



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto de la hiperglucemia *in utero* sobre la diferenciación
y maduración de las células alfa del páncreas de rata**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Mónica Rojas Zamorate

DIRECTOR DE TESIS

Dra. María Cristina Revilla Monsalve

Ciudad Universitaria, Cd. de México, 2017





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MONTIEL AGUIRRE JESUS FERNANDO

VOCAL: Profesor: GARCIA ESCAMILLA NATIVIDAD

SECRETARIO: Profesor: REVILLA MONSALVE MARIA CRISTINA

1er. SUPLENTE: Profesor: CARDOSO SALDAÑA GUILLERMO CELESTINO

2° SUPLENTE: Profesor: CARMONA SALAZAR LAURA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES METABÓLICAS, HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARIA CRISTINA REVILLA MONSALVE

SUSTENTANTE:

MÓNICA ROJAS ZAMORATE

ÍNDICE

Abreviaturas	4
Introducción	6
1. Diabetes Mellitus	6
1.1 Diabetes Materna	7
2. Alteraciones en el desarrollo inducidos por el ambiente hiperglucémico	11
3. Homeostasis de la glucosa	14
4. Organización del páncreas	22
5. Desarrollo del páncreas.....	24
5.1 Factores de transcripción en el desarrollo temprano del páncreas.....	25
5.2 Desarrollo, diferenciación y maduración de las células α	27
6. Fisiología y regulación de la célula α del páncreas endócrino.....	30
7. Estreptozotocina como agente inductor de hiperglucemia crónica en modelos murinos.....	32
8. Planteamiento del problema	35
9. Hipótesis	35
10. Objetivo General.....	36
10.1 Objetivos particulares	36
11. Materiales y Métodos.....	37
11.1 Apareamiento.....	37
11.2 Lote control.....	37
11.3 Lote experimental.....	38

11.4 Inmunohistoquímica	40
11.5 Western Blotting.....	40
11.6 Curva de tolerancia a la glucosa.....	41
11.7 Análisis estadístico	41
12. Resultados.....	42
12.1 Peso de ratas gestantes.....	42
12.3 Número de reabsorciones y fetos por camada	44
12.4 Medidas morfométricas de fetos y crías	44
12.7 Expresión de MafB	48
12.7 Expresión de MafB en fetos de 17 y 21 días	49
12.8 Expresión de insulina y glucagon en fetos de 17 y 21 días	52
12.9 Expresión de MafB en crías de 20, 28 y 90 días	55
12.10 Expresión de insulina y glucagon en crías de 20, 28 y 90 días	60
12.11 Curva de tolerancia a la glucosa.....	63
13. Discusión.....	66
14. Conclusiones.....	73
15. Bibliografía.....	74

Abreviaturas

AR	Ácido retinoico
ADA	Asociación Americana de diabetes
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ArGP	Proteína relacionada con agutí
ARNm	ARN mensajeros
Arx	Aristalesrelatedhomeobox
BCAAs	Biomarcadores propuestos son los aminoácidos de cadenas ramificadas
DG	Diabetes gestacional
DM	Diabetes materna
dPN	Día post-natal
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
E	Día embrionario
G1P	Glucosa 1-fosfato
G6F	Glucosa 6 fosfato
GIP	Péptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido similar al glucagon tipo 1
GLUT	Facilitadores del transporte de glucosa independientes de sodio
Hb9	Homeobox 9
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
IOD	Densidad óptica integrada
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MafA	Musculoaponeuroticfibrosarcomaoncogenehomolog a
MafB	Musculoaponeuroticfibrosarcomaoncogenehomolog b
ncRNAs	RNA no codificantes
Ngn3	Neurogenin 3
Nkx 2.2	Homeoboxprotein nkx 2.2

NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropéptido Y
O-GlcNAc	O-ligado N-acetilglucosamina
Pax4	Paired box 4
Pax6	Paired box 6
PC2	Prohormona convertasa 2
Pdx1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PKC	Proteína cinasa K
POMC	Molécula pro-opiomelanocortina
PN	Post-natales
Ptf1a	Pancreas transcription factor 1 ^a
Rb	Retinoblastoma
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SGLT	Transportadores de glucosa dependiente de sodio
STZ	Estreptozotocina
Wnt	Wnt- β -catenina
YAP	Yes-associated protein

EFFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA *IN UTERO* SOBRE LA DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS ALFA DEL PANCREAS DE RATA

Introducción

La presente tesis tiene como objetivo estudiar las alteraciones que se presentan durante la diferenciación, maduración y funcionamiento de las células alfa de fetos y crías de ratas de madres diabéticas, mediante la evaluación de la expresión del factor de transcripción MafB, las alteraciones en el metabolismo de la glucosa con la expresión de insulina y glucagon.

1. Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus es un desorden metabólico de múltiples etiologías, caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, que resulta de defectos en la secreción y en la acción de la insulina (ALAD, 2013). Este padecimiento ha sido clasificado en varias categorías: La diabetes tipo 1 (DT1), es aquella que se caracteriza por una destrucción autoinmune de las células β reduciendo la síntesis de la insulina, (Diabetes DOF, 2012; Grieco F, *et al*, 2012; Yeung WC *et al*, 2011; Stene LC *et al*, 2012; Sacks DB *et al*, 2011; Yin H *et al*, 2001; Rasschaert J *et al*, 2003); La diabetes tipo 2 (DT2), se presenta con mayor frecuencia en la población, en este tipo de diabetes el páncreas es capaz de producir insulina, pero los órganos y tejidos no responden a los mecanismos de acción de esta hormona, desarrollando una resistencia a insulina (Shankaracharya OD *et al*, 2011; Gunasekaran U *et al*, 2011; Mannucci E, *et al*, 2007; Christensen M *et al*, 2011); La diabetes gestacional (DG), es detectada entre la 24 y 28 semanas de embarazo y se caracteriza por presentar resistencia a insulina.

La diabetes materna (DM) a diferencia de la diabetes gestacional es aquella en la que las mujeres embarazadas fueron diagnosticadas con DT1 o DT2 antes o desde el inicio del embarazo.

Datos de la Federación Internacional de la Diabetes (IDF) en el 2013, revelaron que la diabetes afecta a 382 millones de personas en el mundo y se estima que para 2035 habrá 592 millones de personas con esta enfermedad. La mayoría de los casos se presentan en países en vías de desarrollo (Wild S *et al*, 2004; Centers for Disease Control and Prevention, 2011). La IDF reportó que el

16.9% (21.4 millones) de recién nacidos se desarrollaron en un ambiente hiperglucémico, y que la hiperglucemia materna se presenta con mayor frecuencia en mujeres de entre los 35 y 45 años de edad.

Durante las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes en México ha incrementado y actualmente, figura como la primera causa de muerte en nuestro país. Datos de la ENASUT (2012) señalan que 6.4 millones de adultos mexicanos con diabetes, es decir, 9.2% de los adultos en México han sido diagnosticados con diabetes.

1.1 Diabetes Materna

La hiperglucemia durante el embarazo, incrementa el riesgo de aparición de efectos adversos tanto para el feto como para la madre. Se ha demostrado que el riesgo durante la diabetes materna para la madre es presentar una mayor susceptibilidad de desarrollar preeclampsia y presentar complicaciones durante el parto, poniendo en riesgo la vida de la madre y el feto, aunado a ello, hay un incremento en el riesgo de presentar malformaciones y desarrollar obesidad, diabetes, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares en la vida postnatal (PN) adulta (Figura 1). (Fernández JL *et al*, 2010; IDF atlas 2013).

Durante la segunda mitad del embarazo, a partir de la semana 20, se presentan varias adaptaciones metabólicas para proveer de glucosa, lípidos y aminoácidos para el desarrollo del feto. En este periodo hay un aumento en las concentraciones de la prolactina y lactógeno placentario humano (somatomamotropina coriónica humana), dando como resultado un incremento en el número de las células β del páncreas y en la secreción de insulina. Se ha demostrado que la diabetes materna modifica las concentraciones de estas hormonas incrementando el número de células β y alterando la secreción y sensibilidad a la insulina, dando como resultado una hiperglucemia en la madre. Entre otras adaptaciones metabólicas se presenta una hipertrigliceridemia, la cual es definida como un incremento de triglicéridos en la sangre entre 100-200%, lo que permite la acumulación de reservas de lípidos, los cuales son utilizados en las etapas finales del embarazo para el crecimiento del feto. Este fenómeno está acompañado por un incremento en la síntesis en el hígado de lipoproteínas de baja densidad (LDL). La hipercolesterolemia es una respuesta adaptativa presente durante el embarazo para satisfacer la demanda de lípidos que requiere el feto para su desarrollo.

En la diabetes materna los niveles de triglicéridos, LDL, colesterol y glucosa se incrementan aún más debido a un aumento en los niveles de estriol y a la presencia de la resistencia a la insulina, este conjunto de modificaciones metabólicas presentes en la diabetes materna, trae como consecuencia alteraciones en el desarrollo de los fetos (Leiva A *et al*, 2011).



Figura 1. Alteraciones en la madre, el feto y durante el embarazo producidos por la Diabetes.

La diabetes materna afecta al 7% de las embarazadas en México y al 16.9% de mujeres a nivel mundial, esto ubica a la diabetes materna como la principal enfermedad que causa alteraciones durante el desarrollo del feto, incrementando la probabilidad de desarrollar enfermedades metabólicas en la vida adulta de la descendencia.

Los criterios para diagnosticar la presencia de diabetes materna recomendados por la ADA (American Diabetes Association) son evaluados con una prueba de tolerancia a la glucosa oral con un ayuno de 8 horas con la administración de una dosis de 75g de glucosa oral, esta prueba debe realizarse

antes del embarazo, al inicio del embarazo y entre las 24 y 28 semanas de gestación, los criterios para el diagnóstico de hiperglucemia materna antes o durante el embarazo se muestran en la Tabla 1 A y B (Ryan EA *et al*, 2011; American Diabetes Association, 2012; Hadden *et al*, 2014). Se han propuesto nuevos métodos a nivel metabolómico a fin de detectar en etapas tempranas biomarcadores que permitan revelar alteraciones metabólicas en mujeres embarazadas. Dentro de los biomarcadores propuestos para el diagnóstico en etapas tempranas está un aumento la dimetilarginina asimétrica (ADMA), la cual es un inhibidor competitivo del óxido nítrico sintetasa (NO), teniendo como consecuencia una disfunción endotelial. Otros biomarcadores propuestos son los aminoácidos de cadenas ramificadas (BCAAs), entre los que están la valina, leucina y la isoleucina que son considerados como factores de riesgo debido a que contribuyen al desarrollo de la resistencia a la insulina. Los aminoácidos aromáticos como la tirosina y la fenilalanina han sido propuestos como biomarcadores debido a que alteran el funcionamiento en el metabolismo del hígado (Huynh *et al*, 2014). Sin embargo estos nuevos métodos aún presentan inconsistencias en el perfil metabolómico debido a la variación que hay entre las diferentes poblaciones, estilos de vida, edades y estado de salud. Se necesitan más estudios para poderlos utilizar como una herramienta de diagnóstico oportuno en la diabetes materna, además, es necesario reducir los costos que generan realizar este tipo de pruebas.

Las condiciones en las que se desarrollan los órganos y tejidos de los embriones y fetos, está determinado por el ambiente *in utero*. El desarrollo en un medio hiperglucémico induce una reprogramación fetal que en gran medida determinará el estado de salud de la descendencia, la cual es el resultado de la predisposición genética y los factores ambientales a los cuales se expone un individuo desde las primeras etapas del desarrollo y la vida PN.

A

Debe alcanzarse o superarse los valores mínimos en la prueba oral de tolerancia a la glucosa:

Prueba	Hiperglucemia en el embarazo	Hiperglucemia en el embarazo y diabetes
Glucosa en plasma en ayunas	≥92 mg/dL	≥126 mg/dL
Glucosa en plasma después de 1 hora de administración	≥180 mg/dL	≥200mg/dL
Glucosa en plasma después de 2 horas de administración	≥153 mg/dL	≥171mg/dL
HbA _{1c}	≤5.1%	≥6.5%
Glucosa en plasma casual*	≤140mg/dL	≥200 mg/dL

B

Visita Prenatal	
<p>Glucosa en plasma en ayunas, HbA_{1c} o glucosa en plasma al azar * en todas (o tan sólo en mujeres de alto riesgo)</p>	<p>Si el resultado no es un diagnóstico de diabetes manifiesta y:</p> <p>a) La glucosa en plasma en ayunas ≥ 92mg/dL y < 126mg/dL (≥5.1% y < 7%) el diagnóstico es hiperglucemia durante el embarazo</p> <p>b) La prueba e glucosa en plasma en ayunas < 92mg/dL (5.1%) a las 24 – 28 semanas con la prueba oral de tolerancia a la glucosa de 75 g</p>
24 – 28 semanas de gestación	
<p>Prueba oral de tolerancia a la glucosa de 75 g con ayuno de 8 horas</p>	<p>A mujeres que no hayan presentado alteración en la curva de tolerancia a la glucosa oral en la visita prenatal</p>

Tabla 1. Criterios de diagnóstico y detección de hiperglucemia materna antes y durante el embarazo. Tomado de Hadden *et al*, 2014

2. Alteraciones en el desarrollo inducidos por el ambiente hiperglucémico

El desarrollo es un proceso en el que están involucrados la expresión de diversos genes, modificaciones epigenéticas, factores ambientales y nutricionales. Diversas investigaciones en modelos murinos han demostrado que el desarrollo en un ambiente hiperglucémico *in utero* incrementa la probabilidad del 5-10% de que los fetos presenten malformaciones y entre el 15-20% presenten reabsorciones espontáneas (Pociot F *et al.*, 2010; Reece EA, 2012; Chew EY *et al.*, 1995; Best RM *et al.*, 1997; Hayslett JP *et al.*, 1987a,b; Reece EA *et al.*, 1998b; Fischer, 2007).

La hiperglucemia durante la morfogénesis, es el principal factor teratogénico que induce la mayoría de los defectos en el desarrollo embrionario y fetal así como alteraciones metabólicas en la vida PN. En la diabetes materna, El aumento en las concentraciones del ácido araquidónico, de mioinositol, de prostaglandina y la hipercetonemia, son las principales modificaciones que incrementan el estrés oxidativo afectando los procesos de diferenciación y desarrollo de los tejidos embrionarios y fetales. En modelos murinos se ha demostrado que la hiperglucemia *in utero* trae como consecuencia que la descendencia presente un retraso en el desarrollo, bajo peso y talla al nacer, alteraciones en la diferenciación y desarrollo de órganos, incremento en la morbilidad y mortalidad perinatal e incremento en la susceptibilidad para desarrollar alteraciones metabólicas en la vida adulta como el síndrome metabólico, obesidad, hipertensión y diabetes. Sin embargo, estudios realizados en ratas y ratones gestantes han reportado resultados controversiales y se ha demostrado que la severidad en las alteraciones, depende de los niveles de glucosa que presenta la madre durante la gestación (Wahabi H *et al.*, 2012; Fetita LS *et al.*, 2006; Ladon MB *et al.*, 2009; Crowther CA *et al.*, 2005; Green AS *et al.*, 2010; Simmons R *et al.*, 2001).

Reportes clínicos y evidencias experimentales en modelos murinos han demostrado que la hiperglucemia materna puede afectar el proceso de morfogénesis de cualquier órgano, siendo los defectos del tubo neural y las malformaciones cardiovasculares las anomalías más comunes asociadas con el desarrollo en un ambiente hiperglucémico *in utero* (Onroy A *et al.*, 2015) Tabla 2.

Los modelos animales han sido utilizados ampliamente en la investigación de la diabetes, la mayoría de estos estudios se realizan en roedores. Existen diferentes métodos para inducir diabetes experimental, se pueden clasificar en los

inducidos por: agentes químicos como la estreptozotocina (STZ) y el alloxana; por técnicas de biología molecular donde se han obtenido diferentes cepas de ratones knock-out y knock-in tales como los ratones Ob/Ob y db/db; también están los modelos de restricción nutricional, restricción uterina, virales y quirúrgicos. La inducción de hiperglucemia materna por medio de la administración de estreptozotocina (STZ) en modelos murinos, asemeja las alteraciones presentes en el humano y el ambiente *in utero* que se alteran en el embarazo y el desarrollo. Las concentraciones elevadas de glucosa incrementan los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo, lo cual repercutirá de manera directa en el desarrollo y diferenciación de los órganos y tejidos, debido a que pierden la capacidad de sintetizar antioxidantes, presentan alteraciones en las membranas, disfunción mitocondrial e incremento en la fosforilación oxidativa y la activación de vías de señalización apoptóticas. Al conjunto de estas alteraciones se denomina embriopatía lo cual lleva a modificaciones genéticas y epigenéticas (Dhanasekaran N et al., 1999; Reece EZ et al., 2002; Ornoy A et al., 2009).

HUMANO			RATA	
SNC	Sistema Cardiovascular	Estructuras Craneofaciales	Malformaciones congénitas	Alteraciones en el crecimiento
Anencefalia	Síndrome hipoplásico del corazón izquierdo o derecho	Microsomia hemifacial	Coartación de la aorta	Macrosomía
Acrania	AVSD y VSD	Labio o paladar leporino	Teratología de Fallot	Visceromegalia
Mielomeningocele	Atresia tricuspídea	Microtia	Hipoplasia del corazón izquierdo	Organomegalia
Arrinencefalia	Atresia mitral	Micrognatia	Defectos del septum auricular	Enfermedad vascular
Microcefalia	Doble entrada del ventrículo izquierdo	Microftalmia	Anancefalia	Retraso en la maduración pulmonar
Exencefalia	Doble salida del ventrículo derecho	Displasia frontonasal	Estenosis pulmonar	Trombosis de la vena renal
Holoprosencefalia	Transposición de los grandes vasos	Opacidad del cristalino	Síndrome de regresión caudal	Muerte fetal
Espina bífida	Teratología de Fallot		Hidrocefalea	

Tabla 2. Alteraciones más frecuentes en descendencia que se desarrolló en un ambiente hiperglucémico *in utero* en humanos y modelos murinos.

Estudios realizados en modelos murinos han demostrado que la diabetes materna altera la expresión del 30% de los genes y factores de transcripción involucrados en el desarrollo de los órganos en etapas embrionarias y fetales. Se ha demostrado que el principal factor de transcripción de las células β sufre modificaciones a nivel epigenético demostrando tener una disminución en la expresión de PDX1 debido a una baja acetilación de H3 (histona 3) y H4 (histona 4) así como de una disminución de H3K4me3 (tri-metilación de la lisina 4 de la histona 3) en el promotor de PDX1 dando como resultado alteraciones en el desarrollo y diferenciación de este tipo celular (Pavlinkova G *et al* 2009). De manera similar se ha reportado que el promotor del gen de Arx, factor de transcripción Arx responsable de la diferenciación y desarrollo de las células α , es acetilado y el

promotor de PDX1 es metilado permitiendo el inicio y diferenciación de este tipo celular.

En la DT2 se ha observado que las células α juegan un papel fundamental debido a que sirven como una fuente de reserva para ser transdiferenciadas e incrementar el número de células β , este fenómeno se da metilando el promotor del gen de Arx y desmetilando el promotor del gen de Pdx1, este proceso compensa la deficiencia en el funcionamiento de las células β (Onroy A *et al*, 2015; Bramswig NC *et al*, 2014; Habener Jet *al*, 2012; Yang Y *et al*, 2011; Pavlinkova G *et al*, 2009; Riedel M *et al*, 2012).

3. Homeostasis de la glucosa

La homeostasis de la glucosa es regulada por la síntesis y secreción de glucagon e insulina por parte de las células α y β respectivamente. Depende de la tasa de glucosa que entra a la circulación y la que es removida de circulación. La glucogenolisis y la gluconeogenesis son las principales fuentes de obtención de energía durante el estado pre-prandial.

La sensación de hambre y saciedad está modulada por el hipotálamo llevando a la producción de neuropéptidos, como el neuropéptido Y (NPY), la proteína relacionada con agutí (ArGP) y la molécula pro-opiomelanocortina (POMC), que estimulan órganos como el páncreas, intestino y tejido adiposo, que responden y promueven la producción de hormonas peptídicas, como la insulina, la amilina, el glucagon, el péptido similar al glucagon tipo 1 (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), que son los principales glucorreguladores de los niveles de glucosa en sangre (Tabla 3).

El glucagon, sintetizado por las células α del páncreas, es la principal hormona peptídica catabólica compuesta por 29 aminoácidos, fue descrita por primera vez en 1950 por el investigador Roger Unger. Y tiene como principal función el mantenimiento de la normoglucemia por medio de la degradación del glucógeno del hígado, promover la gluconeogénesis y la cetogénesis (Gerich JE *et al*, 1974).

La insulina es la principal hormona con funciones anabólicas la cual está compuesta por 51 aminoácidos, es sintetizada y secretada por las células β del páncreas. Su principal función es la disminución de la glucosa en respuesta al

incremento de las concentraciones de este carbohidrato en el plasma sanguíneo en respuesta a un estado post-prandial (Wallum BJet *al*, 1992).

La amilina (IAPP islet amyloid polypeptide) es una hormona peptídica neuroendócrina compuesta por 37 aminoácidos que es co-expresada y co-secretada con la insulina en las células β en respuesta a un estado post-prandial en una relación 1:100. Sus efectos son complementarios a los que desempeña la insulina para regular las concentraciones de glucosa por medio de dos vías: 1) suprimiendo la secreción de glucagon en el estado post-prandial, lo que da por resultado la disminución de secreción de glucosa por parte del hígado, 2) disminuyendo la tasa de absorción de alimentos en los intestinos y reduciendo el consumo de alimentos, puesto que disminuye el vaciamiento gástrico e inhibe la secreción digestiva, disminuyendo los niveles de ácido gástrico, enzimas pancreáticas y secreción de bilis (Moore CX *et al*, 1991; Cooper GJSet *al*, 1987; Ogawa A *et al*, 1990; Koda JE *et al*, 1992).

PÁNCREAS	HORMONA	FUNCIÓN
célula α	Glucagon	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula el rompimiento del glucogeno almacenado en el hígado. • Promueve la gluconeogenesis hepática. • Promueve la cetogenesis.
célula β	Insulina	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la captación de glucosa en las células. • Suprime la secreción de glucagon post-prandial. • Promueve la síntesis de proteínas y lípidos. • Promueve el uso de glucosa como fuente de energía.
célula β	Amilina	<ul style="list-style-type: none"> • Suprime la secreción de glucagon post-prandial. • Disminuye la absorción de alimentos. • Reduce el consumo de alimentos.
INTESTINO		
célula K	GIP	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula la secreción de insulina post-prandial. • Regula la síntesis de lípidos.
célula L	GLP-1	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula la secreción de insulina dependiente de glucosa. • Inhibe la secreción de glucagon post-prandial. • Disminuye la absorción de alimentos. • Reduce el consumo de alimentos.
HIPOTÁLAMO		
Neuropéptidos	NPY	<ul style="list-style-type: none"> • Genera señales que promueven la ingesta de alimentos
	ArGP	<ul style="list-style-type: none"> • Genera señales que promueven la ingesta de alimentos • En el tejido adiposo disminuye la expresión de enzimas lipogénicas, aumenta la acumulación de grasa y disminuye el graso energético
	POMC	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe la sensación de hambre y aumenta la actividad del sistema nervioso simpático. • Reduce la secreción basal de insulina

Tabla 3. Funciones de las principales hormonas glucorreguladoras y de los neupéptidos involucrados en la estimulación de la sensación de hambre y saciedad.

En la década de 1960 los investigadores Perley y Kipnis demostraron que posterior a la ingesta de alimentos se potenciaba la secreción y función de la insulina, a este efecto se le denominó efecto incretina. Este fenómeno ocurre por la regulación hormonal de la GLP-1 y GIP (Péptido insulínico dependiente de glucosa) sintetizadas en el intestino y son secretadas en respuesta al consumo de alimentos ricos en grasas y carbohidratos que potencializan la secreción de insulina para regular la homeostasis de la glucosa (Perley MJ *et al*, 1967).

La GIP participa en la secreción de insulina y regula el metabolismo de lípidos, sin embargo, no inhibe la secreción de glucagon. La GLP-1 estimula la secreción de insulina, suprime la secreción de glucagon después de la ingesta de alimentos, disminuye la absorción de alimentos e inhibe el consumo de alimentos debido a la disminución de la sensación de saciedad que provoca; ambos son sintetizados por el intestino en las células K y L respectivamente. (Yip RG *et al*, 2000; Vilsboll T *et al*, 2001; Matsuyama T *et al*, 1988).

El metabolismo de la glucosa comienza con su transporte intracelular, esta molécula ingresa a la célula mediante dos tipos de transportadores: los transportadores de glucosa dependiente de sodio (SGLT) y sistemas facilitadores del transporte de glucosa independientes de sodio (GLUT). Los primeros se expresan principalmente en epitelios que se encargan de la absorción y de la reabsorción de nutrientes, como el epitelio del intestino delgado y el epitelio tubular renal. Las 14 proteínas GLUT que existen se expresan en todas las células del organismo y permiten transportar la glucosa de un compartimento a otro (Castrejón V *et al*, 2007)

La familia de los SGLT son transportadores que acoplan el ingreso de Na^+ y glucosa aprovechando el gradiente electroquímico a favor de la entrada del Na^+ , transportando a la hexosa en contra de un gradiente de concentración. Esta familia incluye a los transportadores de glucosa intestinal y renal SGLT1 y SGLT2 respectivamente. La estructura de los SGLTs consta de 14 dominios transmembranales tipo α -hélice, con 7 asas intracelulares y 6 extracelulares, con sus grupos amino y carboxilo terminales del lado extracelular y un sitio de glicosilación entre los segmentos 6 y 7. El transporte de Na^+ se realiza en una región cercana al amino terminal y la glucosa entra por la región cercana al carboxilo terminal. Inicialmente la interacción con el Na^+ promueve un cambio conformacional en la proteína que aumenta la afinidad por la glucosa. El gradiente

químico de Na^+ que impulsa el transporte de la glucosa se mantiene por acción de la bomba ATPasa de Na^+/K^+ (Scheepers A *et al*, 2004; Brown *et al*, 2000), Figura 2.

