



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA POST LACTANCIA
SOBRE LA MORFOMETRÍA DE LOS ISLOTOS PANCREÁTICOS
MATERNOS EN EL RATÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A
P R E S E N T A:**

BRIANDA BERENICE LÓPEZ AVIÑA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA CRISTINA REGINA FERNÁNDEZ MEJÍA**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx, 2019



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

PROPIETARIO	Dr. Adolfo Andrade Cetto
PROPIETARIO	Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez
PROPIETARIA TUTORA	Dra. María Cristina Regina Fernández Mejía
SUPLENTE	Dra. Patricia Rivas Manzano
SUPLENTE	M. En C. Sara Teresa Méndez Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad de Genética de la Nutrición. Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Pediatría.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María Cristina Regina Fernández Mejía

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis fue dirigida por:

Dra. María Cristina Regina Fernández Mejía

Unidad de Genética de la Nutrición.
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Insitituto de investiagciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México / Instituto Nacional de Pediatría

AGRADECIMIENTOS

Sin duda alguna, cursar la licenciatura ha sido una de las más grandes aventuras que he vivido, y con este escrito celebro el término de la misma, sin olvidar a todas aquellas personas que me acompañaron y me apoyaron a cada paso. Creo que las palabras que aquí reflejare no serán las suficientes para agradecerles su compañía en este gran viaje:

Dra. Cristina, gracias por creer en mi desde que llegué a su laboratorio, por la confianza y por la paciencia durante mi formación. Gracias por darme la oportunidad de desarrollar un proyecto que me ayudaría a crecer académicamente y en el ámbito personal. Cambio mi devenir de forma extraordinaria.

A mis compañeros del laboratorio, por las risas y las enseñanzas año tras año. A Gustavo Canul, gracias por ser mi guía durante todo este proceso de formación, por la ayuda y apoyo brindado. Fuimos un buen equipo. A Karen, mi compañera de experimentos y amiga; no solo me sorprendió lo bien que trabajamos juntas y nos apoyamos, si no, el vínculo de amistad que formamos desde el primer día hasta cuando regresaste a tu ciudad natal. No hay día que no te agradezca el tiempo compartido. A Wilma, por sus asesorías, consejos y gran amistad, sé que nos volveremos a encontrar en algún país del mundo. A Esme, por siempre estar presente y alegrarme mis días con tu risa y ocurrencias, eres una gran persona.

A mis amigos de toda la vida ; Polett, Jaime, Liliana, Bernardo, Laura, Itzel, Erika, Enrique, Luis, Germán, por su amor y apoyo incondicional desde que teníamos 16 años. Se quedaron cuando más los necesitaba. Sin ustedes no sería la persona que soy ahora, tantos sueños y tantos deseos para una vida los tengo gracias a ustedes. Gracias por inspirarme cada día a ser mejor, creer en mi y explotar mis talentos.

Pero sobretodo esto va dedicado a la gran familia que tengo.

A mis hermanos, que me enseñaron que los sueños son posibles de alcanzar y me cuidaron en todo momento. Su compañía ha sido invaluable; son una extensión de mi ser.

A mi padre, quien hizo todo lo necesario para que tuviera una carrera universitaria y que en momentos difíciles me recordaba lo orgulloso que se sentía por tener una hija con gusto por la ciencia. Nunca olvidare el primer libro de ciencia que me regalaste cuando era niña.

Y a mi madre, por hacer posible cada uno de mis sueños al tejerme estas alas con las que vuelo y volaré aún más alto. Por criarme rebelde, libre y con mucho amor. Por hacerme una mujer valiente. Mis éxitos también son tuyos; eres la razón de todo. Siempre te llevo conmigo.

ÍNDICE

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
Páncreas: órgano responsable de la homeostasis de la glucosa	8
La secreción de insulina	9
El islote pancreático: papel de las células beta	11
Gestación	12
Lactancia	15
Post lactancia	16
ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROYECTO	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
METODOLOGÍA.....	19
Modelo Animal	19
Curvas de tolerancia a la glucosa	19
Curva de tolerancia a la insulina	20
Inclusión y cortes histológicos	20
Inmunohistoquímica de fluorescencia	20
Análisis de islotes pancreáticos.....	21
Análisis estadístico	21
RESULTADOS	22

Morfometría y morfología del islote pancreático.....	22
Proporción de células beta y alfa	25
Curva de tolerancia a la glucosa.....	26
Curva de tolerancia a la insulina	27
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIÓN	32
PERSPECTIVAS	33
REFERENCIAS.....	34

RESUMEN

El embarazo y la lactancia son dos periodos en los cuales se producen cambios morfológicos y funcionales en los islotes pancreáticos maternos en el ratón. Hasta la fecha no hay reportes en la literatura documentando la existencia de cambios en el islote pancreático materno después de la lactancia, fenómeno que se buscó describir y caracterizar en este trabajo. Mediante técnicas de inmunofluorescencia en secciones histológicas de páncreas, se encontraron cambios en el tamaño y morfología de los islotes pancreáticos maternos al término de la lactancia y una semana después, lo cuál se desconocía. Resultó relevante encontrar islotes de más de 100, 000 μm^2 , cuando en hembras no gestantes es de 6 072 μm^2 , situación que se relaciona con el aumento en proporción de las células β , las cuáles ocupan entre 91-93% del total de células en el islote. Los datos generados en este trabajo, permitirán el desarrollo de nuevos estudios relacionados con los mecanismos moleculares y celulares que permiten la modificación del tamaño y masa de los islotes de Langerhans durante la gestación, lactancia y post lactancia.

INTRODUCCIÓN

Páncreas: órgano responsable de la homeostasis de la glucosa

El páncreas es un órgano glandular mixto con función endocrina y exocrina, situado en la cavidad abdominal. Se divide en tres regiones: cabeza, cuerpo y cola. En el humano, la primera región es la más ancha y se encuentra ubicada del lado derecho del abdomen, en la curvatura del duodeno. El cuerpo y la cola se extienden hasta el lado izquierdo del abdomen, cerca del bazo; esta última región es más estrecha (Wang X et al, 2013).

La parte exocrina del páncreas o tejido acinar representa cerca del 98% del volumen total del páncreas; las células acinares tienen morfología poligonal o piramidal, con el vértice dirigido hacia la luz central del acino, núcleo basal y gran cantidad de gránulos secretorios (zimógenos) (Slack, 1995). Dentro de sus funciones está la secreción de diversas enzimas digestivas que por un sistema de conductos se vacían al lumen intestinal.

La parte endócrina está constituida por los islotes de Langerhans, que corresponden al 1-2% del volumen total del páncreas. Los islotes de Langerhans, descubiertos en 1869 por Paul Langerhans, se encuentran inmersos entre el tejido acinar y participan en el control de la homeostasis de la glucosa, a través de la secreción de diversas hormonas (Bouwens, 2005). La distribución y densidad de los islotes es similar en las regiones de la cabeza y el cuerpo, pero es mucho mayor en la región de la cola (Wang X et al, 2013). Está compuesto por distintas células que producen y secretan diferentes hormonas: las células beta (β) secretan insulina, las células alfa (α) secretan glucagón, las células delta (δ) secretan somatostatina, las células PP secretan polipéptido pancreático y las células-épsilon (ϵ) que secretan ghrelina (Mirmira, 2010). (Figura 1).

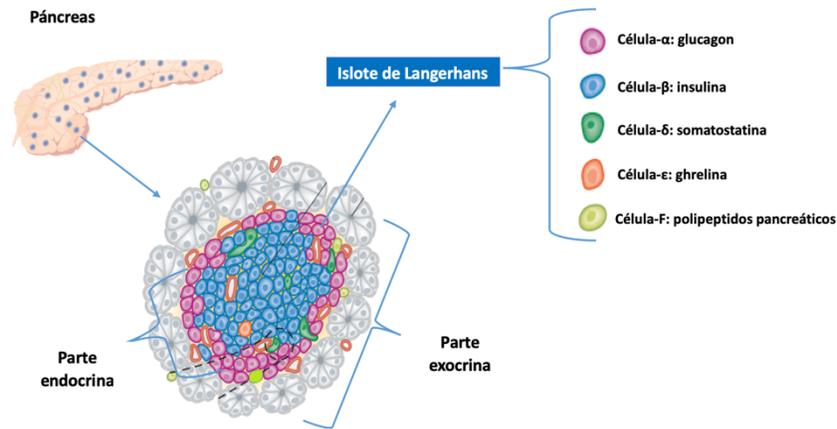


Figura 1. Estructura del páncreas conformado por glándulas exocrinas y endocrinas. Representación de los diferentes tipos celulares que conforman la parte endocrina del páncreas (Modificado de Mirmira, 2010).

La secreción de insulina

La homeostasis de la glucosa en condición post prandial es controlada por las células β , las cuales comprenden aproximadamente el 80% del volumen total del islote de Langerhans; estas se encargan de sintetizar y secretar la cantidad de insulina necesaria para un óptimo control de la glucemia (Bouwens 2005). La insulina tiene como tejidos efectores principales al músculo, hígado y el tejido adiposo. Durante el post prandio, la secreción de insulina desencadena en dichos tejidos una serie de respuestas que permiten la captación de glucosa.

