



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS
DE LOS ISLOTES PANCREÁTICOS
MATERNOS EN RATONES PRIMÍPAROS Y
MULTÍPAROS**

T E S I S

QUE PRESENTA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A:

FATIMA ERENDIRA BENITEZ RAMIREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA

Facultad de Medicina



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. María Cristina Fernández Mejía**, por recibirme en su laboratorio y dirigir este proyecto de investigación, ser mi guía académica y humana; por escuchar, apoyar y corregir mis propuestas e ideas. Gracias infinitas por su dedicación, compromiso y pasión por la generación de conocimiento y gracias por compartir eso conmigo.

Al Dr. Jesús Adolfo García Saíenz, la Dra. Ivette Caldelas Sánchez, la Dra. María Teresa Tusié Luna y a la Dra. Yazmín Macotela Guzmán por ser parte del jurado de examen, por el tiempo invertido en el mejoramiento de esta tesis, su crítica constructiva y sus aportaciones. Mi admiración, respeto y cariño para cada uno.

A la Dra. Wilma Tixi Verdugo por enseñarme las técnicas que se emplearon en este proyecto y por las aportaciones intelectuales que brindó en este proyecto.

A mis tutores a lo largo de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica, el Dr. Rafael Camacho Carranza y la Dra. Diana Escalante Alcalde por instruirme y enseñarme a realizar investigación de manera independiente y a ser valiente ante los retos intelectuales y personales.

A mis magníficos maestros, el Dr. Alejandro Zentella Dehesa, el Dr. Carlos Ochoa, el Dr. Jesús Chimal, el Dr. Iván Velasco y la Dra. Ma. Dolores Correa Beltrán por los conocimientos compartidos y, sobre todo, por iluminarme el alma con la parte creativa de la ciencia.

A mis compañeros de la licenciatura, amigos del laboratorio por compartir gratos momentos, así como la oportunidad de intercambiar conocimientos, trabajar juntos y aportar ideas para cada uno de nuestros proyectos.

A mi maravillosa familia nuclear, integrada por mi padre Uriel Benítez, mi madre Susana Ramírez, mi hermano Pablo Benítez y mi abuela Loreto García por su amor incondicional por su fe en mí y en mis proyectos personales y profesionales.

RESUMEN

Los islotes de Langerhans constituyen el tejido endócrino del páncreas. En roedores, los islotes se componen predominantemente por las células- β y las células- α encargadas de la secreción de insulina y glucagon, respectivamente, esenciales para la homeostasis de glucosa.

El tejido endócrino pancreático de animales y humanos puede modificar su morfología, composición y capacidad secretora como respuesta a eventos que requieren un incremento sistémico en la demanda de insulina, uno de ellos es la gestación. En la gestación se presenta un incremento en la cantidad de tejido endócrino durante la etapa temprana, mientras que la hiperplasia de células- β ocurre en la mitad de gestación, ambos fenómenos son resultado a la resistencia a insulina, que se desarrolla progresivamente en el embarazo con el fin de suplir glucosa al feto.

Se ha propuesto que, en humanos, la multiparidad puede alterar a largo plazo la homeostasis de glucosa debido a la exposición repetida de alteraciones hormonales, e incrementar el riesgo a desarrollar la diabetes tipo 2 asociado a un aumento en el número de embarazos. Sin embargo, en los estudios epidemiológicos que han analizado esta relación existen controversias debido a la heterogeneidad de las poblaciones humanas y el gran número de factores demográficos que pueden estar involucrados en esta asociación.

Al finalizar la gestación comienza el periodo de lactancia, que se considera confiere beneficios en la salud de las madres a corto y a largo plazo. Dentro de los beneficios a corto plazo se encuentra que se promueve la reversión de las adaptaciones metabólicas, causadas por el embarazo que involucran mejor tolerancia a la glucosa, disminución del peso corporal, un menor perfil aterogénico y mejor distribución del tipo de grasa corporal, en comparación con mujeres no lactantes. Los efectos benéficos de la lactancia a largo plazo incluyen una reducción en el riesgo a desarrollar cáncer de mama y de ovario, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo-2; sin embargo, se sabe poco sobre el efecto de la lactancia en los tejidos que participan en la homeostasis de glucosa.

Por lo tanto, el objetivo de este proyecto de tesis es analizar la morfometría de islotes durante la primera y segunda gestación, en presencia o ausencia de lactancia, en un modelo de ratones de la cepa C57BL/6 en el que la única variable es el número de gestaciones.

En este trabajo se describió por primera vez la dinámica de cambios presente en la primera y segunda gestación en presencia o ausencia de lactancia. Se observó que el tamaño del islote, área positiva a insulina y número de células- β aumentan en la gestación media y disminuye hacia el final de la primera gestación. De manera interesante, se demostró el aumento progresivo en la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina en la gestación tardía.

Se observó también que, en el día 14 de la segunda gestación se presenta una mayor densidad de células- β con respecto al día 14 de la primera gestación y que la lactancia favorece las adaptaciones morfológicas en el día 14 del segundo evento gestacional, debido a que el aumento en el tamaño del islote pancreático y en el número de células- β en el día 14 de la segunda gestación son dependientes de la lactancia.

CONTENIDO

1. Abreviaturas

2. Introducción

2.1 Estructura y Fisiología del páncreas endócrino

2.2 Las células- β y la secreción de insulina en el islote pancreático

- Secreción de insulina en respuesta a glucosa

2.3 Diferencias morfológicas asociadas con la heterogeneidad funcional de los islotes pancreáticos.

- Cambios morfológicos y de composición en los islotes pancreáticos durante condiciones fisiológicas y patológicas

2.4 Adaptaciones fisiológicas durante la gestación

- Comunicación nutricional materno-fetal.
- Transporte de Glucosa a través de la placenta.
- Metabolismo feto-placentario de glucosa.
- Gradiente de glucosa en la circulación materno-fetal.

2.4 Dinámica de cambios en los islotes pancreáticos durante la gestación.

- Cambios estructurales del islote pancreático durante la gestación.
- Secreción de insulina durante la gestación.
- Insulinorresistencia en la etapa tardía de la gestación
- Efecto de las hormonas somatotropas en el páncreas endócrino.
- Mecanismo de adaptación del islote pancreático mediado por distintas vías de señalización.
- Involución del islote pancreático materno en el postparto.
- Efecto de la lactancia en la reversión de las adaptaciones gestacionales
- Efecto de la prolactina en el crecimiento de los islotes pancreáticos maternos y su secreción de insulina

2.5 Efectos de la gestación múltiparo en los islotes pancreáticos de roedores y humanos

- Asociación del número de embarazos con el riesgo de Diabetes tipo 2 y desordenes metabólicos relacionados.

3. Planteamiento y Justificación

4. Hipótesis

5. Objetivo

6. Materiales y Métodos

- Modelo animal
- Procesamiento del tejido para hacer cortes histológicos del páncreas
- Protocolo para Inmunohistoquímica
- Anticuerpos y diluciones
- Morfometría de los islotes.
- Análisis estadístico

7. Resultados

7.1 Cambios morfológicos de los islotes pancreáticos maternos durante la primera gestación

- 7.1.a Área total del islote pancreático en la primera gestación
- 7.1.b Cambios en el porcentaje de área positiva a insulina durante la primera gestación
- 7.1.c Cambios en la composición celular del islote pancreático durante la primera gestación: Cuantificación del número y tamaño individual de las células- β .
- 7.1.d Cambios en la composición celular del islote pancreático durante la primera gestación: Cuantificación del número y tamaño individual de las células- α .
- 7.1.e Efecto de la primera gestación en la tolerancia a la glucosa
- 7.1.f Curva de tolerancia a la insulina durante la primera gestación

7.2 Comparación de los cambios morfológicos de los islotes pancreáticos maternos entre la primera y la segunda gestación cuando existió proceso de lactancia

- 7.2.a Comparación del área total del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió proceso de lactancia
- 7.2.b Comparación del área positiva a insulina entre la primera y la segunda gestación cuando existió proceso de lactancia
- 7.2.c Comparación de la composición celular del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió el proceso de lactancia: cuantificación del número y tamaño individual de las células- β
- 7.2.d Comparación en la composición celular del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió el proceso de lactancia Cambios en la segunda gestación cuando existió un proceso de lactancia: Cuantificación del número y tamaño individual de las células- α

7.3 Efecto de la lactancia en los cambios morfológicos de los islotes pancreáticos en el día 14 de la segunda gestación: Comparación de la segunda gestación entre el grupo en el que si existió lactancia vs. el no lactante

- 7.3.a Comparación del aumento en el tamaño del islote pancreático materno durante la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia
- 7.3.b Comparación del número de células- β y de su tamaño individual durante el día 14 la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia
- 7.3.c Comparación del número de células- α y de su área individual durante el día 14 de la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia

8. Discusión

- Efecto de la primera gestación en la morfología del islote pancreático y la homeostasis de glucosa
- Relación entre las características morfométricas del islote pancreático materno y sus componentes con la tolerancia a la glucosa e insulina en los días 14 y 17 de la primera gestación
- Comparación morfológica entre el día 14 de la primera gestación y el día 14 de la segunda gestación
- Efecto de la lactancia en la morfología del islote pancreático materno durante la segunda gestación

9. Conclusión

10. Referencias

1. ABREVIATURAS

1° G14	Día 14 de la Primera Gestación
1° G17	Día 17 de la Primera Gestación
2° CE	Control edad de la Primera Gestación
2° G14 LAC	Día 14 de la Segunda Gestación-Grupo Lactante
2° G14 NL	Día 14 de la Segunda Gestación-Grupo No Lactante
AKT/PKB	Proteína cinasa B
ATP	Trifosfato de adenosina
BrdU	Bromodeoxiuridina
Ca ²⁺	Calcio
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
E1	Estrona
E2	Estriol
ER	Retículo endoplasmático
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FFA	Ácidos grasos libres
Foxd3	Forkhead box D3
FoxM1	Forkhead box M1
GH	Hormona de crecimiento
GLI	Gránulos de liberación inmediata
GLL	Gránulos listos para la liberación
GLUT	Transportador de glucosa
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
hPL	Lactógeno Placentario en humano
Htr2b	Receptor 2B de Hidroxitriptamina
IAPP	Polipéptido amiloide
JACK2	Cinasa Janus 2
K ⁺	Potasio

K _{ATP}	Canal de potasio sensible a ATP
MAPK	Cinasa de proteína activada por mitógenos
MB	Membrana basal
MMV	Membrana de microvellosidades
mTOR	Mammalian target of rapamycin
Na ⁺	Sodio
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxilcinasa
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor de prolactina
PTHrp	Péptido placentario relacionado con la hormona paratiroidea
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
rPL-I	Lactógeno placentario de ratas
SRP	Señal de Ribonucleoproteína Citosólica
STAT5	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción
Tph1	Triptófano hidroxilasa 1
Tph2	Triptófano hidroxilasa 2

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Estructura y fisiología del páncreas endócrino

El páncreas es un órgano mixto, compuesto por glándulas exocrinas y endocrinas. El páncreas exocrino consiste en células acinares y ductales epiteliales que secretan enzimas digestivas y HCO_3^- hacia el lumen intestinal. Las células acinares producen y liberan una variedad de zimógenos que son transportados a través del sistema pancreático ductal al duodeno para la digestión de nutrientes (Bakhti et al., 2018, Sheerwood et al., 2014).

Dispersos en todo el páncreas, entre las células exocrinas, se encuentran alrededor de un millón de agrupaciones o “islas” de células endocrinas denominadas Islotes de Langerhans.

Los islotes de Langerhans constituyen entre el 1%-2% de la masa total pancreática de una rata adulta y tienen un rango de 100-200 μm de diámetro. Mientras que en el páncreas en humanos, contiene en promedio 3.2 millones de islotes, con un diámetro promedio de 108.92 μm ($\pm 6.27 \mu\text{m}$).

Los islotes consisten en un conjunto de células poligonales rodeadas por una lámina basal, una red de fibras reticulares (tipo de fibra de tejido conectivo compuesta por colágeno III) y capilares intercalados (Mense et al., 2018) (Fig. 1).

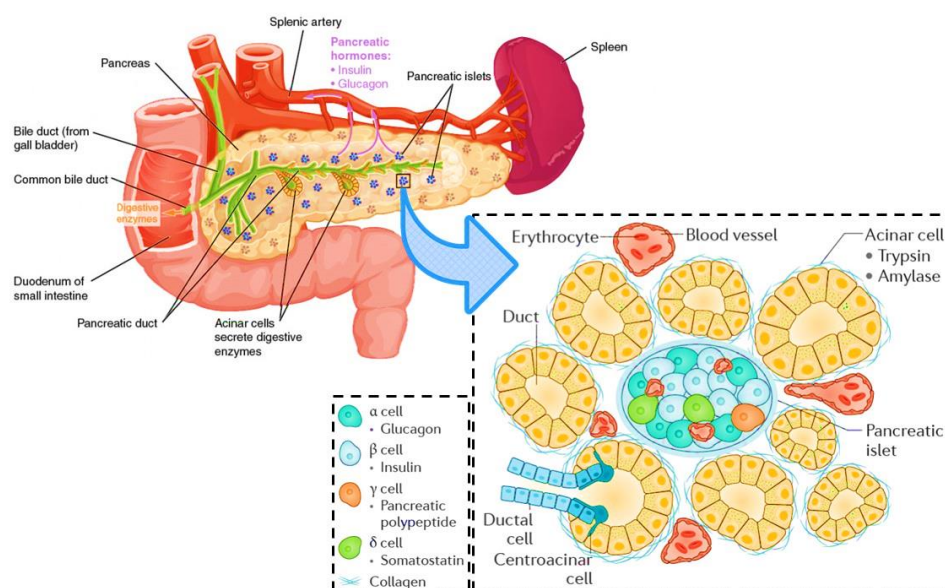


Figura 1. El páncreas como órgano mixto y estructura del islote pancreático.