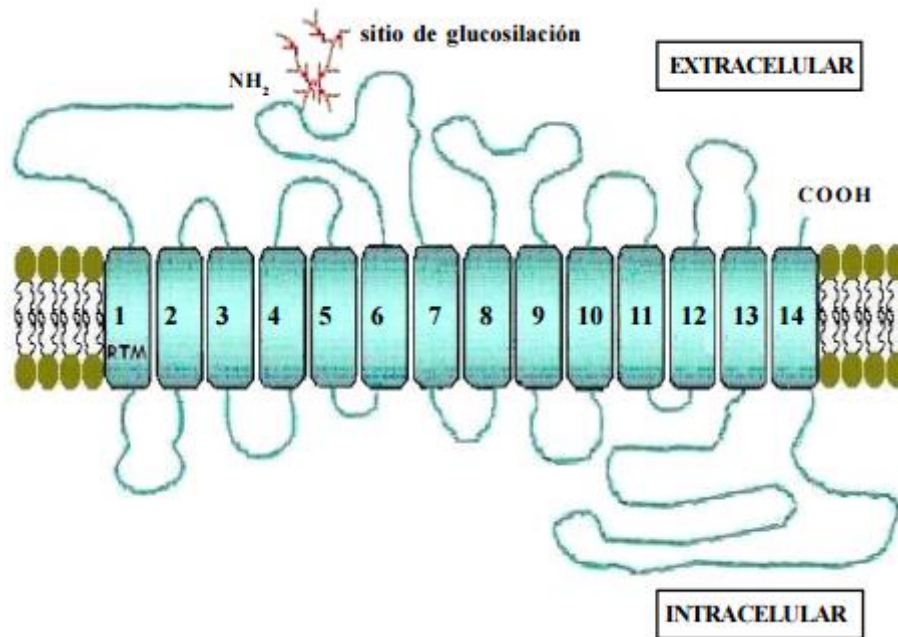


Figura 2. Esquema de la estructura de los sistemas de transporte SGLT. Presentan 14 dominios transmembranales. Los sitios carboxilo y amino terminal se encuentran del lado extracelular. En el asa que conecta a los segmentos transmembranales 6 y 7 se encuentra un sitio de glucosilación.

Los GLUT constituyen una familia de proteínas transmembranales, encargadas del transporte de los monosacáridos al interior de todas las células. Son glicoproteínas con 12 dominios hidrofóbicos transmembranales con una estructura α helicoidal conectados entre sí por 13 asas hidrofílicas, 6 de ellas son asas extracelulares y 5 intracelulares; la primera asa es externa y en algunos GLUT presenta un sitio de glucosilación. Tienen sus grupos amino y carboxilo terminales del lado citosólico de la membrana (Figura 3). La selectividad a la glucosa está determinada por una serie de 500 residuos de aminoácidos altamente conservados, poseen un oligosacárido ligado a N. Se han identificado 14 GLUT divididos en tres subfamilias de acuerdo a las similitudes en su secuencia y a sus características funcionales, como su especificidad al sustrato y su ubicación tisular (Wu X *et al*, 2002; Castrejón *et al*, 2007).

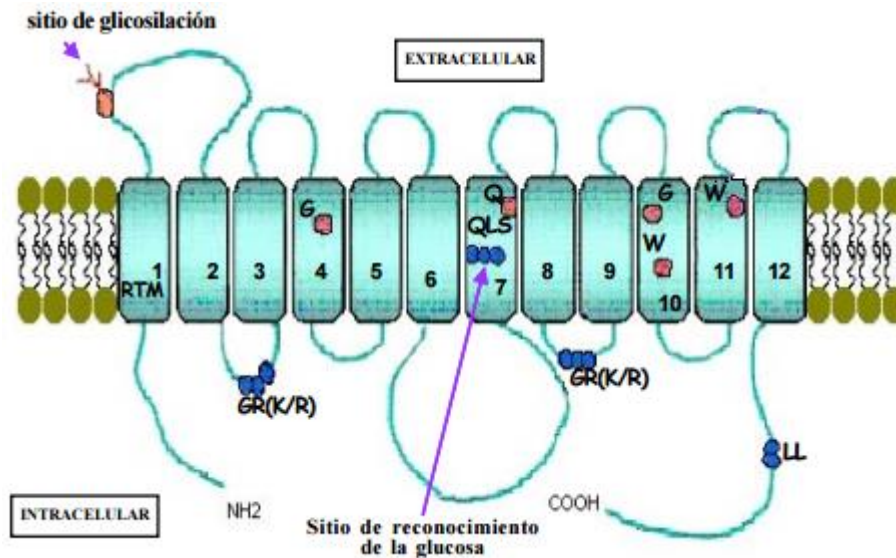


Figura 3. Esquema de la estructura de los GLUT. Se componen de 12 dominios transmembranales, conectados por asas hidrofílicas. Las terminaciones amino y carboxilo se encuentran en la parte citoplasmática y presentan una serie de aminoácidos muy conservados entre todos los transportadores. G= glicina; R= arginina; Q= glutamina; L= leucina; K= lisina; S= serina; W= triptófano

El mantenimiento de las concentraciones de glucosa está en función del estado post-prandial, en este estado la glucosa es fosforilada a glucosa 6 fosfato (G6P) por la hexocinasa oxidada en la vía glucolítica formando piruvato y ATP; el piruvato es oxidado a CO₂ y H₂O en las mitocondrias, en donde se producen 30 a 32 moles de ATP (Osorio *et al*, 2012).

La glucosa se almacena en el hígado y en el músculo en forma de glucógeno en el proceso metabólico de la glucogénesis. En esta vía metabólica la glucosa se convierte en G6P por la acción de la hexocinasa (en músculo) o de la glucocinasa (en hígado), la G6P se convierte en glucosa 1-fosfato (G1P) por la acción catalítica de la fosfoglucomutasa, G1P se convierte en UDP-glucosa mediante la UDP-glucosa pirofosforilasa; la glucógeno sintasa cataliza la formación de los enlaces α (1→4) entre las unidades de glucosa del glucógeno, por último, la enzima ramificadora del glucógeno (transglucosilasa), cataliza la transferencia de un segmento de 6-7 residuos de un lugar a otro de una misma cadena lineal, o de una cadena a otra, formando enlaces α (1→6), que conduce a una molécula de glucógeno altamente ramificada que es almacenada. Así mismo, en el tejido adiposo se almacena en forma de triacilglicerol a partir de la acetil CoA proveniente del piruvato, estos procesos son realizados gracias al efecto de la insulina. (American Diabetes Association, 2004).

Durante un estado de ayuno (4-12h) es esencial mantener las concentraciones de glucosa para evitar un estado hipoglucémico, este proceso está regulado principalmente por la secreción de glucagon por la célula α del páncreas endócrino, el glucagon es la principal hormona peptídica con funciones catabólicas, por lo que durante el estado de ayuno se activan principalmente las vías metabólicas de la glucogenolisis en el hígado y el músculo, en esta vía metabólica se rompe el glucógeno para secretar glucosa al plasma sanguíneo. El rompimiento del glucógeno se lleva a cabo mediante la glucógeno fosforilasa que cataliza la fosforolisis de los enlaces α (1 \rightarrow 4) del glucógeno para convertirlo en G1P que mediante la acción de la fosfoglucomutasa se convierte a G6P; en músculo, la G6P entra en la vía de la glucolisis produciendo piruvato que puede dar lactato o CO_2 y H_2O en las mitocondrias.

Así mismo, se activa la vía de la gluconeogénesis en el hígado, fenómeno que sólo ocurre en este órgano en un estado de ayuno moderado, en esta ruta metabólica, se sintetiza glucosa *de novo* a partir de precursores de aminoácidos como la alanina y el lactato, finalmente en el tejido adiposo ocurre la degradación de ácidos grasos y triglicéridos.

Hormonas como la noradrenalina y el cortisol participan en el mantenimiento de las concentraciones de la glucosa y la obtención de ATP en un estado de ayuno prolongado (>12h), estas hormonas inducen la síntesis de cuerpos cetónicos a partir de la oxidación parcial de los ácidos grasos en el hígado, que se transportan hacia tejidos extrahepáticos, donde actúan como fuente de energía (en el ayuno prolongado y la inanición), así como en la degradación de proteínas para la obtención de aminoácidos en el músculo para la obtención *de novo* de glucosa a partir de la gluconeogénesis (Bolli GB *et al*, 1999; Hirsch IB *et al*, 1999).

La diabetes es una enfermedad que se caracteriza por alterar la homeostasis de la glucosa, presentar resistencia a la insulina o pérdida de la síntesis de esta hormona, lo que significa una disminución en los efectos ejercidos para disminuir las concentraciones de glucosa plasmática, lo que provoca una deficiencia en la regulación de la síntesis y secreción de glucagon, ocasionando una hiperglucagonemia, alterando la regulación de la gluconeogénesis, glucogenolisis y la secreción de glucosa en el hígado. Por otro lado los efectos ejercidos por la amilina, la GLP-1, la GIP en conjunto con la insulina provocan alteraciones tales como: 1) absorción rápida de alimentos, 2) mayor consumo de

alimentos y 3) se pierde la capacidad de regular la secreción de insulina y glucagon post-prandial.

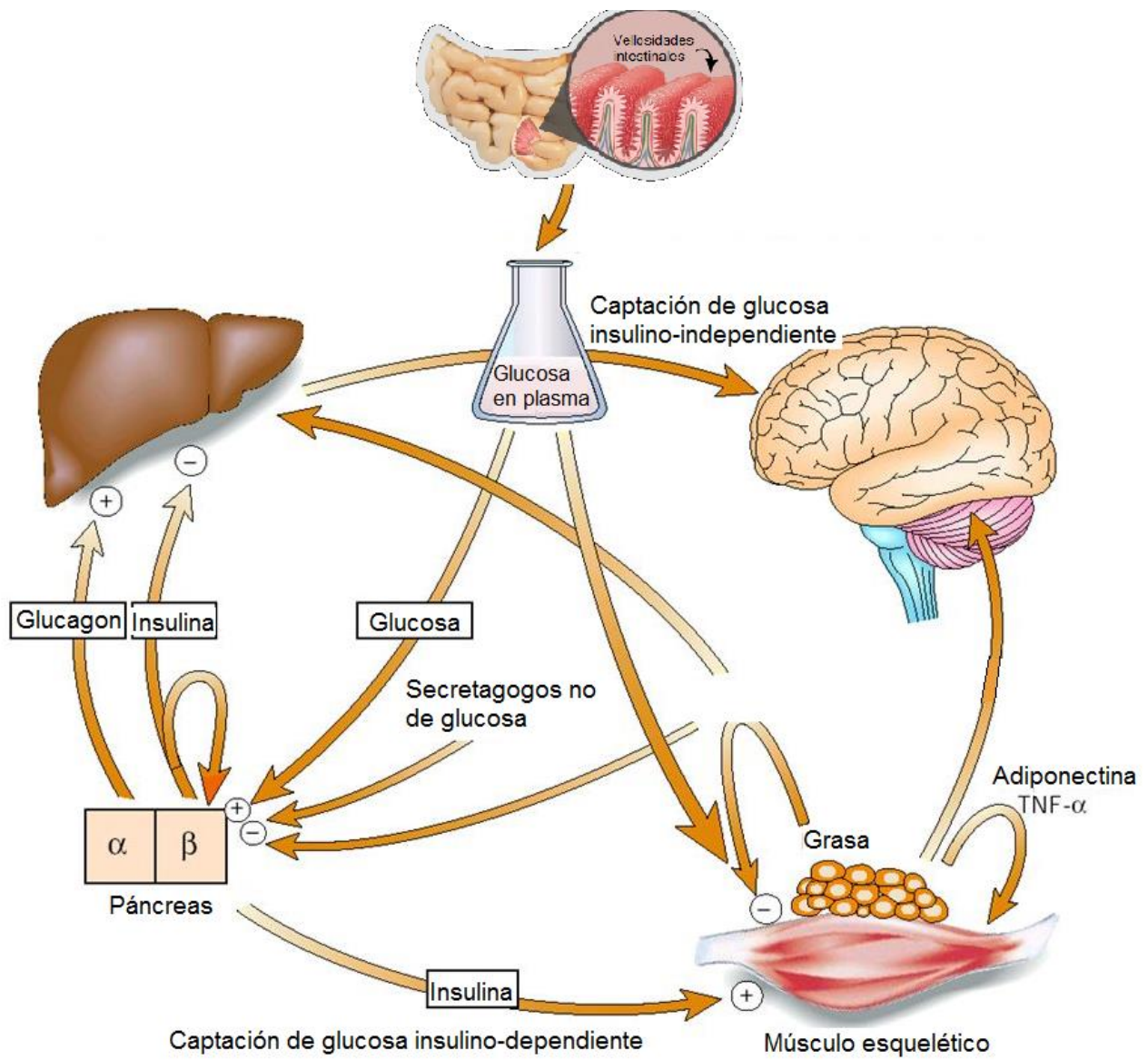


Figura 4. Esquema de todos los órganos involucrados en la homeostasis de la glucosa

4. Organización del páncreas

El páncreas es una glándula mixta del sistema digestivo formado por tejido exocrino y endócrino. El páncreas exocrino está constituido por células ductales y células acinares, este grupo de células representan un 95-99% de la masa total del páncreas. Las células acinares producen enzimas como la amilasa, la lipasa y la fosfolipasa que participan en la digestión de nutrientes, enzimas que son liberadas por las redes ductales hacia el duodeno (Pan FC *et al*, 2011).

El tejido endócrino del páncreas está compuesto por los islotes de Langerhans que representan entre el 1-5% de la masa total del páncreas. Los islotes están compuestos por cinco diferentes tipos celulares, cada una de estas células sintetiza diferentes hormonas, las células α se encargan de sintetizar glucagon, las células β sintetizan insulina y amilina, las células δ sintetizan y liberan somatostatina, las células que sintetizan el polipéptido pancreático son las células PP y finalmente las células encargadas de sintetizar y secretar la grelina son las células ϵ .

En modelos murinos, la organización de los islotes se caracteriza por contener un porcentaje muy alto de células β en el centro, rodeadas por las células α , ϵ , δ y PP (Figura 5).

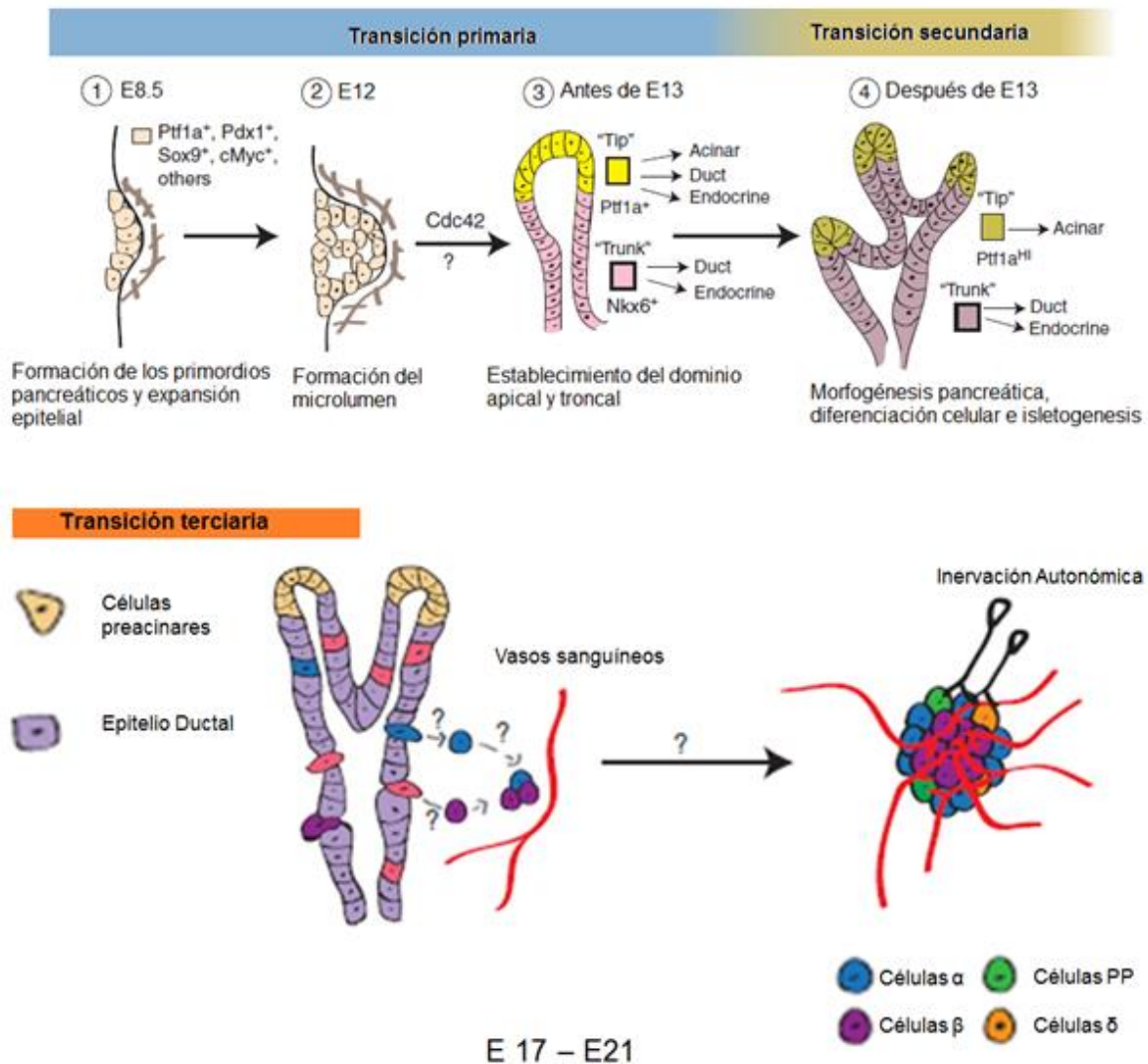


Figura 5. Esquema del desarrollo del páncreas. Primera transición, donde se forman los primordios pancreáticos (dorsal y ventral) y va desde E8.5 a E12.5. Segunda y tercera transición, ocurre la tubulogénesis ductal, diferenciación de células endocrinas y exocrinas e isletogénesis. Tomada y modificada de Cecil *et al*, 2012.

La insulina y el glucagon se encargan de regular los niveles de glucosa en la sangre, el polipéptido pancreático es un potente inhibidor de la secreción de las enzimas del páncreas exocrino, la grelina se encarga de regular el apetito y la somatostatina regula la secreción de la insulina, el glucagon y el PP (Bonafant *et al*, 2008).

5. Desarrollo del páncreas

El desarrollo del páncreas es un proceso complejo y altamente regulado que involucra vías de señalización y la expresión de una serie de factores de transcripción que se activan en forma jerárquica y temporal y que son capaces de iniciar y mantener la diferenciación de los distintos tipos celulares del páncreas así como su función y de obtener un órgano con el tamaño adecuado.

El estudio del desarrollo del páncreas de ratas se ha dividido en tres transiciones. La primera transición ocurre durante la organogénesis temprana y se conoce como fase transicional primaria o primera transición y ocurre desde el día embrionario E8.5 al E12.5, en la que se forman los primordios pancreáticos, dorsal y ventral que sufren un proceso de evaginación alrededor del mesénquima que contendrá las células progenitoras multipotentes del páncreas. Durante esta transición, en el día E10.5 comienza la coexpresión de glucagón e insulina. La segunda transición ocurre entre E13 y E16.5, y en ésta se inicia el proceso de tubulogénesis ductal así como la diferenciación de las células que componen el tejido endócrino y el tejido exocrino del páncreas. Entre E12 y E14 las células progenitoras multipotentes forman un dominio troncal que dará origen a las células ductales y de manera parcial se alojan las células endócrinas y un dominio apical quedará origen a las células acinares. La tercera transición se presenta desde E16.5 hasta el nacimiento, a esta transición se le denomina isletogénesis. Durante esta fase las células endócrinas alojadas parcialmente en el dominio troncal del páncreas comienzan a migrar a través de la matriz extracelular alrededor del mesénquima en donde finalmente se agregan para formar los islotes de Langerhans (Bonalet *et al*, 2008). Los islotes no se forman totalmente hasta poco antes del nacimiento en E18-19 y continúan su remodelación y maduración durante 2 ó 3 semanas posteriores al nacimiento (Holland *et al*, 2002; Kelly C *et al*, 2011; Zaret KS *et al*, 2008) (Figura 5).

El ácido retinóico (RA) participa en el desarrollo del páncreas, el cual define la posición anterior-posterior endodérmica del páncreas. Estudios realizados en ratones han demostrado que el RA tiene efectos específicos en el desarrollo del dominio dorsal pancreático. *Aldh1a2* es un gen que codifica la enzima requerida para la síntesis de RA y se expresa en el mesénquima dorsal del páncreas. La supresión de este gen conduce a la agenesia de la parte dorsal pancreática. (Mastracci TL *et al*, 2012). La vía de señalización HIPPO-YAP es importante para controlar el tamaño de los órganos y la homeostasis de los tejidos. Originalmente

fue identificada en *Drosophila melanogaster* se ha demostrado que está altamente conservada en mamíferos. Consta de una cascada de cinasas, Mstl 1/2 y Lats 1/2. El complejo Mstl 1/2 cinasas se une a la proteína scaffold Sav1, haciendo que se fosforile y active Lats 1/2 cinasas que a su vez se une a Mob1, otra proteína scaffold para fosforilar a yes-associated protein (YAP) en una secuencia de cinco residuos de serina. La fosforilación de YAP puede provocar una retención citoplasmática, degradación o alteraciones en la proliferación celular, dependiendo de la posición de la fosforilación. Estudios en modelos murinos han demostrado que la vía de señalización HIPPO-YAP es una vía principal que se activa de manera temprana en el desarrollo del páncreas, se ha demostrado que la inactivación de YAP a través de su fosforilación inhibe la división celular de las células pancreáticas dando como resultado una reducción en el tamaño del órgano (BinZhao LL et al, 2011; Xian L et al, 2015).

5.1 Factores de transcripción en el desarrollo temprano del páncreas

Se ha realizado poca investigación sobre la diferenciación del linaje exócrino del páncreas, por lo cual no se han establecido cuales son todos los factores de transcripción que participan en el desarrollo y función de las células acinares y ductales. Estudios recientes han demostrado que la masa celular exócrina depende en gran parte de las células positivas a Pdx1, así como de la expresión a Ptf1a y MIST1 a partir del día E13.5 que son factores que están altamente involucrados en el desarrollo del páncreas exócrino. En la diferenciación también participan vías de señalización como Wnt/ β -catenina y Notch, que son requeridos en la expansión y diferenciación de los progenitores exócrinos (Claire B et al, 2008).

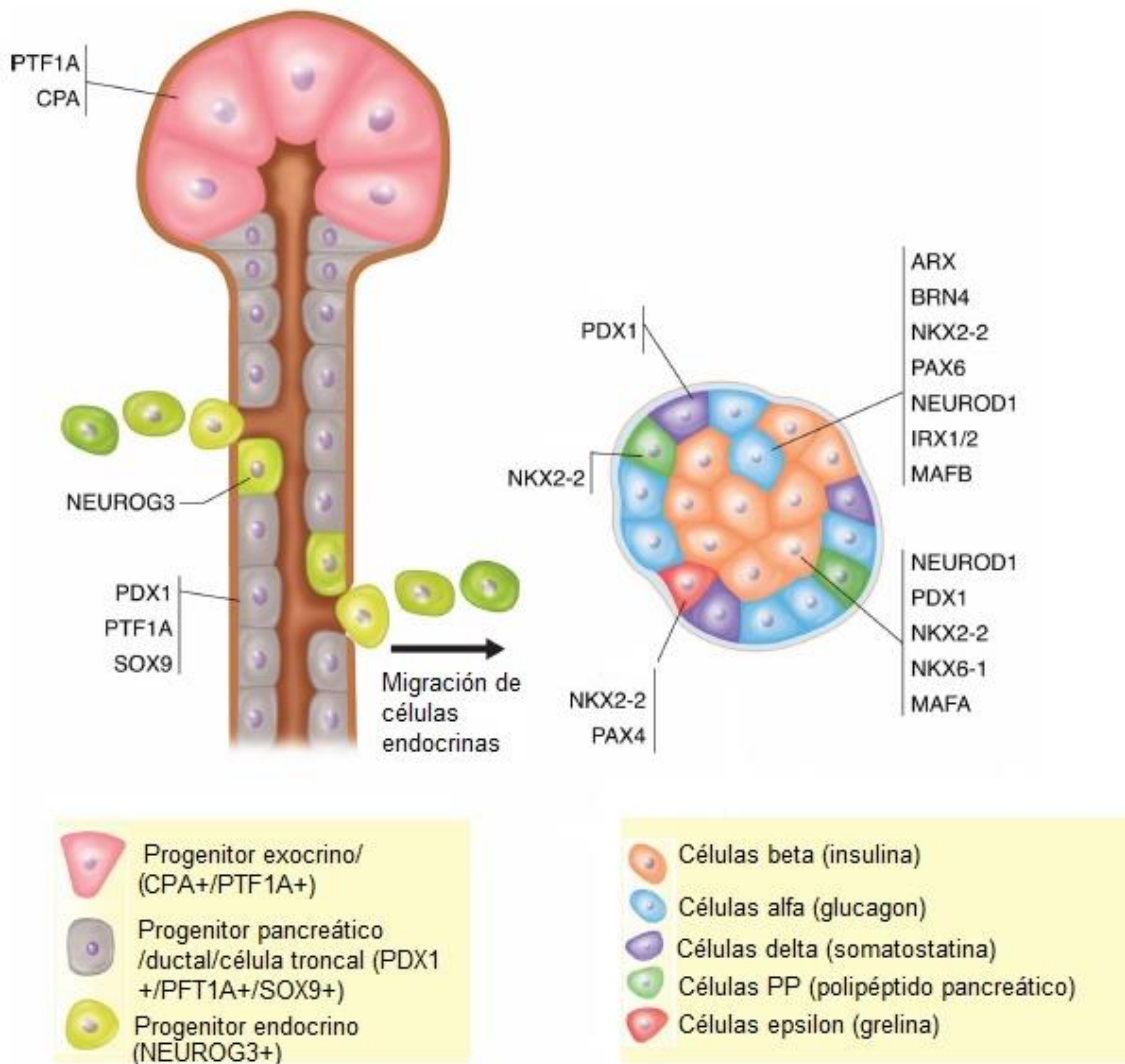


Figura 6. Diferenciación de los tipos celulares de los islotes de Langerhans. Células progenitoras multipotentes (PDX1, SOX9, PTF1A) presentes en epitelio ductal durante el desarrollo del páncreas y factores de transcripción presentes en el desarrollo y diferenciación cada tipo celular. Tomada y modificada de Mastraciet *et al*, 2012.