La secreción de insulina en respuesta a glucosa requiere una secuencia de acciones coordinadas en las que participan la oxidación de glucosa (Meglasson & Matschinsky, 1986), cambios electro-fisiológicos, fusión de los gránulos que contiene insulina con la membrana plasmática (Rorsman, 2003) y finalmente su secreción al medio extracelular. La glucosa es el estímulo para la liberación de insulina (Röder et al, 2016) y se almacena en forma de glucógeno en el hígado inmediatamente después de la ingesta de alimento.

La secreción de insulina por las células β producida por la glucosa, está modulada tanto por controles hormonales y neuronales vía activación de receptores membranales (Chandra, 2009). La incorporación de glucosa es mediada por proteínas transportadoras de glucosa (GLUT) (Schiut, 1997) ubicadas en la membrana de la célula β , predominando en roedores la isoforma 2 de transportador de glucosa (GLUT2). El proceso se inicia con el transporte de glucosa al interior de las células β por difusión facilitada (Röder et al, 2016).

Después de entrar a la célula, la glucosa es fosforilada por la enzima glucocinasa para formar glucosa-6 fosfato. La glucocinasa regula el flujo de la oxidación de glucosa y la secreción de insulina, y se considera un sensor de los niveles de glucosa en las células β (Meglasson & Matschinsky, 1986; Matschinsky, 1996). Además participa en el proceso de expansión de la masa de las células β (Gloyn et al, 2008; Terauchi, 2007). El aumento en los niveles de ATP por la glucólisis y el ciclo de Krebs provocan el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP (KATP) generando una despolarización de la membrana plasmática, activando los canales dependientes de voltaje Ca^{2+} (Fu, 2013; Röder et al, 2016), a la par de diferentes eventos que permiten incrementar los niveles de Ca^{+2} del citoplasma como la entrada de Ca^{+2} del espacio extracelular y la movilización de las reservas de Ca^{+2} del retículo endoplasmático (Wollheim et al, 1981; Wolf et al, 1988; Anhê et al, 2007). El aumento de Ca^{+2} en el citoplasma es la señal que desencadena la secreción de insulina al permitir la fusión de los gránulos que la contiene con la membrana plasmática y la liberación de insulina a la circulación (Rorsman, 2003) (Figura 2).

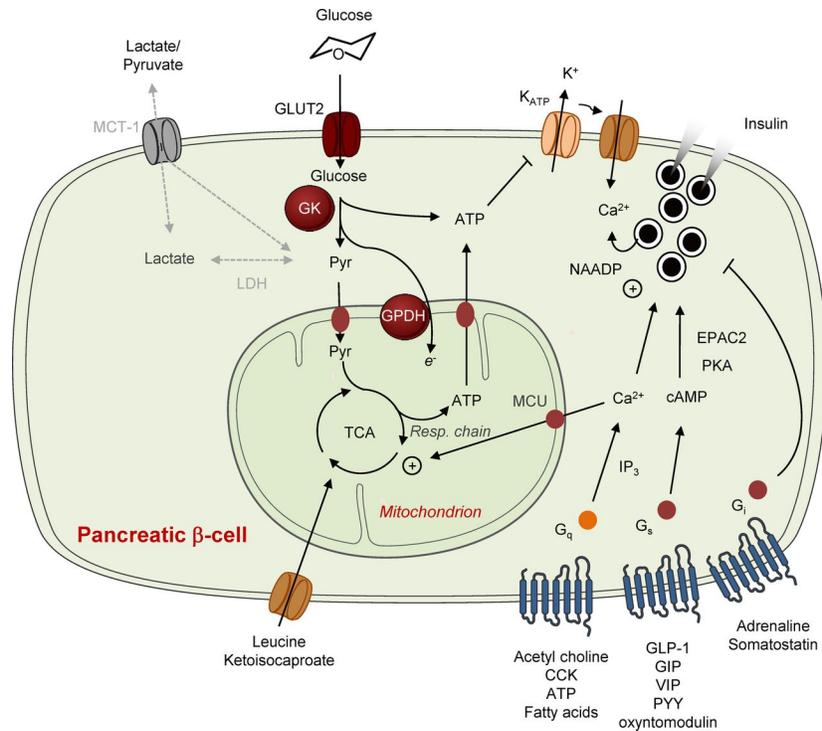


Figura 2. Modelo de secreción de insulina estimulada por glucosa en las células β . (Rutter et al, 2015)

El islote pancreático: papel de las células beta

El control en el nivel de glucosa depende de la síntesis y secreción de insulina por parte de la célula β , pero cuando existe una falla en función (Bouwens, 2005), puede resultar en el desarrollo de diabetes (Migliorini, 2014). Además de una función adecuada de las células β , otro aspecto importante a considerar es su masa total para mantener una producción necesaria. Ésta se incrementa progresivamente durante los periodos fetal y neonatal, alcanzando una meseta durante la adultez (Ackermann et al, 2007) y decayendo gradualmente con la edad (Bouwens, 2005). La masa total está dada por el número y tamaño de células β .

La masa de los islotes pancreáticos se regula por un estricto balance entre la replicación celular, hipertrofia y neogénesis, así como la muerte celular, atrofia y autofagia (Dor et al, 2004; Bouwens, 2005; Ackermann et al, 2007, Meier et al, 2008). Ante las diferentes demandas metabólicas, la masa de los islotes pancreáticos no permanece constante a lo

largo de la vida. Experimentos en roedores adultos reportan la capacidad de las células β de adaptarse ante incrementos en la demanda de insulina, mediante aumento en su masa y la secreción de esta hormona (Bouwens, 2005; Ackermann et al, 2007). Este proceso ocurre en la gestación, obesidad y pancreatectomía. Estos cambios adaptativos en la masa de los islotes son controlados por ajustes en la muerte, proliferación y tamaño celular; la alteración en estos mecanismos participan en la aparición de diabetes (Rieck, 2009 ;2010; Butler et al, 2003).

La replicación de células a partir de células β preexistentes, diferenciación de células madre pancreáticas, de células acinares y del ducto; transdiferenciación de células acinares (Dor et al, 2004; Rieck et al, 2009) son mecanismos participantes en la modulación de la masa de las células beta. En dichos mecanismos participan factores de transcripción como NGN3, PDX1 y MAFA (Migliorini, 2014).

En busca de estrategias terapéuticas para tratar la diabetes, procesos relacionados con la proliferación, supervivencia y destrucción de la célula β pancreática seguirán siendo objeto de estudio, siendo la disminución parcial o total de la masa de células β , el común denominador en la aparición de los diferentes tipos de diabetes.

Gestación

Uno de los estímulos fisiológicos más fuertes para la modificación en la masa de las células beta es la gestación (Figura 3) (Rieck, 2010). En ella se presentan una serie de cambios endocrinos y metabólicos (Freemark, 2006) cuyo objetivo es permitir el crecimiento óptimo del feto. Las modificaciones en los niveles de hormonas incluyen aumento de progesterona, estrógenos, lactógeno placentario y prolactina (Figura 4) (Nadal et al, 2009). Además de estos cambios, los requerimientos energéticos del feto provocan en la madre resistencia a la insulina en tejidos periféricos (Freemark, 2006; Catalano, 1999), evento que acontece de manera normal durante la gestación para permitir la homeostasis

energética entre la madre y el feto, conduciendo a un aumento en la masa de los islotes pancreáticos y en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Sorenson, 1997).

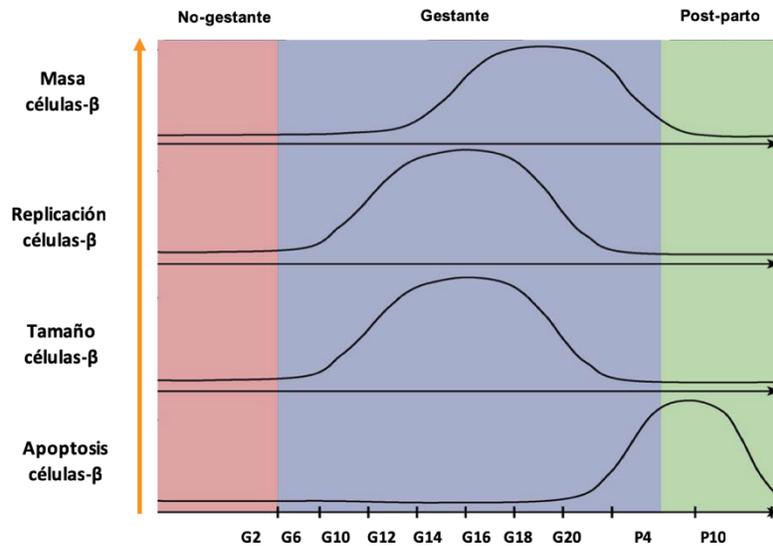


Figura 3. Gráfica del cambio en la masa de las células-β durante la gestación y el post-parto. (Rieck, 2010)