*Modificado de courses.lumenlearning.com y (Ellis, Ramzy, & Kieffer, 2017)

Los tipos celulares del páncreas endócrino secretan distintas hormonas. En orden decreciente de abundancia las células que componen al islote, son: las células beta (β) que secretan insulina, péptido C y amilina, las células alfa (α) secretan glucagon, las células delta (δ) secretan somatostatina, que inhibe la digestión y absorción de nutrientes. Las células gamma (γ) también llamadas células F secretan polipéptido pancreático, una hormona que posiblemente tiene un papel en la reducción del apetito e ingesta alimenticia y finalmente las células epsilon (ϵ) que se encuentran en el islote durante el desarrollo embrionario del páncreas, pero desaparecen en el órgano adulto, secretan ghrelina, la “hormona del hambre” (Boron Boulaep et al., 2014, Sheerwood et al., 2014).

La composición y arquitectura de los islotes pancreáticos es distinta entre especies. De manera particular, la composición celular en el islote pancreático del humano adulto y del ratón adulto varía considerablemente; los islotes pancreáticos aislados de humano contienen $53.9 \pm 2.5\%$ de células- β , $34.4 \pm 2.5\%$ de células- α , y $10.4 \pm 0.9\%$ de células- δ . Mientras que en los islotes aislados de ratón se componen de un $75.4 \pm 1.2\%$ de células- β , un $18.7 \pm 0.9\%$ de células- α y un $5.9 \pm 0.5\%$ de células- δ . Adicionalmente, los islotes exhiben una arquitectura distinta, ya que, en el ratón adulto, las células- β se posicionan en el centro de los islotes y los tipos celulares restantes se distribuyen en la periferia. Mientras que, en el humano, los islotes presentan una organización espacial más heterogénea, con las células- β dispersas entre los demás tipos celulares. La variabilidad entre especies en la composición del islote pancreático podría reflejar adaptaciones evolutivas a diferentes hábitos alimenticios u otras constricciones ambientales. (Brissova et al., 2005). (Fig. 2).

El balance preciso en la función de estas hormonas pancreáticas regula los niveles sanguíneos de glucosa y contribuye al metabolismo energético. Las células- β , responden dinámicamente a incrementos sistémicos en la demanda de insulina, regulando su capacidad secretora y expandiendo su masa funcional, incrementando su tamaño celular, ajustando su tasa de proliferación y muerte celular, para mantener la homeostasis de la glucosa. La desregulación en estos mecanismos es una característica esencial en la patogénesis de la diabetes mellitus, un desorden metabólico prevalente que se estima, afectará a 300 millones de personas en 2025 (Rieck et al., 2013).

En mamíferos, la masa de la célula β , considerada como el producto numérico del área positiva a insulina en el islote pancreático por el peso del páncreas, se mantiene mediante el balance entre el crecimiento y la pérdida celular (Rieck et al., 2013).

Existen varios reportes basados en la interpretación de datos histológicos, que indican que el incremento de la masa de la célula- β puede ser el producto de diversos procesos, como: a) hipertrofia de las células- β o b) proliferación, división mitótica de células- β maduras (Georgia & Bhushan, 2004) o c) neogénesis, diferenciación a partir de células troncales pancreáticas adultas que residen en el epitelio de los ductos pancreáticos (Eberhard et al., 2009; Yuval Dor et al., 2004) o mediante d) transdiferenciación de células acinares (Lipsett M et al. 2002), esplenocitos (Guz et al., 2014) u otras células del islote no secretoras de insulina (Kodama et al., 2003). Estudios de trazado de linaje desarrollados en ratones adultos demuestran que la mayoría de las células- β nuevas se derivan de la replicación de las células- β preexistentes, y unas pocas, si es que hay algunas, derivan de poblaciones progenitoras (Yuval Dor et al., 2004).

Evidencia creciente sugiere que, en roedores y humanos, la proliferación e hipertrofia de las células- β ocurre durante periodos de intensa demanda

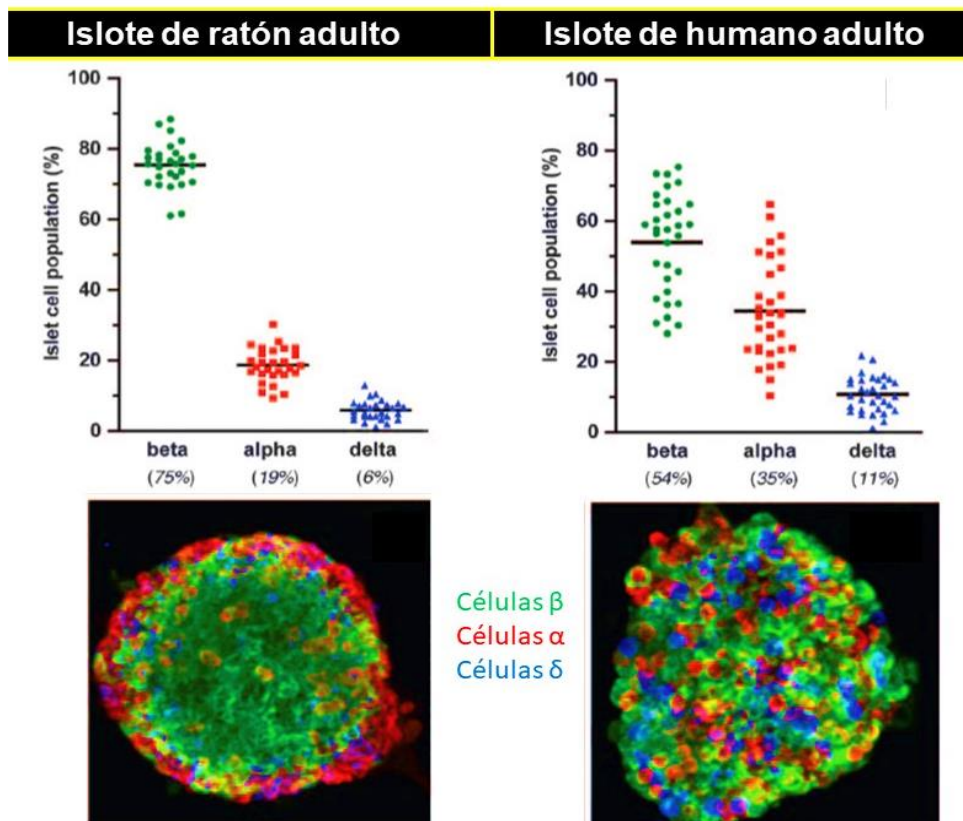


Figura 2. Diferencias en la composición y organización espacial entre los islotes pancreáticos de ratón adulto y humano adulto. *Modificada de Brissova, et.al. 2005

metabólica, característicos de eventos fisiológicos como el envejecimiento y la gestación, y patológicos como la obesidad (Lee & Nielsen, 2009).

2.2 Las células- β y la secreción de insulina en el islote pancreático

Las células- β pancreáticas regulan la síntesis, procesamiento, almacenamiento y modulación de la secreción de insulina en respuesta a incrementos en las concentraciones de nutrientes en sangre periférica durante el estado posprandial, principalmente en respuesta a las concentraciones de glucosa (

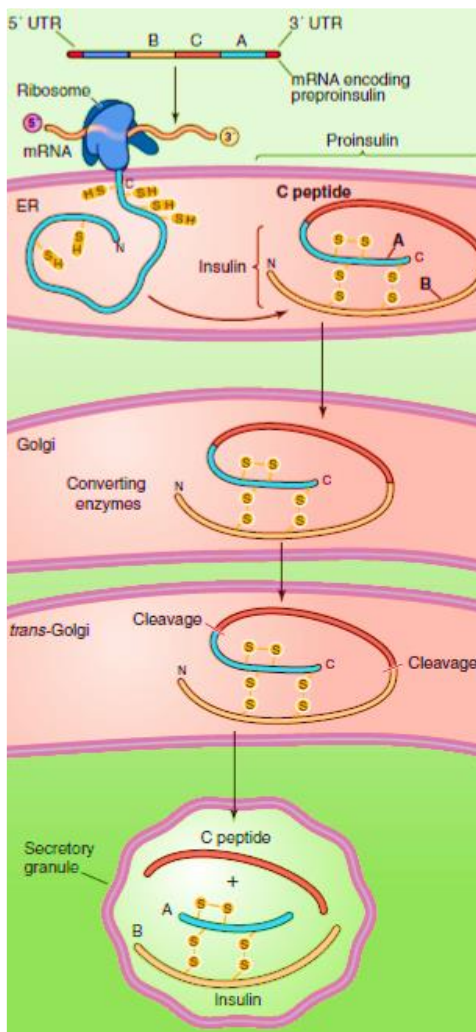


Figura 3. Síntesis y procesamiento de la molécula de insulina.
*Modificada de Boron Boulpaep 2012.

Vega-Monroy ML et al., 2012, Fu et al, 2013).

La insulina secretada en humanos es una hormona peptídica con un peso molecular de 5.8 kDa, hecha de dos cadenas polipeptídicas, denominadas A y B, unidas por puentes disulfuro (Cho et al., 1971). La molécula de insulina madura está constituida por 51 aminoácidos, 21 en la cadena A y 30 en la cadena B. Sin embargo, el gen de la insulina codifica para un precursor de 110 aminoácidos conocido como preproinsulina, que contiene un péptido señal hidrofóbico en el extremo N-terminal, que interacciona con partículas de reconocimiento de señal de ribonucleoproteína citosólica (SRP) (Egea et al., 2005). La SRP facilita la translocación de la preproinsulina al interior del Retículo Endoplasmático (ER) donde se rompe por una peptidasa para generar proinsulina. La proinsulina se pliega y forma 3 enlaces disulfuro un proceso que requiere de

diversas chaperonas del ER. Subsecuentemente, la proinsulina plegada se transporta desde el ER, al Aparato de Golgi donde la proinsulina entra a vesículas secretoras inmaduras y dentro se rompe para dar lugar a insulina y al

péptido C. Ambos productos se almacenan en gránulos secretores junto con el polipéptido amiloide (IAPP o amilina) y otros productos secretores de la célula- β menos abundantes (Fu et al., 2013) (Fig. 3).

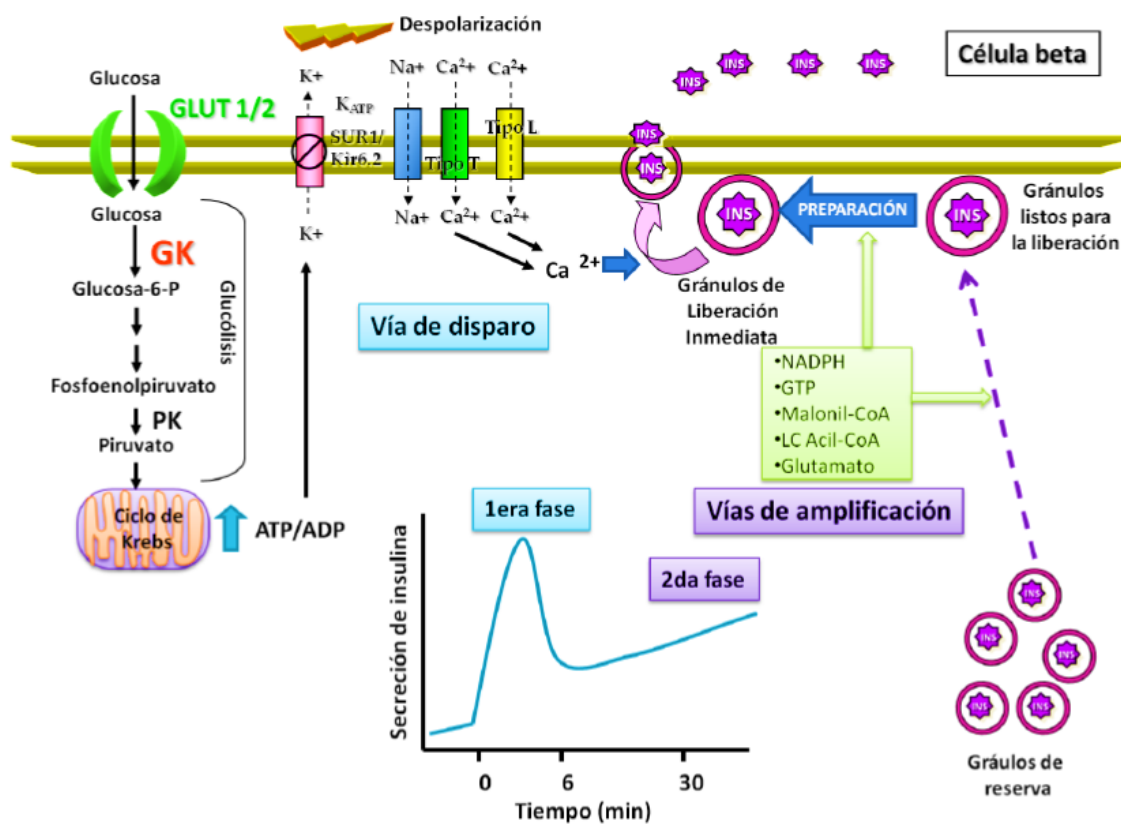
Secreción de insulina en respuesta a glucosa

La célula- β determina la cantidad de insulina que requiere secretar en respuesta a las concentraciones de glucosa en sangre, mediante un mecanismo en el que participa el metabolismo de glucosa intracelular de la célula- β , el cual activa vías de señalización que estimulan la transcripción, traducción y secreción de la insulina. La secreción de insulina en respuesta a glucosa es pulsátil y bifásica (Stagner et al., 2017). Dichos pulsos se asocian a oscilaciones sincrónicas de calcio (Ca^{+2}) (Bergsten et al. 1994) y se sugiere que podrían estar acoplados a oscilaciones en la glucólisis de la célula- β (Kar et al., 2005) . De manera interesante, los pulsos secretorios están regulados y sincronizados con los otros tipos celulares que componen al islote pancreático. Dada su función antagónica, la insulina y glucagon tienen patrones de secreción asincrónicos, mientras que los pulsos de somatostatina se sincronizan con la secreción de insulina (Stagner et al., 2017).