La morfogénesis y el desarrollo del páncreas endócrino es regulado por una cascada de factores de transcripción (Martin M *et al*, 2007; Lyttle BM *et al*, 2008). La diferenciación de las células endócrinas requiere que se activen vías de

señalización en tiempos determinados y cualquier alteración provocará modificaciones en la diferenciación del tejido endócrino. Son muchos los factores que participan en la diferenciación del páncreas endócrino y otros más que son responsables del mantenimiento y función de éste. En ratas, la expresión de Ngn3 (neurogenin 3) inicia en E8.5, y da origen a los progenitores de las células endócrinas. La expresión de factores de transcripción río abajo de Ngn3, inducirá el desarrollo y diferenciación de cada uno de las células que componen a los islotes de Langerhans (Bonal C y Herrera PL, 2008; Figura 6).

5.2 Desarrollo, diferenciación y maduración de las células α

A través de estudios genéticos realizados sobre el desarrollo de los diferentes tipos celulares del páncreas, se han identificado factores que participan en el desarrollo y maduración de las células α , tales como Arx y Foxa2 que juegan un papel crucial en la diferenciación inicial y terminal de las células α , respectivamente. Otros factores como Foxa1, Pax6, Brn4, 1SL-1 y MafB regulan la transcripción del preproglucagon para dar origen al glucagon.

La diferenciación de las células α comienza por la represión en la expresión del factor de transcripción Pax4 (paired box 4) y Arx (aristaless-related homeobox). Los RNA mensajeros (RNAm) de Pax4 pueden ser detectados en las células del páncreas en desarrollo a partir de E9.5, su expresión es restringida en células que sintetizan y secretan insulina y presenta un decremento en su expresión poco tiempo después del nacimiento (Collombat *et al*, 2003). Embriones que no presentan la expresión de Pax4 pero si expresan los factores de transcripción Pdx1 y Hb9 (homeobox 9) en la primera transición del desarrollo de este órgano, no presentan diferenciación de las células β del páncreas, indicando que Pax4 es requerido durante la transición secundaria para la diferenciación de las células β . Se ha reportado que la falta en la expresión de Pax4 en ratas, induce un decremento en el número de las células δ y un incremento en el número de células que expresan glucagon y grelina. Pax4 reprime la síntesis del factor de transcripción Arx inhibiendo la diferenciación de las células α , también actúa como un represor transcripcional de la expresión de glucagon y grelina por la unión directa a su promotor (Liu Z *et al*, 2011).

En contraste a la función que Pax4 desempeña en la diferenciación de las células β del páncreas, el factor de transcripción Arx es el responsable de la

diferenciación inicial de las células α del páncreas, el cual actúa río abajo de la Ngn3 (Kubo A *et al*, 2011). La mutación del factor de transcripción Arx en ratas ocasiona una pérdida completa en la diferenciación de las células α y un incremento en el número de células β y δ . La inhibición en la expresión de Arx es regulada cuando comienza la síntesis de Pax4 y la represión en la expresión de Pax4 inicia cuando Arx es sintetizada, indicando que Arx y Pax4 se inhiben mutuamente debido a que Arx tiene sitios de unión en el promotor de Pax4 y viceversa. Estos datos resaltan la importancia del balance en la síntesis de estos factores de transcripción para poder realizar de manera correcta el proceso de diferenciación celular de las células α y β . Nkx 2.2 (homeoboxproteinnkx 2.2) inicia su expresión de forma paralela a Pax4 mostrando que su presencia es fundamental en las primeras etapas de la diferenciación de las células β .

El factor de transcripción Pax6 (paired box 6) inicia su síntesis en el epitelio pancreático en E9.5-10.5, y se expresa en células positivas a insulina y células positivas a glucagon. Pax6 es esencial para la formación de las células α , la mutación de este factor induce una reducción en la síntesis de glucagon (Hart AW *et al*, 2013).

MafA (musculoaponeuroticfibrosarcomaoncogenehomolog a) y MafB (musculoaponeuroticfibrosarcomaoncogene homolog b) son miembros de una gran familia de factores involucrados en la transcripción de insulina y glucagon. Ambos son responsables de la maduración de las células α y β , sin embargo, MafA es exclusivo para las células β y su expresión comienza en E13.5, mientras que MafB se encuentra en los dos tipos celulares a partir de E10.5 y en la etapa adulta su expresión se limita sólo en las células α , en esta etapa es caracterizado como el activador celular de unión al elemento G1 del glucagon, lo que lleva a la síntesis y secreción de esta hormona peptídica y por lo tanto a la maduración y funcionalidad de la célula α (Hang Y. *et al*, 2011)

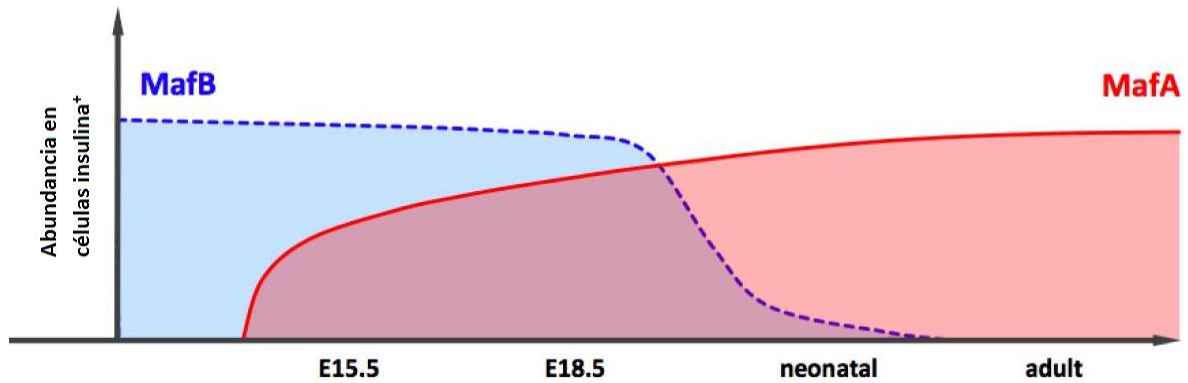


Figura 7. Expresión de MafB y MafA en células insulina⁺ de rata.

Finalmente Pdx1 limita su expresión a las células β a partir de E17 permitiendo la maduración de estas células y regulando la transcripción de los marcadores de las células β como son Glut2 y la glucocinasa (Hang Y. *et al*, 2011). A partir de E14.5, Brn4 se expresa sólo en las células α , y es responsable de la expresión de glucagon y de mantener la identidad de estas células durante el desarrollo y en la vida adulta del organismo (Liu J *et al*, 2011).

Se ha demostrado que la presencia de GLP-1 (glucagonlikepeptide 1) inhibe la expresión de Rb (retinoblastoma), lo cual da resultados controversiales, ya que la inhibición de la expresión de Rb induce la proliferación de células β , pero ocasiona que se detenga el ciclo celular de las células α , así mismo, la expresión de p107 induce que se detenga el ciclo celular de las células α y la inhibición de ambas proteínas induce la proliferación de las células α (Woo *et al*, 2014).

Durante la diferenciación y el desarrollo de las células endócrinas (E10.5) hay una población celular que coproduce las hormonas peptídicas de insulina y glucagon, sin embargo, conforme avanza el desarrollo, esta población de celular disminuye. Se ha demostrado que esta población expresa el factor de transcripción Arx presente exclusivamente durante la diferenciación de las células α y no expresa el factor de transcripción Pdx1 el cual es exclusivo para la diferenciación de las células β . Se ha sugerido que estas células representan una fase transitoria durante el desarrollo que llevan a la maduración de las células α , sin embargo, debido a esta característica, han sido propuestas para realizar ensayos de reprogramación celular y realizar la conversión de células α a células β en enfermedades como la DM. Se ha reportado que el desarrollo en un ambiente

hiperglucémico altera la expresión de los factores de transcripción que participan en los procesos de diferenciación y desarrollo de diversos linajes celulares (Pavlinkova G *et al*, 2009).

6. Fisiología y regulación de la célula α del páncreas endócrino

Las células α son las encargadas de la síntesis y secreción del glucagon, estas células tienen un papel fundamental en incrementar los niveles de glucosa en condiciones hipoglucémicas para mantener la homeostasis de la glucosa por medio de la degradación del glucógeno, promover la gluconeogénesis y la cetogénesis. La síntesis del glucagon en las células α pancreáticas, comienza a partir de la expresión del gen del preproglucagon, la expresión de este gen dará origen a la síntesis de hormonas peptídicas como el glucagon, GLP1 y GLP2. La síntesis y maduración de estos péptidos se da gracias a la reacción enzimática de las prohormonas convertasas (PC). La expresión de los subtipos de PC va a mediar la producción de las diferentes hormonas peptídicas. La prohormona convertasa 2 (PC2) se expresa únicamente en las células α , lo que dará origen al glucagon, posteriormente esta hormona será secretada por la célula α del páncreas endócrino (Gerich *et al*, 1974). El glucagon se encarga de liberar glucosa, la insulina es una hormona sintetizada y secretada por la célula β del páncreas endócrino que ejerce acciones opuestas al glucagon, (Gromada *et al*, 2007; Leung *et al*, 2005).

La secreción de glucagon está regulada a diferentes niveles, la principal depende de las concentraciones de glucosa en la sangre, al disminuir las concentraciones de glucosa sanguínea, la célula α secreta glucagon al hígado y activa la vía de la glucogenolisis en el hígado y el músculo, en esta vía metabólica se rompe el glucógeno para secretar glucosa al plasma sanguíneo, así mismo, se activa la vía de la gluconeogénesis en el hígado, fenómeno que sólo ocurre en este órgano en un estado de ayuno moderado, en esta ruta metabólica, se sintetiza glucosa *de novo* a partir de precursores de aminoácidos como la alanina y el lactato, finalmente en el tejido adiposo ocurre la degradación de ácidos grasos y triglicéridos, estos procesos sirven para mantener las concentraciones de glucosa.

La secreción de glucagon en las células α en condiciones de hipoglucemia, se da por un incremento intracelular de la relación ATP/ADP, el cual va a activar

los canales de potasio dependientes de ATP (KATP), éste a su vez va inducir un disparo en el potencial de acción en el cual va a haber activación de los canales de sodio y de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv), finalmente los canales de calcio se activan incrementando las concentraciones de calcio intracelular induciendo la secreción de los gránulos de glucagon al medio extracelular (Rorsman *et al*, 2014)

En contraparte al incrementarse los niveles de glucosa sanguínea se inhibe la activación de los KATP por el incremento en las concentraciones ATP/ADP, así mismo, se inhibe la activación de los canales de Na, de los canales de potasio dependiente de voltaje (Kv) y disminuyen los niveles intracelulares de calcio, impidiendo la secreción de los gránulos de glucagon. Otro mecanismo de regulación es a nivel endocrino, al incrementarse las concentraciones de insulina se inhibe la liberación de glucagon y de manera opuesta al disminuir las concentraciones de insulina se incrementa la liberación de glucagon, también la secreción de somatostatina por parte de la célula δ regula la liberación de glucagon. En la célula α se expresa el receptor tipo 2 de somatostatina, este receptor es un receptor acoplado a proteínas G inhibitoras, al momento de activarse este receptor se inhibe la liberación de glucagon al haber un incremento en los niveles de esta hormona peptídica (Rorsman *et al*, 2014).

Las células α y β del páncreas endócrino son reguladas por los neurotransmisores GABA y glutamato, ambos neurotransmisores son sintetizados en la célula β y pueden regular la secreción de glucagon, por un lado la liberación de GABA a la célula α ejerce su acción en los receptores GABAA y GABAB dando como resultado la inhibición de la secreción de glucagon y de manera opuesta la liberación de glutamato y la unión a su receptor AMPA induce la liberación de vesículas de glucagon (Braun M *et al*, 2004; Frankilet *al*, 2004; Sakurai *et al*, 1974; Kumar *et al*, 1999).

En la fisiopatología de la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2, la célula α presenta un incremento desregulado en la secreción de glucagon contribuyendo a que se presente constantemente una condición de hiperglucemia. En la diabetes tipo 1 se presenta una hiperplasia de las células α y una disminución de las células β dando como resultado un incremento en los niveles de glucagon, como consecuencia hay una activación de las rutas metabólicas de la glucogenólisis y la gluconeogénesis provocando un incremento en las concentraciones de glucosa en la sangre. En la diabetes tipo 2 la resistencia a la insulina que puede definirse como la incapacidad de la insulina de ejercer su acción sobre su receptor y la

pérdida en la regulación de la secreción de glucagon, contribuyen a que se presente un incremento en los niveles de glucosa.

7. Estreptozotocina como agente inductor de hiperglucemia crónica en modelos murinos

La STZ (2-deoxy-2(3-methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranosa; es una glucosamina-nitrosourea, es un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces achromogenes*. Es un agente diabético ampliamente utilizado para inducción de hiperglucemia experimental en modelos murinos. Su acción citotóxica es ejercida directamente sobre las células β pancreáticas de manera específica y rápida que da por resultado la necrosis celular irreversible (Wu J *et al*, 2015; Szkudelzki T, 2012). Figura 7

La administración de la STZ induce una respuesta trifásica: 1) a las dos horas después de la administración, los niveles de glucosa se elevan por procesos de glucogenolisis en el hígado, 2) 10 horas después de la administración los niveles de glucosa descienden y 3) a las 24 horas después de la administración de STZ se produce una hiperglicemia crónica y es eliminada por la orina en 48 horas. La severidad de la hiperglucemia inducida depende de la dosis de STZ que es administrada. Se sabe que a dosis elevadas ($\geq 40\text{mg/kg}$) se produce una necrosis masiva de las células β y un incremento significativo en los niveles de glucosa en ratas. Dosis intermedias (35mg/kg - 40mg/kg) se induce una necrosis moderada de las células β y disminuyen la efectividad de la insulina similar al que se presenta en la diabetes tipo 2 (DT2). A dosis bajas ($\leq 35\text{mg/kg}$) no induce hiperglucemia crónica (Islam S *et al*, 2012; Junod A *et al*; 1967).

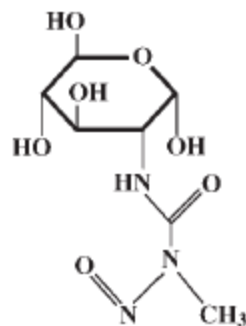


Figura 8. Estructura química de la estreptozotocina.

La STZ está compuesta por una molécula de glucosa acoplada a una molécula de metilnitrosourea altamente reactiva que ejerce los efectos citotóxicos. La STZ es reconocida por el transportador GLUT2 presente en las células β , es metabolizada por el hígado y rápidamente eliminada por excreción renal, sin embargo, GLUT2 también es expresado en menor proporción en el hígado y el riñón. Debido a que su vida media en el plasma sanguíneo es de 15 minutos se puede asumir que cualquier daño presente en estos órganos es debido al incremento en los niveles de glucosa y no por la administración de STZ.

Debido al proceso de necrosis y a la disminución de la masa celular β , el incremento en los niveles de glucosa activa vías de señalización y bioquímicas que incrementan las concentraciones intracelulares de NADH/NAD⁺, ésto crea un ambiente pseudohipóxico caracterizado por un estrés reductivo, la vía de la hexosamina modifica la proteína O-ligado N-acetilglucosamina (O-GlcNAc), activa la proteína cinasa K (PKC). La activación de la vía de los polioles da por resultado la acumulación de sorbitol, de fructosa, la formación de metilglioxal y de enediol. Todos estos procesos culminan en la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y junto a la insuficiencia de producir antioxidantes alteran el funcionamiento de las células β por la alteración en procesos redox que inducen alquilaciones en el DNA y la fragmentación de esta molécula ((Wu *et al*, 2015; Szkudelzki T, 2012) Figura 8.

Las complicaciones provocadas por la hiperglucemia son derivadas de la glucotoxicidad crónica que induce un estrés directo en las células β por las concentraciones elevadas de glucosa que traen como consecuencia efectos adversos en el funcionamiento de estas células. Se ha demostrado que los efectos glucotóxicos en las células β , provocan alteraciones en el funcionamiento de las mitocondrias, incrementando los niveles de ROS y alterando el funcionamiento de este tipo celular.

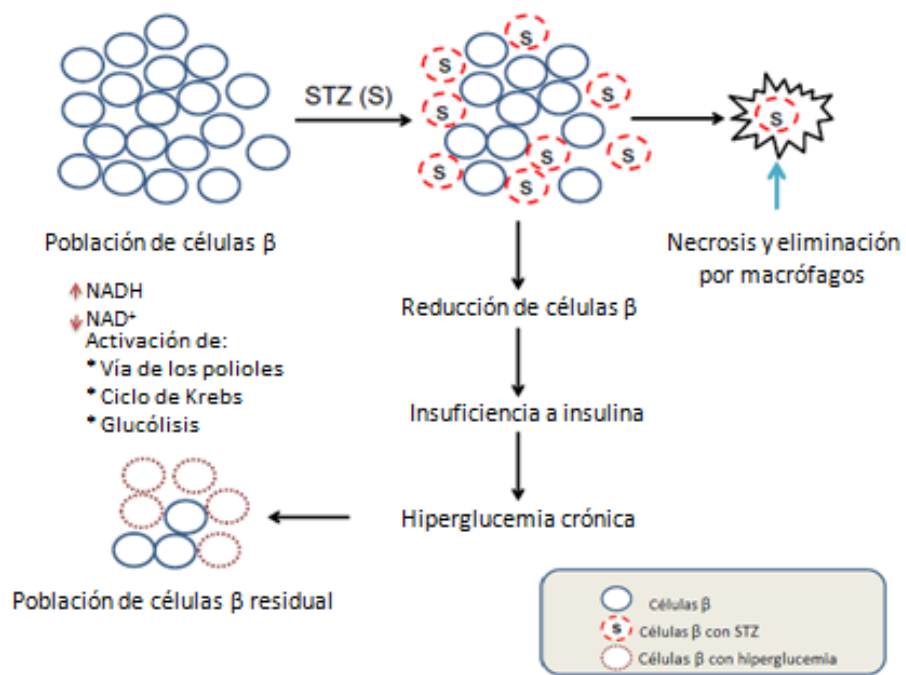


Figura 9. Destrucción parcial de las células β por acción de la STZ, reducción de la masa celular β e inducción de hiper glucemia crónica. Tomado y modificado de Wu *et al*

8. Planteamiento del problema

Estudios clínicos y experimentales han demostrado que el desarrollo en un ambiente hiperglucémico *in utero*, afecta la diferenciación, maduración y funcionamiento del páncreas, lo que provocará efectos adversos en la vida adulta del organismo, incrementando el riesgo de desarrollar diabetes, obesidad, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares (Sánchez LS *et al*, 2008). Sin embargo, no hay estudios que revelen el mecanismo de acción a través del cual se generan estas alteraciones en la etapa embrionaria y fetal y que repercutirán en la vida adulta de los descendientes de madres diabéticas.

Debido a la importancia que tiene la célula α del páncreas en regular la homeostasis de la glucosa, es importante realizar investigaciones en modelos animales para identificar qué mecanismos se alteran durante la diferenciación, maduración y funcionamiento de las células α en un ambiente hiperglucémico.

Por tal motivo en este estudio se propuso analizar las alteraciones en la expresión del factor de transcripción MafB, el cual participa en la maduración y función de las células α , así como demostrar las alteraciones en la expresión de insulina y glucagon en tiempos fetales y post-natales.

9. Hipótesis

El ambiente hiperglucémico *in utero* provocará alteraciones en la expresión del factor de transcripción requerido para la maduración y función de las células α (MafB) a los 17 y 21 días fetales, a los 20, 28 y 90 días post-natales y en consecuencia alterará la homeostasis de la glucosa y ocasionarán alteraciones metabólicas en la vida adulta de las crías.

10. Objetivo General

Identificar los cambios en la expresión del factor de transcripción que participa en la maduración y funcionamiento de las células α (MafB) en fetos y crías de ratas hiperglucémicas y compararlos con la de fetos y crías de ratas sanas.

10.1 Objetivos particulares

- Comparar niveles de glucosa y peso de ratas gestantes con hiperglucemia con el de ratas gestantes sanas a lo largo de la gestación
- Comparar peso y talla de fetos de 17 y 21 días de ratas con hiperglucemia con el de fetos de madres sanas.
- Comparar peso, talla, niveles de glucosa y peso del páncreas de crías de 20, 28 y 90 días de ratas con hiperglucemia con los de crías sanas.
- Identificar en el páncreas de fetos y crías de madres con hiperglucemia los cambios de expresión del factor de transcripción MafB y compararlo con la de fetos y crías sanas por medio de técnicas inmunohistoquímicas.
- Identificar en fetos y crías de ratas hiperglucémicas los cambios de expresión del factor de transcripción MafB en proteínas de páncreas total y compararlos con los de fetos y crías sanas por medio de western blot.
- Identificar cambios en la señal positiva de insulina y glucagon en tejido pancreático en fetos y crías de ratas hiperglucémicas y compararlos con fetos y crías sanas por medio de técnicas inmunohistoquímicas.
- Comparar las curvas de tolerancia a la glucosa de crías de 28 y 90 días de ratas hiperglucémicas y comparalas con las de crías de ratas sanas y demostrar alteraciones en la homeostasis de la glucosa

11. Materiales y Métodos

11.1 Apareamiento

Se aparearon 30 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley con un peso de 250-300 g con machos de fertilidad comprobada durante toda una noche. Al día siguiente a las 8:00 a.m. se realizaron frotis vaginales; la presencia de espermatozoides en el frotis determinó éste como el día 1 de la gestación (Figura 9 y 10).

11.2 Lote control

A 15 ratas gestantes de la cepa Sprague-Dawley se les administró, el 5° día de la gestación, una dosis i.p de 0.2-0.3ml de amortiguador de acetatos a 0.1M a un pH 4.3, dependiendo su peso. Se formaron los siguientes grupos:

Grupo 1C	<ul style="list-style-type: none">• 3 ratas gestantes sanas que se sacrificaron a los 17 días de gestación (inicio de la proliferación endocrina).
Grupo 2C	<ul style="list-style-type: none">• 3 ratas gestantes sanas que se sacrificaron a los 21 días de gestación (término de la formación de islotes durante la gestación).
Grupo 3C	<ul style="list-style-type: none">• 3 ratas gestantes sanas cuyas crías fueron sacrificadas a los 20 días de nacidas (maduración del páncreas antes del destete).
Grupo 4C	<ul style="list-style-type: none">• 3 ratas gestantes sanas cuyas crías fueron sacrificadas a los 28 días de nacidas (respuesta del páncreas endócrino a la dieta).
Grupo 5C	<ul style="list-style-type: none">• 3 ratas gestantes sanas cuyas crías fueron sacrificadas a los 90 días de nacidas (adaptaciones y mantenimiento del páncreas endócrino (Figura 9)).

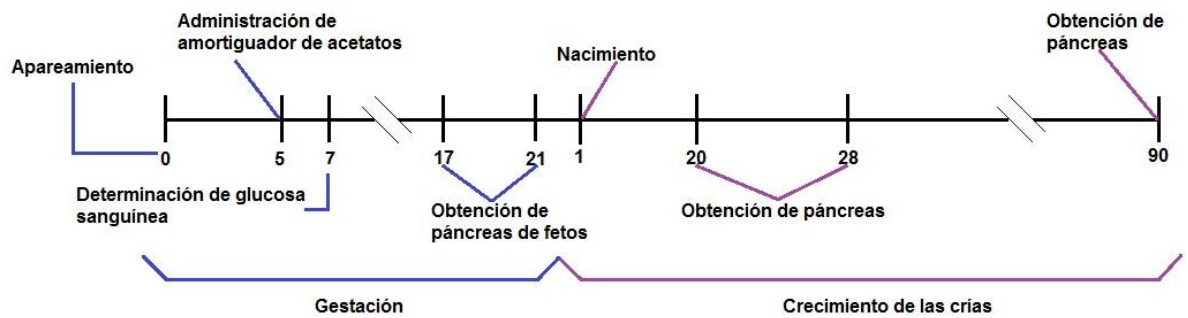


Figura 10. Diseño experimental y línea del tiempo.

11.3 Lote experimental

A 15 ratas gestantes de la cepa Sprague-Dawley se les administró, el 5° día de la gestación, una dosis ip de 40mg/Kg de STZ en amortiguador de acetatos a 0.1M a un pH 4.3. A las 48 hrs después de la administración de STZ, se les determinaron los niveles de glucosa sanguínea de la vena caudal (glucómetro Accu-Check®), las que presentaron niveles ≥ 200 mg/dL fueron consideradas diabéticas. Se formaron los siguientes grupos:

Grupo 1E	<ul style="list-style-type: none"> 3 ratas gestantes diabéticas que se sacrificaron a los 17 días de gestación (inicio de la proliferación endocrina).
Grupo 2E	<ul style="list-style-type: none"> 3 ratas gestantes diabéticas que se sacrificaron a los 21 días de gestación (término de la formación de islotes durante la gestación).
Grupo 3E	<ul style="list-style-type: none"> 3 ratas gestantes diabéticas cuyas crías fueron sacrificadas a los 20 días de nacidas (maduración del páncreas antes del destete).
Grupo 4E	<ul style="list-style-type: none"> 3 ratas gestantes diabéticas cuyas crías fueron sacrificadas a los 28 días de nacidas (respuesta del páncreas endócrino a la dieta).
Grupo 5E	<ul style="list-style-type: none"> 3 ratas gestantes diabéticas cuyas crías fueron sacrificadas a los 90 días de nacidas (adaptaciones y mantenimiento del páncreas endócrino (Figura 10)).