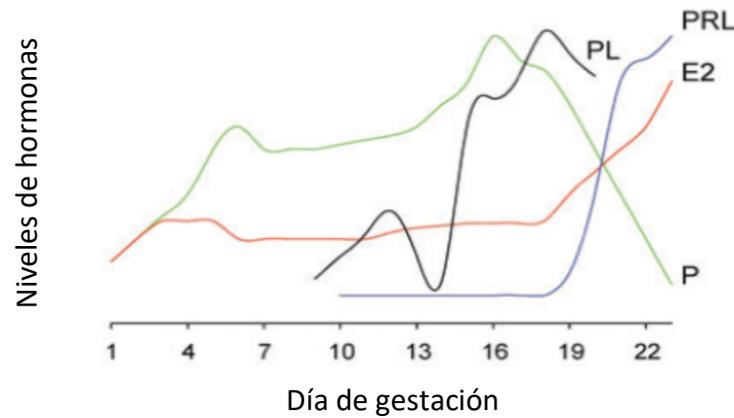


Figura 4. Gráfica de los cambios hormonales durante la gestación en roedores. (Nadal et al, 2009) PL: lactógeno placentario; PRL: prolactina; E2: estradiol; P: progesterona

En la Tabla 1 se presentan algunas moléculas y sus efectos en las células β y la acción de la insulina durante la gestación (Drasutiene et al, 2007; Al-Noaemi, 2011; Lain, 2007).

Molécula	Efecto
Estradiol	↑Concentración de insulina
Progesterona	↓Supresión gluconeogénesis hepática inducida por insulina
Lactógeno Placentario/Prolactina	↑Resistencia a la insulina ↑Secreción de insulina ↑Síntesis de insulina ↑Cantidad de IGFs ↑Número de las células β ↑Tamaño de las células β
TNF α	↑Resistencia a la insulina
Cortisol	↑Resistencia a la insulina ↓Fosforilación del receptor de insulina ↓IRS-1
Leptina	↑Resistencia a la insulina (probable)
Resistina	↑Resistencia a la insulina
Adiponectina	↓Resistencia a la insulina
Ácidos grasos	↑Resistencia a la insulina

Tabla 1. Efectos en metabolismo y homeostasis de glucosa de algunas moléculas que modifican sus niveles durante el periodo de gestación (Drasutiene et al, 2007; Al-Noaemi, 2011; Lain, 2007).

Durante la gestación, gran parte de los cambios en los islotes de Langerhans se producen por el incremento de prolactina y lactógeno placentario, los cuales se sabe que son reguladores de la masa de las células β durante este periodo (Parsons, 1992; Freemark et al, 2002; Vasavada, 2000). La función de estas hormonas a través de unión al receptor de prolactina (PRLRs) expresado en los islotes, resultan en la activación de la vía de la cinasa Janus 2/ transductor de señales y activador transcripcional 5 (JAK2/STAT5) (Brelje et al, 2002; Huang, 2009). También se sabe que activan las vía fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI3K/AKT), ERK1/2, Adenilciclase /AMPc y la proteincinasa/ calcio intracelular. A través de dichas vías de señalización se promueve la proliferación y la actividad antiapoptótica, interviniendo en la regulación de la masa de células β (Amaral et al, 2003; Ramos-Roman, 2011; Scaglia, 1995; Lombardo et al, 2011)

Lactancia

Después del parto, todos los cambios realizados en los islotes durante la gestación se revierten, permitiéndoles recuperar las características previas a la gestación; el páncreas materno regresa a las condiciones de un páncreas no gestante, justo después de haber dado a luz a sus crías (Lellis-Santos et al, 2012; Bromati et al, 2011).

En la lactancia, se observan en la madre una serie de cambios metabólicos y hormonales que favorecen su adaptación a las nuevas necesidades energéticas durante este periodo. Se ha reportado que la lactancia ayuda a revertir más rápida y eficientemente la acumulación de grasa visceral, los niveles elevados de lípidos sanguíneos y la resistencia a la insulina que se presenta durante la gestación (Gunderson et al, 2007). En un estudio en mujeres de entre 40-64 años con el fin de estudiar la incidencia de diabetes tipo 2 , se encontró que aquellas que amamantaron a sus hijos mas de un mes, presentaron menos índice de diabetes que aquellas que no lactaron (Jager et al, 2014; Gunderson et al, 2007), además de datos que sugieren que el ejercicio en la lactancia mejora la homeostasis de la glucosa y protege de la Diabetes Mellitus 2. Un efecto protector similar se ha encontrado en la incidencia de infarto al miocardio, la prevalencia del síndrome metabólico, hipertensión, e hiperlipidemias (Roig, 2009).

Se ha propuesto que son las hormonas las que participan después de la gestación en la remodelación de los islotes de Langerhans en el páncreas (Weinhaus et al, 2000; Nicoletti-Carvalho et al, 2010;Anhê et al, 2007; Lellis-Santos et al, 2012). Se ha reportado que los glucocorticoides participan en la modificación del islote después del parto (Nicoletti-Carvalho et al, 2010, Lellis-Santos et al, 2012, Weinhaus et al), los cuales reajustan el páncreas endocrino durante los primeros días de la lactación contrarrestando la acción de la prolactina y del lactógeno placentario.

Post lactancia

Al término de la lactancia, existen cambios hormonales que regulan nuevos procesos metabólicos en la madre, tal cuales son el incremento del estradiol, calcitonina y disminución de glucocorticoides, prolactina, oxitocina y hormona paratiroidea. Durante este periodo, órganos que sufrieron cambios durante la lactancia atraviesan ciertas modificaciones; por ejemplo glándula mamaria (Lund et al, 1996; Quarrie et al, 1996) y hueso (Kirby et al, 2011; Liu et al, 2012), este último importante, ya que durante la lactancia, ha suplido los requerimientos de calcio para la constitución de la leche materna. Particularmente en el hueso, se observa un incremento gradual en su densidad durante los días 3, 7 y 14 posteriores al destete (Kirby et al, 2011; Liu et al, 2012; Collins et al, 2013)

ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROYECTO

Datos reportados en la bibliografía y estudios en nuestro laboratorio han encontrado cambios impactantes en los islotes pancreáticos durante la gestación y lactancia (Rieck, 2009; Canul, 2014). Se encontraron modificaciones tanto en el tamaño de los islotes como diferencias en la forma de los mismos, habiendo una frecuencia mayor de islotes grandes y redondeados con gran porcentaje de células β (beta) y menos de células α (alfa) respecto a los ratones no gestantes.

Hasta la fecha no existen estudios que reporten los cambios por los que atraviesan los islotes pancreáticos maternos al término de la lactancia y después de la misma, por lo que en este proyecto proponemos investigar los cambios en el islote pancreático materno durante ese periodo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la gestación los requerimientos de energía del feto provocan cambios en el metabolismo materno que permiten la expansión de la masa de las células β y aumentos en la secreción de insulina. En el periodo de lactancia, se reduce la proliferación de células β y se aumenta la apoptosis celular y por ende la disminución del islote. A pesar de dicha información, se desconoce si el islote regresa al tamaño original después de la lactancia. La pregunta que se propone investigar en este proyecto es si en el periodo de post-lactancia se producen cambios en el islote pancreático materno, dado que estudios han evidenciado cambios en la forma del islote durante la gestación y lactancia.

En este trabajo se caracterizaron los cambios morfológicos y morfométricos por los que atraviesan los islotes pancreáticos maternos durante la post lactancia y se compararon con la morfología de los islotes de hembras no gestantes, y de esta manera poder comprender los cambios acontecidos en esta etapa. Los resultados que se obtenidos en

este proyecto permitirán ampliar el conocimiento sobre las modificaciones del islote pancreático y los efectos de post lactancia sobre la masa del islote.

Se pretende generar información para el futuro desarrollo de investigaciones sobre las modificaciones del metabolismo energético que sufre la madre durante este periodo y para comprender los mecanismos mediante los cuales los islotes pancreáticos se adaptan ante diferentes estímulos fisiológicos.

HIPÓTESIS

Se sabe que las hormonas son capaces de modificar la masa de las células β . En la post lactancia existen cambios hormonales en diferentes tejidos, por lo que es posible que en este periodo se modifique la masa del islote pancreático materno.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los cambios morfológicos y morfométricos que ocurren en el islote pancreático materno durante la post lactancia.

OBJETIVOS PARTICULARES

Analizar y comparar al término de la lactancia y en el estado post lactancia, contra el grupo no gestante, lo siguiente:

- 1.- La morfometría y morfología de los islotes pancreáticos maternos.
- 2.- La proporción de células β y células α del islote pancreático.
- 3.- La glucemia en condiciones de ayuno y no ayuno.
- 4.- La sensibilidad a la insulina como consecuencia de la función de la célula β pancreática

METODOLOGÍA

Modelo Animal

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 de 7-8 semanas (Harlan Laboratories, México), se mantuvieron dentro del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM con libre acceso a comida y agua, en un ciclo de 12 horas de luz 12 horas de oscuridad.