Como se mencionó anteriormente, la secreción de insulina en respuesta a glucosa es bifásica. **La primera fase de secreción de insulina**, también conocida como vía de disparo, requiere de: el transporte por difusión facilitada y oxidación de glucosa, cambios electrofisiológicos y la fusión de gránulos secretores que almacenan la insulina con la membrana plasmática de la célula- β . (Vega Monroy et al., 2012) (Fig. 4). En la célula- β pancreática la glucosa se transporta a través de la membrana mediante el GLUT2, una vez dentro, la glucosa es fosforilada por la glucocinasa y así comienza la glucólisis y el Ciclo de Krebs, que resultan en la síntesis de ATP. El aumento en la concentración intracelular de ATP provoca el cierre del canal de potasio (K^{+}) sensible a ATP (K_{ATP}), lo cual permite la entrada de sodio (Na^{+}). Estos dos eventos despolarizan la membrana plasmática en un rango que permite la apertura de los canales de Ca^{+2} sensibles a voltaje y de los canales de Na^{+} . La entrada de Na^{+} y de Ca^{+2} despolariza aún más a la membrana, ocasionando que se abran los canales de Ca^{+2} tipo L y otros canales de Ca^{+2} sensibles a voltaje, lo cual, desencadena

potenciales de acción que incrementan la concentración intracelular de Ca^{2+} . (Hiriart et al., 2008). Adicionalmente, se moviliza el Ca^{2+} de las reservas intracelulares, lo que promueve la fusión de los gránulos secretores con la membrana plasmática y la liberación de la insulina al torrente circulatorio (Rorsman et al., 2003).

La segunda fase de secreción de insulina en respuesta a glucosa, también conocida como la vía de amplificación, es una fase sostenida, más lenta que la primera y funciona con un mecanismo independiente de los K_{ATP} (Aizawa et al., 2002; Henquin et al., 2000).



Se ha explicado la naturaleza bifásica de la secreción de insulina en respuesta a glucosa, por distintas pozas de gránulos de insulina en el interior de la célula- β . Una poza es de gránulos de reserva que contiene el 94% del total de gránulos, mientras que el resto constituye a la otra poza de gránulos liberables que están anclados a la membrana plasmática. Se ha sugerido que los gránulos dentro de ésta última poza(los gránulos liberables) poseen una habilidad diferencial para su liberación, por lo que se dividen en; gránulos listos para la liberación y gránulos de liberación inmediata. Los gránulos de liberación inmediata son los

primeros en secretar insulina como consecuencia del aumento intracelular en la concentración de Ca^{+2} durante la fase de disparo. Durante el punto mínimo de la secreción, encontrado entre la primer y segunda fase, los gránulos listos para la liberación se convierten en gránulos de liberación inmediata en un proceso dependiente de ATP denominado “priming” (Vega Monroy et al., 2012) (Fig. 4).

2.3 Diferencias morfológicas asociadas con la heterogeneidad funcional de los islotes pancreáticos.

Los análisis morfométricos del páncreas endocrino reportados desde 1947 hasta la actualidad, muestran diferencias en la distribución, número y volumen de los islotes pancreáticos en diversas especies (Aizawa et al., 2001; Baetens et al., 1979; Farhat et al., 2013; H.-H. & L., 2015; Huang et al., 2011; Lau et al., 2016; White et al., 1999), incluyendo humanos (Cabrera et al., 2006; Farhat et al., 2013; Kilimnik et al., 2014).

De manera interesante, existen no sólo diferencias entre especies, sino también en los islotes pancreáticos dentro del mismo páncreas, dependiendo de la región. En 1979, Baetens y cols (Baetens et al., 1979) describieron dos diferentes poblaciones de islotes pancreáticos en la región dorsal y ventral del páncreas de ratas. La población de la región ventral pancreática era rica en polipéptido pancreático (PP), pero pobre en glucagón, mientras que la dorsal el glucagón abundante y el PP es escaso, dicha diferencia en la composición de los islotes puede atribuirse a la irrigación de diferentes sistemas arteriales y a diferencias en el desarrollo embrionario de cada región. Un año después, en 1980 Bonner-Weir y Like, (Bonner-Weir & Like, 1980) reportaron 2 poblaciones de islotes pancreáticos en bovinos dependientes del tamaño, clasificándolos en pequeños y grandes, con distribuciones únicas, tasas de crecimiento y granularidad de la célula- β , sugiriendo diferencias en la funcionalidad en ambas poblaciones.

En el 2001, se analizó en ratas, la heterogeneidad funcional entre los islotes pancreáticos de distintos tamaños, mediante la secreción de insulina de islotes individuales y se encontró que la sensibilidad de la célula- β a la glucosa era la más alta, intermedia y más baja en los islotes grandes ($\geq 300 \mu\text{m}$ de diámetro), medianos (≥ 200 - $<300 \mu\text{m}$ de diámetro) y pequeños ($<200 \mu\text{m}$ de diámetro), respectivamente (Aizawa et al., 2001) (Fig. 5).

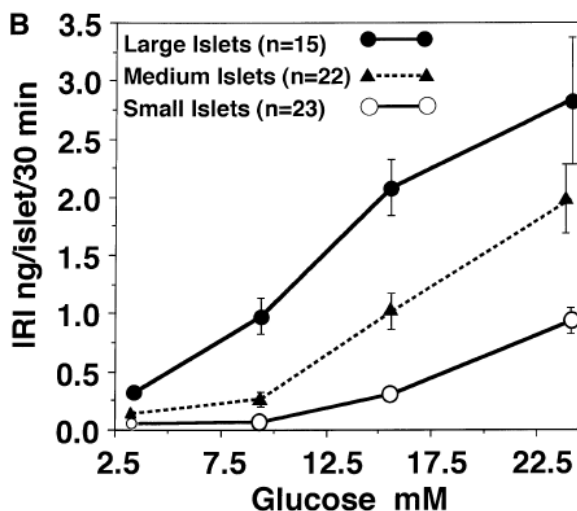


Figura 5. Liberación de insulina en respuesta a concentraciones crecientes de glucosa es diferencial entre islotes de distintos tamaños. *Tomada de Aizawa et al., 2001.

Un estudio más reciente del 2011 (Huang et al., 2011), midió la secreción de insulina mediante experimentos de perfusión en ratas

y reportó que, tanto en concentraciones basales como estimuladoras de glucosa, los islotes pequeños liberan más insulina por volumen que los islotes grandes, hecho que coincide con lo publicado en humanos (Farhat et al., 2013). Las diferencias en la capacidad secretora de los islotes de distinto tamaño podrían relacionarse con un incremento en: a) la densidad promedio de los gránulos de insulina, b) en el área positiva a insulina y c) la densidad celular, ya que la densidad endócrina celular (número de células/ $10^3 \mu\text{m}^2$) es mayor en los islotes pequeños en comparación con los grandes, es decir, en los islotes pequeños el área individual de las células endócrinas es menor que en los grandes (Fig. 6).

Adicionalmente, un estudio independiente (Lau et al., 2016) determinó que en los islotes grandes el porcentaje de área positiva a glucagon era de 1.43 ± 0.28 y de 0.1 en los islotes pequeños, en los islotes aislados y que dicha diferencia se mantenía en islotes en páncreas de modo que los islotes grandes presentaban un porcentaje de 8.61 ± 0.5 contra con los islotes pequeños de 3.22 ± 0.51 . Por lo tanto, a pesar de que no existen diferencias en el número de células endócrinas, como es señalado en el párrafo anterior, sí existen diferencias en el

porcentaje de área positiva a insulina y glucagon entre los islotes pequeños y grandes de roedores.

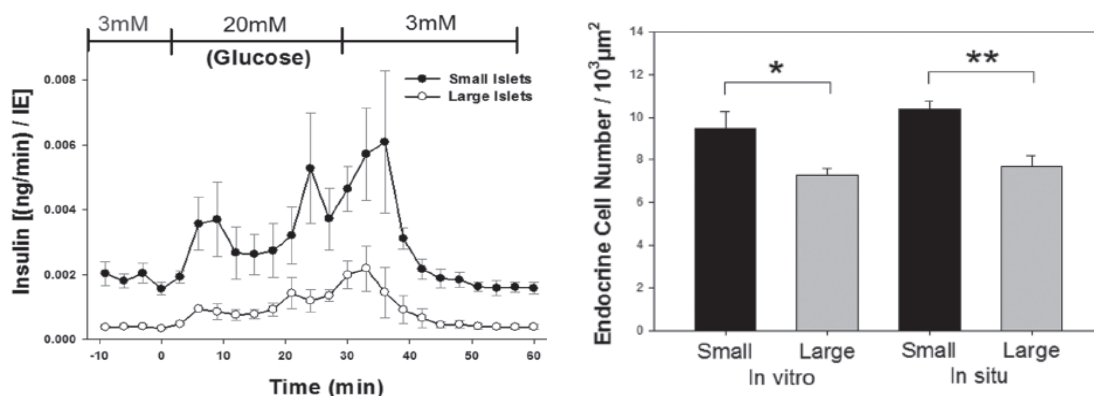


Figura 6. La heterogeneidad funcional en islotes pancreáticos grandes y pequeños, está asociada con una mayor densidad celular en islotes pequeños. *Tomada y modificada de Huang et al., 2011.

Sorpresivamente, se demostró que la heterogeneidad funcional entre los islotes pequeños y grandes en roedores, no se explica por ninguno de los siguientes factores (ya que ninguno de ellos se presenta): a) limitaciones de difusión que evitan que la glucosa estimule a las células del centro del islote, en los islotes grandes, o b) diferencias en la vía de síntesis de insulina (H.-H. & L., 2015), o c) diferencias en el número de células- α ,- β o - δ (cuantificadas mediante inmunofluorescencia con DAPI) (Huang et al., 2011), ni d) la expresión diferencial de las proteínas GLUT2, glucocinasa (GCK) ni PDX-1, ni por la regulación intracelular de Ca^{+2} en respuesta a glucosa (Kaihoh et al., 2008). Por lo tanto, aún se desconocen los mecanismos moleculares y celulares que expliquen como las diferencias morfológicas de los islotes están asociadas a la heterogeneidad funcional de los mismos. La investigación en este tema, posee relevancia clínica debido a que se ha demostrado, en ratas, que la efectividad a corto plazo del trasplante de islotes pequeños es superior al de islotes grandes. Esto fue evaluado mediante una prueba de tolerancia a la glucosa después del trasplante, en un modelo de diabetes inducida por el tratamiento con estreptozotocina. De modo que, en los días 10 y 40 después del trasplante, los niveles de glucosa en la prueba fueron significativamente más altos en grupo que recibió el trasplante de islotes grandes en comparación con el que recibió el trasplante de islotes pequeños (Li et al., 2014).

Cambios morfológicos y de composición en los islotes pancreáticos durante condiciones fisiológicas y patológicas.

Diversos estudios realizados en roedores y humanos revelan un alto grado de plasticidad estructural de los islotes pancreáticos, que funciona como mecanismo compensatorio en los eventos en los que se incrementa la demanda de insulina, debido a que existe un incremento proporcional en el tamaño del páncreas, número de islotes y masa total del islote. Sin embargo, lo que “escapa” de esta expansión proporcional es la distribución de tamaño de los islotes, porque los humanos tienen islotes de tamaño similar a los de los ratones, sugiriendo que el islote tiene ciertas limitaciones de tamaño para mantener su funcionalidad (Steiner et al., 2010). La incapacidad de los animales con páncreas más grandes para generar islotes gigantes, puede ser compensada con la notable plasticidad en la citoarquitectura de los islotes y con cambios en la distribución del tamaño del islote o en el número de islotes.

Estudios en islotes pancreáticos de ratones muestran plasticidad estructural en eventos de alta demanda a la insulina, como diabetes, la gestación y obesidad. Los islotes del ratón diabético mutante para el receptor de leptina *db/db* muestran una organización interna aleatoria con una mayor proporción de células-alfa, mientras que el tamaño del islote es similar al del ratón control (Kim et al., 2009). Por otra parte, los islotes del ratón obeso *ob/ob* están casi totalmente compuestos de células- β con células- α dispersas en la periferia (Kim et al., 2009), mientras que los ratones diabéticos no obesos (*NOD*) tienen un menor número de islotes y los presentes, tienen un menor número de células- β y un mayor número de células- α y PP (Sreenan et al., 1999).

De manera similar, en autopsias de humanos con DMT2, se realizó un análisis morfológico y de composición de los islotes pancreáticos individuales y se encontró una pérdida preferencial de islotes grandes (>60 μm de diámetro) (Fig. 7), una reducción en el área promedio del islote y una composición celular alterada, ya que hay una reducción en fracción de la célula- β y un incremento en la fracción de la célula- α . Sin embargo, el área de la célula-alfa se reduce a la par con el área de la célula- β (Kilimnik et al., 2011).

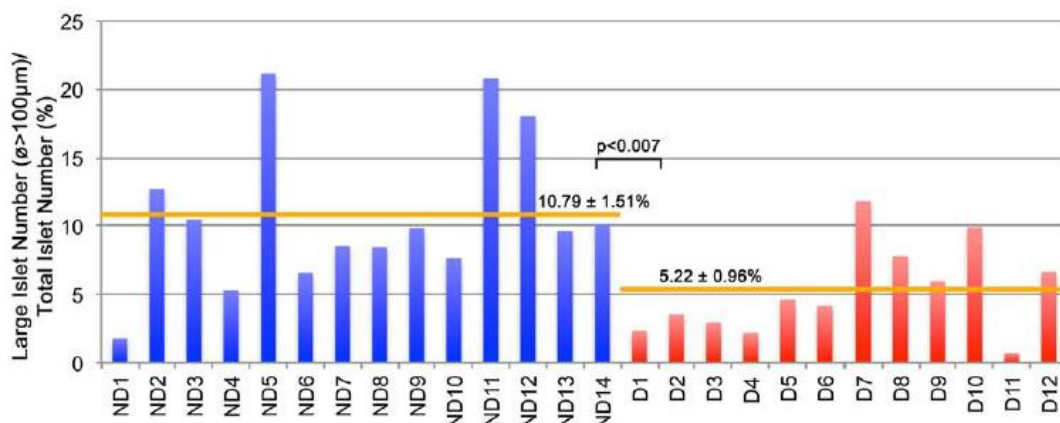


Figura 7. Los pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 (D1-D12) presentan una pérdida preferencial de islotes grandes (>60 μm de diámetro) en comparación con individuos sanos. *Tomada y modificada de Kilimnik et al., 2011.