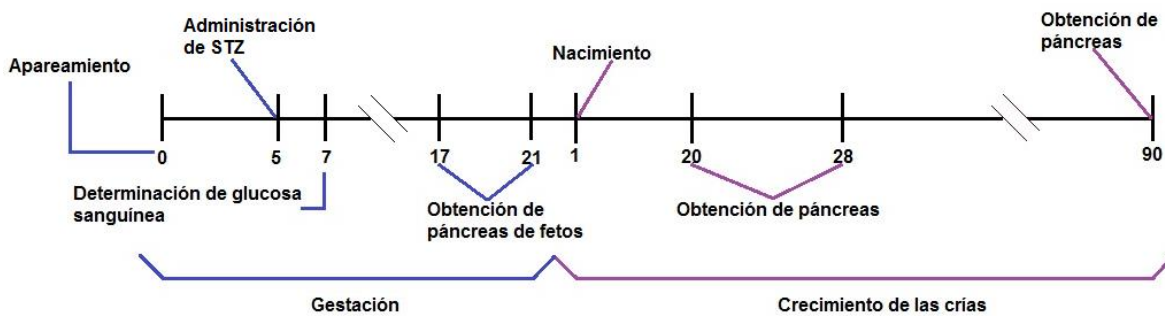


Figura 11. Diseño experimental y línea del tiempo

Durante la gestación a las ratas se les determinó una vez por semana peso y glucosa sanguínea (glucómetro Accu-Check®). A los días, 17 y 21 de gestación se sacrificaron por dislocación cráneo-cervical y se determinó el número de fetos vivos, muertos y el número de reabsorciones. Los fetos se pesaron en balanza analítica (Sartorius EMBM) y se midieron con un vernier (Mitutoyo CD-6" CSX) de la cabeza a la cola para obtener la talla, se registró la presencia y tipo de malformaciones macroscópicas. Los fetos se sacrificaron por decapitación y con un capilar se obtuvo una muestra de sangre que se colocó en una tira reactiva para determinar los niveles de glucosa sanguínea (glucómetro Accu-Check®). Se les extirpó el páncreas, se pesó y fijó en una solución de formol-PBS al 10%. El tejido pancreático se deshidrató en alcoholes graduales (50%-100%) durante 60 min en cada cambio, se transfirió a xilol durante 30 minutos y se incluyó en Paraplast® (Leica). Se realizaron cortes de 5µm con un micrótopo (KEDEE KD-3358) se montaron en portaobjetos tratados con Poli-L-lisina (Sigma®) y se procesaron con técnicas de inmunohistoquímica.

Las crías de 20, 28 y 90 días se pesaron en una balanza (Sartorius EMBM), se midieron con una cinta métrica de la cabeza a la punta de la cola y se les determinaron los niveles de glucosa sanguínea una vez por semana (glucómetro Accu-Check®). Posteriormente fueron sacrificadas por decapitación, se obtuvo el páncreas, se pesó en una balanza analítica (Sartorius EMBM), se fijaron en una solución de formol-PBS al 10% e incluyeron en Paraplast® (Leica). Se realizaron cortes de 5µm con un micrótopo (KEDEE KD-3358) y se montaron en portaobjetos tratados con Poli-L-lisina (Sigma®) y se procesaron con técnicas de inmunohistoquímica.

El proyecto fue aprobado por la Comisión Local de Investigación del IMSS (R-2009-3604-21) y el uso y manejo de los animales de laboratorio se realizó bajo la norma establecida NOM-062-ZOO-1999, en todos los procedimientos experimentales se evitó cualquier daño o sufrimiento innecesario de los animales.

11.4 Inmunohistoquímica

Los cortes de páncreas montados en portaobjetos tratados con Poli-L-lisina (Sigma®) se colocaron 30 minutos en una incubadora con control de temperatura a 60°C y posteriormente en xilol por 30 minutos a temperatura ambiente. Los cortes se hidrataron con alcoholes graduales (100%--50% y PBS 1x) durante 10 minutos cada uno. Se colocaron durante 10 minutos en el recuperador de antígeno 5x (Rodent Decolaker) a una temperatura de 120°C, se permeabilizaron las membranas de los cortes histológicos con PBS1x-triton 0.25% durante 10 minutos. Se colocó el inhibidor de peroxidasa (H₂O₂ al 10%) durante 20 minutos, se lavaron con PBS1x-tritón 0.25% durante 10 minutos, se depositaron 2 gotas de bloqueador de proteínas (ImmunoDNA Background Blocker) durante 30 minutos y se agregó el anticuerpo primario, para MafB (Abcam) una dilución 1:300, para insulina se utilizó una dilución 1:400 (Thermo Scientific) y para glucagon se usó una dilución 1:500 (Thermo Scientific) en PBS1x-tritón 0.25%, todos los anticuerpos se dejaron incubando toda la noche a una temperatura de 4°C.

Al día siguiente se realizaron 4 lavados con PBS1x-tritón 0.25% 10 minutos cada uno, se agregó una gota de biotina (Biocare) durante 30 minutos, se hicieron otros 4 lavados con PBS1x-tritón 0.25% durante 10 minutos, se depositó una gota de avidina-HRP durante 30 minutos, se realizaron 4 lavados con PBS1x-tritón 0.25% durante 10 minutos y se reveló con diaminobenzidina (1:100; BioSB) durante 1 minuto. Se contratiñó con hematoxilina de Harris durante 1 minuto y se deshidrató en alcoholes graduales (70%-100%) durante 3 minutos en cada alcohol, se depositaron en xilol por 3 minutos y se montaron con entellan (Sigma).

Se realizaron análisis de densidad óptica integrada (IOD) a partir de imágenes obtenidas por medio de microscopio óptico (Nikon ecilpse E400) para obtener valores semi-cuantitativos de la expresión de proteínas en el tejido por medio del Software Image Pro Plus®.

11.5 Western Blotting

En los diferentes tiempos de estudio se obtuvieron muestras de páncreas que se congelaron inmediatamente a -70°C. Las muestras se trituraron en morteros congelados para conservar la muestra, se agregó buffer de lisis suplementado con un inhibidor de proteasas, las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se mantuvieron durante 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron (eppendorf centrifuge 5402) a 12.500 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Al sobrenadante se le cuantificó la concentración de proteína por medio del método de Bradford.

Las muestras de proteínas con una concentración de 40µg/ml se separaron en un gel de poliacrilamida al 12%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en cámara húmeda (Bio Rad®) a 4°C durante toda la noche. Para confirmar la transferencia de proteínas se tiñó con rojo Ponceau, se bloqueó la membrana con albúmina al 1.5% (Amresco®) durante 1 hora a temperatura ambiente y se dejó incubando con el anticuerpo primario toda la noche, MafB una dilución 1:300 (Abcam), posteriormente se realizaron lavados con PBS 1x durante 10 minutos cada uno y se incubó con el anticuerpo secundario de cabra IgG anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:1000 durante una hora a temperatura ambiente, una vez terminado el tiempo de incubación se realizaron lavados con PBS 1x durante 10 minutos cada uno y finalmente se colocó un volumen de 6 ml de revelador (Bio Rad®) para determinar la presencia de las bandas de interés.

La determinación cuantitativa de las proteínas se realizó por medio del software Image Studio Lite Ver 5.2.

11.6 Curva de tolerancia a la glucosa

Para determinar la presencia de alteraciones en el metabolismo de la glucosa, a las crías de 28 y 90 días se les sometió a un ayuno de 12 horas y se les administró glucosa con una dosis de 2g/kg vía i.p. Las muestras sanguíneas se obtuvieron de la vena caudal y las concentraciones de glucosa se midieron con un glucómetro automático (Accu-Chek®) en los tiempos 0, 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de la glucosa.

11.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los diferentes grupos se expresaron como promedio y error estándar (E.E). El análisis estadístico para determinar si las mediciones obtenidas presentaron distribución normal fueron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, se realizaron graficas de distribución de los datos, a los valores no paramétricos se les realizó la prueba de Mann-Whitney U con una significancia de $p \leq 0.05$ y los datos con distribución normal se les realizó un t-student y una ANOVA con una prueba post-hoc de Tukey con una significancia de $p \leq 0.05$. Los programas estadísticos que se utilizarán son el SPSS.

Los resultados obtenidos por medio de western blot e inmunohistoquímica de la expresión de MafB en los grupos controles y experimentales en fetos de 17 y 21 días de gestación y en crías de 20, 28 y 90 días se realizó análisis de normalidad de Kolmogorov-

Smirnov, se obtuvo una $p < 0.01$ (Z), este resultado indicó que los valores obtenidos no presentaron distribución normal.

12. Resultados

12.1 Peso de ratas gestantes

El día 1 de la gestación el peso promedio de las ratas gestantes del grupo control (n=20) fue de 277 ± 0.49 g, a los días 7 y 17 presentaron un promedio de 282 ± 0.84 g y 293 ± 1.6 g respectivamente y a los 21 días se obtuvo un promedio de 304 ± 1.3 g.

La hiperglucemia provocó que el incremento en el peso no fuera como el de las ratas sanas, siendo en promedio de 293 ± 0.56 g, 277 ± 0.53 g, 290 ± 0.82 g y $291 \text{g} \pm 0.79$ g respectivamente, estos datos no presentaron diferencias significativas comparado con el grupo control (n=25; Figura. 11.A).

A

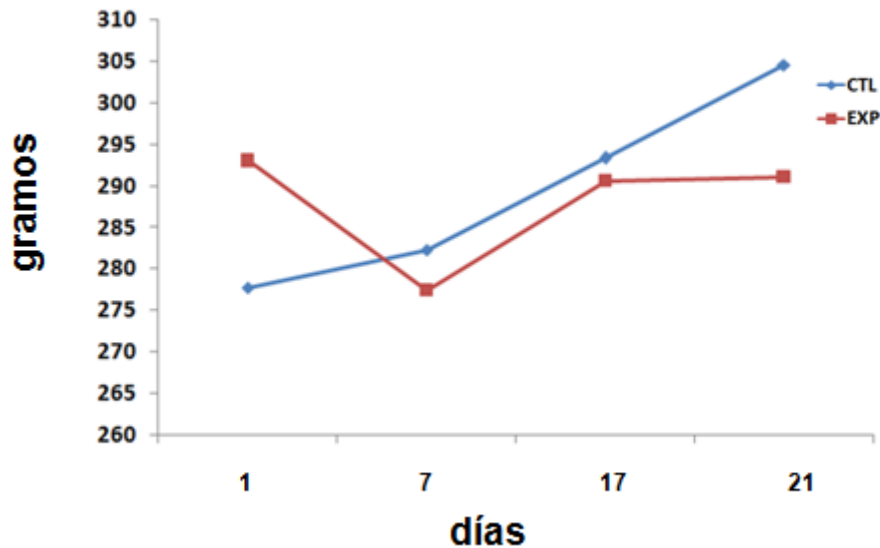


Figura 12. Peso de ratas gestantes. (A) La inducción de hiperglucemia en ratas gestantes disminuye el peso comparado con ratas gestantes del grupo control.

12.2. Glucosa de ratas gestantes

El promedio de los niveles de glucosa del grupo control el día 1 de gestación fue de 99.8 ± 0.56 mg/dL, a los 7, 17 y 21 días mostraron un incremento no significativo en los niveles de glucosa con valores promedio de 142.7 ± 0.53 mg/dL, 137.2 ± 0.82 mg/dL y 106.3 ± 0.79 mg/dL respectivamente (n=20). Sin embargo, la administración de STZ en el grupo experimental indujo un incremento significativo ($p \leq 0.01$) en los niveles de glucosa con valores promedio de 101.8 ± 0.42 mg/dL, 369.2 ± 2.01 mg/dL, 447.8 ± 1.77 mg/dL y 487.2 ± 2.43 mg/dL respectivamente (n=25); $p < 0.01$; Figura. 12. A).

A

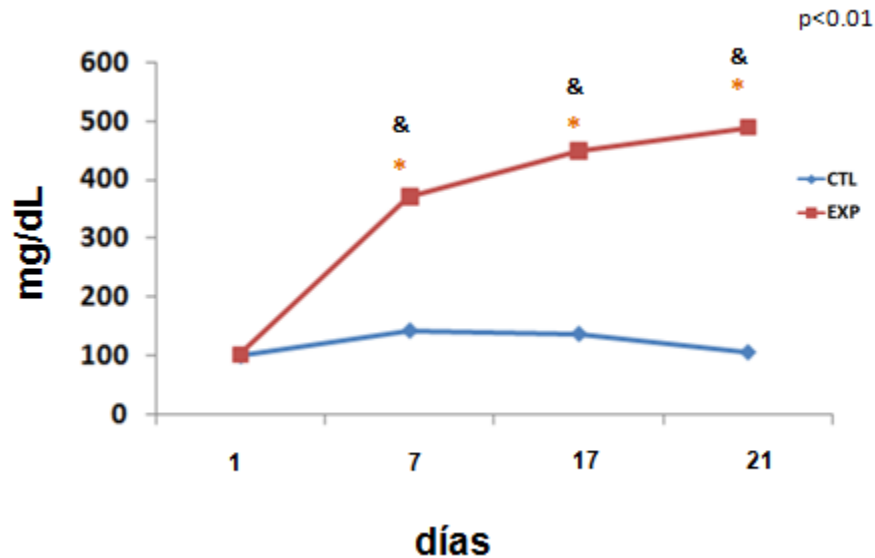


Figura 13. Niveles de glucosa sanguínea de ratas gestantes. (A) La administración de STZ incrementa de manera significativa los niveles de glucosa. Cambios significativos entre el grupo experimental (*), respecto al día 1 de gestación. Las diferencias entre cada grupo se muestra con &(p<0.01).

12.3 Número de reabsorciones y fetos por camada

El número promedio de fetos por camada en el grupo control fue de 11 y en el grupo experimental fue de 7 fetos. En el grupo experimental el promedio de reabsorciones por camada fue de 4 y no se observaron malformaciones. Se registraron 3 días de retraso en el nacimiento de las crías, 3 muertes entre los días 3 y 5 después del nacimiento y 12 reabsorciones completas. No se presentaron reabsorciones ni malformaciones en el grupo control (Tabla. 4).

	Control	Experimental
Número de fetos	11	7
Número de reabsorciones	0	4

Tabla 4. Fetos y reabsorciones por camada. Número de fetos y reabsorciones por camada presentes en el grupo control y en el grupo experimental.

12.4 Medidas morfométricas de fetos y crías

Los pesos en los grupos controles de fetos de 17 y 21 días fueron $0.53\pm 0.02\text{g}$ y $4.15\pm 0.01\text{g}$ respectivamente. Los fetos que se desarrollaron en un ambiente hiperglucémico presentaron menor peso $0.46\pm 0.1\text{g}$ y $3.32\pm 0.08\text{g}$ respectivamente, lo que representa una disminución de 13.21% y 20% ($n=6$; $p<0.01$; Tabla. 5).

El promedio obtenido de la medición de cabeza-rabadilla de los fetos de 17 y 21 días de los grupos controles fue de $16.57\pm 0.06\text{mm}$ y $36.80\pm 0.06\text{mm}$, los grupos experimentales tuvieron un promedio de $15.63\pm 0.06\text{mm}$ y $33.82\pm 0.19\text{mm}$, mostrando una reducción del 5.68% y 8.1% ($n=6$; $p\leq 0.01$; Tabla. 5).

La medición de la cabeza en los grupos controles fue de $9.39\pm 0.03\text{mm}$ y $16.03\pm 0.04\text{mm}$, en los grupos experimentales fue de $8.87\pm 0.04\text{mm}$ y $13.89\pm 0.10\text{mm}$ lo que representa una reducción del 5.54% y 13.35% respectivamente ($n=6$; $p\leq 0.01$; Tabla. 5).

La media de la medición cabeza-cola fue de $23\pm 0.05\text{mm}$ y $50.45\pm 0.10\text{mm}$ en los grupos controles y en los grupos experimentales fue de $21.24\pm 0.10\text{mm}$ y $46.51\pm 0.2\text{mm}$ presentando una disminución del 7.66% y 7.81% ($n=6$; $p\leq 0.01$; Tabla. 5).

Fetos		Peso (g)	Cabeza – rabadilla (mm)	Cabeza (mm)	Cabeza – cola (mm)
17 días	Control	0.53 ± 0.02	16.57 ± 0.06	9.39 ± 0.03	23 ± 0.05
	Experimental	$0.46\pm 0.01^*$	$15.63\pm 0.06^*$	$8.87\pm 0.04^*$	$21.24\pm 0.10^*$
21 días	Control	4.15 ± 0.01	36.80 ± 0.06	16.03 ± 0.04	50.45 ± 0.10
	Experimental	$3.32\pm 0.08^*$	$33.82\pm 0.19^*$	$13.89\pm 0.10^*$	$46.51\pm 0.2^*$

Tabla 5. Medida de fetos de 17 y 21 días. El desarrollo en un ambiente hiperglucémico disminuye el peso, la talla de cabeza-rabadilla, cabeza y cabeza-cola en fetos de 17 días comparado con el grupo control ($p\leq 0.01$).

La media del peso en crías controles de 20, 28 y 90 días fue de $42.03\pm 0.8\text{g}$, $66.2\pm 1.74\text{g}$ y $259.8\pm 0.8\text{g}$, en los grupos experimentales los promedios fueron de $22.5\pm 0.6\text{g}$, $39.8\pm 1.72\text{g}$ y $349.1\pm 0.5\text{g}$, lo que representó una disminución del 54% y 39.88% en crías de 20 y 28 días. Las crías de 90 días mostraron un incremento del 34.37%, en todos los grupos las diferencias fueron estadísticamente significativas comparadas con el grupo control ($n=7$; $p< 0.01$; Tabla. 6.).

La media obtenida en la talla de las crías de los grupos controles fueron de $18\pm 0.25\text{cm}$, $23.1\pm 0.42\text{cm}$ y $48.92\pm 0.88\text{cm}$. El promedio de la talla de las crías del grupo experimental fue de $15.25\pm 0.22\text{cm}$, $20.1\pm 0.31\text{cm}$ y $39.9\pm 0.61\text{cm}$ respectivamente, demostrando una reducción del 17%, 13% y 18.44% en la talla ($n=7$; $p\leq 0.01$; Tabla. 6.).

12.5 Peso del páncreas

El promedio del peso del páncreas de las crías de los grupos controles fue de $0.18\pm 0.02\text{g}$, $0.25\pm 0.03\text{g}$ y $1.18\pm 0.03\text{g}$, el promedio de peso de los páncreas de los grupos experimentales fue de $0.05\pm 0.005\text{g}$, $0.013\pm 0.05\text{g}$ y $0.77\pm 0.05\text{g}$, representando una reducción de 27.8%, 5,2% y 65.25% ($n=7$; $p\leq 0.01$; Tabla. 6.)

Crías		Peso (g)	Talla (cm)	Peso del páncreas (g)
20 días	Control	42.03±0.8	18±0.25	0.18±0.02
	Experimental	22.5±0.6*	15.25±0.22*	0.05±0.005*
28 días	Control	66.2±1.74	23.1±0.42	0.25±0.03
	Experimental	39.8±1.72*	20.1±0.31*	0.013±0.05*
90 días	Control	259.8±0.8	48.92±0.88	1.18±0.03
	Experimental	349.1±0.5*	39.9±0.61*	0.77±0.05*

Tabla 6. Medidas de crías de 20, 28 y 90 días. El desarrollo en un ambiente hiperglucémico disminuye el peso, la talla, cabeza y el peso del páncreas en crías de 20, 28 y 90 días comparados con el grupo control ($p \leq 0.01$).

12.6 Niveles de glucosa en fetos de 17 y 21 días y en crías de 20, 28 y 90 días

El promedio de los niveles de glucosa en fetos de 17 y 21 días controles fueron de 35.76±0.19mg/dL y 32.6±0.19mg/dL respectivamente. Los grupos experimentales mostraron un incremento significativo en los niveles de glucosa promediando 395.5±0.77mg/dL y 373.75±0.49mg/dL en fetos de 17 y 21 días ($p < 0.01$; Tabla. 7).

Fetos		Glucosa (mg/dL)
17 días	Control	35.76±0.19
	Experimental	*395.5±0.77
21 días	Control	32.6±0.19
	Experimental	*373.75±0.49

Tabla 7. Niveles de glucosa en fetos de 17 y 21 días. El desarrollo en un ambiente hiperglucémico incrementa los niveles de glucosa en fetos de 17 y 21 días ($p < 0.01$).

El promedio de los niveles de glucosa sanguínea fueron 133.11±3.71 mg/dL, 149.32±5.26 mg/dL y 79.33±0.9 mg/dL en las crías de los grupos controles de 20, 28 y 90 días respectivamente. En los grupos experimentales se obtuvieron

valores de 126.03 ± 3.75 mg/dL, 157.7 ± 13.19 mg/dL y 112.28 ± 0.59 mg/dL, presentando una disminución del 94.7% en crías de 20 días y un aumento del 105.6% y 104.5% en crías de 28 y 90 días (n=7; $p \leq 0.01$; Tabla 8).

Crías		Glucosa (mg/dL)
20 días	Control	133.11 ± 3.71
	Experimental	126.03 ± 3.75
28 días	Control	149.32 ± 5.26
	Experimental	157.7 ± 13.19
90 días	Control	79.33 ± 0.9
	Experimental	112.28 ± 0.59

Tabla 8. Niveles de glucosa en crías de 20, 28 y 90 días. El desarrollo en un ambiente hiperglucémico disminuye los niveles de glucosa en crías de 20 días, y en crías de 28 y 90 aumenta los niveles de glucosa sanguínea.

12.7 Expresión de MafB

El factor de transcripción MafB, es un factor que se expresa preferentemente en placenta, cerebro y páncreas, por tal motivo, se usó el tejido placentario y las proteínas totales de placenta como control positivo para la identificación del factor de transcripción por medio de inmunohistoquímica y western blot (Figura 13. A y B).

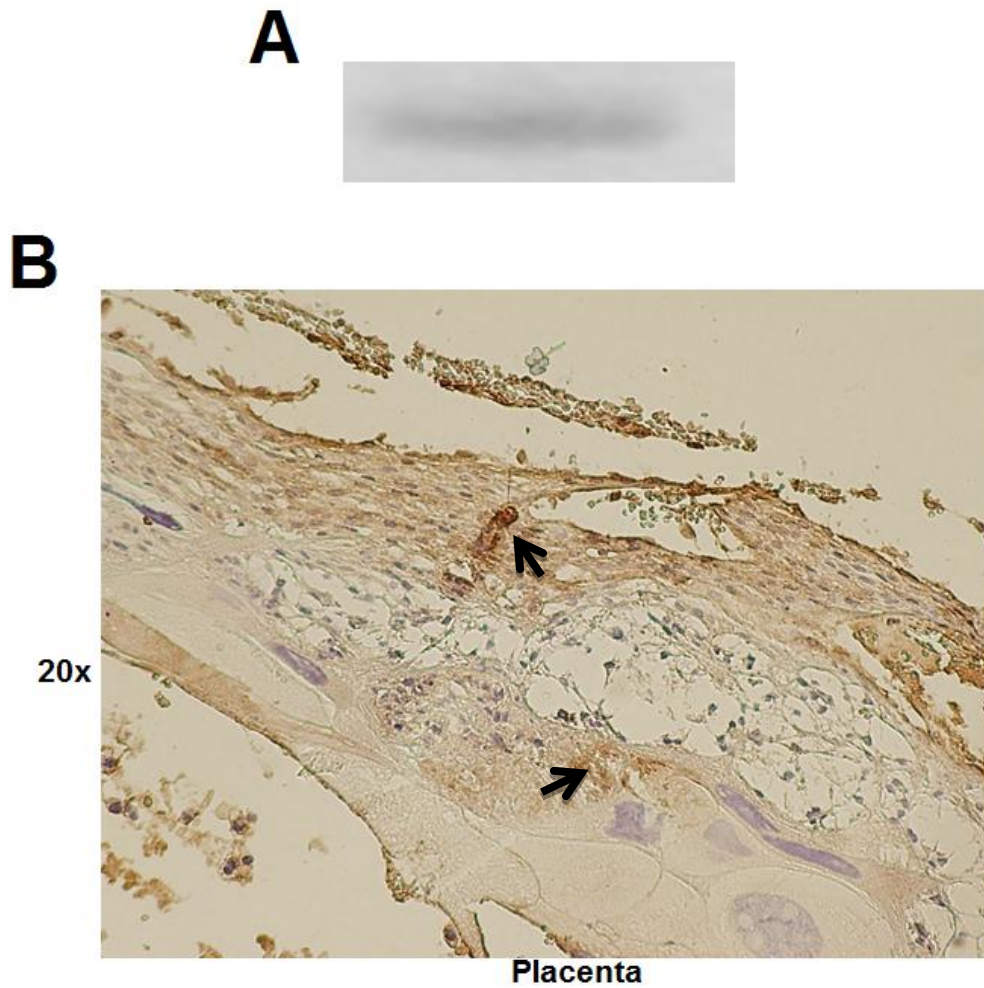


Figura 14. Expresión de MafB en tejido y proteínas totales de placenta. (A) Detección de la señal de MafB a través western blot e (B) inmunohistoquímica

12.7 Expresión de MafB en fetos de 17 y 21 días

Todos los análisis de western blot fueron normalizados y cuantificados a partir del control de carga β -actina.

El análisis cuantitativo de la expresión de MafB por western blot en fetos de 17 y 21 días en los grupos control presentó un promedio de 2148 INT/mm² y 91657INT/mm². En los grupos experimentales se obtuvo un promedio de 1265 INT/mm² y 215907 INT/mm², lo que indica una disminución no significativa en la expresión de 0.59 veces a los 17 días y un aumento significativo de 2.3 veces en 21 días ($p \leq 0.05$; 58kDa; Figura 14).

La cuantificación de la inmunopositividad por medio del IOD de MafB fue en promedio de 8.82 y 4.19 en grupos controles en fetos de 17 días y 21 días (Figura 15). Mientras que en el grupo experimental se obtuvo una media de 7.79 y 6.67, mostrando un decremento significativo en los niveles de expresión de MafB generado por el ambiente hiperglucémico durante el desarrollo a los 17 días y un aumento a los 21 días con una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.01$; Figura 15).