Los ratones fueron apareados colocando en caja, dos hembras y un macho. Las hembras fueron monitoreadas hasta la aparición del tapón vaginal, que persiste de 6-12 horas posteriores al apareamiento, siendo resultado de la coagulación del espermatozoides del macho y las secreciones vaginales. A partir de la observación de este tapón se considera la fecha como el día 0 de la gestación.

Las hembras preñadas se reubicaron en cajas individuales, recibiendo una dieta con los requerimientos necesarios (2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Diet Harlan Laboratories S.A. de C.V.) y agua *ad libitum*. A partir de las hembras preñadas, se formaron 2 grupos: término de la lactancia (post lactancia 0 días) y una semana después del término de la lactancia (post lactancia 7 días). Las hembras que no quedaron preñadas, conformaron el grupo de las no gestantes.

Durante el periodo de experimentación, las hembras lactantes y post lactantes fueron monitoreadas en peso corporal y consumo de alimento. Se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa e insulina. Al término de la lactancia (post lactancia 0) y 7 días después (post lactancia 7) , las madres se sacrificaron previa anestesia con Sevoflurane. Se extrajeron los páncreas fijándolos por 24 horas en paraformaldehído para posterior tratamiento histológico.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con el Reglamento para el Cuidado y Manejo de los Animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Curvas de tolerancia a la glucosa

Los ratones se sometieron a un ayuno de 16 horas antes de la prueba al término de la lactancia (post lactancia 0) y 7 días después (post lactancia 7). A cada ratón se le administro glucosa (2g/kg peso corporal) en inyección por vía intraperitoneal. Se colectó

sangre antes de la inyección de glucosa (tiempo 0min) , así como a los minutos 15, 30, 60, 90 y 120 después de la inyección. La glucosa en sangre fue cuantificada con un glucómetro (Precision QID , MediSense, IN. ,Abbott Laboratories Company).

Curva de tolerancia a la insulina

Los ratones fueron alimentados *ad libitum* y se les inyectó 1 IU/kg de insulina regular humana (Humulin, Laboratorios Eli Lilly). Se midieron las concentraciones de glucosa en sangre utilizando un glucómetro (Precision QID, MediSense, IN., Abbott Laboratories Company) antes de la inyección, así como en los minutos 15, 30, 60, 120 posteriores a la inyección de insulina. Las curvas de tolerancia la insulina se realizaron al término de la lactancia (post lactancia 0) y 7 días después (post lactancia 7).

Inclusión y cortes histológicos

Los páncreas disectados se fijaron en paraformaldehído al 4% por 24 horas, deteniendo la autólisis del tejido y conservando sus estructuras lo más similar a la original. Posterior a las 24 horas se hizo un lavado de PBS 1X (0.8 % p/v NaCl, 0.02 % p/v KCl, 0.144 % p/v Na₂HPO₄, 0.024 % p/v KH₂PO₄, pH7.4) . El tejido fue deshidratado en un tren de concentraciones crecientes de etanol (25-50-75-100%), a continuación se realizó el aclaramiento con baño de xilol, sustancia miscible tanto en etanol como con el medio de inclusión, en este caso parafina; por último se realizó la inclusión; se colocó el tejido en un "casette" agregándole parafina hasta formar un bloque, de esta forma se consigue que el tejido no se rompa o deteriore durante el proceso de obtención de cortes. Se realizaron cortes de 5 µm y se fijaron en laminillas pretratadas con polilisina.

Inmunohistoquímica de fluorescencia

Los cortes en laminillas de páncreas se desparafinaron y rehidrataron para continuar con inmunofluorescencia contra insulina y glucagón. Para desparafinar, se realizaron dos baños con xilol y se rehidrataron en un tren de concentración decrecientes de etanol (100-75-50-25%), por último un lavado con PBS 1X. Se llevó a cabo la recuperación del antígeno

mediante un baño de buffer de citrato a 90°C por 15 minutos, transcurrido el tiempo se dejó enfriar por 20 minutos, se dieron tres lavados con PBS 1X. Concluidos los lavados se dibujo alrededor del tejido una zona hidrófoba utilizando PAP pen (Sigma Aldrich) para contener dentro del área delimitada al buffer de perforación con 0.3% de Triton X-100 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) y se bloquearon con suero bovino al 3% (Microlab, Aguascalientes, México) en una cámara húmeda por 45 minutos. Los anticuerpos primarios para Insulina (1:150, Sigma) y glucagón (1:4500, Sigma) se incubaron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron lavados con suero normal de cabra al 1% (Microlab, Aguascalientes, México) y se incubaron los anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromo: FITC (1:200, Jackson) y Cy3 (1:800, Jackson) por una hora. Transcurrida la incubación, se hicieron lavados con PBS 1X; los núcleos se tiñeron con DAPI (DAPI Sigma) durante 1 minuto. Finalmente las preparaciones se cubieron con cubreobjetos con medio para montaje fluorescente (Dako) sellándolas con barniz. Las preparaciones obtenidas se utilizaron para el análisis de los islotes pancreáticos.

Análisis de islotes pancreáticos

Las imágenes de los islotes pancreáticos se obtuvieron con un sistema de microscopía de campo amplio Axioskop 2 plus (Seiss, Thornwood, NY) acoplado a una lámpara de fluorescencia de mercurio (FluoArc) con una cámara AxioCamRm. Se observaron 4 preparaciones de cada ratón, en un total de 4 ratones por grupo experimental. Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software Image J 1.40 (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD) cuantificando el área del islote, área de células positivas a insulina (células- β) y células positivas a glucagón (células- α). Se considera a un islote aquel grupo de 4 o más células positivas a insulina (Butler et al, 2003).

Análisis estadístico

Los datos representan la media \pm ES del número de muestras o sujetos evaluados (n). El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPadPrism (AbacusConcepts,

Berkeley, CA, USA). Los datos se analizaron por medio de una prueba de t de Student o ANOVA de 2 vías. Los valores de p menores a 0.05 son considerados como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

En este trabajo se analizaron los cambios morfológicos del islote en grupos experimentales que corresponden al término de la lactancia (post lactancia día 0) y una semana después (post lactancia día 7). También, se estudiaron los posibles cambios por las que atraviesa el metabolismo de la glucosa mediante el estudio de curvas de tolerancia a la glucosa e insulina.

Morfometría y morfología del islote pancreático

El estudio de los islotes de Langerhans durante la post lactancia, reveló que se producen cambios en la morfología. El promedio del área total ocupada por los islotes por corte analizado de hembras no gestantes fue de $6,072 \pm 419 \mu\text{m}^2$. Al término de la lactancia (post lactancia día 0) los islotes poseían un promedio de $6,004 \pm 608 \mu\text{m}^2$, valor cercano al del grupo de ratones no gestantes (Figura 5). Una semana después (post lactancia día 7), se observa un incremento significativo ($p < 0.05$) en el tamaño de los islotes, llegando a $10,640 \pm 1023 \mu\text{m}^2$, comparable con el tamaño observado durante la gestación de $11,673 \mu\text{m}^2$; reportado por Canul-Medina (2014).

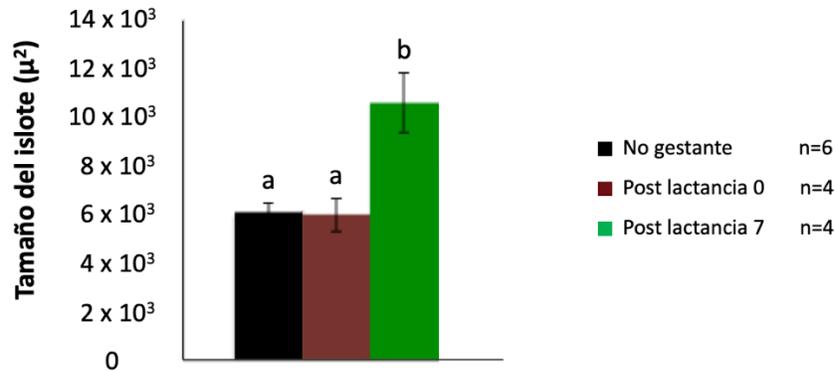


Figura 5. Tamaño promedio de los islotes de Langerhans del páncreas materno. Los datos representan la media \pm ES. $P < 0.05$ vs no gestante

También se realizó el análisis de frecuencia del tamaño de los islotes. Se encuentra bien definido que el páncreas posee islotes de diferentes tamaños (Chintinne, 2010; Bonne-Weir, 2016). En el grupo no gestante, se encontró que la frecuencia de islotes pequeños ($< 1000 \mu\text{m}^2$) es de 21.3 %, al término de la lactancia es de 29.3% y una semana después (post lactancia 7) corresponden a 12.2% islotes del número total. En el grupo de hembras no gestante, cerca del 80% de islotes analizados miden menos de $10,000 \mu\text{m}^2$ y el restante, se localiza entre $20,000$ - $40,000 \mu\text{m}^2$. Al término de la lactancia (post lactancia día 0) gran cantidad de islotes miden menos de $10,000 \mu\text{m}^2$, y la distribución de los mismos se amplía, a comparación de las no gestantes, de tal forma que encontramos islotes de $80,000 \mu\text{m}^2$. En el día 7 de la post lactancia (Figura 6) la proporción de islotes pequeños menores de $10,000 \mu\text{m}^2$ es baja en tanto que en este periodo cerca del 1% corresponde a islotes de más de $90,000 \mu\text{m}^2$ e interesantemente, es el único periodo donde encontramos islotes que superan los $100,000 \mu\text{m}^2$ (Figura 7).