Como se mencionó brevemente en los párrafos anteriores, uno de los eventos no patológicos caracterizados por una creciente demanda de insulina por un periodo prolongado, es la gestación. A diferencia de la obesidad y diabetes, dicho incremento en la demanda de insulina es temporal y reversible. Por lo que, resulta interesante estudiar la fisiología metabólica de la gestación para entender los mecanismos que subyacen a las adaptaciones compensatorias con el objetivo futuro de encontrar alternativas para la prevención de enfermedades metabólicas caracterizadas por un aumento en la demanda de insulina.

2.4 Adaptaciones fisiológicas durante la gestación

En humanos, la duración promedio de la gestación es ~266 días (38 semanas) a partir de la última ovulación o 280 días (40 semanas) a partir del último periodo menstrual, (Boron & Boulpaep et al., 2012) mientras que, en ratones, el periodo gestacional es de 19 días. Durante este periodo gestacional, los sistemas maternos en mamíferos experimentan progresivamente cambios adaptativos profundos en su fisiología, anatomía, metabolismo y nutrición para contender con las demandas crecientes del crecimiento y desarrollo embrionario-fetal.

En la gestación temprana, el cuerpo lúteo, la placenta y el embrión en desarrollo sintetizan y liberan cantidades crecientes de hormonas, factores de crecimiento y otras sustancias a la circulación materna. Dichas sustancias desencadenan una cascada de eventos que transforman el sistema cardiovascular, renal, respiratorio, circulatorio y endócrino (Weissgerber et al., 2006).

Comunicación nutricional materno-fetal

El intercambio de oxígeno, sustratos y productos de deshecho entre la madre y el embrión-feto ocurre a través de nutrición histiotrófica (materno-embionaria) y hemotrófica (materno-fetal).

La nutrición histiotrófica, presente hasta las 12 semanas de gestación en humanos (Weissgerber & Wolfe, 2006), es la transferencia inicial de material nutricional o histiotrofo de la madre al embrión. Se estima que entre las 6-10 semanas de gestación en el humano, las secreciones del histiotrofo derivan del transudado capilar de las glándulas uterinas y de las arterias espirales del endometrio materno y entran al espacio de intervelloso del corion. Este material nutricional es absorbido por fagocitosis por el trofoectodermo del blastocisto y después por el trofoblasto de la placenta, en la que el histiotrofo será digerido y utilizado en vías locales de síntesis o se almacenará intacto en el núcleo mesenquimal de vellosidades coriónicas. Los productos difunden a lo largo de los canales estromales, para pasar de las vellosidades coriónicas al fluido celómico, donde se absorben por el epitelio del saco vitelino y transferidos al embrión mediante circulación vitelina. Posteriormente, al final del primer trimestre, las células del citotrofoblasto que obstruían las arterias espirales se pierden y permiten que el suero materno y después la sangre materna, entren directamente al espacio de intervelloso coriónicas, estableciéndose así el intercambio nutricional hemotrófico (Burton et al., 2001).

Una vez que la sangre materna comienza a circular en el espacio de intervelloso coriónicas, el intercambio de gases, nutrientes y otros solutos entre la madre y el feto, es mediado por la placenta, el órgano nutriente, endócrino respiratorio y excretor del feto (Sheerwood et al., 2014).

Al igual que en el humano, el ratón posee una placenta hemocorial, es decir que el la membrana del trofoblasto está en contacto directo con la sangre materna y

no se separa de ésta por un endotelio o epitelio. No obstante, existen diferencias en la anatomía, tipos celulares y perfiles de secreción hormonal entre las placentas corioalantoideas de ambas especies. El ratón posee una placenta de saco vitelino invertida (forma de placenta en la que el mesodermo esplácnico está en contacto directo con el tejido uterino materno) que se activa en la gestación temprana y persiste hasta el parto. Este tipo de placenta es típica en roedores, pero es completamente ausente en humanos. Entre las diferencias estructurales de las placentas corioalantoideas de ratones y humanos, se encuentra también que las interdigitaciones en humanos se caracterizan por una organización de vellosidades más abierta que en la estructura de laberinto murina, que representa un sistema de cavidades interconectadas. Además, la placenta del ratón es tricorial, mientras que la humana es monocorial. La zona de unión en ratón se compone de tipos celulares y capas que no existen en humanos, por ejemplo, las células gigantes del trofoblasto que rodean la decidua materna. Una diferencia entre especies de central importancia es que en el humano se presenta una invasión intersticial profunda y endovascular de las células del trofoblasto hacia el primer tercio del miometrio humano. Contrastadamente, en ratón la invasión se restringe a la decidua materna, un fenotipo disfuncional en humanos comúnmente presente en la preeclampsia o en la restricción de crecimiento fetal (Schmidt et al., 2015, Watson E. et al., 2005).

Transporte de glucosa a través de la placenta

La glucosa proveniente de la circulación materna es la principal fuente energética para el desarrollo del feto y la placenta. El transporte de glucosa a través de la placenta es pasivo facilitado por la familia de transportadores de glucosa (GLUTs).

En humanos, GLUT1 se encuentra en el citotrofoblasto, en células endoteliales placentarias y en la membrana de microvellosidades (MMV) (membrana apical, en contacto con la madre) y membrana basal (MB) (en contacto con el embrión-feto) del sinciotrofoblasto (Farrell et al., 2002). De manera interesante, la distribución de GLUT1 entre la MMV y MB es asimétrica, pues hay una mayor expresión en la MMV, que tiene también una mayor área superficial, lo cual asegura una densidad de transportador mayor en la superficie de microvellosidades comparada con la presente en la MB.

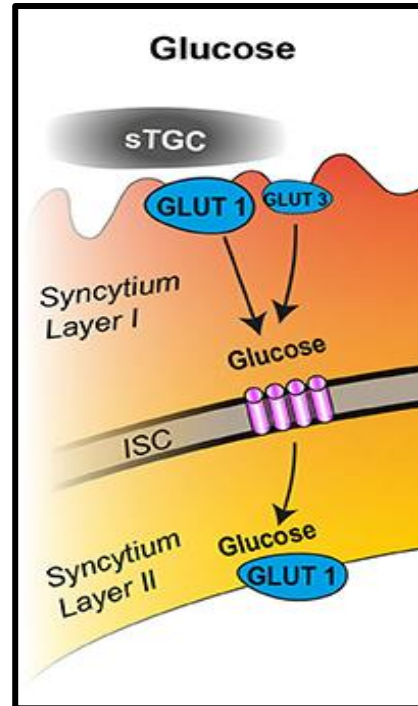


Figura 8. El transporte de glucosa a través de la placenta murina es pasivo facilitado por la familia de transportadores de glucosa (GLUTs). En la región superior se encuentran los sinusoides de la madre y en la región inferior los capilares fetales. Tomada y modificada de Elke Winterhager et al., 2017.

En ratón, rata y oveja se expresa también GLUT1 y mantiene una expresión diferencial con GLUT3. Mientras que la proporción de GLUT1 placentario disminuye hacia el término de la gestación, la proporción de GLUT3 aumenta. En la placenta humana, GLUT4, la isoforma responsiva a insulina del transportador de glucosa se expresa en las células del estroma intravelloso (Charron et al., 1998) sin embargo, se considera que la insulina no afecta, al menos directamente, el transporte de glucosa a través de la placenta (Fig. 8).

Metabolismo feto-placentario de glucosa

En condiciones normales, el feto no sintetiza glucosa por gluconeogénesis en roedores, a pesar de que la mayoría de las enzimas de la gluconeogénesis y glucogenólisis están presentes en el desarrollo embrionario, la enzima limitante de la gluconeogénesis, la fosfoenol piruvato carboxilcinasa (PEPCK) se expresa

hasta después del nacimiento (Kalhan et al., 2000). Por lo que, el desarrollo y metabolismo fetal es dependiente de la transferencia de glucosa materna.

El transporte de glucosa a través de la placenta está regulado por 4 mecanismos: a) el metabolismo de la placenta, b) el área superficial placentaria c) la densidad de transportadores GLUT y d) el gradiente de concentración de glucosa materno-fetal (Gallo et al., 2017).

Con respecto al metabolismo placentario, un estudio transversal *in vivo* (Holme et al., 2015) calculó las diferencias en la concentración plasmática de glucosa de las regiones maternas y placentarias en 40 mujeres con embarazos sanos. Se determinó, mediante las diferencias arteria-vena de la madre y del feto, que la placenta utiliza el 6% de la glucosa disponible por litro de sangre materna que circula a través de ella para su metabolismo, en el que la glucosa consumida se utiliza en la glucogenogénesis (Jones et al., 1993), y de acuerdo con estudios en explantes placentarios de roedores, también puede usarse para la lipogénesis *de novo*. En contraste, el feto consume el 10% de la glucosa por litro de sangre circulante.

Gradiente de glucosa en la circulación materno-fetal

La liberación de glucosa materna al feto depende del gradiente de concentración de glucosa entre la madre y el feto, de modo que en humanos, la concentración de glucosa, 4.71 mM es mayor en la madre, que en el feto 3.48 mM (Holme et al., 2015).

En la gestación temprana, las células- β fetales establecen este gradiente manteniendo una concentración baja de glucosa en la circulación fetal, a través de una secreción basal de insulina alta, vista por inmunodetección a partir del día embrionario 9.5 en ratón (Jørgensen et al., 2007), y en la rata una nula secreción de insulina estimulada por glucosa en el periodo embrionario, ya que solo se detecta, en fetos de roedores, hasta el día postnatal 2 (Asplound et al., 1969).

A medida que el feto se desarrolla, desvía una fracción creciente de glucosa materna, lo que tiende a disipar el gradiente, ya que disminuye la concentración de glucosa en la madre. Para mantener el gradiente, desde la gestación

temprana se promueve en la madre humana, la acumulación de tejido adiposo y la secreción basal de insulina, mientras que la sensibilidad de insulina disminuye a medida que progresa la gestación (P. M. Catalano et al., 2017; Patrick M. et al., 1999). Contrastadamente, en la gestación tardía, los depósitos de tejido adiposo disminuyen porque aumenta la lipólisis, los niveles de ácidos grasos libres (FFA) aumentan y la secreción de insulina estimulada por glucosa es 40-60% menor que en la etapa previa a la gestación (Barbour et al., 2007). Además, la placenta secreta hormonas que incrementan la resistencia a la insulina y la producción de glucosa hepática, aumentando así los niveles de glucosa en la circulación materna (Baeyens et al., 2016).

Para prevenir la liberación excesiva de nutrientes al feto, en diversas especies de mamíferos, el incremento en la resistencia a insulina materna debe estar balanceado con el incremento en la capacidad de las células- β para responder a la ingesta de alimentos, que resulta del incremento en la masa de las células- β y en su secreción de insulina en respuesta a glucosa.

El balance materno entre la resistencia a la insulina y la reserva hiperdinámica de las células- β continúa hasta finalizar la gestación. Posteriormente, en el periodo post-parto la masa de las células- β regresa al tamaño pre-gestacional.

2.5 Dinámica de cambios en los islotes pancreáticos durante la gestación.

La regulación a corto plazo de la secreción de insulina se obtiene elevando la concentración de glucosa. Sin embargo, si este mecanismo prevaleciera en la gestación, habría una persistente necesidad de hiperglicemia. Por lo tanto, ante el incremento en la demanda de insulina, los islotes se someten a cambios morfológicos y fisiológicos que resultan en el aumento de secreción de insulina a niveles normales de glucosa (R. L. Sorenson et al., 1997). Sin embargo, cuando los mecanismos compensatorios en la célula- β fallan durante la gestación, como sucede en individuos obesos, se desarrolla diabetes.

Cambios estructurales del islote pancreático durante la gestación

Desde 1930, diversos estudios han caracterizado a la gestación en la madre como una condición de niveles séricos de insulina elevados y aumento en la masa de las células- β como adaptación a la resistencia a insulina.

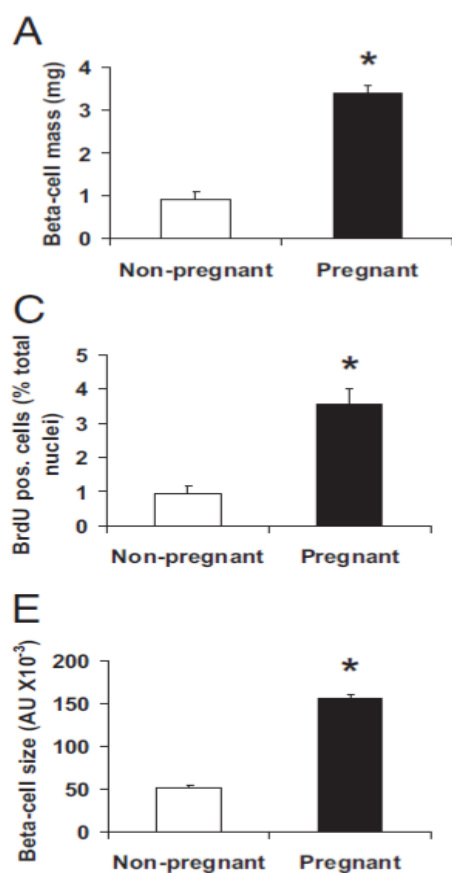


Figura 9. En el día 14.5 de gestación en ratones aumenta la masa de las células- β , la proliferación celular y el tamaño individual de las células- β . Tomada y modificada de Rieck et al., 2009.