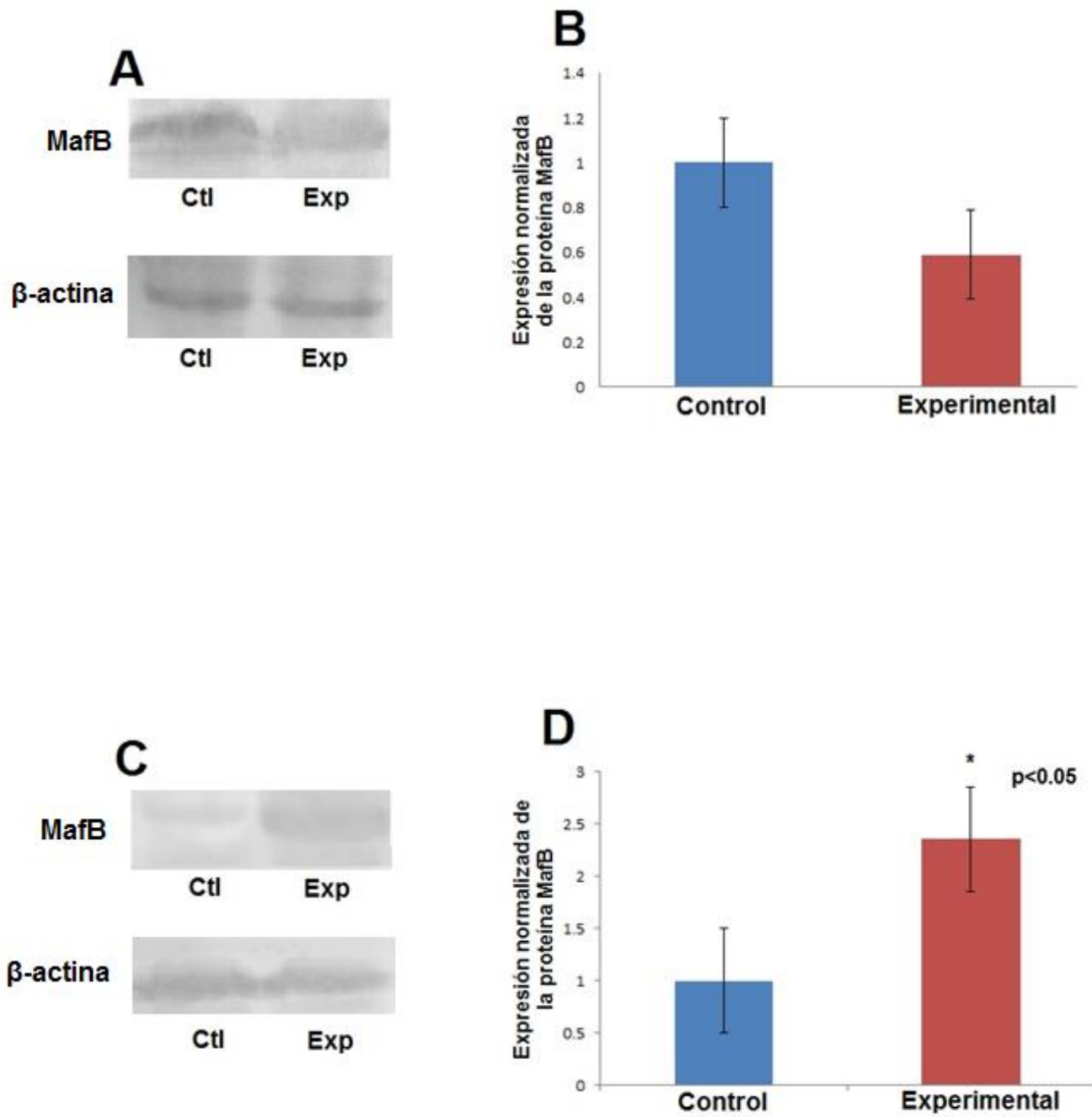


Figura 15. Modificaciones de la expresión de MafB en fetos de 17 y 21 días. (A) Western Blot correspondiente a MafB. (B) Normalización de la expresión de la proteína de MafB

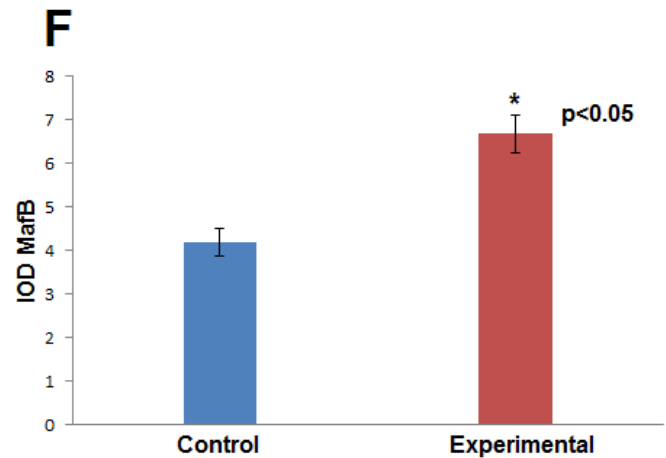
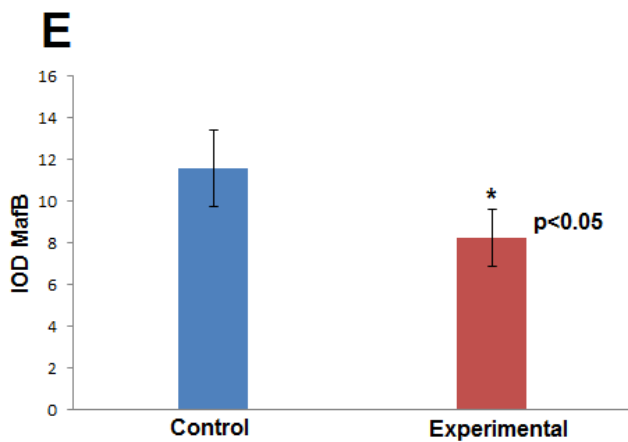
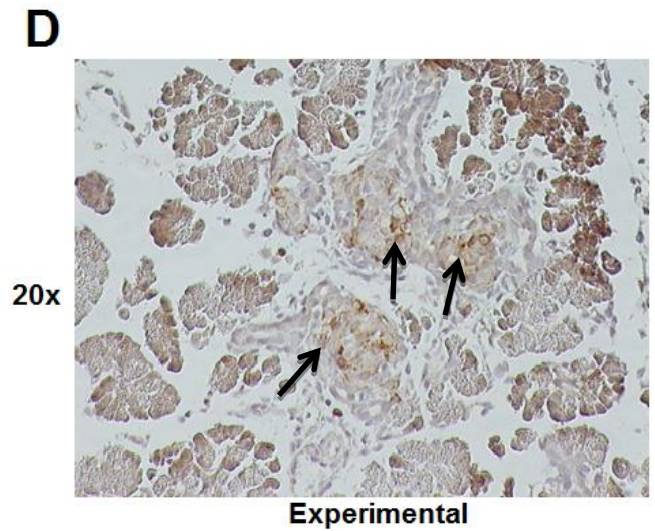
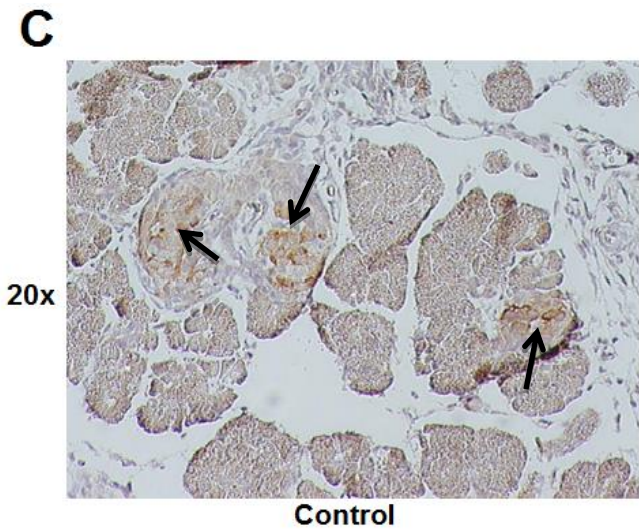
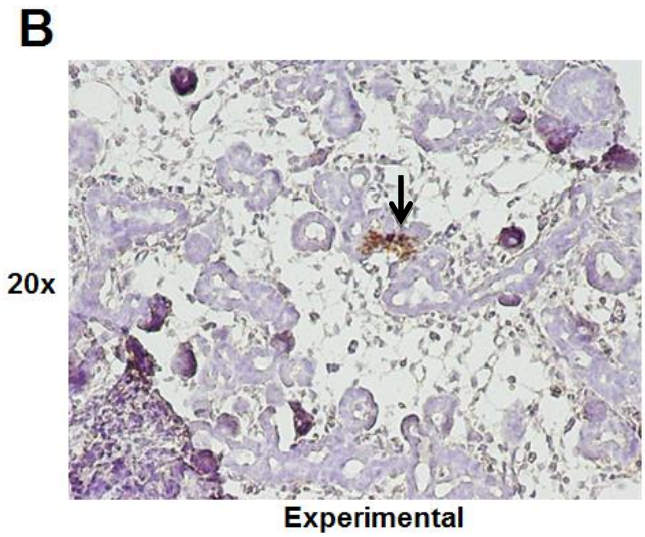
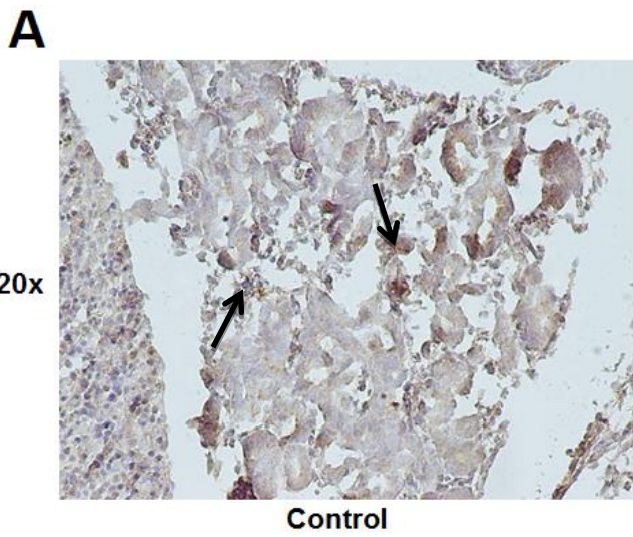


Figura 16. Modificaciones de la expresión de MafB en fetos de 17 y 21 días. (A y B) Inmunopositividad de MafB a los 17 días fetales (C y D). Inmunopositividad de MafB a los 21 días. (E) Aumento en los niveles de expresión de Mafb comparado contra el grupo control (N=6; $p \leq 0.05$). (F). Aumento en los niveles de expresión de MafB comparado contra el grupo control (N=6; $p \leq 0.05$).

12.8 Expresión de insulina y glucagon en fetos de 17 y 21 días

El análisis de IOD de insulina en los grupos controles fue en promedio de 5.30 y 13.42 en 17 y 21 días respectivamente ($p < 0.01$; Figura. 18 y 19. A y E). En grupos experimentales se obtuvo una media de 3.23 y 30.97 respectivamente (Figura. 18 y 19. B y E). A los 17 días se detectó una disminución en la señal positiva de insulina y la inmunopositividad se detectó en la región troncal del páncreas en desarrollo (Figura 18 y 19. A y B) y a los 21 días se detectó un incremento en la señal positiva y la inmunopositividad estaba distribuida en el centro del islote ($p < 0.01$; Figura. 18 y 19. A y B).

El análisis cuantitativo del IOD realizado para glucagon mostró un promedio de 7.95 y 7.54 a los 17 y 21 días respectivamente en los grupos control ($p < 0.01$; Figura. 18 y 19. C y F). En los grupos experimental se obtuvo una media de 4.75 y 10.31 respectivamente ($p < 0.01$; Figura. 18 y 19. D y F); indicando una disminución significativa en la inmunopositividad a los 17 días y un aumento significativo a los 21 días ($p \leq 0.01$).

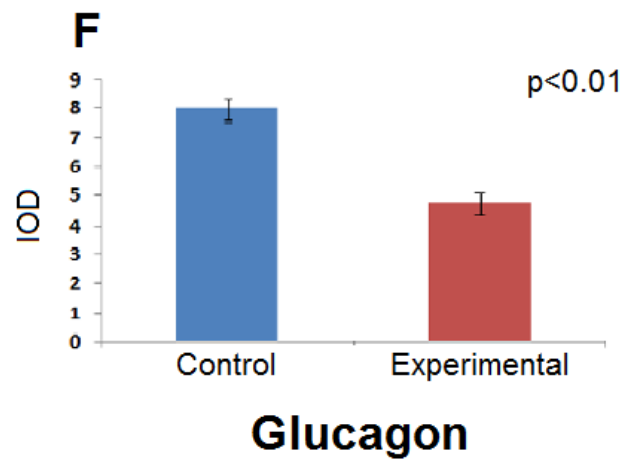
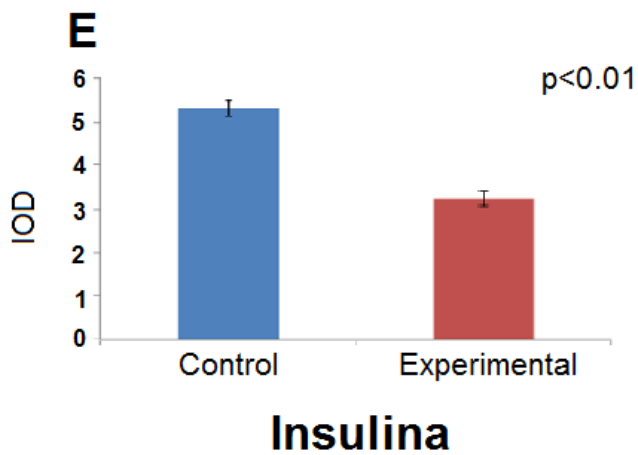
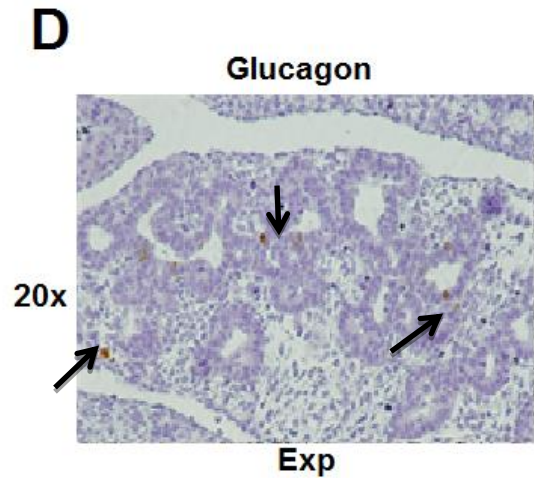
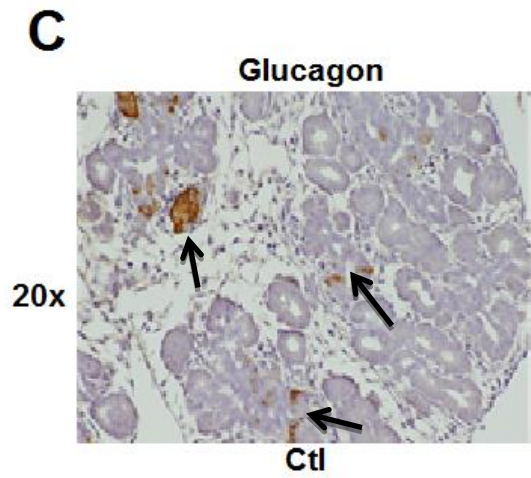
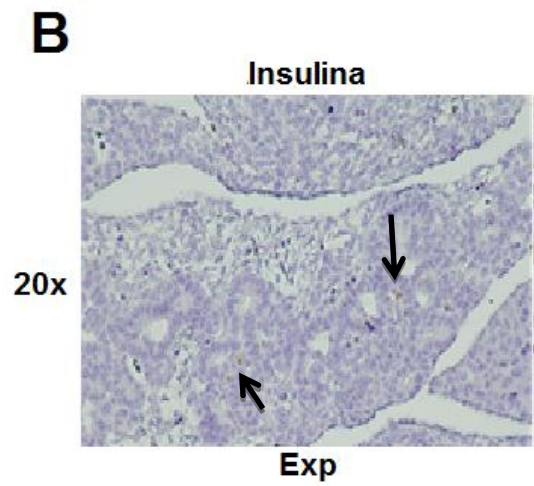
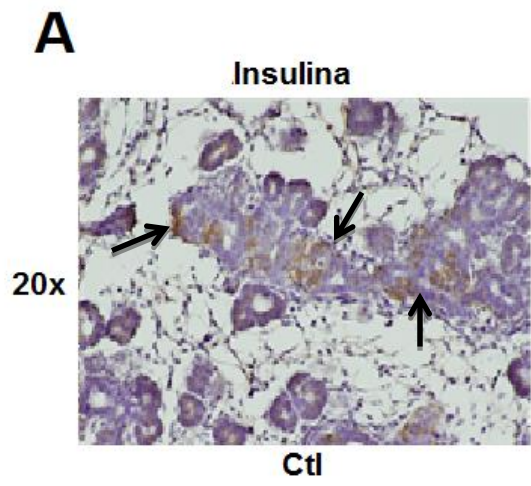


Figura 17. Expresión de insulina y de glucagon en fetos de 17 días. (A y B) Inmunoposividad de insulina. (C y D) Inmunoposividad de glucagon. (E y F). El ambiente hiperglucémico disminuye los niveles de expresión de insulina y glucagon comparado contra el grupo control (n=6; $p \leq 0.01$).

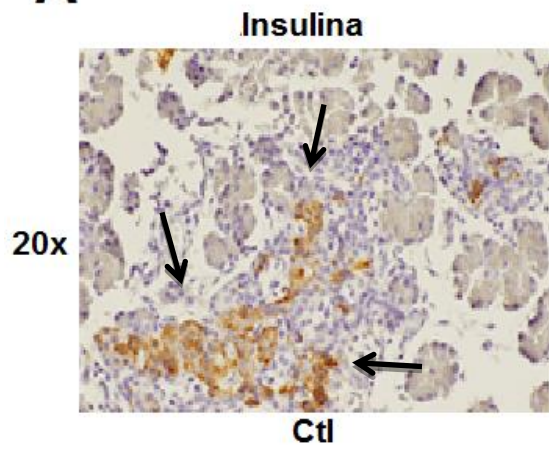
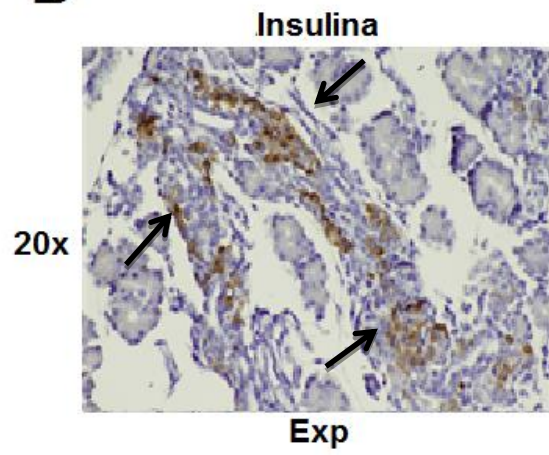
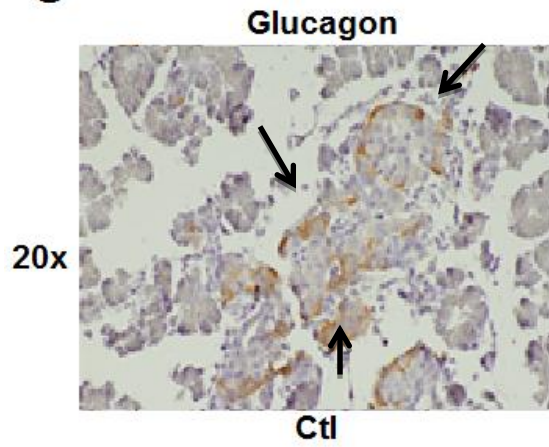
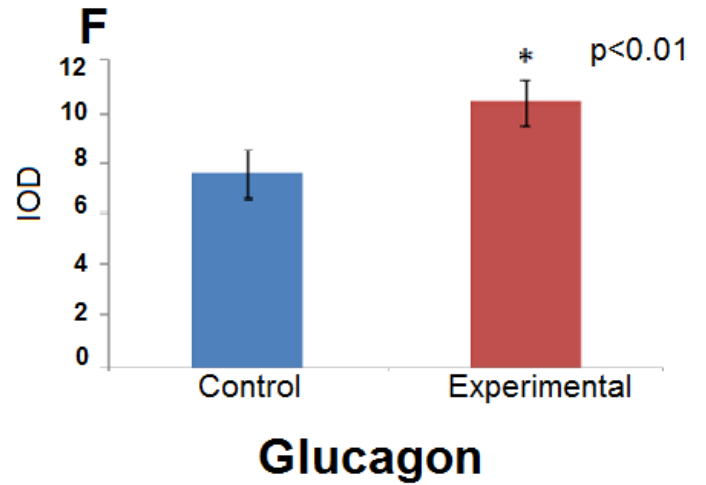
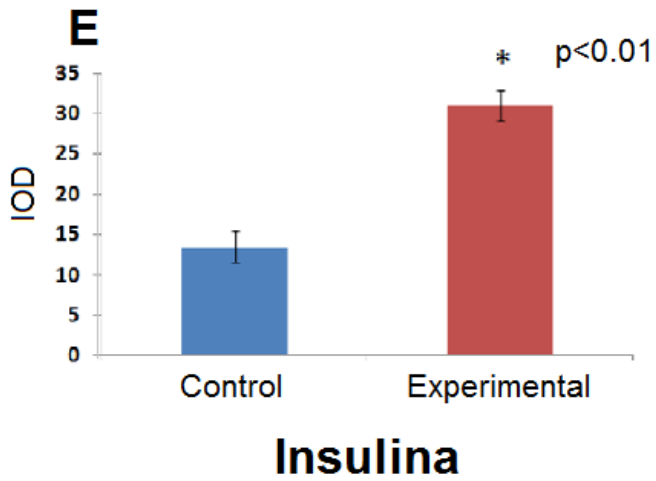
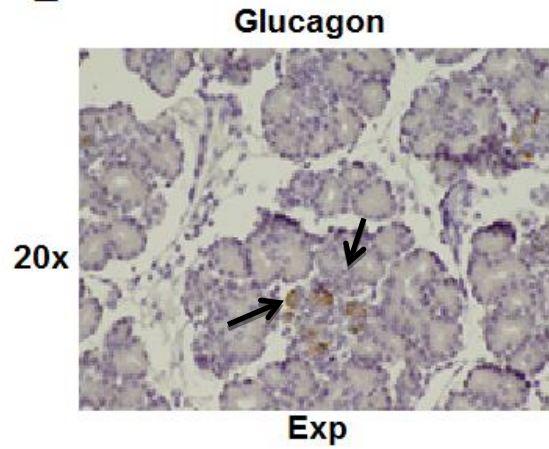
A**B****C****D**

Figura 18. Expresión de insulina y de glucagon en fetos de 21 días. (A y B) Inmunoposividad de insulina. (C y D) Inmunoposividad de glucagon. (E y F). El ambiente hiperglucémico incrementa los niveles de expresión de insulina y glucagon comparado contra el grupo control. (n=6; $p \leq 0.01$).

12.9 Expresión de MafB en crías de 20, 28 y 90 días

A los datos obtenidos por medio de western blot e inmunohistoquímica en la expresión de MafB en los grupos controles y experimentales en crías de 20, 28 y 90 días se les realizó el análisis de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, se obtuvo una $p < 0.0001$ (Z), lo que indicó que los valores obtenidos no presentaron distribución normal. Todos los análisis de western blot fueron normalizados y cuantificados a partir del control de carga β -actina.

El análisis cuantitativo de la expresión de MafB (58kDa) por medio de western blot en crías controles de 20, 28 y 90 días fue en promedio de 3829INT/mm², 179266INT/mm² y 4534INT/mm² respectivamente. Los grupos experimentales presentaron una expresión en promedio de 5358INT/mm², 221891INT/mm² y 3239INT/mm². En crías de 20 y 28 días representaron un aumento significativo de 1.39 y 1.23 veces respectivamente, mientras que en crías de 90 días disminuyeron 0.72 veces (Figura 18).

La inmunopositividad fue observada en la periferia del islote. El análisis del IOD de MafB en crías controles de 20, 28 y 90 días mostraron un promedio de 9.71, 9.16 y 7.53 respectivamente (Figura. 19). La cuantificación en los grupos experimentales mostró una disminución en la señal, presentando promedios de 16.06, 11.49 y 2.75 respectivamente ($p < 0.001$; Figura 19).