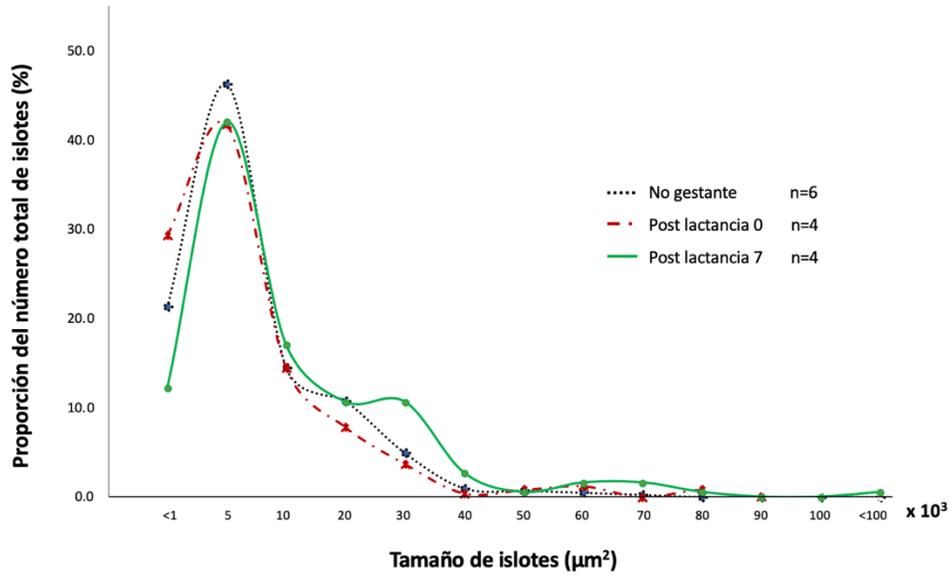


Figura 6. Distribución de frecuencias del tamaño de los islotes, expresado como el porcentaje del número total de islotes de Langerhans medidos en el páncreas materno.

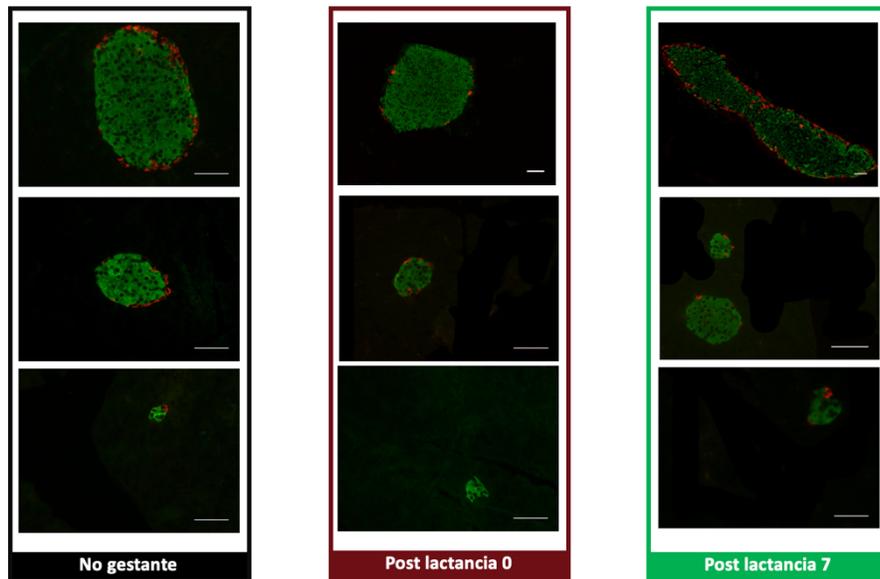


Figura 7. Morfología del islote de Langerhans al término de la lactancia y 14 días posteriores a la misma. Imágenes de inmunofluorescencia de islotes pancreáticos teñidos para insulina (verde) y glucagón (rojo). Las fotografías de la parte superior de cada periodo analizado, muestran los islotes más grandes observados, seguidos del tamaño promedio y los islotes más pequeños. Escala 50 micras.

Proporción de células beta y alfa

Se ha observado que el tamaño de los islotes y su proporción cambia durante los diferentes periodos estudiados, por lo que se analizó si los mismos modifican su proporción de células β , responsables de la producción y secreción de insulina, y de células α , responsables de la producción y secreción de glucagón. El análisis se llevó a cabo mediante la cuantificación del área total positiva a insulina y glucagón de los islotes de Langerhans observados en inmunofluorescencias de páncreas materno.

En ratonas no gestantes, el promedio del área total positiva a insulina representó el $83.7 \pm 0.48\%$ del total de células en el islote (Figura 8), la cual se incrementa significativamente a lo largo de la gestación a 92% (Canul-Medina, 2014), encontrando su valor máximo al término de la lactancia (post lactancia día 0; $92 \pm 0.51\%$, $p < 0.05$ vs no gestantes). Una semana después (post lactancia 7) su tamaño ($91.4 \pm 0.85\%$) no cambia de manera significativa respecto al día del fin de la lactancia.

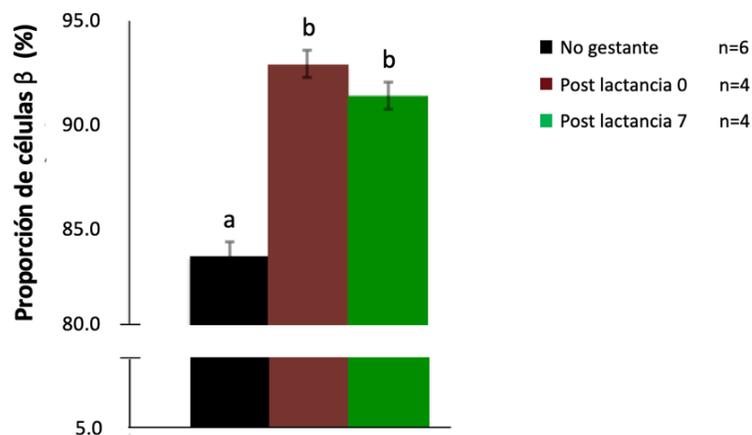


Figura 8. Proporción del área positiva a insulina en los islotes de Langerhans. Los datos representan la media \pm ES. $P < 0.05$ vs no gestante

En el caso de las células α , el promedio del área total positiva a glucagón disminuye significativamente su proporción durante la gestación, siendo el cambio más drástico al fin de la lactancia (post lactancia día 0; $7.11 \pm 0.58\%$; Figura 9), tomando como punto de partida las ratonas no gestantes en donde las células alfa representan cerca del 16% de la masa total de un islote materno. Una semana después (post lactancia 7) del fin de la lactancia, no se encuentran diferencias significativas ($8.5 \pm 0.74\%$).

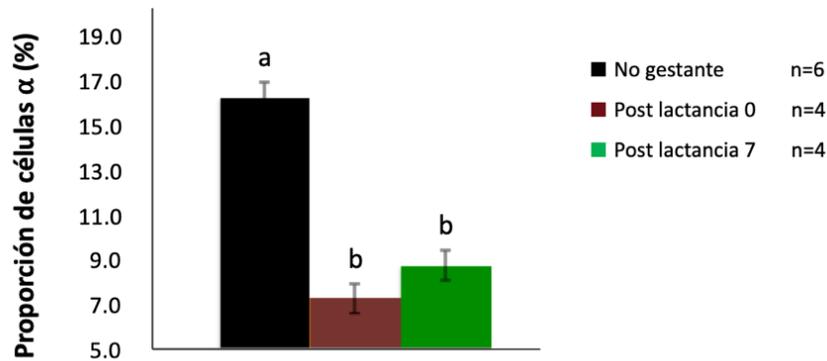


Figura 9. Proporción del área positiva a glucagón en los islotes de Langerhans. Los datos representan la media \pm ES. $P < 0.05$ vs no gestante

Curva de tolerancia a la glucosa

Para determinar si se produce algún cambio en el metabolismo de la glucosa en los periodos analizados, se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa.

La comparación de los grupos experimentales con el grupo de ratonas no gestantes mostró que la concentración de la glucosa sanguínea materna presenta en los 3 grupos su mayor nivel a los minutos 15, disminuyendo posteriormente de la misma forma a los 30 y 60 minutos después de la inyección (Figura 10). El promedio del área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa, muestra que las diferencias no son significativas (Figura 11). , lo cual indica que no hay diferencias en la tolerancia a la glucosa.