Un estudio en roedores (Rieck et al., 2009) reporta un incremento de 3-4 veces en la masa de las células- β , 3 veces mayor en el tamaño individual de las células- β , indicando hipertrofia y un incremento de 4 veces en el número de células- β en proliferación al día 14.5 de gestación comparado con ratones nulíparas (Fig. 9).

La proliferación de las células- β en la gestación de ratones, se ha estudiado mediante experimentos de incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) o timidina tritiada o marcaje con Ki67, que indican que el incremento en la proliferación inicia el día 10, alcanza el pico al día 14 y declina los días 18-19 hasta llegar a niveles no gestantes (R. L. Sorenson & Brelje, 1997).

Similar a los roedores, el número de células- β en mujeres embarazadas aumenta 1.4-2,4 veces, basados en autopsias. Sin embargo, dicho aumento no se debe a la proliferación

de las células- β , evaluada por el marcaje con Ki67, ya que no se encontraron diferencias entre las mujeres embarazadas y mujeres no gestantes de la misma edad (Butler et al., 2010). Esto puede explicarse porque la gestación humana dura en promedio, 40 semanas, por lo que podría requerirse una tasa de proliferación de células- β mucho menor que en roedores, cuyo periodo de gestación es de 3 semanas.

Una vez que la gestación culmina en roedores, la masa de las células- β tiene una tendencia a disminuir a partir del día 4 postparto a 10 días después del parto

regresa a niveles no gestantes, a través de un aumento en la apoptosis, disminución en la proliferación y una reducción en el tamaño de las células- β pancreáticas (Smith, 2017) (Fig. 10).

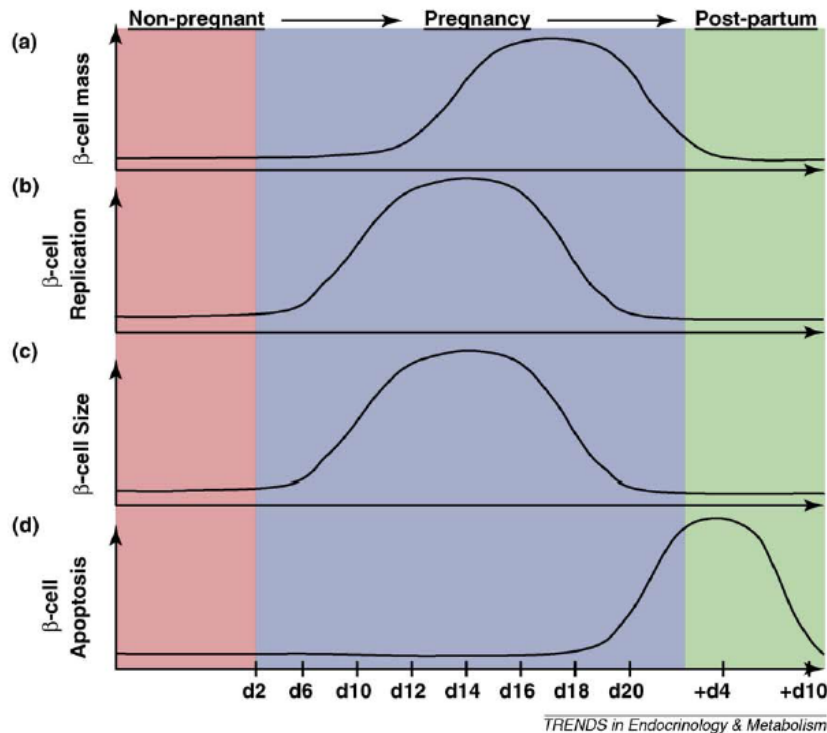


Figura 10. Resumen de los cambios en las células- β durante la gestación y en el posparto. Tomada y modificada de Rieck et al., Cell Press, 2009.

Secreción de insulina durante la gestación

La gestación en mamíferos representa un periodo en que la célula- β sufre adaptaciones para contener con el incremento en la demanda de insulina.

Un estudio realizado por Metzger y cols en 1974 (B. Metzger et al. 1974) reporta que el estado de alimentación durante el día 16 de gestación en ratas, se caracteriza por bajos niveles séricos de glucosa, una mayor concentración sérica de insulina y una ligeramente menor de glucagón en comparación con ratas no gestantes. Durante el ayuno, la glucosa llega hasta niveles hipoglicémicos en las ratas gestantes al día 16, mientras que en las no gestantes la glucosa cae, pero no alcanza niveles hipoglicémicos. Es interesante que, se mantienen mayores niveles de insulina sérica en las ratas gestantes a pesar de la hipoglicemia en el ayuno, esto podría ser un mecanismo para moderar el catabolismo proteico materno ante la demanda energética del feto. Esto coincide con que en la semana 1 de gestación en ratas (Día 6-7) la secreción de insulina *in vitro*

promedio no difiere de los valores de ratas no gestantes. Sin embargo, a la segunda semana (Día 14-16) la secreción de insulina incrementa un 20% y continúa aumentando hasta la tercera semana (Día 18-21) al alcanzar un 50% por arriba del valor control y al inicio de la gestación (Costrini & Kalkhoff, 1971). Por otro lado, un estudio independiente de gestación en ratas muestra que al día gestacional 10 hay un aumento de 2 veces en la secreción de insulina y que al día 15 es 8 veces mayor que los valores no gestantes. Posteriormente los niveles regresan a los valores control hacia el final de la gestación (J. A. Parsons et al., 1992) (Fig. 11).

Sorprendentemente, el umbral de secreción de insulina estimulado por glucosa disminuye un 20% al día 10 (a 4.6 mM) , y decrece otro 20% del día 12-15 (a 3.3 mM) . Después de eso, el umbral

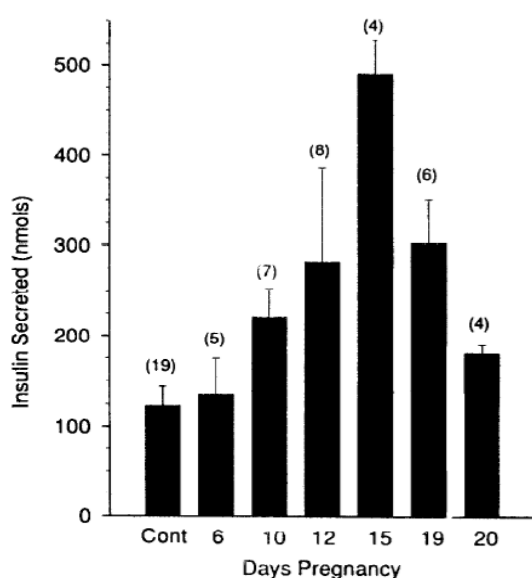


Figura 11. La secreción a insulina aumenta progresivamente hasta alcanzar su máximo en el día 15 de gestación, a partir de cual disminuye a medida que progresa la gestación . Tomada y modificada de Sorenson et al., 1992.

aumenta aproximándose a los valores no gestantes de (5.7 mM) (J. A. Parsons et al., 1992).

Lo anterior sugiere que a pesar de que el incremento en la masa de la célula- β podría contribuir a la potenciación de la secreción de insulina en la gestación, es probable que el incremento en el potencial secretor de las células- β sea más importante (J. A. Parsons et al., 1992). Dicho potencial se manifiesta por:

- 1) una disminución en el umbral de secreción de insulina estimulada por glucosa y 2) por un incremento en el umbral de secreción de insulina, de modo

que se secreta 10 veces más insulina en concentraciones normales de glucosa sanguínea.

Insulinorresistencia en la etapa tardía de la gestación

En la etapa tardía de la gestación, la sensibilidad de los tejidos maternos a la insulina disminuye, produciéndose una resistencia a la insulina de origen

fisiológico, que genera hiperglucemia. Esta hiperglucemia promueve una compensación fisiológica del páncreas reflejada en un aumento en la producción y la secreción de insulina en el páncreas. La resistencia a la insulina causa un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo y como consecuencia cetonemia en un estado de ayuno. Todo lo anterior produce mayor disponibilidad de nutrientes para el feto (Edgar-Sánchez-Ramírez, 2016).

Uno de los primeros estudios realizado en 1985, demostró que la acción de la insulina disminuye entre 50 y 70% al final de la gestación con respecto a mujeres no embarazadas, a través de la técnica de fijación (en inglés clamp) hiperinsulinémica y la prueba de tolerancia a la glucosa (vía intravenosa) (Ryan et al., 1985). Otro estudio independiente (Catalano et al., 1999), demostró que al final de la gestación, las reservas de tejido adiposo en ciertas regiones empiezan a decrecer, los niveles de ácidos grasos libres incrementan en un estado postprandial y la captación de glucosa estimulada por la insulina decrece.

Un estudio reciente en humanos, evaluó el grado de resistencia a la insulina durante cada uno de los 3 trimestres de la gestación en mujeres, comparándolo con un grupo de mujeres no gestantes, y demostraron (a través de diversas técnicas y modelos matemáticos para determinar resistencia a la insulina) que el índice HOMA-IR (Evaluación del modelo homeostático-Resistencia a la insulina) y el índice QUICKI (Índice cuantitativo de control de la sensibilidad a la insulina), así como los niveles de insulina en ayuno se ven alterados tanto en el segundo como en el tercer trimestre de la gestación, con respecto al primer trimestre y el grupo control (no gestante). Esto demuestra que, en humanos, desde el segundo trimestre comienza a bajar la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, la relación glucosa/insulina en el ayuno únicamente es menor en el tercer trimestre de la gestación, donde el grado de resistencia a la insulina incrementa significativamente (Sonagra, 2014). La mayoría de las mujeres gestantes contienden a estos cambios produciendo y secretando una concentración adecuada de insulina. Sin embargo, aquellas que no logran esta compensación (entre el 3 y 7% de la población) se transforman en intolerantes a la glucosa en grados variables, haciéndolo evidente entre las 26 y 30 semanas de embarazo, lo cual puede desencadenar una patología, denominada diabetes gestacional. La diabetes gestacional es una de las más comunes complicaciones médicas en

la gestación, la cual puede tener graves repercusiones en la salud de la madre y en el desarrollo embrionario y post-natal del feto. Esta patología es definida como una intolerancia a la glucosa con inicio durante la gestación (Catalano et al., 2018).

Los cambios temporales en la secreción de insulina y la resistencia a la insulina presente al final de la gestación, así como en la masa de la célula-β y su proliferación correlacionan con el patrón de secreción del lactógeno placentario de ratas 1 (rPL-I). Por esa razón, en la siguiente sección se describirá el efecto de las hormonas somatolactogénicas en el páncreas endócrino.

Efecto de las hormonas somatolactogénicas en el páncreas endócrino

La placenta es un órgano endócrino transitorio, cuya secreción hormonal no está sujeta a un control extrínseco, sino que se regula dependiendo del estadio gestacional. La placenta secreta hormonas peptídicas como la gonadotropina coriónica humana (hCG), la somatomamotropina coriónica humana, relaxina, el péptido placentario relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrp),

Peptide Hormones and Neuropeptides
hCG
Thyrotropin (thyroid-stimulating hormone [TSH])
Placental-variant growth hormone
hCS1 and hCS2, also known as hPL (hPL1 and hPL2)
Placental proteins PP12 and PP14
TRH
Corticotropin-releasing hormone (CRH)
Growth hormone-releasing hormone (GHRH)
GnRH
Substance P
Neurotensin
Somatostatin
Neuropeptide Y
ACTH-related peptide
The inhibins

Steroid Hormones
Progesterone
Estrone
Estradiol
Estriol

Figura 12. Relación de hormonas peptídicas y esteroideas secretadas por la placenta de roedores. Tomada y modificada de Boron, Boulpaep 2012.

etc. Y hormonas esteroideas (Sheerwood et al., 2014, Boron, Boulpaep et al. 2012) (Fig. 12).

Entre las hormonas esteroideas que aumentan durante la gestación en roedores, se encuentran la estrona (E1), el estradiol (E2) y la progesterona. Los estudios in vivo e in vitro que examinan los efectos de los esteroides en la gestación,

reportan que no hay efecto de estas hormonas en la secreción de insulina ni en la división de las células- β características de la gestación (Sorenson et al., 1993).

Por otra parte, las somatomamotropinas humanas, hCS1 y hCS2, también denominadas lactógenos placentarios en humano (hPL) se consideran los principales efectores de los cambios en el páncreas endócrino durante la gestación. Ambas hormonas polipeptídicas, hCS1 y hCS2, están estructuralmente relacionadas con las hormonas pituitarias: hormona de crecimiento (GH) y prolactina (PRL) (Boron, Boulpaep 2012). De manera similar, en roedores se han identificado dos lactógenos placentarios, PL-I y PL-II, que también interactúan con el receptor de lactógeno placentario (PRLR) y lo comparten con prolactina (PRL). El lactógeno placentario-1 (PL-I) aparece en la mitad de la gestación en el suero de ratas, específicamente en el día 10 de la gestación y alcanza su punto máximo al día 12 con una concentración de 400 ng/ml. Mientras que, el lactógeno placentario-2 (PL-II) aparece en el día 12 e incrementa hasta el final de la gestación con concentraciones por arriba de 1ug/ml (Sorenson & Brelje, 1997). Tanto en humanos, como en roedores, los efectos de los lactógenos placentarios y de la prolactina está mediado por su unión al receptor de prolactina (PRLR) (Kawai & Kishi, 1999).