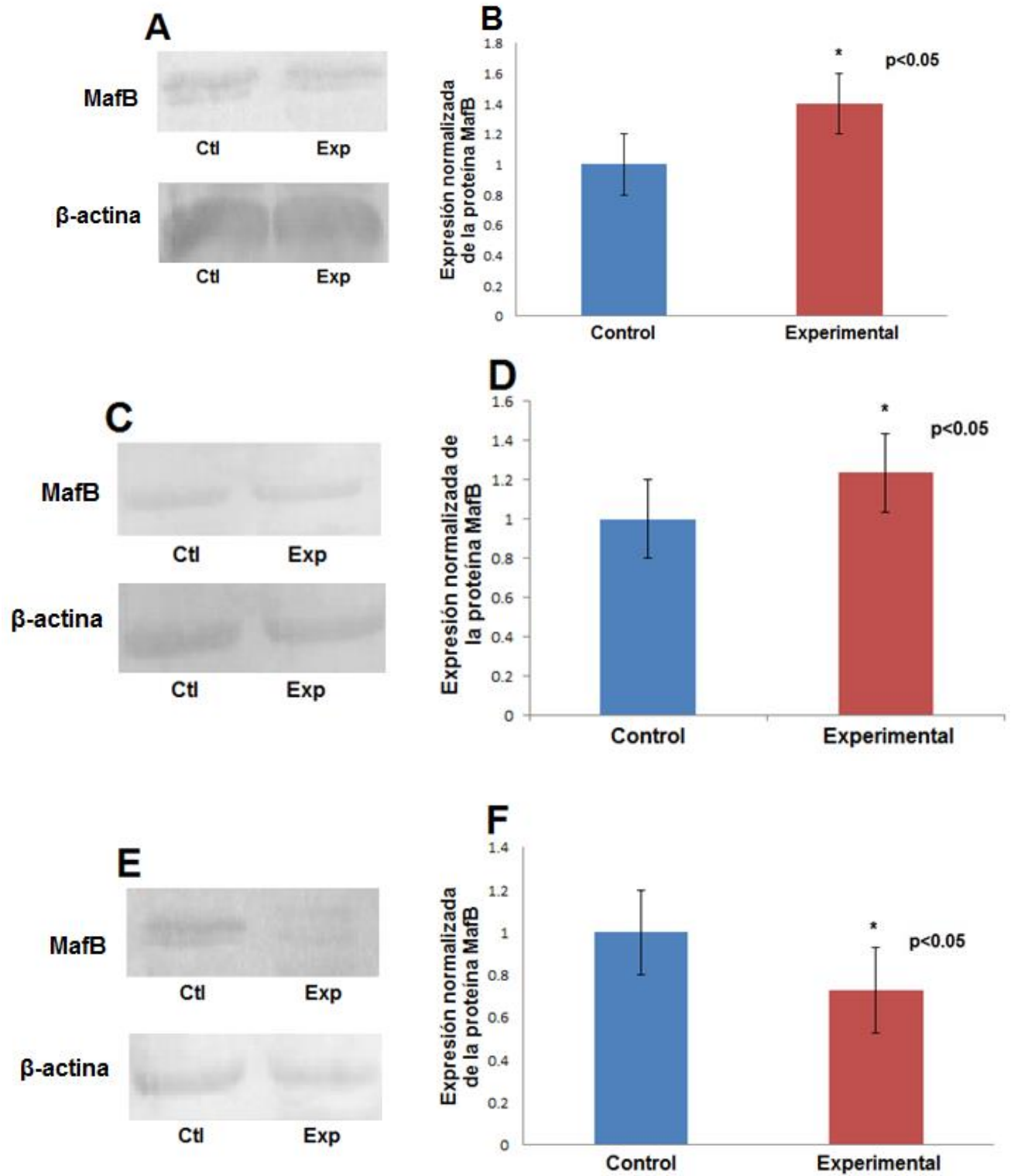


Figura 19. Modificaciones de la expresión de MafB en crías de 20, 28 y 90 días. (A) Western Blot correspondiente a MafB. (B) Normalización de la expresión de la proteína de MafB

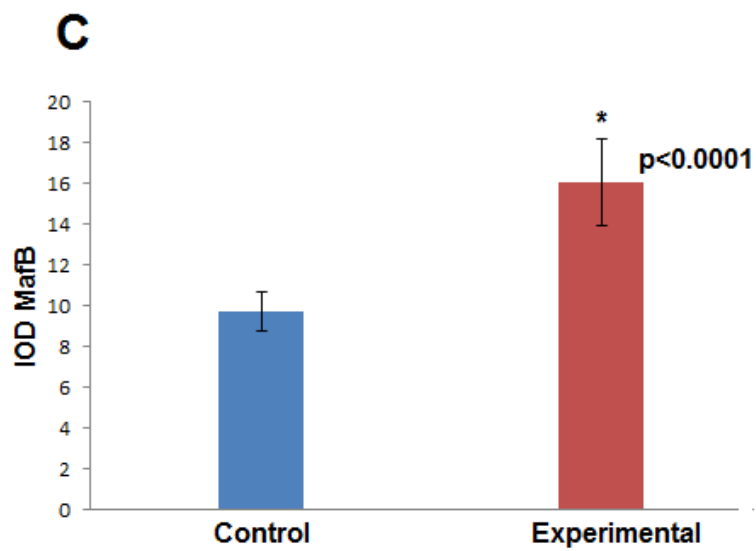
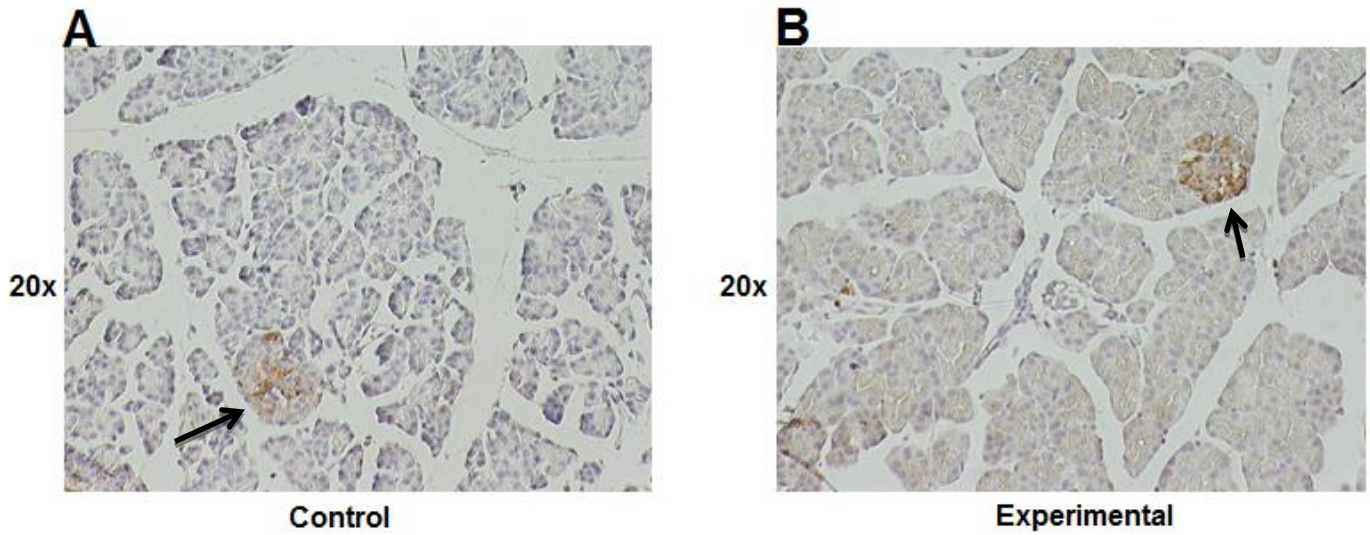


Figura 20. Modificaciones de la expresión de MafB en crías de 20 días. (A y B) Inmunopositividad de MafB a los 20 días (C) Aumento en los niveles de expresión de Mafb comparado contra el grupo control (N=6; $p \leq 0.01$).

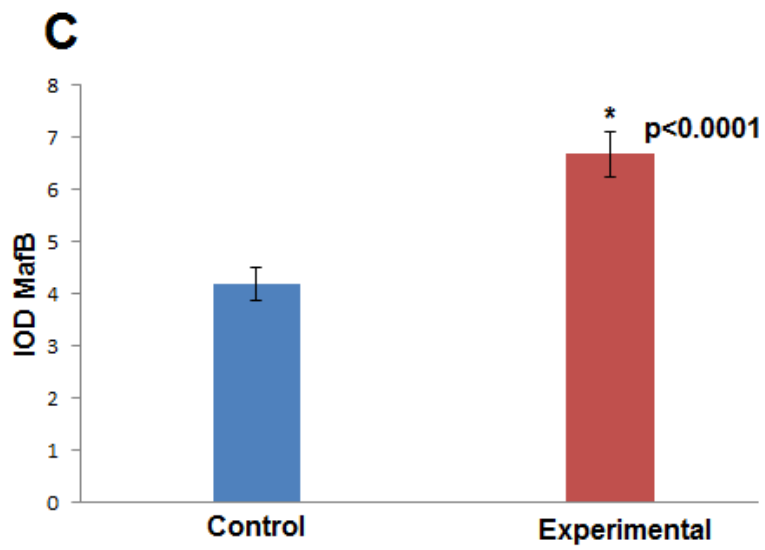
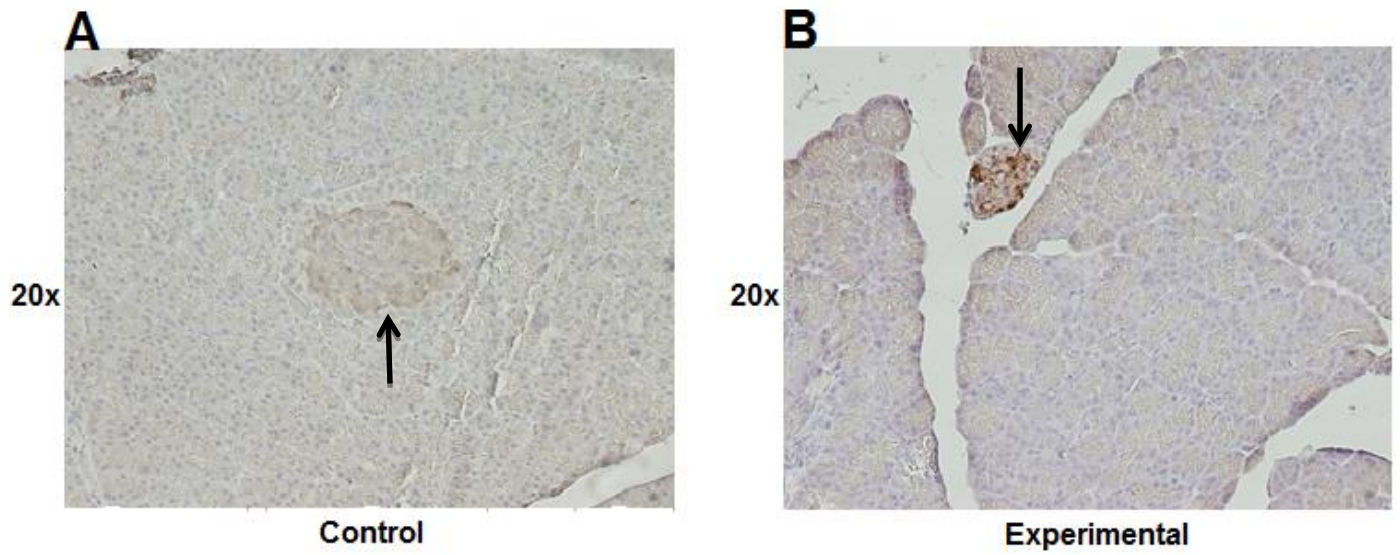


Figura 21. Modificaciones de la expresión de MafB en crías de 28 días. (A y B) Inmunopositividad de MafB a los 28 días (C) Aumento en los niveles de expresión de Mafb comparado contra el grupo control (N=6; $p < 0.05$).



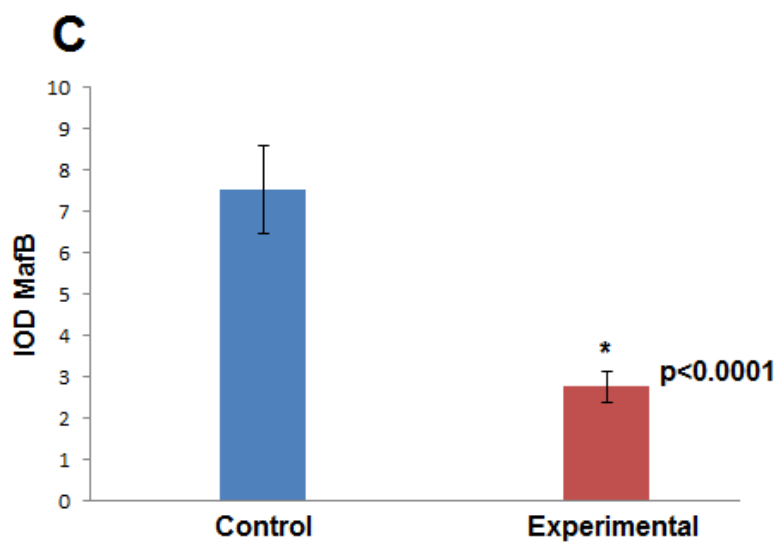
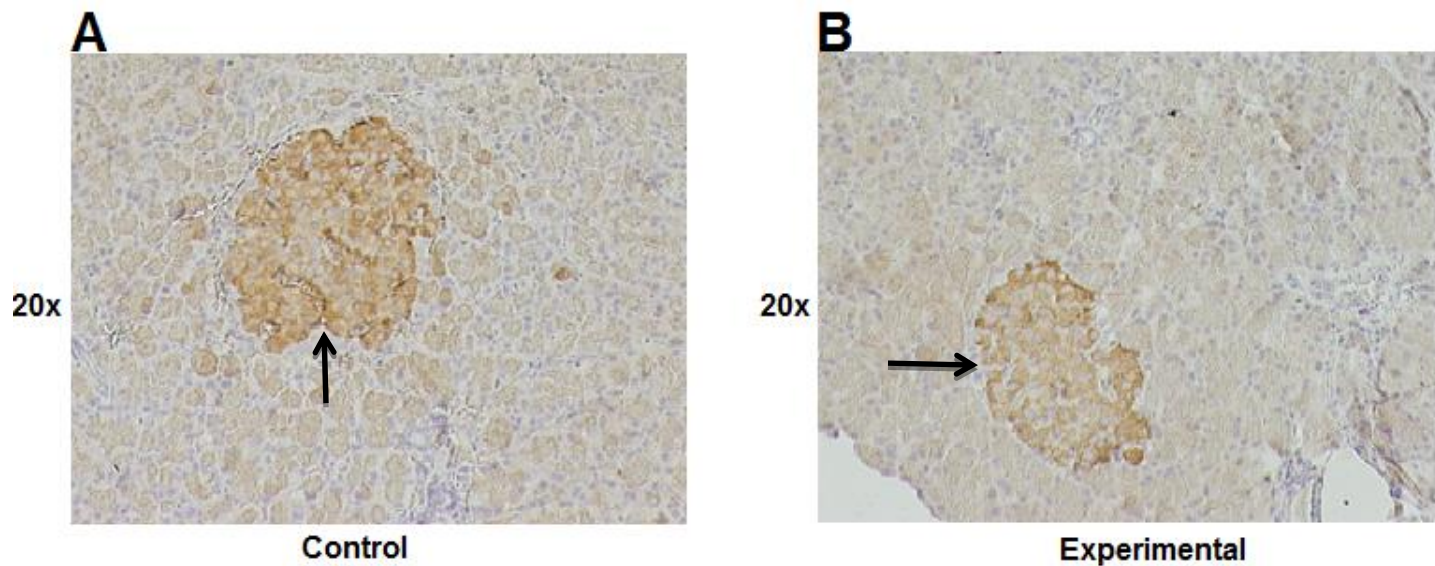


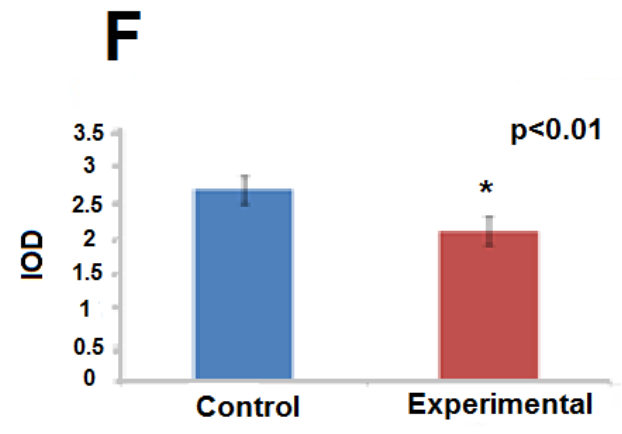
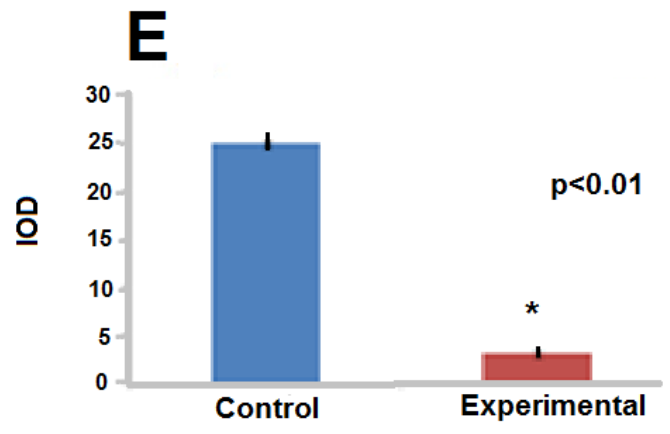
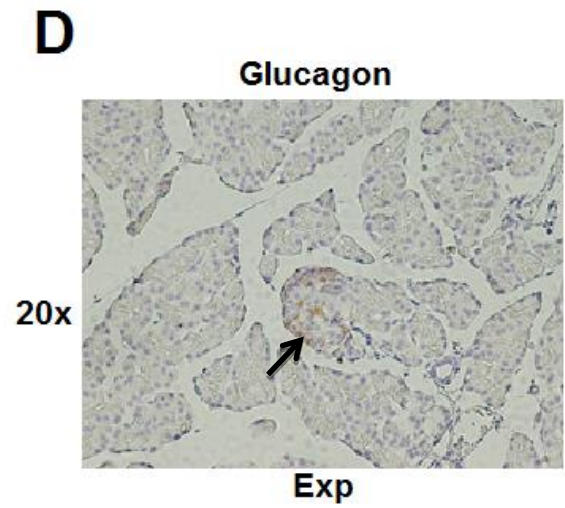
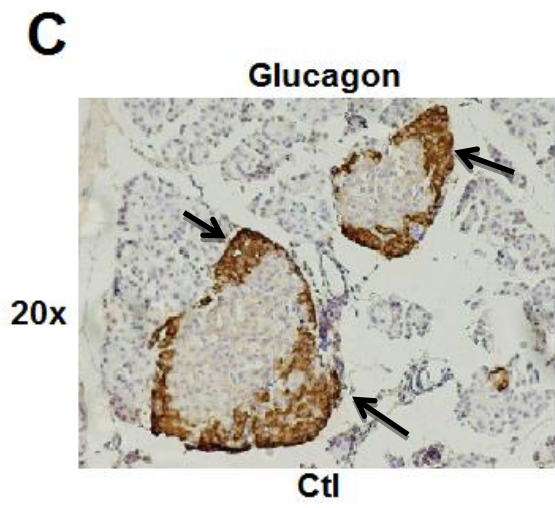
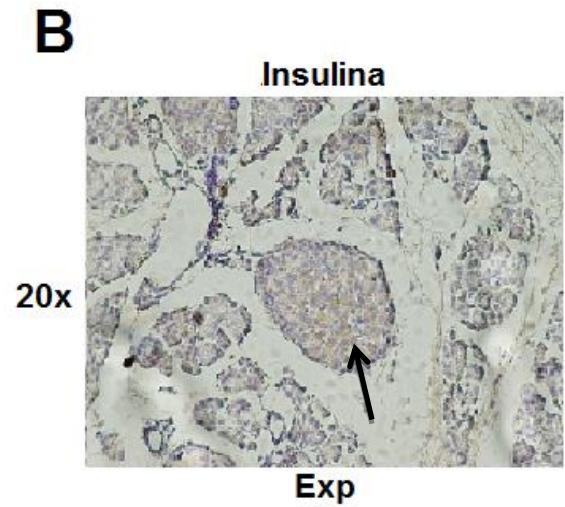
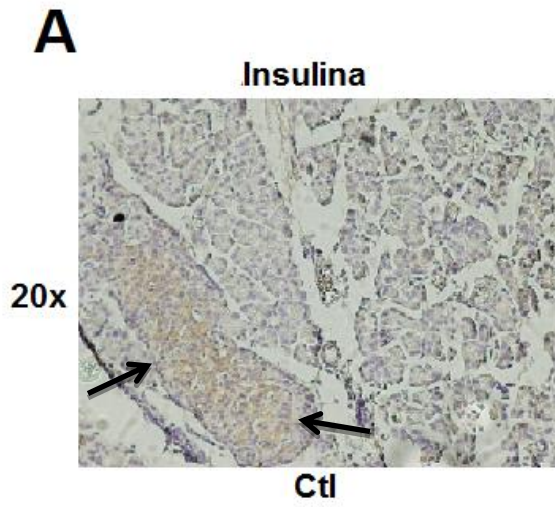
Figura 22. Modificaciones de la expresión de MafB en crías de 90 días. (A y B) Inmunopositividad de MafB a los 90 días (C) Disminución en los niveles de expresión de Mafb comparado contra el grupo control (N=6; $p \leq 0.001$).

12.10 Expresión de insulina y glucagon en crías de 20, 28 y 90 días

A los datos obtenidos por medio inmunohistoquímica en los grupos controles y experimentales en la expresión de insulina y glucagon en crías de 20, 28 y 90 días se les realizó el análisis de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, se obtuvo una $p < 0.01$ (Z), este resultado indicó que los valores obtenidos no presentaron distribución normal.

Los resultados de la expresión de insulina en grupos controles fueron en promedio de 2.62, 5.73 y 4.17 en crías de 20, 28 y 90 días respectivamente. En el grupo experimental se obtuvieron 2.11, 4.22 y 10.95 en crías de 20, 28 y 90 días respectivamente. Para todos los tiempos se obtuvieron diferencias significativas con una $p < 0.01$ para 20 y 90 días y con una $p < 0.05$ para 28 días. (Figura 22, 23 y 24. A, B y E).

Los resultados obtenidos por inmunohistoquímica de glucagon del grupo control los resultados obtenidos fueron de 24.82, 12.87 y 47.30 para 20, 28 y 90 días respectivamente. En el grupo experimental se obtuvieron datos de 3.08, 83.37 y 29.34 en 20, 28 y 90 días respectivamente, la inmunopositividad se observa en todos los casos en la periferia de los islotes. En todos los tiempos se obtuvieron resultados significativos con una $p < 0.01$. (Figura 26, 27 y 28. C, D y F).



Insulina

Glucagon

Figura 23. Expresión de insulina y de glucagon en crías de 20 días. (A y B) Inmunopositividad de insulina. (C y D) Inmunopositividad de glucagon. (E y F). El ambiente hiperglucémico disminuye los niveles de expresión de insulina y glucagon comparado contra el grupo control. (n=6; $p \leq 0.01$).

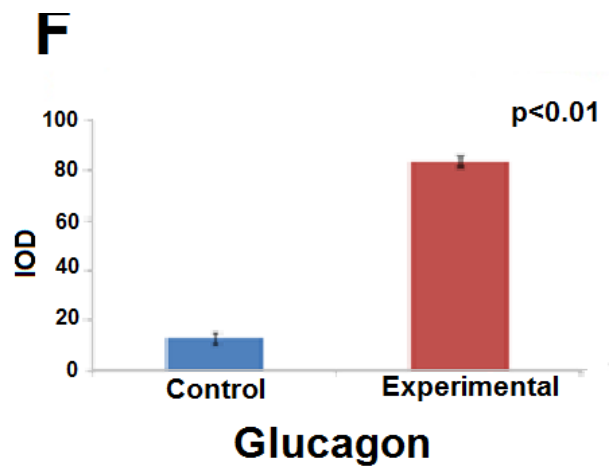
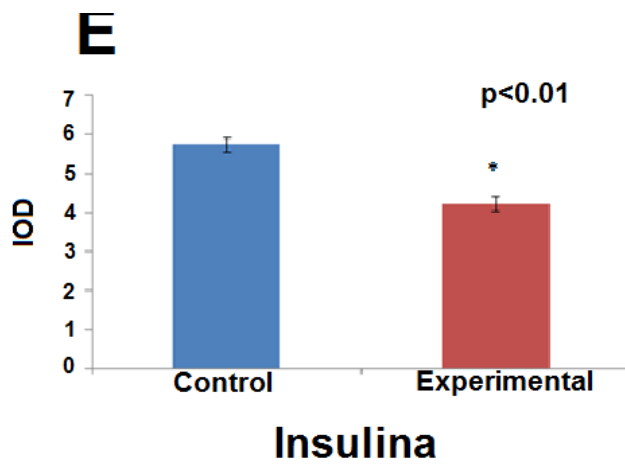
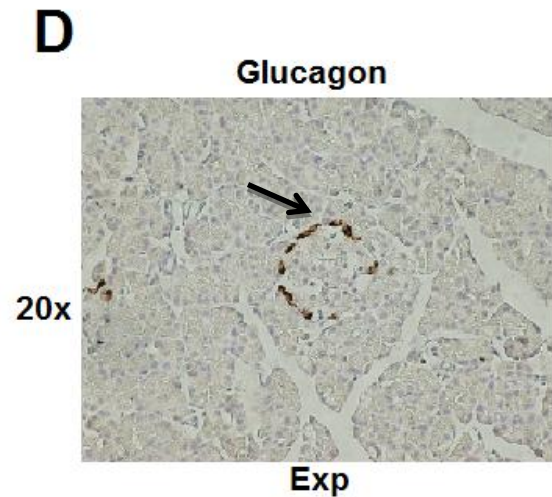
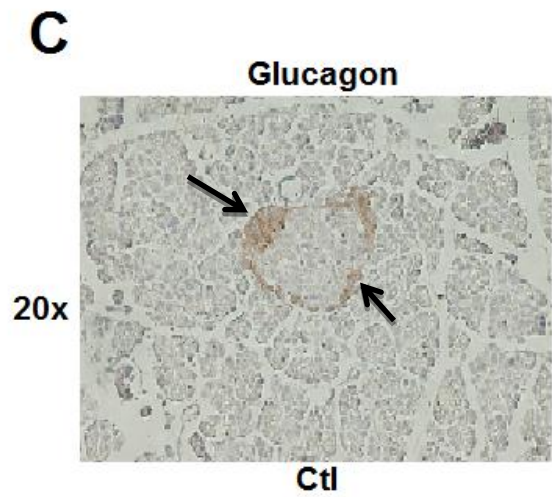
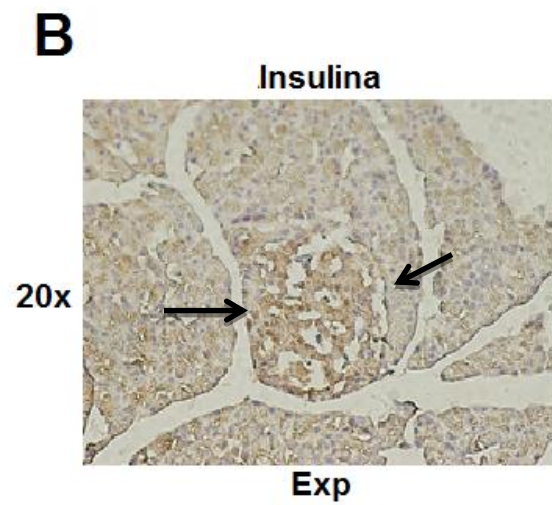
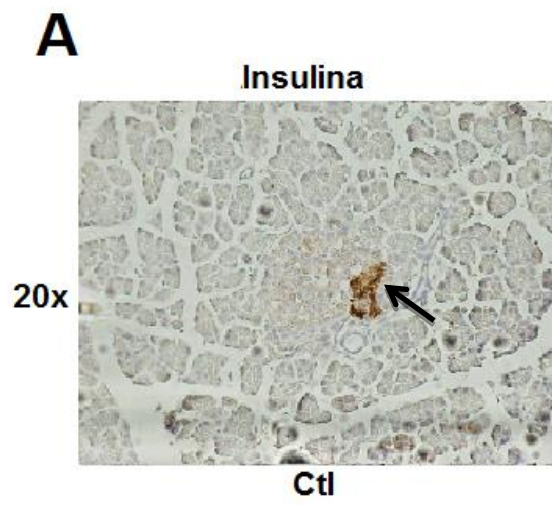
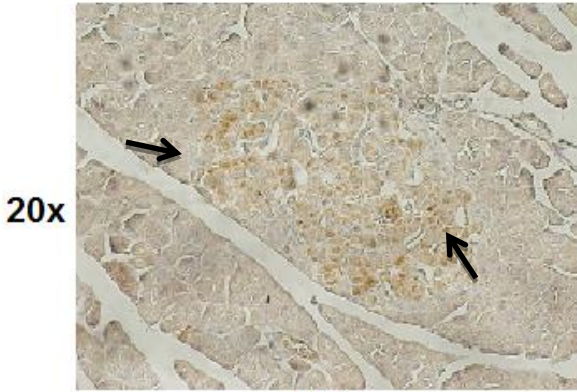
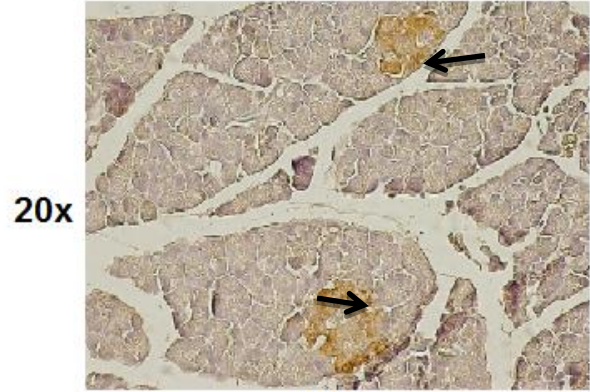


Figura 24. Expresión de insulina y glucagon en crías de 28 días. (A y B) Inmunopositividad de insulina. (C y D) Inmunopositividad de glucagon. (E y F). El ambiente hiperglucémico disminuye los niveles de expresión de insulina e incrementa los niveles de glucagon comparado contra el grupo control. (n=6; $p \leq 0.01$).