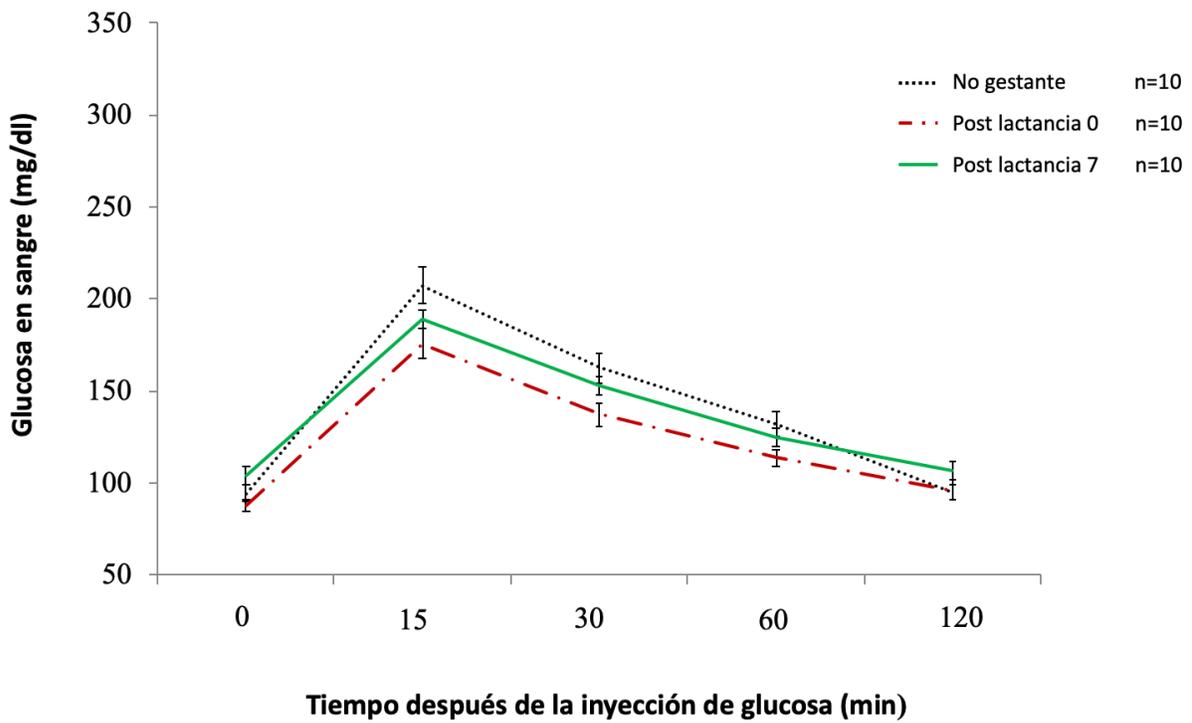


Figura 10. Curva de tolerancia a la glucosa en ratonas no gestantes, al termino de la lactancia y una semana después. Los datos representan la media \pm ES.

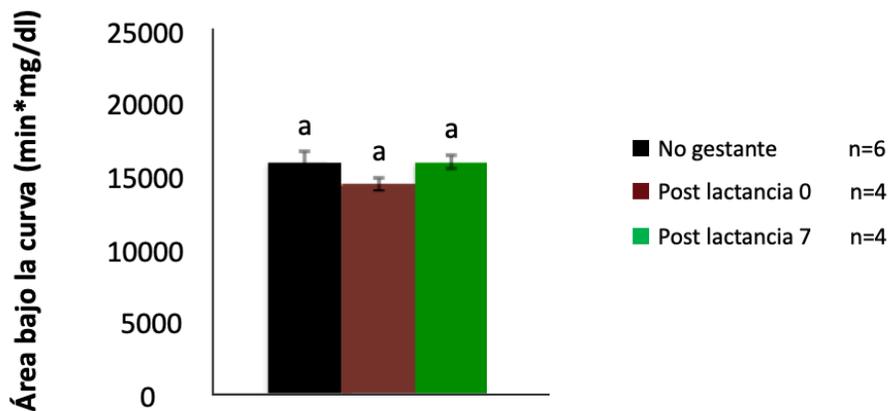


Figura 11. Área bajo la curva de tolerancia a la glucosa en ratonas no gestantes, al término de la lactancia y una semana después. $P < 0.05$ vs no gestante

Curva de tolerancia a la insulina

Para saber si los cambios que acontecen en el islote se encuentran asociados a alteraciones en la sensibilidad a la insulina, como sucede en el periodo del embarazo, se determinó este parámetro mediante curvas de tolerancia a la insulina.

Al término de la lactancia (post lactancia día 0) se observa una menor sensibilidad a la insulina que la presente en el grupo control no gestante, y al día 7 de post lactancia (Figura 12), esta última muestra, un patrón similar al grupo no gestante. El promedio del área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la insulina, muestra diferencia significativa entre la del día 0 de la post lactancia y el grupo no gestante (Figura 13).

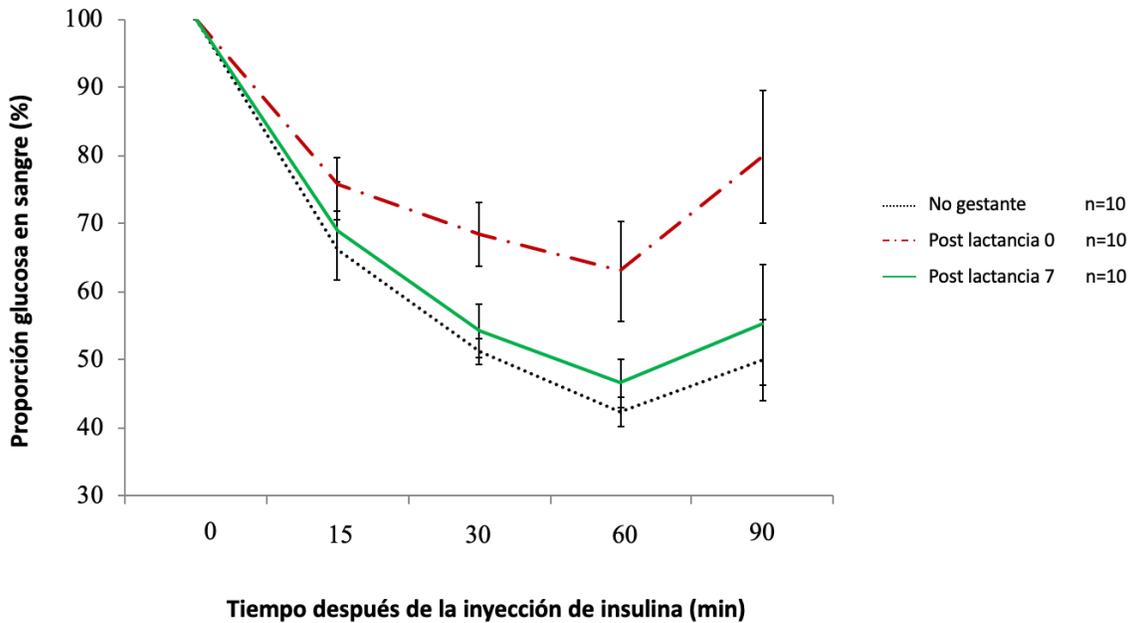


Figura 12. Curva de tolerancia a la insulina en ratonas no gestantes, al termino de la lactancia y una semana después. Los datos representan la media \pm ES

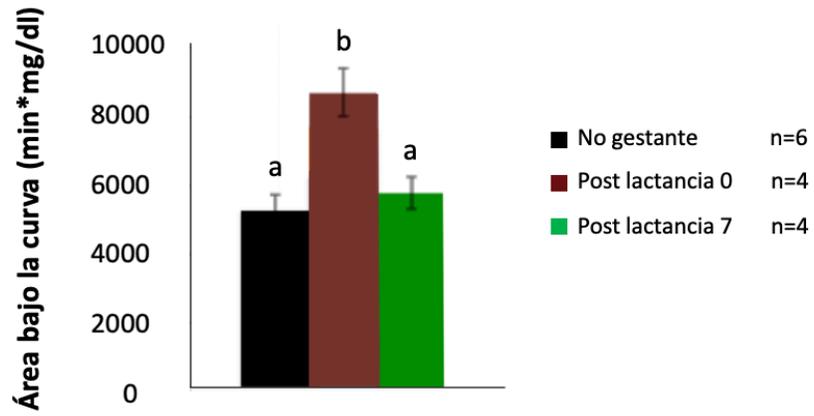


Figura 13. Área bajo la curva de tolerancia a la insulina en ratonas no gestantes, al término de la lactancia y una semana después. $P < 0.05$ vs no gestante

DISCUSIÓN

Los islotes de Langerhans tienen una gran capacidad plástica; modifican su función y morfología en respuesta a diferentes retos metabólicos y cambios hormonales a lo largo de diferentes periodos de la vida (Bouwens, 2005; Ackermann et al, 2007).