El patrón de incremento continuo en la masa de la célula- β y su hipertrofia a lo largo de la gestación, correlaciona con el desarrollo placentario, lo que llevó a asumir que la adaptación de los islotes pancreáticos a la gestación está mediada específicamente por los lactógenos placentarios, pero no por prolactina. Para demostrar dicha suposición, un estudio cuantificó el volumen de islotes pancreáticos con la tinción de difeniltiocarbazona, en ratones enanos, que carecen de la secreción hipofisiaria de prolactina (PRL), hormona del crecimiento (GH) y tirotrópina (TSH) y ratones control. Los resultados demuestran que lactógeno placentario-1 (PL-I) y el lactógeno placentario-2 (PL-II) pero no prolactina (PRL) ni la hormona del crecimiento (GH), regulan la función de la masa de las células- β , ya que ratones enanos al embarazarse presentan los mismos incrementos en el volumen de los islotes pancreáticos que los ratones control (Parsons & Sorenson, 2014). Además, el tratamiento *in vitro* e *in vivo* con lactógenos placentarios en islotes humanos y de roedores, incrementa la secreción de insulina estimulada por glucosa. Finalmente, los cambios en la

célula- β requieren del receptor de prolactina (PRLR) intacto (Baeyens et al., 2016). Esto coincide con el hecho de que, a pesar de que la secreción de lactógenos placentarios y de prolactina (PRL) tienen un patrón de secreción de aumento gradual hasta el término de la gestación, los niveles de lactógenos placentarios exceden 10 veces los de prolactina (PRL), por lo que las señales mediadas por lactógenos placentarios son las dominantes en la gestación medio-tardía (Sorenson & Brelje, 1997).

Mecanismo de adaptación del islote pancreático mediado por distintas vías de señalización

El receptor de prolactina (PRLR) pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas clase-1, que también incluye al estrechamente relacionado receptor de la GH. Cuando el lactógeno placentario se une al receptor de prolactina (PRLR), el receptor se fosforila por la Cinasa Janus 2 (JAK2), lo que permite el reclutamiento y fosforilación del Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 5 (STAT5) que una vez fosforilado se transloca al núcleo donde regula la expresión de genes blanco, entre los que se encuentran los genes de las 2 isoformas de la enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de serotonina, la triptófano hidroxilasa 1 y 2 (Tph1 y Tph2 respectivamente) (Baeyens et al., 2016). En ratones gestantes, la serotonina al unirse con el receptor 5HT_{2b} en los islotes pancreáticos maternos promueve la expansión de la masa de las células- β y la tolerancia a la glucosa (Kim et al., 2010). Sorprendentemente, la estimulación *in vitro* del receptor de prolactina (PRLR) induce la expresión de los genes de la “firma genética de los islotes en la gestación” observada *in vivo* y promueve la acción de serotonina en islotes de ratones machos y hembras (Goyvaerts et al., 2015). Además de la Tph1 y Tph2, otro de los genes que aumenta su expresión paralelamente con la inducción del ciclo celular en respuesta a lactógenos placentarios en ratones es el factor de transcripción FoxM1. De manera opuesta el también factor de transcripción, Foxd3 y el supresor de tumores endócrinos, Menina disminuyen durante la gestación (Baeyens et al., 2016).

La señalización por el receptor de prolactina (PRLR) también activa otras vías de señalización, que incluyen las cascadas de Ras/Rap/MAPK, Raf/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR, sin embargo, su papel permanece no dilucidado.

Por otra parte, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) secretado por las células endoteliales del islote de ratas, a través de la unión con su receptor (c-met) promueve la proliferación de las células- β y la expansión de la masa de las células- β (Johansson et al., 2006).

Involución del islote pancreático materno en el postparto

En ratones, al finalizar la gestación la sensibilidad a la insulina se recupera y la masa de la célula- β vuela a sus niveles normales, a pesar de que la prolactina y la serotonina persisten en la circulación sanguínea materna (Bromati et al., 2010; Lellis-Santos et al., 2012). Esto es posible debido a que los receptores de serotonina, Htr2b, se pierden en las células pancreáticas y se reemplazan por otros receptores acoplados a proteínas G (Gi-GPCRs), lo que inhibe la proliferación y aumenta la apoptosis de las células- β (Baeyens et al., 2016; Berger et al., 2015). Adicionalmente, los altos niveles de progesterona placentaria al final de la gestación pueden bloquear los efectos pro-proliferativos de los lactógenos placentarios en la célula- β (Sorenson et al., 1993).

Efecto de la lactancia en la reversión de las adaptaciones gestacionales

Se considera que la lactancia confiere beneficios en la salud materna a corto y a largo plazo. Los efectos a corto plazo incluyen el regreso del útero a sus condiciones fisiológicas y morfológicas normales (no preñadas), la movilización de las reservas de grasa adquiridas durante la gestación, y la reversión de las adaptaciones metabólicas causadas por el embarazo que involucran mejor tolerancia a la glucosa, menos retención de peso corporal (Jane et al., 1993; Janney et al., 1997) y mejor distribución de tipo de grasa corporal, en comparación con mujeres no lactantes. Adicionalmente, durante el primer año postparto, las mujeres lactantes exhiben menor concentración de glucosa e insulina plasmática, un menor perfil aterogénico, una mayor movilización del tejido adiposo (Gunderson et al., 2007) y mayor secreción de insulina con valores

similares en la sensibilidad a insulina (McManus et al., 2001) en comparación con las mujeres no lactantes. Con respecto al perfil lipídico y de lipoproteínas, durante las 6 semanas después del parto, las mujeres lactantes poseen niveles más altos en la diferencia de concentraciones entre el periodo antes del parto y posterior al parto en la Lipoproteína de Alta Densidad (HDL), colesterol, fosfolípidos, apo A-I y apo A.II, en comparación con mujeres no lactantes (Knopp et al., 1985), lo cual sugiere que la lactancia promueve la disminución en la concentración de estas moléculas en el post-parto.

Los efectos benéficos de la lactancia a largo plazo incluyen una reducción en el riesgo a desarrollar cáncer de mama y de ovario (Group, Factors, & Cancer, 2002), síndrome metabólico (Gunderson et al., 2010), enfermedades cardiovasculares (Gunderson et al., 2007; Schwarz et al., 2009) y diabetes mellitus tipo-2 (Gunderson, 2015). Estos efectos favorables podrían explicarse porque en el periodo postparto, después de la lactancia, las mujeres presentan una mayor tolerancia a la glucosa, una mayor sensibilidad a la insulina y una menor retención de peso en algunos (Rooney et al., 2002), pero no en todos los estudios (Sichieri et al., 2003) y con un menor riesgo a desarrollar sobrepeso 10-15 años después del parto.

Adicionalmente, no sólo el estímulo de la lactancia es importante para ejercer dichos efectos, sino también la duración del estímulo. Esto se comprobó en un estudio hecho en más de 110 mil mujeres de Estados Unidos, que reporta una relación inversa entre la duración de la lactancia y la incidencia a desarrollar diabetes mellitus tipo-2 (La duración de la lactancia se evaluó en los siguientes rangos: a) no lactancia b) >0-3 meses c) >3-6 meses d) >6-11 meses e) >11-23 meses y f) >23 meses) (Stuebe et al., 2006).

No obstante, estos estudios proporcionan poca evidencia directa de los efectos de la lactancia sobre los factores de riesgo bioquímicos (p. ej., glucosa, lípidos, insulina, adipocinas, función endotelial) que determinan el desarrollo de enfermedades cardiometabólicas en mujeres. Por lo que, estudiar los efectos duraderos de la lactancia en el metabolismo materno es de particular importancia para la prevención de diabetes mellitus tipo-2 y enfermedades cardiovasculares en mujeres que previamente presentaron diabetes mellitus gestacional (Gunderson, 2015).

Efecto de la prolactina en el crecimiento de los islotes pancreáticos maternos y su secreción de insulina

La prolactina es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada principalmente por las células lactotróficas de la glándula hipófisis anterior. Las acciones de la prolactina están mediadas por su receptor transmembrana, el receptor de prolactina (PRLR)(Goyvaerts et al., 2015). La principal actividad biológica atribuida a la prolactina es la estimulación de la proliferación y diferenciación de las células mamarias en la lactancia, sin embargo, estudios en modelos animales le han asignado más de 300 funciones adicionales a esta en diferentes especies (Bernard et al., 2019).

La prolactina además de tener su efecto en la glándula mamaria, posee efectos importantes en el crecimiento y función de los islotes pancreáticos durante la lactancia en las madres y en el periodo perinatal en las crías (Ben-jonathan et al., 2006). Un estudio realizado en ratones deficientes del receptor de prolactina (RPRL) resaltan la importancia de la prolactina en el desarrollo de los islotes pancreáticos, ya que de las 3 semanas de edad en adelante, estos islotes presentan tamaño, densidad celular y masa de la célula- β reducida (Freemark et al., 2002). Además, se reduce el contenido de insulina en los islotes y la secreción de insulina en respuesta a glucosa, pero la respuesta de glucosa a inyecciones de insulina y las concentraciones de glucosa en sangre en ayuno son normales. Un estudio más reciente, realizado en el 2016 demuestra que los ratones que carecen del receptor de prolactina específicamente en las células- β pancreáticas desarrollan características de diabetes mellitus gestacional (Banerjee et al., 2016).

En concordancia con lo anterior, la prolactina en roedores tiene un papel en la sensibilidad a insulina periférica (Bernard et al., 2019.) y probablemente también en la homeostasis energética a través de la modulación del metabolismo de lípidos, porque regula la función y diferenciación del tejido adiposo marrón (Auffret et al., 2019).

Por otra parte, la prolactina, al igual que los lactógenos placentarios, estimulan la replicación de las células-beta, la síntesis de insulina en los islotes pancreáticos asilados y en las células de insulinoma y la secreción de insulina

en respuesta a glucosa (Brelje et al., 1993). Sin embargo, no se entienden totalmente los efectos de la prolactina sobre la morfología y fisiología de los islotes pancreáticos. Se hipotetiza que el aumento en la secreción de insulina en respuesta a glucosa producido por la prolactina, se da porque la prolactina afecta a los dos sensores de glucosa en las células- β , aumentando un 50% la actividad la glucocinasa e incrementando dos veces los niveles proteicos del transportador de glucosa-2 (GLUT2) (Weinhaus & Sorenson, n.d.). Adicionalmente, se sabe que específicamente en las células- β , la activación de la vía de señalización de JAK2/STAT5, inducida por prolactina, induce la translocación nuclear del factor de transcripción STAT5b, no obstante, se desconoce el mecanismo en el que la prolactina induce la transcripción del gen de insulina, debido a que la unión de STAT5 con el promotor de insulina es baja (Ben-jonathan et al., 2006). Esto ha llevado a sugerir que existen otros elementos responsivos a prolactina además de los motivos de STAT5 (Freemark et al., 2001). Por otra parte, un estudio con oligonucleótidos anti-sentido dirigidos al receptor de prolactina, reveló que la prolactina también activa la vía de Fosfatidilinositol-3-Cinasa/ Proteína Cinasa B o AKT (PI3-K/PKB) y de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) en los islotes pancreáticos de ratas gestantes (Amaral et al., 2004).

Un artículo sugiere un pequeño pero significativo efecto de las señales dependientes de la lactancia, es decir la secreción de prolactina, en mantener la masa de las células β , ya que después de la administración de BrdU 10 días después del parto (día 10 de lactancia), se observa que la lactancia mantiene una elevación en la proliferación e hipertrofia de las células β comparado con ratones no gestantes, este fenómeno no se observa en ratones al postparto que no lactaron a sus crías (Drynda et al., 2015). Este efecto, coincide con el hecho de que la expresión pancreática del receptor de prolactina tiene su valor más alto en la gestación y permanece elevada hasta el día 10 del postparto (Hagedorn, 1993).

2.6 Efecto de la primera gestación sobre las gestaciones subsecuentes

Durante el periodo postparto la madre puede someterse a un segundo evento gestacional en el que posiblemente la respuesta fisiológica a señales

somatolactogénicas sea similar e incluso más rápida y eficiente a la presentada en la primera gestación. Existe conocimiento empírico que respalda esta idea, debido a que mujeres multíparas afirman que la segunda gestación es “más fácil” que la primera. De hecho, existe un estudio clínico descriptivo (Lowe, 1992) que investigó las diferencias en el dolor durante las cuatro fases del parto en 65 mujeres nulíparas en comparación con 100 mujeres multíparas. El dolor sensorial fue significativamente mayor en las mujeres nulíparas que en las multíparas durante el trabajo de parto temprano y activo. Estos hallazgos preliminares se interpretan en relación con las diferencias clínicas conocidas entre los obstetras en el embarazo por primera vez en comparación con los embarazos subsecuentes. No obstante, se desconoce casi en su totalidad la fisiología de los eventos multigesta en roedores y humanos y aún no se estudia si existe algún tipo de programación materna que “facilite” o “agilice” la respuesta fisiológica del segundo embarazo y los efectos que podría tener en el islote pancreático.

Asociación entre la multiparidad y el riesgo a desarrollar Diabetes mellitus tipo 2 y desordenes metabólicos relacionados, en humanos

Durante el embarazo, las mujeres son propensas a cambiar características de su estilo de vida como la composición de su dieta, incrementar su consumo energético, reducir la duración e intensidad de la actividad física. Adicionado a esto, se encuentran los cambios fisiológicos de la gestación que incluyen la resistencia a insulina progresiva, la acumulación y redistribución de tejido adiposo, dislipidemia e inflamación. Por lo tanto, el embarazo representa un reto metabólico *per se*, por lo que el aumento en su frecuencia o multiparidad se ha considerado como un factor reproductivo asociado con el desarrollo futuro de diabetes mellitus tipo-2 (DMT2) y de otros desordenes metabólicos relacionados.