A**Insulina**

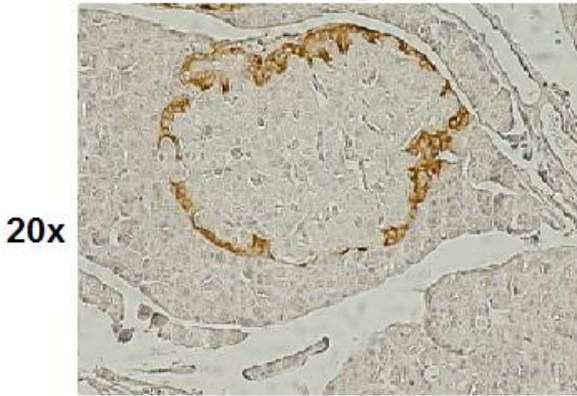
20x

Ctl

B**Insulina**

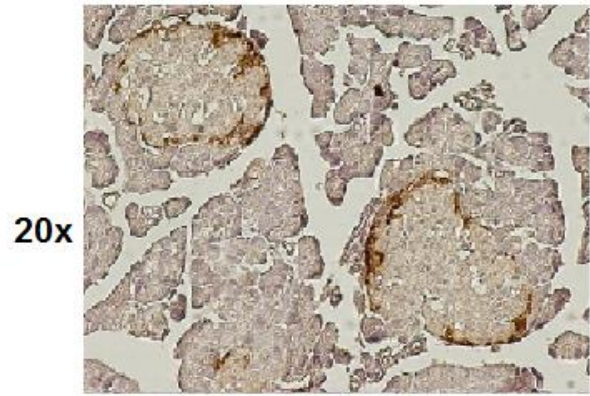
20x

Exp

C**Glucagon**

20x

Ctl

D**Glucagon**

20x

Exp

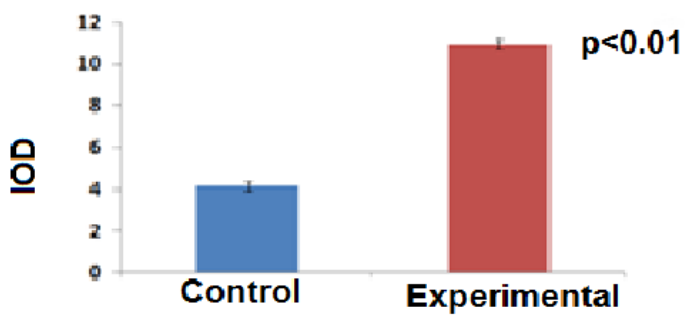
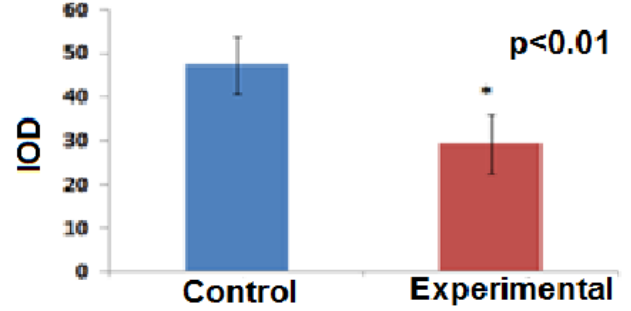
E**Insulina****F****Glucagon**

Figura 25. Expresión de insulina y glucagon en crías de 90 días. ((A y B) Inmunopositividad de insulina. (C y D) Inmunopositividad de glucagon. (E y F). El ambiente hiperglucémico incrementa los niveles de expresión de insulina y disminuye los niveles glucagon comparado contra el grupo control. (n=4; $p \leq 0.01$).

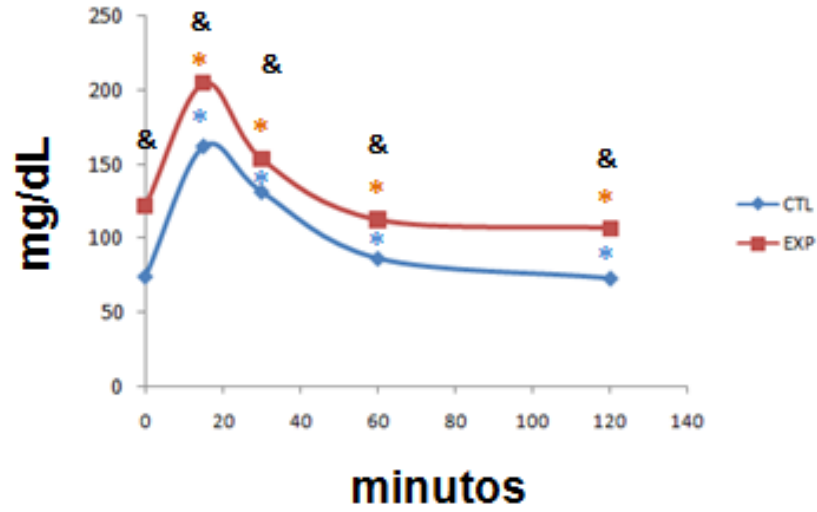
12.11 Curva de tolerancia a la glucosa

La administración de glucosa a una dosis de 2g/Kg mostró un incremento en las concentraciones del carbohidrato. El nivel máximo de glucosa se presentó a los 15 minutos después de la inyección con respecto a los niveles basales de cada grupo.

Los niveles de glucosa de crías de 28 días ratas del grupo control al tiempo cero fueron de 73 ± 0.67 mg/dL, el grupo experimental mostró un promedio de 122 ± 0.32 mg/dL, a los 15 minutos el grupo control mostró una media de 162 ± 0.25 mg/dL, en el grupo experimental fue de 204 ± 0.47 mg/dL, a los 30 minutos fueron de 131 ± 0.61 mg/dL y 153 ± 0.46 mg/dL respectivamente, a los 60 minutos fueron de 86 ± 0.81 mg/dL y 112 ± 0.72 mg/dL y a los 120 minutos mostraron un promedio de 73 ± 0.43 mg/dL y 107 ± 0.17 mg/dL ($p < 0.01$; Figura 29. A).

En las crías de 90 días del grupo control los niveles de glucosa al tiempo cero fue de 79 ± 0.33 mg/dL, el grupo experimental mostró un promedio de 112.2 ± 0.50 mg/dL, a los 15 minutos el grupo control mostró una media de 309.83 ± 0.55 mg/dL, en el grupo experimental fue de 432 ± 2.19 mg/dL, a los 30 minutos fueron de 233 ± 1.67 mg/dL y 319 ± 1.79 mg/dL respectivamente, a los 60 minutos fueron de 194 ± 1.36 mg/dL y 217 ± 1.2 mg/dL y a los 120 minutos mostraron un promedio de 115 ± 1.03 mg/dL y 148 ± 0.92 mg/dL ($p < 0.01$; Figura 29. B).

A



B

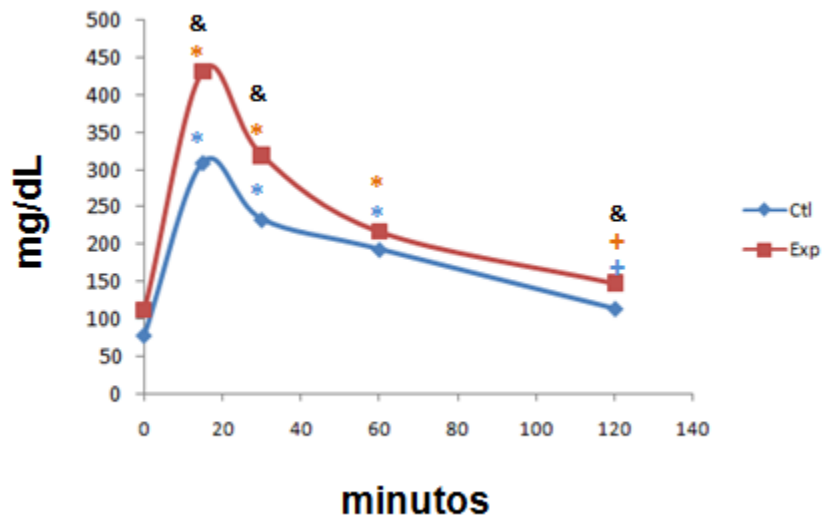


Figura 26. Curva de tolerancia a la glucosa de crías de 28 y 90 días (A y B). El desarrollo en un ambiente hiperglucémico altera el metabolismo de la glucosa en crías de 28 y 90 días (n=7). * Diferencias entre el mismo grupo comparado (*p≤0.01; +p≤0.05). & Diferencias entre grupos (&p≤0.05)

13. Discusión

La STZ es un agente inductor de diabetes experimental ampliamente usado en modelos murinos, debido a que induce un proceso necrótico y selectivo de manera específica en las células β del páncreas. Se ha demostrado que dependiendo de la dosis administrada será el grado de hiperglucemia que se presente, a dosis altas de STZ ($\geq 40\text{mg/kg}$) se induce una necrosis masiva de las células β , a dosis intermedias (35mg/kg - 40mg/kg) se desarrolla intolerancia a la glucosa similar a la que se presenta en la DT2 y finalmente a dosis bajas ($\leq 35\text{mg/kg}$) no inducen hiperglucemia crónica (Yan J, 2015; Chaudhry Z *et al*, 2013; King A, 2012; Szukudelski T *et al*, 2012).

En este estudio la administración de una dosis única de 40mg/kg de STZ se realizó el quinto día de gestación para garantizar que las alteraciones son provocadas por la hiperglucemia y no por un efecto de la STZ y así poder evaluar las alteraciones en los procesos de diferenciación y desarrollo del páncreas y en especial de las células α .

Durante la gestación ocurren diversos cambios y adaptaciones metabólicas en la madre para proveer de carbohidratos, aminoácidos y lípidos al producto durante el desarrollo, entre estas adaptaciones están los cambios en la sensibilidad y secreción de la insulina e incremento en la masa de las células β , cambios que se dan por la síntesis de la prolactina y del lactógeno placentario. Durante la gestación en condiciones normales, la síntesis de citocinas proinflamatorias van a dar como resultado un incremento en los niveles de glucosa durante este estado, todas estas modificaciones permiten el desarrollo normal de los embriones y fetos (LeivaA *et al*, 2011; Yessoufou A *et al*, 2011; Ballas J *et al*, 2012).

Diversos estudios clínicos y experimentales han demostrado que el desarrollo en un ambiente hiperglucémico *in utero* puede inducir diferentes alteraciones en embriones y fetos, tales como: malformaciones, retraso en el desarrollo en diferentes órganos de los fetos, así como, incremento en la susceptibilidad para que en la vida post-natal adulta la descendencia desarrolle obesidad, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Leiva A *et al*, 2011; Yessoufou A *et al*, 2011; Ballas J *et al*, 2012; Green AS *et al*, 2010; Ornoy A *et al*, 2015; Kim C, 2014; Pettitt DJ *et al*, 1988).

Los estudios realizados en modelos animales han contribuido a elucidar algunos de los mecanismos de acción que participan en la diferenciación y desarrollo de las células y tejidos de los embriones y de los fetos, lo que permite identificar algunas de las alteraciones provocadas por la hiperglucemia *in utero*, que incrementan el riesgo de presentar malformaciones y muerte fetal. Se ha demostrado que las concentraciones elevadas de glucosa incrementan los niveles de ROS y el estrés oxidativo, debido a que los tejidos fetales pierden la capacidad de sintetizar antioxidantes, lo que induce una disminución en las concentraciones de lípidos en las membranas, incrementa el metabolismo aeróbico, provoca disfunción mitocondrial, incrementa la fosforilación oxidativa mitocondrial, provoca daño al DNA y activa vías de señalización apoptóticas. Estas alteraciones ocasionan cambios a nivel epigenético debido a que es la interface entre el ambiente y la expresión de genes, posteriormente ocasionarán cambios a nivel genético (Dhanasekaran *N et al*, 1999; Reece *EA et al.*, 2002; Ornoy *A et al.*, 2009; Pavlinkova *G et al*, 2009; Ballas *J et al*, 2012; Pettitt *DJ et al*, 1988).

En este estudio se demostró que el desarrollo en un ambiente hiperglucémico severo, provocó la prolongación de la gestación como un mecanismo de compensación para completar el desarrollo, una reducción del número de fetos por camada y el medio adverso en el que se desarrollan y en algunas ratas provocó reabsorciones. Aunado a ello, los fetos y las crías presentaron menor peso y talla que el de los controles. Los fetos que lograron llegar a término, fueron animales pequeños. El peso del páncreas de las crías que se desarrollaron en un ambiente hiperglucémico fue de menor peso.

En la diabetes materna, los fetos están sometidos de manera constante a altos niveles de glucosa, lo cual provoca cambios adaptativos en el metabolismo de los fetos para poder sobrevivir al ambiente hiperglucémico *in utero* en el que se desarrollan. Las adaptaciones metabólicas que desarrollan van a repercutir en su vida post-natal.

Se ha demostrado que el desarrollo en un ambiente hiperglucémico en los islotes de Langerhans se presenta una hipertrofia de células endócrinas, hiperplasia de células β y un incremento en la biosíntesis de insulina. Estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran claramente que la respuesta a insulina en fetos se incrementa de manera proporcional al grado de hiperglucemia *in utero* dando como resultado una hiperinsulinemia (Aerts *L et al*, 1990; 2006; Kervran *A et al*, 1978).

El incremento en el metabolismo de ácidos grasos, colesterol y de glucosa en combinación con las adaptaciones antes descritas en una hiperglucemia moderada estimulan el anabolismo de los fetos dando origen a neonatos macrosómicos. Con niveles altos de glucosa, como los inducidos en este estudio, las células β sufren hiperplasia y posteriormente una desorganización funcional, dando paso de una hiperinsulinemia a una hipoinsulinemia, provocando una disminución en el anabolismo e incrementando procesos catabólicos obteniéndose neonatos microsómicos como los obtenidos en el presente estudio (Aerts L *et al*, 2006; Huynh J *et al*, 2014; Marseille TC *et al*, 2008; Khan NA *et al*, 2007; Clausen TD *et al*, 2009; Magnusson AL *et al*, 2004; Fig.1.).

Los factores genéticos y ambientales son fundamentales para el desarrollo del embrión y del feto, sin embargo, son escasos los estudios que describen las alteraciones ocasionadas a nivel molecular derivadas de la diabetes materna. Recientemente se ha reportado que la diabetes materna altera la expresión de los genes involucrados en el desarrollo, resultando en una morfogénesis anormal o una embriopatía. La hiperglucemia materna disminuye la expresión del factor de transcripción Pax3, el cual está involucrado en el desarrollo del tubo neural y la alteración en la expresión, propicia defectos en esta estructura durante el desarrollo. Se ha demostrado que la desregulación de Pax3 es debido al incremento del estrés oxidativo. Pavlinkova *et al* (2008) han demostrado que la vía de señalización de Wnt es afectada por la exposición a la diabetes materna, lo que demuestra que la hiperglucemia *in utero* altera la expresión de moléculas que juegan un papel fundamental en el desarrollo de diversos órganos y tejidos, lo que trae como consecuencia una alteración en la regulación transcripcional en el embrión y en el feto. Estos mismos estudios confirmaron que la hiperglucemia altera los niveles de expresión de los factores de transcripción y de los genes involucrados en el desarrollo, este fenómeno es debido al incremento de ROS que se genera en el ambiente intrauterino en la diabetes materna (Pavlinkova G *et al*, 2009; Wyman A *et al*, 2008; Ornoy A *et al*, 2015; Epstein DJ *et al*, 1991, 1993; Morgan SC *et al*, 2008; Pavlinkova G *et al*, 2008).

En este estudio se describen por primera vez, las alteraciones que provoca la hiperglucemia *in utero* en la maduración y función de las células α , una de las principales células que participa en la regulación de las concentraciones de glucosa. El factor de transcripción MafB se expresa en cerebro, placenta y páncreas; sin embargo, hay evidencia suficiente que demuestra que este factor de transcripción tiene un mayor nivel de expresión

en la placenta y que en el páncreas esta proteína se expresa exclusivamente en las células α después del nacimiento, por tal motivo se utilizó el tejido placentar y las proteínas totales de placenta como control positivo para la identificación del factor de transcripción por medio de inmunohistoquímicas y western blot.

El factor de transcripción MafB participa en procesos de segmentación del cerebro, es esencial para la diferenciación de los podocitos y el desarrollo glomerular y de la placenta, también juega un papel importante durante la diferenciación y desarrollo del páncreas. Los estudios del grupo de investigación de Yan Hang *et al* (2011) han revelado que MafB se puede detectar tanto en células α y células β durante la fase temprana del desarrollo del páncreas, después del nacimiento este factor desaparece de las células β y se convierte en un factor específico de las células α en los islotes maduros. MafB se expresa alrededor de E10.5 en el epitelio pancreático, la presencia de este factor es esencial para la producción de células insulina⁺ y glucagon⁺ durante la primera y segunda transición del páncreas. Después de E13.5 la expresión de MafB en células insulina⁺ comienza a disminuir hasta que se sólo se expresa en células glucagon⁺; esto debido a que MafB da lugar a la expresión de MafA, un factor importante en la maduración de las células β y en la expresión del gen de insulina. Estos dos factores de transcripción se expresan de manera dinámica como se muestra en la figura 6.

En el presente estudio, se evaluó por primera vez en diferentes tiempos fetales y en distintas edades post-natales, cómo el desarrollo en un ambiente hiperglucémico *in utero*, afecta la diferenciación y maduración de las células α . En nuestro trabajo, la disminución en los niveles de MafB al inicio de la isletogénesis (E17), puede deberse a que durante el desarrollo en un ambiente hiperglucémico se induce un retraso en la diferenciación y desarrollo de este tipo celular, el cual se presentó como un mecanismo de compensación para llevar a cabo la diferenciación. Al final del proceso de isletogénesis (E21) el aumento en la expresión de MafB, puede deberse a mecanismos de compensación por la exposición a concentraciones elevadas de glucosa y así contrarrestar los efectos del ambiente intrauterino aunado a la co-expresión de este factor en células insulina⁺, como se muestra en la Figura 26.

Los resultados en el día 20 y 28 PN revelan un aumento en la expresión de MafB en el grupo experimental. A los 20 días PN, es de esperarse que este factor mantenga niveles elevados de expresión, puesto que aún se sigue

expresando en células insulina⁺ junto a MafA, aunque en menor proporción, y no hay que dejar de tomar en cuenta el retraso en el desarrollo del páncreas, que también puede influir en estos niveles de expresión. Mientras que en 28 PN, podemos decir que el aumento en la expresión de MafB en el grupo experimental, es debido, en parte, al retraso que provoca el ambiente en niveles altos de glucosa en que se desarrolló la cría. Pero si comparamos el valor de la expresión en este tiempo en el Wb (11.49 INT/mm²) con los valores obtenidos en 20 PN de la misma prueba (16.06 INT/mm²), podemos observar que en 28 PN hay menos expresión de MafB y esto lo podemos apoyar con que después de la segunda semana después del nacimiento, la expresión de MafB se limita sólo a la célula α y aunado a ello, en los dos tiempos, podemos considerar que el aumento en los niveles de expresión, también va de la mano con lo que reporta el grupo de trabajo de Philip E. (2012), donde mencionan que el desarrollo en un ambiente hiperglucémico la síntesis del glucagón se ve afectada, lo que lleva a un aumento de esta hormona peptídica, pero también hay que considerar la posibilidad que los factores de transcripción Brn4 y Pax6 también pueden tener alteraciones en su expresión, que junto con la de MafB pueden repercutir en la expresión de glucagón. En 90 PN, se observó una disminución de la expresión de MafB, debido a que en este tiempo, la expresión de este factor, sólo se limita a la célula α .

Como ya se mencionó con la hiperglucemia materna el feto lleva a cabo modificaciones metabólicas para poder adaptarse a las condiciones adversas a las que se expone en el ambiente intrauterino. Algunas de estas adaptaciones en la hiperglucemia severa es una prematura actividad en la síntesis y secreción de insulina, seguida de una hipoactividad de las células β , una exacerbación en la actividad catabólica y el desarrollo de neonatos microsómicos. Además de las alteraciones anteriormente descritas, hay que agregar los datos del presente trabajo que por primera vez se describen en etapas fetales, y con lo cual demostramos que las células α también presentan adaptaciones que alteran su desarrollo (Quesada I *et al*, 2008; Artner I *et al*, 2006; Gosmain Y *et al*, 2011; Green AS *et al*, 2010; Simmons Ret *al*, 2001; Fig. 20).

Todas las modificaciones y adaptaciones metabólicas en el desarrollo, inducen una reprogramación en el feto como un mecanismo de adaptación a la hiperglucemia *in utero*, estas modificaciones se dan a nivel genético, epigenético y en la expresión de factores de transcripción, que van a repercutir

en la vida adulta, ésto es debido al desarrollo de una memoria metabólica que trae como consecuencia alteraciones de manera directa en la expresión de Brn4 y en la fisiología de la célula α pancreática en diferentes tiempos post-natales como se demuestra en este estudio (Yessoufou A *et al*, 2011; Ornoy A *et al*, 2015; Pavlinkova G *et al*, 2009).

Datos previos de nuestra línea de investigación y los del presente estudio demostraron que las condiciones hiperglucémicas *in utero* promueven alteraciones morfológicas y funcionales de los islotes de Langerhans. Por primera vez demostramos alteraciones en la expresión del factor de transcripción MafB, las cuales repercuten en alteraciones en la maduración y función de las células α .

El glucagon y la insulina son las principales hormonas peptídicas que regulan el metabolismo de la glucosa. El glucagon es un regulador de la homeostasis de la glucosa, que actúa en respuesta en condiciones de hipoglucemia por acción de la insulina y en estados de ayuno severo, su síntesis se debe a la reacción enzimática de la prohormona convertasa 2 para dar lugar al glucagon a partir de la molécula del proglucagon. Posteriormente la hormona es liberada a la vena portal hepática en donde actúa directamente en los receptores acoplados a las proteínas G (GPCR) del hígado para estimular la secreción de glucosa a partir de la glucogenolisis, así como, la síntesis *de novo* de glucosa a partir de precursores como el lactato, aminoácidos y el glicerol a través de la gluconeogénesis, también el glucagon participa en los procesos de cetogénesis y en la oxidación de ácidos grasos. Por otro lado las células β son las encargadas de la síntesis de insulina, la cual disminuye los niveles de glucosa, esta hormona es anabólica por excelencia debido a que en un estado postprandial incrementa la captación de glucosa en los tejidos, promueve la glucogenogénesis en el hígado, inhibe la secreción de glucagon y promueve la síntesis y almacenamiento de ácidos grasos y triglicéridos (Aronoff SL *et al*, 20014; Quesada I *et al*, 2008; Rorsman NJG *et al*, 2014).

En nuestro modelo de hiperglucemia severa, durante el desarrollo, en E17 la señal de insulina (IOD=3) y la señal para glucagon (IOD=4.5) son significativamente menores ($p<0.01$). Posteriormente en E21, la señal de insulina (IOD=30) y de glucagon (IOD=12) son significativamente mayores, mostrando un efecto contrario al observado en el día E17. En ambos grupos presentan un incremento significativo en los niveles de glucosa sanguínea. Estas modificaciones dan paso a una hiperglucagonemia, siendo una evidencia

clara de la alteración en la célula α en este periodo fetal, tales como un incremento en el catabolismo del feto, obteniendo neonatos pequeños, así como alteraciones en la expresión de los factores de transcripción encargados de la expresión de glucagon ($p < 0.01$; Aronoff SL *et al*, 20014; Quesada I *et al*, 2008; Rorsman NJG *et al*, 2014; Aerts L *et al*, 1990; 2006; Kervran A S, L *et al*, 1978; Fig.1.).

La expresión de insulina (IOD=3) y de glucagon (IOD=2) en crías de 20 días que se desarrollaron en un ambiente hiperglucémico, mostraron una disminución significativa ($p < 0.01$). Los niveles de expresión de insulina (IOD=4) en crías de 28 días fue significativamente menor en el grupo experimental, y la expresión de glucagon (IOD=80) aumentó significativamente, dando como resultado una sobreexpresión de glucagon, evidenciando una alteración de la célula α . Estas alteraciones en la célula α también se ven reflejadas con los niveles elevados de glucosa basal del grupo experimental después de un ayuno de 12 horas. La prueba de tolerancia a la glucosa demostró que estas crías presentan resistencia a la insulina y por ende una alteración en el metabolismo de la glucosa ($p < 0.01$; Aronoff SL *et al*, 2014; Quesada I *et al*, 2008; Rorsman NJG *et al*, 2014; Fig. 28).

Finalmente en crías experimentales de 90 días, la señal de insulina (IOD=11) presentó un aumento significativo en sus niveles de expresión y la señal de glucagon (IOD=30) mostró disminución en su expresión, indicando una disminución en la actividad de la célula α . Sin embargo, las crías que se desarrollaron en un ambiente hiperglucémico demostraron en la prueba de la tolerancia a la glucosa tener resistencia a la insulina y alteraciones en el metabolismo de la glucosa ($p < 0.01$; Fig. 28.).

Los cambios en la expresión de glucagon en las células α y las alteraciones en la prueba de tolerancia a la glucosa son adaptaciones y tienen como finalidad regular la homeostasis de la glucosa de las crías que en el desarrollo fetal estuvieron expuestas a condiciones hiperglucémicas. Aerts *et al* 1990, reportaron que los grupos que se desarrollaron en un ambiente intrauterino con niveles severos de glucosa, mostraron alteración en el metabolismo de este carbohidrato en etapas post-natales y adaptaciones en la célula β (Fig.1.)