En la literatura se encuentran bien documentados los cambios que sufre el islote pancreático materno en la gestación (Rieck, 2009;2010); sin embargo, no se encuentran reportados cambios a partir del día del destete sobre los islotes pancreáticos, la sensibilidad a la insulina ni la homeostasis de la glucosa, tema de estudio de esta tesis.

En este trabajo se mostró un incremento en el tamaño de los islotes maternos de casi el doble una semana después del término de la lactancia. Resulto notable encontrar islotes de más de 100, 000 μm^2 en este periodo, tamaño de islotes que no se presentan durante la lactancia y nunca antes vistos en ratones no gestantes. A la par, se encontraron diferencias en la forma de los islotes habiendo una frecuencia mayor de islotes muy alargados una semana posterior al destete, formados en su mayoría por células β (91.4%), mismos que parecían fraccionados, fenómeno que podría interpretarse como islotes en vía de formación. Además, por la distribución de las células positivas a glucagón, encontramos que en esos islotes alargados, las células α se encontraban agrupadas de tal forma que sugieren estar marcando un lugar de fisión del islote. Tal vez la formación de nuevos islotes sea propio del periodo de post-lactancia, por lo que será interesante analizar en días posteriores a los 7 días si estas formas derivan en mayor número de islotes de menor tamaño.

Se encontró que después del embarazo y la lactancia la proporción de células β y α se modifica. Dado que al día 7 de post lactancia se ve una pequeña reversión en los cambios abruptos en la composición celular observados entre el grupo control y el término de la

lactancia, sería interesante analizar si en algún tiempo posterior en la post lactancia se restituye la proporción de células observadas en los ratones control.

Una semana después de la lactancia aún se encuentran las mismas proporciones de células α y β se esperaba que los valores regresaran a los observados en ratones no gestantes, pero no fue así. Puede que se mantengan los cambios para que la hembra se encuentre lista para un futuro embarazo y el reto metabólico que implica. Tal suposición parece correlacionarse con la aparente formación de nuevos islotes durante la post-lactancia. Se sugiere un estudio de morfometría en un segundo y tercer embarazo para probar esta hipótesis.

Al realizarse la curva de tolerancia a la glucosa en nuestro estudio, no se observaron diferencias entre el fin de la lactancia y una semana después del término de la misma. Caso contrario a lo observado en la curva de tolerancia a la insulina, en la cuál al día de término de la lactancia (post lactancia 0) se muestra una menor sensibilidad a la insulina, patrón parecido al de la gestación (Canul-Medina, 2014), periodo de alta resistencia a la insulina. Puede que los cambios hormonales durante la lactancia hayan jugado un papel importante en la sensibilidad a la insulina. Hay que señalar que paradójicamente, la intolerancia a la insulina no se ve reflejada en la curva de tolerancia a la glucosa, lo cual puede ser debido a una mayor secreción de insulina durante la lactancia. Determinar los niveles plasmáticos de insulina podría aclarar este punto.

CONCLUSIÓN

Hasta la fecha se desconocía que el islote materno pancreático atravesara por modificaciones en tamaño, cambios en la proporción de células α y β en la masa total, en la glucemia y sensibilidad a la insulina al término de la lactancia y durante la post lactancia. Se concluye que:

1. Una baja proporción de islotes pancreáticos de casi el doble del tamaño promedio se encuentran una semana después de terminada la lactancia, con respecto a los islotes de las hembras no gestantes. Esta es la primera vez que se reporta este hallazgo.
2. Cambios en la composición del islote: la proporción de tipos de celulares que lo componen, como las células α y β , se modifica. Al término de la lactancia, las células β alcanzan una mayor proporción, ocupando cerca del 93% del total del islote, hecho que se asocia con la resistencia a la insulina observada durante este periodo. Al mismo tiempo, las células α muestran la menor proporción (7%). Una semana después de la lactancia aún se encuentran las mismas proporciones de células α y β .
3. El día de término de la lactancia se encuentra una alta resistencia a la acción de la insulina mientras que 7 días después de terminada ésta, la sensibilidad a la insulina se normaliza.

PERSPECTIVAS

Los datos generados en este trabajo, sugieren el desarrollo de nuevos estudios relacionados con los mecanismos moleculares y celulares que conducen a la modificación del tamaño y masa de los islotes de Langerhans durante la gestación, la lactancia y la post-lactancia.

Entender los cambios producidos durante estas etapas podría ayudar a establecer estrategias para contrarrestar la pérdida de la masa de los islotes y las células β , como lo es en el caso de la diabetes.

REFERENCIAS

- Ackermann, A. M., & Gannon, M. (2007). Molecular regulation of pancreatic β -cell mass development, maintenance, and expansion. *Journal of molecular endocrinology*, *38*(2), 193-206.
- Amaral, M. E. C., Ueno, M., Carvalheira, J. B., Carneiro, E. M., Velloso, L. A., Saad, M. J. A., & Boschero, A. C. (2003). Prolactin-signal transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-signaling pathway. *Hormone and Metabolic Research*
- Anhê, G. F., Nogueira, T. C., Nicoletti-Carvalho, J. E., Lellis-Santos, C., Barbosa, H. C., Cipolla-Neto, J., ... & Bordin, S. (2007). Signal transducer and activator of transcription 3-regulated sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 expression by prolactin and glucocorticoids is involved in the adaptation of insulin secretory response during the peripartum period. *Journal of Endocrinology*, *195*(1), 17-27.
- Al-Noaemi, M. C., & Shalayel, M. H. F. (2011). Pathophysiology of gestational diabetes mellitus: the past, the present and the future. In *Gestational Diabetes*. InTech
- Billaudel, B., & Sutter, B. C. J. (1979). Direct effect of corticosterone upon insulin secretion studied by three different techniques. *Hormone and Metabolic Research*, *11*(10), 555-560
- Billaudel, B., Mathias, P. C. F., Sutter, B. C. J., & Malaisse, W. J. (1984). Inhibition by corticosterone of calcium inflow and insulin release in rat pancreatic islets. *Journal of endocrinology*, *100*(2), 227-233.
- Bonner-Weir, S. (2000). Perspective: postnatal pancreatic β cell growth. *Endocrinology*, *141*(6), 1926-1929.
- Bouwens, L., & Rومان, I. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiological reviews*, *85*(4), 1255-1270.
- Brelje, T. C., Svensson, A. M., Stout, L. E., Bhagroo, N. V., & Sorenson, R. L. (2002). An immunohistochemical approach to monitor the prolactin-induced activation of the JAK2/STAT5 pathway in pancreatic islets of Langerhans. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *50*(3), 365-383.
- Bromati, C. R., Lellis-Santos, C., Yamanaka, T. S., Nogueira, T. C., Leonelli, M., Caperuto, L. C., ... & Bordin, S. (2010). UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3

expression. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(1), R92-R100.

Bonner-Weir, S., Aguayo-Mazzucato, C., & Weir, G. C. (2016). Dynamic development of the pancreas from birth to adulthood. *Upsala journal of medical sciences*, 121(2), 155-158.

Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2003). β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52(1), 102-110.

Catalano, P. M. (1999). Pregnancy and lactation in relation to range of acceptable carbohydrate and fat intake. *European journal of clinical nutrition*, 53(s1), s124.

Chandra, R., & Liddle, R. A. (2009). Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion. *Current opinion in gastroenterology*, 25(5), 441.

Chintinne, M., Stangé, G., Denys, B., Hellemans, K., Pipeleers-Marichal, M., Ling, Z., & Pipeleers, D. (2010). Contribution of postnatally formed small beta cell aggregates to functional beta cell mass in adult rat pancreas. *Diabetologia*, 53(11), 2380-2388.

Collins, J. N., Kirby, B. J., Woodrow, J. P., Gagel, R. F., Rosen, C. J., Sims, N. A., & Kovacs, C. S. (2013). Lactating Ctcgrp nulls lose twice the normal bone mineral content due to fewer osteoblasts and more osteoclasts, whereas bone mass is fully restored after weaning in association with up-regulation of Wnt signaling and other novel genes. *Endocrinology*, 154(4), 1400-1413.

Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I., & Melton, D. A. (2004). Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, 429(6987), 41.

Drasutiene, G. S., Tutkuvienė, J., Zakareviciene, J., Ramasauskaite, D., Kasilovskiene, Z., Lauzikiene, D., ... & Drasutis, J. (2007). Changes in anthropometric and metabolic parameters in pregnancy and neonatal physical development during last decades. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 43(1), 10-26.

Freemark, M., Avril, I., Fleenor, D. O. N., Driscoll, P., Petro, A., Opara, E., ... & Breant, B. (2002). Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology*, 143(4), 1378-1385.

Freemark, M. (2006). Regulation of maternal metabolism by pituitary and placental hormones: roles in fetal development and metabolic programming. *Hormone Research in Paediatrics*, 65(Suppl. 3), 41-49.

Fu, Z., R Gilbert, E., & Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews*, 9(1), 25-53.