Existen estudios en mujeres que analizaron la asociación entre la multiparidad y el riesgo a desarrollar diabetes mellitus tipo-2 en los años subsecuentes al embarazo, sin embargo, los resultados son controversiales. Gran parte de éstos, concluyen que existe una relación positiva (Cure et al., 2015; Fowler-Brown et al., 2010; Guo et al., 2017; Li et al., 2016^a, 2016^b; Luis et al., 2001; Mueller et al.,

2013), otros concluyen que no existe relación alguna (Manson et al., 1992, Collins et al., 1991, Alderman et al., 1993, Cowan et al., 1997) y en menor número de artículos, se reporta una relación negativa o de protección (Charles et al., 1994) entre la multiparidad y el riesgo a desarrollar diabetes mellitus tipo-2. Entre estos reportes, destacan dos metaanálisis del 2016 y 2017 (Guo et al., 2017; Li et al., 2016^a) que condujeron una búsqueda sistemática en la literatura publicada hasta el 2016 en las bases de datos de PubMed y Embase, de artículos que investigaran la asociación entre la cantidad de gestaciones y la diabetes mellitus tipo-2. Ambos metaanálisis concluyen que existe una relación positiva entre ambas variables e incluso uno (Guo et al., 2017) muestra que esta relación es lineal. La investigación en este tema podría explorar las posibles causas de la susceptibilidad incrementada a desarrollar DMT2 en mujeres multíparas, con el objetivo de prevenir su incidencia.

3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

El páncreas endócrino tiene la capacidad de modificar su masa y su capacidad secretora en respuesta a las demandas metabólicas. La gestación es un evento fisiológico que aumenta la demanda de insulina a nivel sistémico, lo cual representa un reto metabólico. Durante la gestación, la madre modifica sus islotes pancreáticos aumentando la masa de las células-beta y la secreción de insulina. Existen estudios en humanos, que asocian el número de eventos de gestación con el riesgo de desarrollar diabetes tipo-2 y otros tipos de trastornos metabólicos, empero los resultados presentan controversia y es difícil discernir, ya que el estilo de vida y condiciones socioeconómicas podrían intervenir también en esta asociación. En este proyecto de tesis se estudian los cambios en la morfología de los islotes pancreáticos maternos durante el primer y segundo evento de gestación, en un modelo murino, en el que la única variable a estudiar es el número de eventos gestacionales.

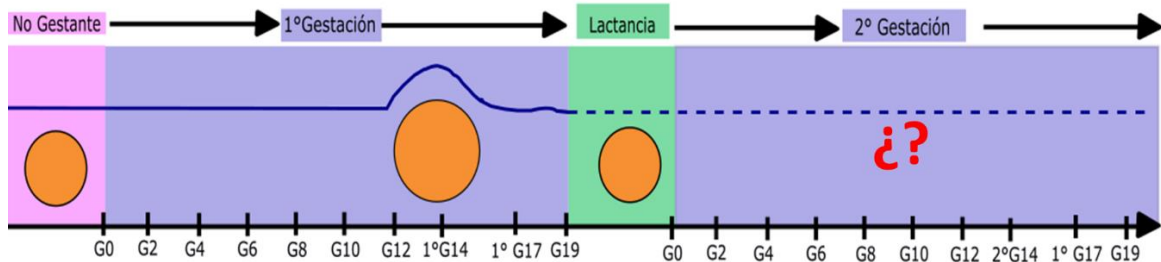


Figura 13. Representación gráfica del planteamiento del problema.

4. HIPÓTESIS

El islote pancreático presentará una dinámica de cambios diferente entre la primera y segunda gestación. Además, el perfil morfológico de los islotes pancreáticos maternos en la segunda gestación será diferencial dependiendo de la presencia de la lactancia.

5. OBJETIVO GENERAL

Comparar los cambios morfológicos y de composición presentes en los islotes pancreáticos maternos durante el primer y segundo evento de gestación y determinar la influencia de la lactancia en las adaptaciones del segundo evento gestacional, utilizando un modelo de ratones de la cepa C57BL/6.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Modelo animal

Los ratones hembras nulíparas C57BL/6 fueron alimentadas *ad libitum* y se mantuvieron con ciclos de luz/obscuridad de 12 horas. Para sacrificar a los siguientes grupos de ratones en las diferentes variables temporales, se privaron de alimento 12 horas, al cabo de las cuales se anestesiaron y se extrajeron muestras de sangre de la vena cava inferior y muestras del tejido total del páncreas.

- **Primera gestación:**

Al comenzar la vida reproductiva del ratón, a partir de las 8 semanas, los ratones se cruzaron durante un periodo de 18-24 horas, al cabo de las cuales se revisó el tapón vaginal en las hembras para evaluar si hubo copula. Se monitoreó

diariamente el peso de la hembra durante toda la gestación y se identificó a las hembras gestantes mediante un aumento del 50% en el peso corporal en los días 10-12. Se consideró como día 1 de gestación el día en que se observó el tapón vaginal al finalizar la cruce.

Durante la primera gestación se evaluaron 2 tiempos, el día 14 equivalente al inicio de la gestación tardía (la duración de la gestación es de 19 días para C57BL/6) y el día 17 que abarca el final de la gestación tardía. Se añadió un grupo control nulíparo, que tiene la misma edad de una ratona que se embaraza por primera vez. Este grupo control se hizo porque se ha demostrado que, en roedores, la masa de la célula aumenta con la edad de manera concomitante con el peso corporal (Montanya et al., 2000) y se deseaba saber los efectos de la gestación en el islote independientemente de la edad.

- 1) Día 14 de la Primera Gestación (1° G14)
- 2) Día 17 de la Primera Gestación (1° G17)
- 3) Control edad de la Primera Gestación: Ratona nulípara, con edad de 8-12 semanas.

- **Segunda gestación:**

Con el fin de evaluar la influencia de la lactancia en las modificaciones morfológicas del islote pancreático, se formaron dos grupos al finalizar el parto de la primera gestación, un grupo que lactó y otro que no lactó a sus crías. Después de finalizar los 21 días de lactancia (el día 1 de lactancia es el día del parto) las crías se destetaron y las madres se sometieron a un periodo de espera de dos semanas, para estabilizar el ciclo hormonal de la hembra y prepararla para la siguiente gesta. Al cabo de ese periodo, se sometió a las hembras a una segunda cruce, que se dejó, al igual que la primera cruce, únicamente 18-24 horas. Los ratones de los dos grupos se sacrificaron el día 14 de gestación. Adicionalmente, también hubo un grupo control edad de la segunda gestación.

- 1) Día 14 de la Segunda Gestación-Grupo Lactante (2° G14-LAC)
- 2) Día 14 de la Segunda Gestación-Grupo No Lactante (2° G14-NL)
- 3) Control edad de la Segunda Gestación: Ratona nulípara, con edad de 18-22 semanas.

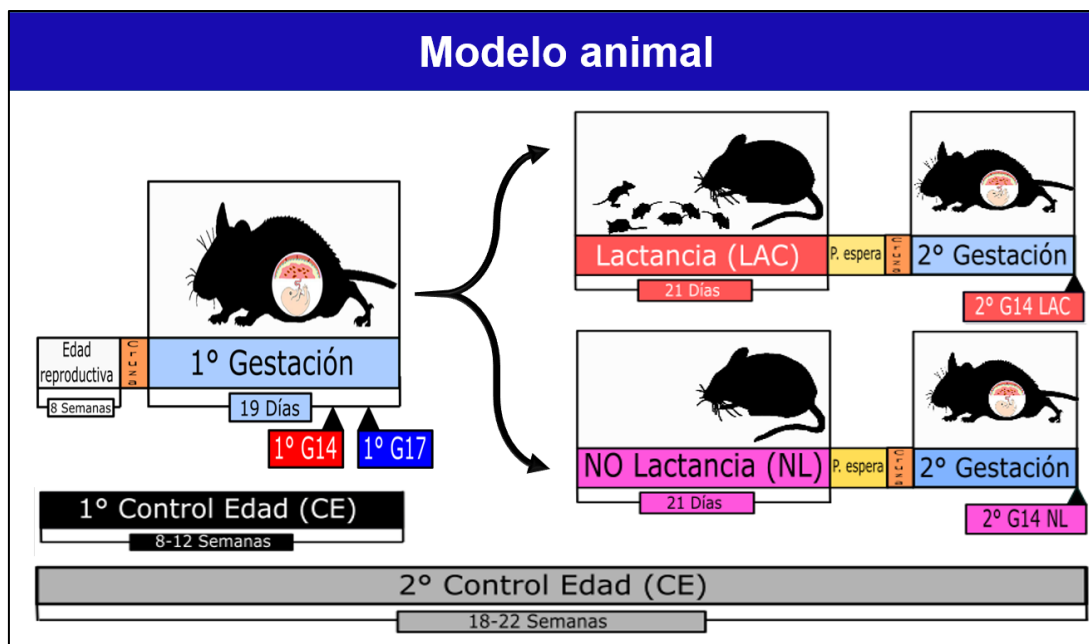


Figura 14. Representación gráfica del modelo animal generada en Inkscape.

6.2 Curvas de tolerancia a la glucosa.

Los ratones se mantuvieron en ayuno durante 12 h (los protocolos aceptados por el bioterio sólo permiten 12 horas de ayuno) y se les inyectó glucosa intraperitoneal a una dosis de 2 g/kg de peso corporal. Se midieron las concentraciones de glucosa en una gota sangre de la vena de la cola, antes de la inyección y a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección de glucosa. La glucosa en sangre se cuantificó con un glucómetro (Presicion QID, MediSense, Inc. Abbot Laboratories Company). El área bajo la curva se determinó utilizando el Software Graph Pad-Prism 8.

6.3 Curvas de tolerancia a la insulina.

Al inicio de la curva, los ratones se encontraban alimentados *ad libitum*. Las concentraciones de glucosa se midieron en muestras de sangre de la cola antes de la inyección intraperitoneal (tiempo 0) y a los 15, 30, 60 y 90 minutos posteriores a la inyección de 1 IU/kg de insulina regular humana (Humulin, Laboratorios Eli Lilly). Las concentraciones de glucosa se determinaron con un glucómetro (Presicion QID, MediSense, Inc. Abbot Laboratories Company). El área bajo la curva se determinó utilizando el Software Graph Pad-Prism 8.

6.4 Procesamiento del tejido para hacer cortes histológicos del páncreas

Los páncreas extraídos por pancreatectomía se fijaron con Formalina 10% en PBS 1x, durante 24 horas a temperatura ambiente o a 48 horas a 4°C. Posteriormente se lavó el tejido con agua destilada durante 3 horas o toda la noche. Luego, los páncreas se transfirieron del tubo Falcon de 15 ml a casetes de histología de plástico. Se comenzó la deshidratación sumergiendo los tejidos dentro de casetes en concentraciones crecientes de etanol y xilol en el siguiente orden: etanol al 50%, 70%, 80%, 96% y 100%, después 50% de etanol absoluto+ 50% de xilol, seguido de xilol puro, durante una hora cada solución. Posteriormente, en la pre-inclusión se sumergieron los tejidos en el primer frasco de parafina (Parafina I) (Paraplast, Sheerwood Medical Co.) en agitación durante 1 hora y luego en un segundo frasco de parafina, con las mismas condiciones que el primero. *NOTA: Previamente ambos frascos de parafina se fusionaron (cambiaron de estado de sólido a líquido), para eso se someten a incubación a baño María a 60° al menos 2 horas antes de usarlos.

En la inclusión, los tejidos se posicionaron en un molde que correspondía al tamaño del tejido y se añadió parafina hasta llenar el molde. Se dejó secar por 30-60 minutos y se sacó el bloque del molde para realizar cortes seriados de 5µm de grosor. Los cortes se montaron en laminillas previamente tratadas con Polilisina-L (Sigma-Aldrich).

6.5 Protocolo para Inmunohistoquímica

Las laminillas se desparafinaron sumergiéndolas en xilol puro durante 3 minutos y después en una solución de 50% xilol-50% etanol absoluto. Posteriormente, se sumergieron en concentraciones decrecientes de etanol con el siguiente orden: Etanol absoluto, 90%,80%, 70%, 50% durante 4 min cada solución. Después, se lavaron las laminillas con PBS 1x durante 5 min y luego se efectuó la recuperación del antígeno y exposición de los epítopes al hervir las laminillas en buffer de citratos (pH: 6, 10mM de $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Mw. 204.10 g/mol + 0.05% de Tween) a exactamente 90° C durante 20 minutos, al cabo de los cuales se deja enfriar a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente, las

laminillas recibieron 3 lavados de 5 minutos c/u en PBS 1x, se limpió el exceso de PBS 1x de las laminillas, cuidando que los tejidos no secan, y con la pluma hidrofóbica se circuló cada tejido. Inmediatamente después, las laminillas se colocaron en la cámara húmeda y se añadieron 40 µl de solución de perforación (Tritón 1% + SNC 0.3% en PBS 1x) durante 40 minutos. Mientras tanto, se prepararon las diluciones de los anticuerpos primarios en SNC 1%, manteniéndolos siempre a 4°C. Posteriormente, se desechó la solución de perforación, se agregaron los anticuerpos primarios y se dejaron dentro de la cámara húmeda durante 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se dieron 3 lavados con PBS 1x, de 5 minutos cada uno a las laminillas. Simultáneamente, se prepararon las diluciones de los anticuerpos secundarios, también en SNC 1% procurando no exponerlos a la luz y mantenerlos a 4°C. Al finalizar los lavados, las laminillas se secaron lo mayor posible con servilletas, se posicionaron en la cámara húmeda y se agregaron los anticuerpos secundarios durante 2-3 horas a temperatura ambiente. Mientras tanto, se limpiaron los cubreobjetos con etanol 70% y gasas, procurando que no quedara ninguna mancha. Una vez que la incubación terminó, se agregó la dilución de DAPI previamente diluida en PBS 1x (Concentración final 2 µg/ml) durante 5 minutos. Para finalizar, se eliminaron los residuos líquidos y se añadieron 40 µl de medio de montaje (Dako) por laminilla y se colocaron sobre el cubreobjetos de modo que cubriera toda el área del tejido, y se presionó firmemente el cubreobjetos contra la laminilla para que no quedaran burbujas. Finalmente se selló la periferia del cubreobjetos con barniz de uñas transparente (Fig.15).