En este estudio se reporta por primera vez, las alteraciones a nivel molecular y fisiológicas que presenta la célula α al ser expuestas a

concentraciones elevadas de glucosa durante el desarrollo *in utero* en etapas post-natales. (Aronoff SL *et al*, 20014; Quesada I *et al*, 2008; Rorsman NJG *et al*, 2014; Aerts L *et al*, 1990).

14. Conclusiones

El desarrollo en un ambiente hiperglucémico severo:

- Disminuye el peso y la talla de los fetos de 17 y 21 días
- Disminuye el peso, la talla y el peso del páncreas en crías de 20, 28 y 90 días
- Disminuyen los niveles de expresión de MafB en E17 ($p \leq 0.01$).
- Aumentan los niveles de expresión de MafB en E21 ($p \leq 0.05$).
- Aumentan los niveles de expresión de MafB en crías de 20 días ($p \leq 0.001$).
- Aumentan los niveles de expresión de MafB en crías de 28 días ($p \leq 0.05$).
- Disminuye los niveles de expresión de MafB en crías de 90 días ($p \leq 0.001$).
- Disminuye la expresión de insulina y glucagon en fetos de 17 días ($p \leq 0.01$).
- Aumenta la expresión de insulina y glucagon en fetos de 21 días ($p \leq 0.01$).
- Disminuye la expresión de insulina y glucagon en crías de 20 días ($p \leq 0.01$).
- Disminuye la expresión de insulina y aumenta la expresión de glucagon en crías de 28 días ($p \leq 0.01$).
- Aumenta la expresión de insulina y disminuye la expresión de glucagon en crías de 90 días ($p \leq 0.01$).
- En crías de 28 y 90 días presentan una intolerancia la glucosa.

15. Bibliografía

- Aerts, L., Holemans, K., & Van Assche, F. A. (1990). Maternal diabetes during pregnancy: Consequence for the offspring. *Diab.Metab. Rev.*, 6: 147–167.
- Aerts, L., Van Assache F. A. (2006). Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 38: 894-903.
- American Diabetes Association (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 27 (Suppl. 1): 35: S64-S71.
- American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations (2004). *Diabetes Care* 27 (Suppl. 1):S1–S150, 2004.
- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B., Want, L. Glucose Metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectrum*. 17(3): 183-190.
- Artner, I., Lay, J. L., Hang, Y., Elghazi, L., Schisler, J. C., Henderson, E., Sosa-Pinea, B., Stein, R. (2006). MafB An activator of the glucagon gene expressed in developing islet α and β cells. *Diabetes*. 55: 297-304.
- Ballas, J., Moore, T. R., Ramos, G. A. (2012). Management of diabetes in pregnancy. *Curr Diab Rep*. 12:33-42.
- Best RM, Chakravarthy U. (1997). Diabetic retinopathy in pregnancy. *Br. J. Ophthalmol*. 81:249–251.
- BinZhao, Li Li, Lloyd Wang, Cun-Yu Wang, JindanYu, and Kun-LiangGuan. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes & Development* 26:54-68, 2012 by Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bolli GB, Di Marchi RD, Park GD, Pramming S, Koivisto VA: Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus. *Diabetologia* 42:1151–1167, 1999.
- Bonal, C., & Herrera, P. L. (2008). Genes controlling pancreas ontogeny. *The International journal of developmental biology*, 52(7), 823–35. doi:10.1387/ijdb.072444cb.

- Bonal, C., Herrera, P. L. (2008). Genes Controlling pancreas ontogeny. *Int J. Dev. Biol.* 52: 823-835.
- Bramswig N, Kaestner K. (2014). Transcriptional and epigenetic regulation in human islets. *Diabetologia.* 57: 451-454.
- Bramswig, N. C., Kaestner, K. H. (2011). Transcriptional regulation of α -cell differentiation. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 13: 13-20.
- Braun M, Wendt A, Buschard K, Salehi A, Sewing S, Gromada J, Rorsman P (2004) GABAB receptor activation inhibits exocytosis in
- Brown GK (2000). Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J Inherit Metab Dis* 23:237-246.
- Castrejón V, Carbó R (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la Glucosa. Instituto Nacional de Cardiología, Departamento de Fisiología, *REB* 26(2):49-57
- Cecil M. Benitez, William R. Goodyer and Seung K. Kim. (2012) Deconstructing pancreas developmental biology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; doi: 10.1101.
- Chaudhry, Z., Morris, D. L., Moss, D. R. (2013). Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice. *Laboratory Animals.* 47(4): 257-265.
- Chew EY, Mills JL, Metzger BE, et al. (1995). Metabolic control and progression of retinopathy. The Diabetes in Early Pregnancy Study. National Institute of Child Health and Human Development Diabetes in Early Pregnancy Study. *Diabetes care* 18:631-637.
- Cho, G., Lim, Y., Cho, I. T., Simonet, J. C., Golden, J. A. (2014). Arx together with FoxA2, regulates Shh floor plate expression. *Developmental Biology.* 393: 137-148.
- Christensen, M., Bagger, J. I., Vilsbøll, T., & Knop, F. K. (2011). The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy. *The review of diabetic studies: RDS*, 8(3), 369-81. doi:10.1900/RDS.2011.8.369.
- Cianni G, Micolli R, Volpe L, Lencioni C, Prato D. (2003). Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes and Metabolism Reviews.* 19(4).259-270.
- Claire Bonal and Pedro L. Herrera. Genes controlling pancreas ontogeny. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 823-835 (2008); doi: 10.1387/ijdb.072444cb.

- Clausen, T. D., Mathiesen, E. R., Hansen, T., Damm, P. (2009). Overweight and the Metabolic Syndrome in Adult Offspring of Women with Diet-Treated Gestational Diabetes Mellitus or Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 94(7): 2464-2470.
- Colasante, G., Simonet, J. C., Calogero, R., Crispi S., Sessa, A., Cho, G., Golden, J. A., Broccoli, V. (2013). Arx regulates cortical intermediate progenitor cell expansion and upper layer neuron formation through repression of cdkn1c. *Cerebral Cortex.* 1-14.
- Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sorensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G., & Gruss, P. (2003). Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes & development*, 17(20), 2591–603. doi:10.1101/gad.269003.
- Cooper GJS, Willis AC, Clark A, Turner RD, Sim RB, Reid KB. (1987). Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreas of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8628–8632.
- Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS, Robinson JS. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2005;352:2477–2486.
- Dames, P., Puff, R., Weise, M., Parthofer, K. G., Göke, B., Götz M., Graw, J., Favor, J., Lechner A. (2010). Relative roles of the different Pax6 domains for pancreatic alpha cell development. *BMC Development Biology.* 10: 39.
- Dhanasekaran, N., Wu YK, Reece, E. A. (1999). Signaling pathways and diabetic embryopathy. *Semin Reprod Endocrinol* 17:167–174.
- Dhawan, S., Georgia, S., Tschén, S., Fan, G., Bhushan, A. (2011). Pancreatic β cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx. *Developmental Cell.* 20: 419-429.
- Diabetes, D. O. F. (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 35 Suppl 1, S64–71. doi:10.2337/dc12-s064.
- Du, A., McCracken, K. W., Walp, E., Terry, N. A., May, C. L. (2012). Arx is required for normal enteroendocrine cell development in mice and humans. *Dev Biol.* 365(1): 175-188.
- Epstein, D. J, Vekemans, M., Gros, P. (1991). Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell.* 67(4):767-774.

- Epstein, D. J., Vogan, K. J., Trasler, D. G., Gros P. (1993). A mutation within intron 3 of the Pax-3 gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the splotch (Sp) mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(2):532-536.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 20:1183–1197.
- Fernández-Morera, J. L., Rodríguez-Rodero, S., Menéndez-Torre, E., & Fraga, M. F. (2010). The possible role of epigenetics in gestational diabetes: cause, [doi:10.1155/2010/605163](https://doi.org/10.1155/2010/605163).
- Fetita, L.-S., Sobngwi, E., Serradas, P., Calvo, F., & Gautier, J.-F. (2006). Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(10), 3718–24. [doi:10.1210/jc.2006-0624](https://doi.org/10.1210/jc.2006-0624).
- Fineman MS, Giotta MP, Thompson RG, Kolterman OG, Koda JE. (1996). Amylin response following Sustacal ingestion is diminished in type II diabetic patients treated with insulin (Abstract). *Diabetologia* 39 (Suppl.1):A149.
- Franklin IK, Wollheim CB 2004 GABA in the endocrine pancreas: its putative role as an islet cell paracrine-signalling molecule.
- Friocourt, G., Kanatani, S., Tabato H., Parnavelas, J. G. (2008). Cell-Autonomous roles of ARX in cell proliferation and neuronal migration during corticogenesis. *The Journal of Neuroscience*. 28(22): 5794-5805.
- Fulp, C. T., Cho, G., Marsh, E. D., Golden, J. A. (2008). Identification of ARX transcription targets in the developing basal forebrain. *Human Molecular Genetics*. 17(23): 3740-3760.
- George, N. M., Day, C. E., Boerner, B. P., Johnson, R. L., Sarvetnick. (2012). Hippo signaling regulates pancreas development through inactivation of Yap. *Molecular and cellular Biology*. 32(24): 5116-5128.
- Gerich JE, Schneider V, Dippe SE, Langlois M, Noacco C, Karam J, Forsham P: Characterization of the glucagon response to hypoglycemia in man. *J Clin Endocrinol Metab* 38:77–82, 1974.
- Gosmain, Y., Cheyssac, C., Heddad Masson, M., Dibner, C., Philippe, J. (2011). Glucagon gene expression in the endocrine pancreas: the role of the transcription factor Pax6 in α -cell differentiation, glucagon biosynthesis and secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 13(3): 31-38.

- Green, A. S., Rozance, P. J., & Limesand, S. W. (2010). Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. *The Journal of endocrinology*, 205(3), 211–24. doi:10.1677/JOE-09-0399.
- Green, A. S., Rozance, P. J., Limesnad, S.W. (2010). Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. *Journal of Endocrinology*. 205: 211-224.
- Grieco, F. a, Sebastiani, G., Spagnuolo, I., Patti, a, & Dotta, F. (2012). Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: how viral infections modulate beta cell function. *Clinical and experimental immunology*, 168(1), 24–9. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04556.
- Gunasekaran, U., & Gannon, M. (2011). Type 2 diabetes and the aging pancreatic beta cell. *Aging*, 3(6), 565–75. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3164365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Habener J, Stanojevic V. (2012). α -cell role in β -cell generation and regeneration.
- Hang Y., Stein R. (2011). MafA and MafB activity in pancreatic β cells. *Trends Endocrinol Metab*; 22(9): 364–373.
- Hart, A. W., Mella, S., Mendrychowski, J., Van Heyningen, V., & Kleinjan, D. a. (2013). The developmental regulator Pax6 is essential for maintenance of islet cell function in the adult mouse pancreas. *PloS one*, 8(1), e54173. doi:10.1371/journal.pone.0054173.
- Hayslett JP, Reece EA. (1987a). Effect of diabetic nephropathy on pregnancy. *Am J Kidney Dis* 9:344–349.
- Hayslett JP, Reece EA. (1987b). Managing diabetic patients with nephropathy and other vascular complications. *Bailliere's Clin Obstet Gynaecol* 1:939–954.
- Heller, R. S., Stoffers, D. A., Liu, A., Schedl, A., Crenshaw III, E. B., Madsen, O. D., Serup, P. (2004). The role of Brn4/Pou3f4 and Pax6 in forming the pancreatic glucagon cell identity. *Development Biology*. 268: 123-134.
- Hirsch IB: Type 1 diabetes mellitus and the use of flexible insulin regimens. *Am Fam Physician* 60:2343–2352, 2355–2356, 1999.

- Holland, A. M., Hale, M. a, Kagami, H., Hammer, R. E., & MacDonald, R. J. (2002). Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12236–41. doi:10.1073/pnas.192255099.
- Holst JJ: Glucagon-like peptide 1: a newly discovered gastrointestinal hormone. *Gastroenterology* 107:1848–1855, 1994.
- Hussain, M. A., Millers, C. P., Habener, J. F. (2002). Brn4 transcription factor expression targeted to the early developing mouse pancreas induces ectopic glucagon gene expression in insulin- producing β cells. *The Journal of Biology Chemistry*. 277(18): 16028-16032.
- Huynh, J., Xiong, G. (2014). A systematic review of a metabolite profiling in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*. 57: 2453-2464.
- Huynh, J., Xiong, G., Bentley-Lewis, R. (2014). A systematic review of metabolite profiling in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*. 57: 2453-2465.
- Isabella Artner, Bruno Bianchi, Jeffrey C. Raum, Min Guo, Tomomi Kaneko, Sabine Cordes, Michael Siewekw and Roland Stein (2007); MafB is required for islet β cell maturation. *PNAS*, vol.104, no.10, 3853-3858.
- Islam, S., Wilson, D. R. (2012). Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Animals Models in diabetes Research*. 933: 161-174.
- Jacqueline F. O'Dowd and Claire J. Stocker. Endocrine pancreatic development: impact of obesity and diet. *Frontiers in Physiology* (2013); doi: 10.3389/fphys.2013.00170.
- Junod, A., Lambert, A. E., Orci, L., Pictet, R., Gobet, A. E. (1967). Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 126: 201-205.
- Kelly, C., McClenaghan, N. H., & Flatt, P. R. (2011). Role of islet structure and cellular interactions in the control of insulin secretion. *Islets* 3(2), 41–47. doi:10.4161/isl.3.2.14805.
- Kervran, A., Guillaume, M., & Jost, A. (1978). The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia* 15: 387–393.
- Khan, N. A. (2007). Role of lipids and fatty acids in macrosomic offspring of diabetic pregnancy. *Cell Biochem Biophys*. 48: 79-88.

- Kim, C. (2014). Maternal outcomes and follow-up after gestational diabetes mellitus. *Diabet Med.* 31(3): 292-301.
- King, A. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology.* 166: 877-894.
- Koda JE, Fineman M, Rink TJ, Dailey GE, Muchmore DB, Linarelli LG. (1992) Amylin concentrations and glucose control. *Lancet.* 339:1179–1180.
- Kubo, A., Stull, R., Takeuchi, M., Bonham, K., Gouon-Evans, V., Sho, M., Iwano, M., et al. (2011). Pdx1 and Ngn3 overexpression enhances pancreatic differentiation of mouse ES cell-derived endoderm population. *PloS one*, 6(9), e24058. doi:10.1371/journal.pone.0024058.
- Kumar U, Sasi R, Suresh S, Patel A, Thangaraju M, Metrakos P, Patel SC, Patel YC (1999) Subtype-selective expression of the fivesomatostatin receptors (hSSTR1–5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis. *Diabetes*48:77–85.
- Landon MB, Spong CY, Thom E, Carpenter MW, Ramin SM, Casey B, Wapner RJ, Varner MW, Rouse DJ, Thorp JM, Jr., Sciscione A, Catalano P, HarperM, Saade G, Lain KY, Sorokin Y, Peaceman AM, Tolosa JE, Anderson GB. A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. *N Engl J Med* 2009;361:1339–1348.
- Leiva, A., Pardo F., Ramírez, M. A. (2011). Fetoplacental vascular endothelial dysfunction as an early phenomenon in the programming of the adult human diseases in subjects born from gestational diabetes mellitus or obesity in pregnancy. *Experimental Diabetes Research.* 11:1-18.
- Liu, J., Hunter, C. S., Du, A., Ediger, B., May, C. L. (2011). Islet-1 Regulates Arx transcription during pancreatic islet α -cell development. *J Biol Chem.* 286: 15352-15360.
- Liu, Z., Kim, W., Chen, Z., Shin, Y.-K., Carlson, O. D., Fiori, J. L., Xin, L., et al. (2011). Insulin and glucagon regulate pancreatic α -cell proliferation. *PloS one*, 6(1), e16096. doi:10.1371/journal.pone.0016096.
- Longo L. (1983). Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy. *The American Journal of Physiology.* 245(5).R720-729.

- Lyttle BM, Li J, Krishnamurthy M, Fellows F, Wheeler MB, Goodyer CG, Wang R. (2008) Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas. *Diabetologia*, 51:1169-80.
- Magnusson, A. L., Waterman, I. J., Wennergren, M., Jansson T., Powell, T. L. (2004). Triglyceride Hydrolase Activities and Expression of Fatty Acid Binding Proteins in the Human Placenta in Pregnancies Complicated by Intrauterine Growth Restriction and Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 89(9): 4607-4614.
- Mannucci, E., Monami, M., Pala, L., Cocca, C., Cresci, B., Bardini, G., Masotti, G., et al. (2007). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*, 30(1), 193–4. doi:10.2337/dc06-2060.
- Marseille-Tremblay, C., Ethier-Chiasson, M., Lafond, J. (2008). Impact of maternal circulating cholesterol and gestational diabetes mellitus on lipid metabolism in human term placenta. *Molecular Reproduction and Development*. 75: 1054-1062.
- Martin M, Hauer V, Messmer M, Orvain C, Gradwohl G. (2007) Transcription factors in pancreatic development. *Animal models*. *Endocr Dev*, 12:24-32.
- Mathis, J. M., Simmons, D. M., He, X., Swanson, L. W., Rosenfeld, M. G. (1992). Brain 4: a novel mammalian POU domain transcription factor exhibiting restricted brain-specific expression. *The EMBO Journal*. 11(7): 2551-2561.
- Matsuyama T, Komatsu R, Namba M, Watanabe N, Itoh H, Tarui S. (1988). Glucagon-like peptide-1 (7-36 amide): a potent glucagonostatic and insulinotropic hormone. *Diabetes Res Clin Pract* 5:281–284.
- Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, Dyer AR, Leiva A, Hod M, Kitzmiller JL, Lowe LP, McIntyre HD, Oats JJ, Omori Y, Schmidt MI. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* 2010;33:676–682.
- Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DA. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008;358:1991–2002.

- Moore CX, Cooper GJS. (1991). Co-secretion of amylin and insulin from cultured islet beta-cells: modulation by nutrient secretagogues, islet hormones and hypoglycaemic agents. *Biochem Biophys Res Commun* 179:1–9.
- Morgan, S. C., Lee, H. Y., Relaix, F., Sandell, L. L., LeVorse, J. M., Loeken, M. R. (2008). Cardiac outflow tract septation failure in Pax3-deficient embryos is due to p53-dependent regulation of migrating cardiac neural crest. *Mech Dev* 2008, 125(9–10):757-767.
- Morgan, S. C., Relaix, F., Sandell, L. L., Loeken, M. R. (2008). Oxidative stress during diabetic pregnancy disrupts cardiac neural crest migration and causes outflow tract defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*.82(6):453-463.
- O' Doud, J .F., Stocker, C. J. (2013). Endocrine pancreatic development: impact of obesity and diet. *Frontiers of physiology*. 4: 1-11.
- Ogawa A, Harris V, McCorkle SK, Unger RH, Luskey KL. (1990). Amylin secretion from the rat pancreas and its selective loss after streptozotocin treatment. *J Clin Invest* 85:973–976.
- Ogihara T, Mirmira R.G. (2010). An islet in distress: β cell failure in type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Investigation*.1(4): 123-133.
- Ohira, R., Zhang, Y. H., Guo, W., Dipple, K., McCabe, E. R. B. (2002). Human ARX gene: genomic characterization and expression. *Molecular Genetics and Metabolism*. 77: 179-188.
- Ornoy A, Reece EA, Pavlinkova G, Kappen C, Miller R. (2015). Effect of Maternal Diabetes on the Embryo, Fetus, and Children: Congenital Anomalies, Genetic and Epigenetic Changes and Developmental Outcomes. *Maternal diabetes and pregnancy outcome*. 105: 43-72.
- Pan, F. C., & Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 240(3), 530–65. doi:10.1002/dvdy.22584. *Physiol* 123:185–190 94.
- Pavlinkova G, Salbaum JM, Kappen C. 2009. Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo. *BMC Genom* 10:274.
- Pavlinkova, G., Salbaum, J. M., Kappen, C. (2008). Wnt signaling in caudal dysgenesis and diabetic embryopathy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*.82:710-719.

- Pavlinkova, G., Salbaum, J. M., Kappen, C. (2009). Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing. *BMC Genomics*.10: 274.
- Perley MJ, Kipnis DM. (1967). Plasma insulin response to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 46:1954–1962.
- Pettitt, D. J., Aleck, K. A., Baird, R. (1988). Congenital susceptibility to NIDDM. Role of intrauterine environment. *Diabetes*. 37: 622-628.
- Pociot F, Akolkar B, Concannon P, et al. (2010). Genetics of type 1 diabetes: what's next? *59*:1561–1571.
- Quesada, I., Tudurí, E., Ripoll, C., Nadal, A. (2008). Physiology of pancreatic α -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal of Endocrinology*. 199: 5-19.
- Rasschaert J, Liu D, Kutlu B *et al.*(2003). Global profiling of double stranded RNA- and IFN-gamma-induced genes in rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2003; **46**:1641–57.
- Reece EA, Leguizamon G, Homko C. (1998b). Pregnancy performance and outcomes associated with diabetic nephropathy. *Am J Perinatol* 15:413–421.
- Reece EA. (2012). Diabetes-induced birth defects: what do we know? What can we do? *Curr Diab Rep* 12:24–32.
- Rice G.E, Illanes S.E., Mitchell M.D. (2012) Gestational diabetes mellitus: A positive predictor of type 2 diabetes?. *International Journal of Endocrinology*. 2012: 1-10.
- Riedel M, Asadi A, Wang R, Warnock G, Kieffer T. (2012). Immunohistochemical characterisation of cells co-producing insulin and glucagon in the developing human pancreas. *Diabetologia*. 55:372–381.
- Robertson R.P. (2009). β -cell deterioration during diabetes: what's in the gun?. *Trends in Endocrinology and Metabolism*.11(2): 98-107.
- Rorsman, P., Ramracheya, R., Rorsman, N. J. G., Zhang, Q. (2014). ATP-regulates potassium channels and voltage-gated calcium channels in pancreatic alpha and beta cells: similar functions but reciprocal effects on secretion. *Diabetologia*. 57: 1749-1761.

- Ryan, E. A. (2011). Diagnosing gestational diabetes. *Diabetologia*. 54: 480-486.
- Sacks, D. B., Arnold, M., Bakris, G. L., Bruns, D. E., Horvath, A. R., Kirkman, M. S., Lernmark, A., et al. (2011). Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 34(6), e61–99. doi:10.2337/dc11-9998.
- Sakurai H, Dobbs R, Unger RH 1974 Somatostatin-induced changes in insulin and glucagon secretion in normal and diabetic dogs. *J Clin Invest* 54:1395–1402.
- Sánchez. L. S., Sánchez. L. A., Hernández. M. M., Solorio. M. E., Torres. J. M., Guillén. J. M. (2008). Diabetes gestacional. Comportamiento de los factores de riesgo en población mexicana. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 46 (6): 659-662.
- Scheepers A, Joost H G, Schurmann A (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28:364-371.
- Shankaracharya, Odedra, D., Mallick, M., Shukla, P., Samanta, S., & Vidyarthi, A. S. (2012). Java-based diabetes type 2 prediction tool for better diagnosis. *Diabetes technology & therapeutics*, 14(3), 251–6. doi:10.1089/dia.2011.0202.
- Simmons, R. a, Templeton, L. J., & Gertz, S. J. (2001). Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes*, 50(10), 2279–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11574409>.
- Stene LC, Rewers M. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies. *Clin Exp Immunol* 2012; **168**:12–23.
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin- nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics on the animal model. *Experimental Biology and Medicine*. 237: 481-490.
- Taricco E, Radaelli T, Rossi G, Nobile de Santis MS, Bulfamante GP, Avagliano L, Cetin I. (2009). Effects of gestational diabetes on fetal oxygen and glucose levels in vivo. *BJOG*. 116: 1729-1735.
- Teresa L. Mastracci, Lori Sussel. The endocrine pancreas: insights into development, differentiation and diabetes. National Institutes of Health, 2012; 1(5): 609-628. doi:10.1002/wdev.44

- Vambergue, A., Fajardy, I. (2011). Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. *World J Diabetes*. 2(11): 196-203.
- Viltsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. (2001). Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50:609–613.
- Wahabi, H. a, Alzeidan, R. a, & Esmail, S. a. (2012). Pre-pregnancy care for women with pre-gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health*, 12, 792. doi:10.1186/1471-2458-12-792.
- Wallum BJ, Kahn SE, McCulloch DK, Porte D: Insulin secretion in the normal and diabetic human. In *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P, Eds. Chichester, U.K., John Wiley and Sons, 1992, p. 285–301.
- Wilcox, C. L., Terry, N. A., Walp, E. R., Lee, R. A., May, C. L. (2013). Pancreatic α -Cell specific deletion of mouse Arx leads to α - Cell identity loss. *Plos One*. 8(6): e66214.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H.(2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*; 27:1047–1053.
- Wu X, Freeze HH (2002). GLUT 14, a duplicon of GLUT 3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* 80(6): 553-557.
- Wu, J., Yan, L. J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell cytotoxicity.
- Wyman, A., Pinto, A. B., Sheridan, R., Moley, K. H. (2008). One-Cell Zygote Transfer from Diabetic to Nondiabetic Mouse Results in Congenital Malformations and Growth Retardation in Offspring. *Endocrinology*. 149(2): 466-469.
- Xu, S., Hayashi, Y., Takagishi, Y., Itoh, M., Murata, T. (2013). Aristaless-Related homeobox plays a key role in hyperplasia of the pancreas Islet α -like cells in mice deficient in proglucagon-derived peptides. *Plos One*. 8(5): e64415.
- Yan, J. (2015). Streptozotocin-induced type I diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 8: 181-188.

- Yang Y, Thorel F, Boyer D. (2011). Context-specific a-to-b-cell reprogramming by forced Pdx1 expression. *Genes Dev.* 25: 1680-1685.
- Yessoufou, A., Moutairou, K. (2011). Maternal Diabetes in Pregnancy: Early and Long-Term Outcomes on the Offspring and the Concept of "Metabolic Memory". *Experimental Diabetes Research.* 2011:1-12.
- Yeung WC, Rawlinson WD, Craing MA. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ* 2011; **342**:d35.
- Yin H, Berg AK, Tuvemo T *et al.* Enterovirus RNA is found in peripheral blood mononuclear cells in a majority of type 1 diabetic children at onset. *Diabetes* 2002; **51**:1964–71.
- Yip RG, Wolfe MM. (2000). GIP biology and fat metabolism. *Life Sci* 66:91–103.
- Zaret, K. S. (2008). Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nature reviews. Genetics*, 9(5), 329–40. doi:10.1038/nrg2318.
- Zaret, K. S. (2008). Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nature Reviews.* 9: 329-340.