Gloyn, A. L., Tribble, N. D., van de Bunt, M., Barrett, A., & Johnson, P. R. (2008). Glucokinase (GCK) and other susceptibility genes for β -cell dysfunction: the candidate approach.

Gunderson, E. P., Lewis, C. E., Wei, G. S., Whitmer, R. A., Quesenberry, C. P., & Sidney, S. (2007). Lactation and changes in maternal metabolic risk factors. *Obstetrics and gynecology*, *109*(3), 729.

Huang, C., Snider, F., & Cross, J. C. (2008). Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of β -cell mass during pregnancy. *Endocrinology*, *150*(4), 1618-1626.

Jäger, S., Jacobs, S., Kröger, J., Fritsche, A., Schienkiewitz, A., Rubin, D., ... & Schulze, M. B. (2014). Breast-feeding and maternal risk of type 2 diabetes: a prospective study and meta-analysis. *Diabetologia*, *57*(7), 1355-1365.

Khan, A., Ostenson, C. G., Berggren, P. O., & Efendic, S. (1992). Glucocorticoid increases glucose cycling and inhibits insulin release in pancreatic islets of ob/ob mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *263*(4), E663-E666

Kirby, B. J., Ardeshirpour, L., Woodrow, J. P., Wysolmerski, J. J., Sims, N. A., Karaplis, A. C., & Kovacs, C. S. (2011). Skeletal recovery after weaning does not require PTHrP. *Journal of Bone and Mineral Research*, *26*(6), 1242-1251.

Lain, K. Y., & Catalano, P. M. (2007). Metabolic changes in pregnancy. *Clinical obstetrics and gynecology*, *50*(4), 938-948.

Lambillotte, C., Gilon, P., & Henquin, J. C. (1997). Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *The Journal of clinical investigation*, *99*(3), 414-423.

Lellis-Santos, C., Sakamoto, L. H., Bromati, C. R., Nogueira, T. C., Leite, A. R., Yamanaka, T. S., ... & Bordin, S. (2012). The regulation of Rasd1 expression by glucocorticoids and prolactin controls peripartum maternal insulin secretion. *Endocrinology*, *153*(8), 3668-3678.

Liu, X. S., Ardeshirpour, L., VanHouten, J. N., Shane, E., & Wysolmerski, J. J. (2012). Site-specific changes in bone microarchitecture, mineralization, and stiffness during lactation and after weaning in mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, *27*(4), 865-875.

Lombardo, M. F., De Angelis, F., Bova, L., Bartolini, B., Bertuzzi, F., Nano, R., ... & Donadel, G. (2011). Human placental lactogen (hPL-A) activates signaling pathways linked to cell survival and improves insulin secretion in human pancreatic islets. *Islets*, *3*(5), 250-258.

Lund, L. R., Romer, J., Thomasset, N., Solberg, H., Pyke, C., Bissell, M. J., ... & Werb, Z. (1996). Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and-dependent pathways. *Development*, 122(1), 181-193.

Matschinsky, F. M. (1996). A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*, 45(2), 223-241.

Meier, J. J., Butler, A. E., Saisho, Y., Monchamp, T., Galasso, R., Bhushan, A., ... & Butler, P. C. (2008). β -Cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of β -cell mass in humans. *Diabetes*, 57(6), 1584-1594.

Meglasson, M. D., & Matschinsky, F. M. (1986). Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes/metabolism reviews*, 2(3-4), 163-214.

Migliorini, A., Bader, E., & Lickert, H. (2014). Islet cell plasticity and regeneration. *Molecular metabolism*, 3(3), 268-274.

Mirmira RG K: Metabolic Syndrome Poster: Pancreatic islet function during normal metabolic physiology. 2010. <https://www.nature.com/nm/poster/Pancreas-Organ-Normal.html>

Morimoto, S., Morales, A., Zambrano, E., & Fernandez-Mejia, C. (2010). Sex steroids effects on the endocrine pancreas. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 122(4), 107-113

Motyl, K. J., McCabe, L. R., & Schwartz, A. V. (2010). Bone and glucose metabolism: a two-way street. *Archives of biochemistry and biophysics*, 503(1), 2-10.

Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Ropero, A. B., & Quesada, I. (2009). The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *The Journal of physiology*, 587(21), 5031-5037.

Ng, K. W. (2011). Regulation of glucose metabolism and the skeleton. *Clinical endocrinology*, 75(2), 147-155.

Nicoletti-Carvalho, J. E., Lellis-Santos, C., Yamanaka, T. S., Nogueira, T. C., Caperuto, L. C., Leite, A. R., ... & Bordin, S. (2010). MKP-1 mediates glucocorticoid-induced ERK1/2 dephosphorylation and reduction in pancreatic β -cell proliferation in islets from early lactating mothers. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299(6), E1006-E1015.

Parsons, J. A., Brelje, T. C., & Sorenson, R. L. (1992). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology*, *130*(3), 1459-1466.

Pi, M., Wu, Y., & Quarles, L. D. (2011). GPRC6A mediates responses to osteocalcin in β -cells in vitro and pancreas in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, *26*(7), 1680-1683.

Pierluissi, J., Navas, F. O., & Ashcroft, S. J. H. (1986). Effect of adrenal steroids on insulin release from cultured rat islets of Langerhans. *Diabetologia*, *29*(2), 119-121.

Quarrie, L. H., Addey, C. V., & Wilde, C. J. (1996). Programmed cell death during mammary tissue involution induced by weaning, litter removal, and milk stasis. *Journal of cellular physiology*, *168*(3), 559-569.

Ramos-Román, M. A. (2011). Prolactin and lactation as modifiers of diabetes risk in gestational diabetes. *Hormone and metabolic research*, *43*(09), 593-600.

Razzaque, M. S. (2010). Osteocalcin: a pivotal mediator or an innocent bystander in energy metabolism?. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *26*(1), 42-45.

Rieck, S., & Kaestner, K. H. (2010). Expansion of β -cell mass in response to pregnancy. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *21*(3), 151-158.

Rieck, S., White, P., Schug, J., Fox, A. J., Smirnova, O., Gao, N., ... & Attie, A. D. (2009). The transcriptional response of the islet to pregnancy in mice. *Molecular endocrinology*, *23*(10), 1702-1712.

Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & molecular medicine*, *48*(3), e219.

Roig A: La duración de la lactancia materna se asocia a un menor riesgo de infarto de miocardio entre la mediana edad y finales de la edad adulta. *Enfermería Clínica* 2009, *19*(04):231-232

Rorsman, P., & Renström, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, *46*(8), 1029-1045.

Rutter, G. A., Pullen, T. J., Hodson, D. J., & Martinez-Sanchez, A. (2015). Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. *Biochemical Journal*, *466*(2), 203-218.

Scaglia, L., Smith, F. E., & Bonner-Weir, S. U. S. A. N. (1995). Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology*, *136*(12), 5461-5468.

Schuit, F. C. (1997). Is GLUT2 required for glucose sensing?. *Diabetologia*, *40*(1), 104-111.

Schwetz, V., Pieber, T. R., & Obermayer-Pietsch, B. R. (2012). The Endocrine Role of the Skeleton-Background and Clinical Evidence. *European Journal of Endocrinology*, EJE-12.

Slack, J. M. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development*, *121*(6), 1569-1580.

Sorenson, R. L., & Brelje, T. C. (1997). Adaptation of islets of langerhans to pregnancy: b-cell growth, enhanced insulin secretion and the role. *Horm Metab Res*, *29*, 301-307.

Sullivan, T. R., Duque, G., Keech, A. C., & Herrmann, M. (2013). An old friend in a new light: the role of osteocalcin in energy metabolism. *Cardiovascular therapeutics*, *31*(2), 65-75.

Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., ... & Tsutsumi, S. (2007). Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory β cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, *117*(1), 246-257

Vasavada, R. C., Garcia-Ocaña, A., Zawalich, W. S., Sorenson, R. L., Dann, P., Syed, M., ... & Stewart, A. F. (2000). Targeted expression of placental lactogen in the beta cells of transgenic mice results in beta cell proliferation, islet mass augmentation, and hypoglycemia. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(20), 15399-15406.

Wang, X., Misawa, R., Zielinski, M. C., Cowen, P., Jo, J., Periwal, V., ... & Millis, J. M. (2013). Regional differences in islet distribution in the human pancreas-preferential beta-cell loss in the head region in patients with type 2 diabetes. *PloS one*, *8*(6), e67454.

Weinhaus, A. J., Bhagroo, N. V., Brelje, T. C., & Sorenson, R. L. (2000). Dexamethasone counteracts the effect of prolactin on islet function: implications for islet regulation in late pregnancy. *Endocrinology*, *141*(4), 1384-1393.

Wolf, B. A., Colca, J. R., Turk, J. O. H. N., Florholmen, J., & McDaniel, M. L. (1988). Regulation of Ca²⁺ homeostasis by islet endoplasmic reticulum and its role in insulin secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, *254*(2), E121-E136.

Wollheim, C. B., & Sharp, G. W. (1981). Regulation of insulin release by calcium. *Physiological reviews*, *61*(4), 914-973.