Metodología experimental

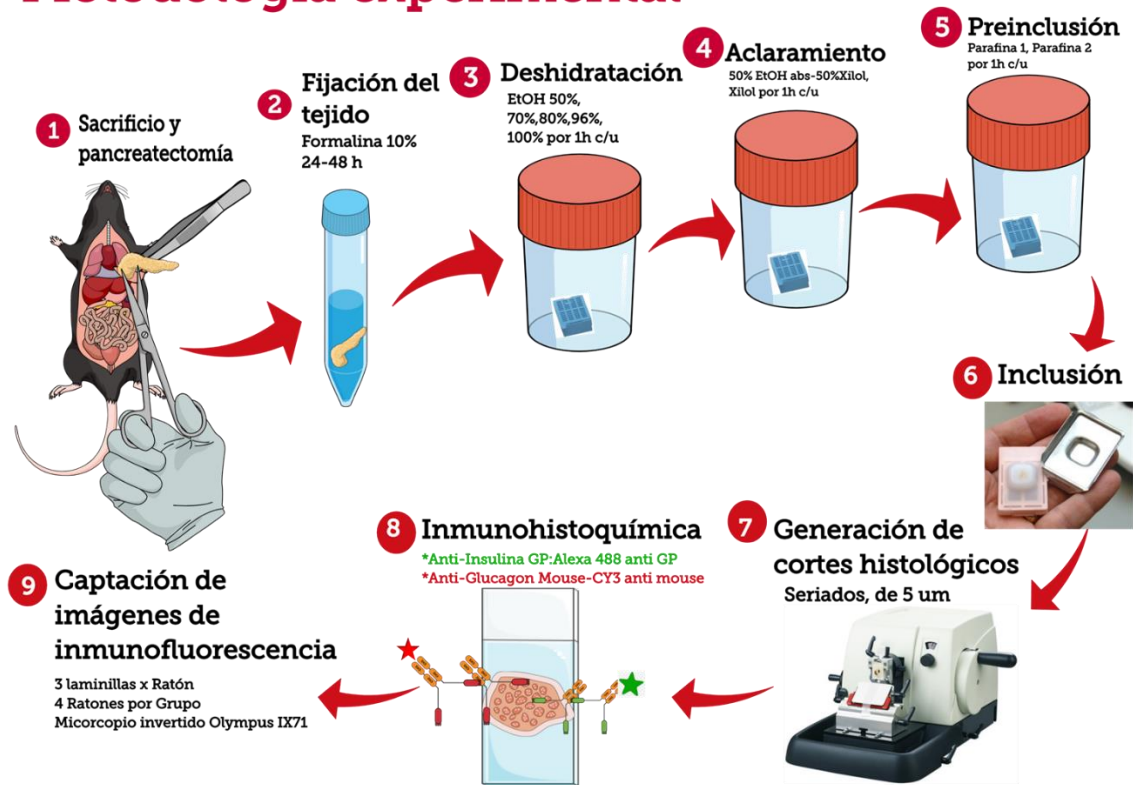


Figura 15. Representación gráfica la metodología experimental.

Anticuerpos y diluciones

- Anticuerpos primarios:
Anti-Insulina: Guinea Pig, Policlonal (Invitrogen PA1-26938) 1:150
Anti-Glucagon: Mouse, Monoclonal (Sigma G2654) 1:4500
- Anticuerpos secundarios
Alexa 488 anti-Guinea Pig: Donkey, Jackson Immunoresearch, 1:300.
CY3 anti-mouse: Donkey, Jackson Immunoresearch, 1:800

6.6 Análisis de la morfometría de los islotes.

El análisis morfométrico se realizó con al menos 3 laminillas por ratón, con un mínimo de 250 islotes por ratón, en un total de 4 ratones por grupo. Las laminillas se analizaron usando el microscopio invertido Olympus IX71 de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, utilizando

los objetivos 10x y 20x. Las fotografías se generaron bajo los mismos parámetros de adquisición para todas las laminillas analizadas.

Mediante el uso del Software Fiji (Chindelin, Arganda-Carreras & Frise, 2012) se cuantificaron los siguientes parámetros morfométricos en el islote pancreático:

- a) Área total del islote pancreático (Fig. 16).
- b) Área positiva a insulina en el islote.
- c) Área positiva a glucagon en el islote (Fig. 17).
- d) Número de núcleos totales en el islote (Fig. 18).
- e) Número de células positivas a insulina o células- β (Fig. 18).
- f) Número de células positivas a glucagon o células- α (Fig. 18).
- g) Tamaño individual de las células- β : División aritmética del área positiva a insulina entre el número de núcleos dados por DAPI dentro de esa área.
- h) Tamaño individual de las células- α : Relación matemática entre el área positiva a glucagon/número de núcleos dados por DAPI dentro de esa área.

La conversión de pixeles a μm^2 se realizó con base en las relaciones dadas por el aumento utilizado en la adquisición de la fotografía, de modo que para 10x $2.16 \text{ pixeles}=1 \mu\text{m}^2$ y para 20x, $4.32 \text{ pixeles}=1 \mu\text{m}^2$.

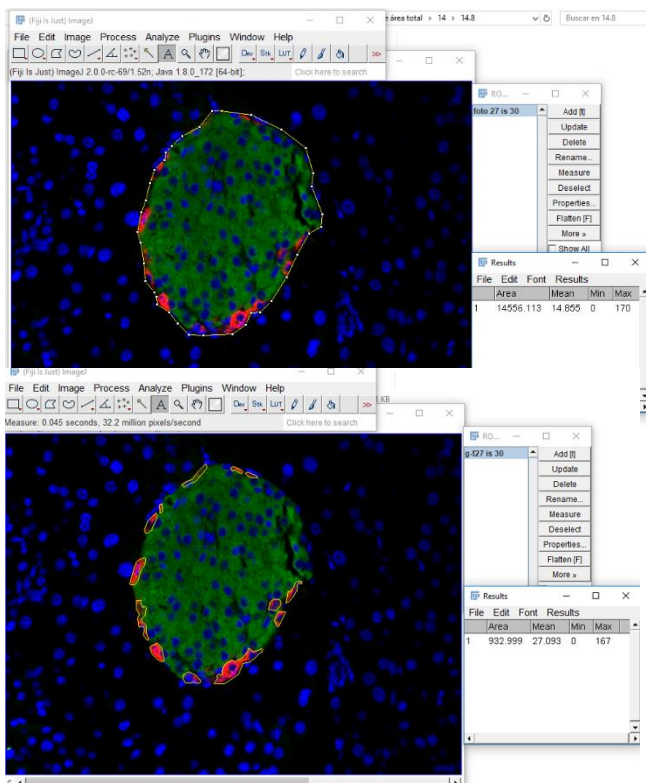


Figura 16. Cuantificación del área total del islote pancreático en el software Fiji.

Figura 17. Cuantificación del área positiva a glucagon en el islote pancreático mediante el software Fiji.

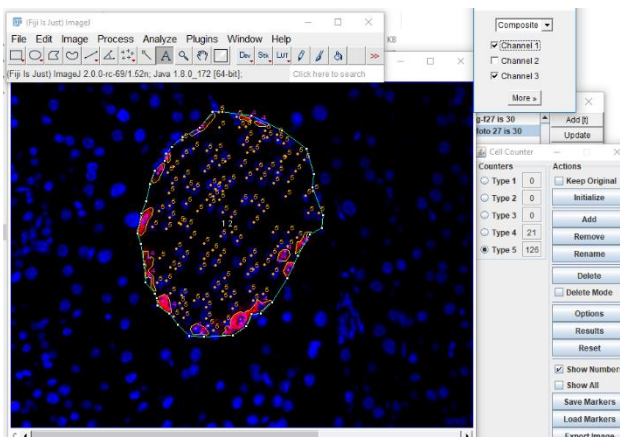


Figura 18. Cuantificación del número de núcleos positivos a insulina y glucagon en el islote pancreático mediante el software Fiji.

6.7 Análisis estadístico

Los datos se presentan como el promedio \pm EE. Se analizaron mínimo 3 laminillas del mismo páncreas por ratón y 4 ratones por grupo; n representa el número de islotes pancreáticos analizados por grupo de 4 ratones. El análisis estadístico se realizó utilizando el Software GraphPad Prism 8.1.0.

a) Análisis de datos provenientes de las laminillas de un solo ratón:

Se hicieron las pruebas de distribución normal de Datos Kolmogorov-Smirnov y D'Agostino-Pearson, posteriormente se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si los datos de las repeticiones para un solo ratón eran diferentes entre sí.

b) Análisis de los datos entre individuos del mismo grupo:

Se observó que no había diferencia en los datos entre las distintas laminillas de un solo ratón, por lo que se prosiguió a evaluar la variación de datos entre ratones del mismo grupo, dichas variaciones son causadas por las diferencias en los individuos dentro del grupo, diferencias no causadas por la variable independiente, que en este caso es el día gestacional. De manera similar a lo anterior, se hicieron las pruebas Kolmogorov-Smirnov y D'Agostino-Pearson de distribución normal de datos, y posteriormente se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si los individuos eran estadísticamente diferentes entre sí.

c) Análisis de datos de las variables dependientes (parámetros morfométricos) entre los grupos de la variable independiente, que es el día gestacional.

Se identificó a las variables dependientes como los distintos parámetros morfométricos. Los datos de dichos parámetros provienen de muestras independientes y aleatorias entre sí, dado que los 4 ratones son de camadas distintas e incluso de distintos bioterios (2 de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas y 2 del bioterio del Instituto Nacional de Pediatría). Adicionalmente, los datos presentan una distribución no normal, dadas las pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y D'Agostino-Pearson, por lo que se eligió la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney que compara medianas y trabaja sobre rangos de orden para comparar dos muestras independientes, por ejemplo, en este caso el día 14 vs el día 17 de la primera gestación (Flores-Ruiz, Miranda-Novales, & Villasís-Keever, 2017) .

7. RESULTADOS

7.1 Cambios morfológicos de los islotes pancreáticos maternos durante la primera gestación

7.1.a Área total del islote pancreático en la primera gestación

El área total del islote pancreático de un ratón no gestante, en edad reproductiva similar a los usados en la gestación, presenta un valor promedio de $6,705 \pm 486 \mu\text{m}^2$. Al someterse a la primera gestación el área total del islote aumenta a $11,443 \pm 756 \mu\text{m}^2$, es decir aproximadamente 2 veces al día 14 de gestación, comparado con el ratón control pareado por edad ($6,705 \pm 486 \mu\text{m}^2$). En contraste, del día 14 al día 17 de gestación el área total del islote disminuye a $8,689 \pm 625 \mu\text{m}^2$, sin embargo, dicha área sigue siendo mayor a la del ratón control pareado por edad ($6,705 \pm 486 \mu\text{m}^2$). (Fig. 19)

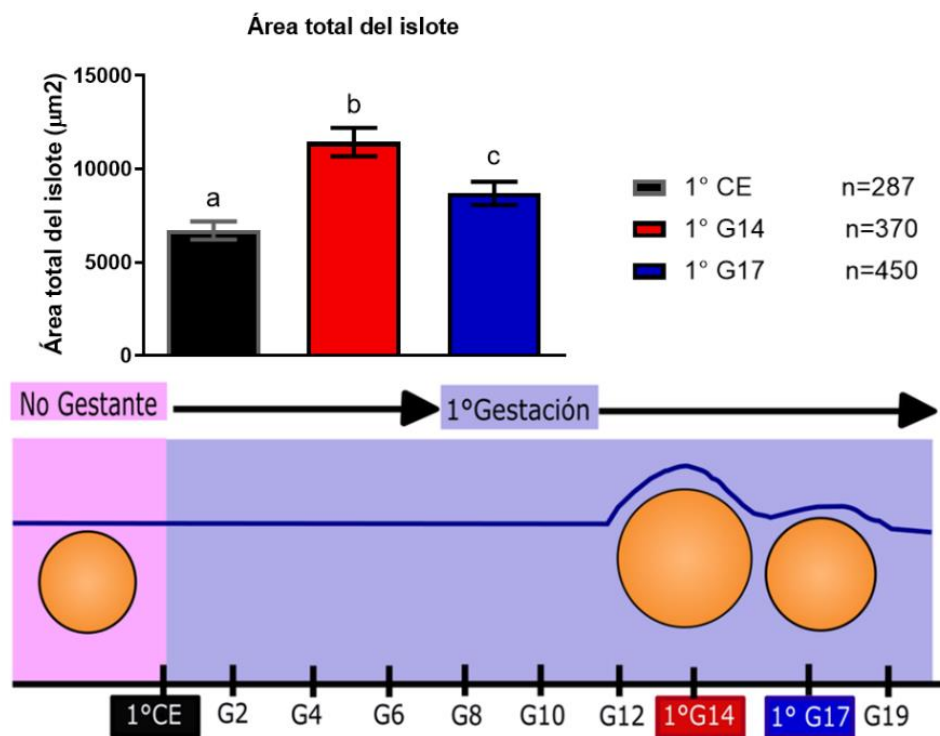


Figura 19. Dinámica de tamaño del islote pancreático materno durante la primera gestación. Área total del islote pancreático materno (μm^2) durante la gestación media (1° G14) y tardía (1° G17) de la primera gestación comparado con el primer control pareados por edad, (1° CE). Los datos representan la media \pm SEM. N=4 ratones por grupo. * $p < 0.05$. *Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

7.1.b Cambios en el porcentaje de área positiva a insulina durante la primera gestación

Con el fin de evaluar la dinámica de cambios en la composición del islote pancreático, se cuantificó el porcentaje de área positiva a insulina. Los resultados revelaron que el islote pancreático de un ratón hembra no gestante de 8-12 semanas presenta un valor promedio de $83.1\% \pm 0.71$. En la primera gestación el porcentaje de área positiva a insulina aumenta un 8% en el día 14 ($91.3\% \pm 0.59$) comparado con el ratón nulípara pareado por edad ($83.1\% \pm 0.71$). Posteriormente, el área positiva a insulina disminuye de $91.3\% \pm 0.59$ en el día 14 a $88.4\% \pm 0.68$ en el día 17 de la primera gestación. (Fig. 21).

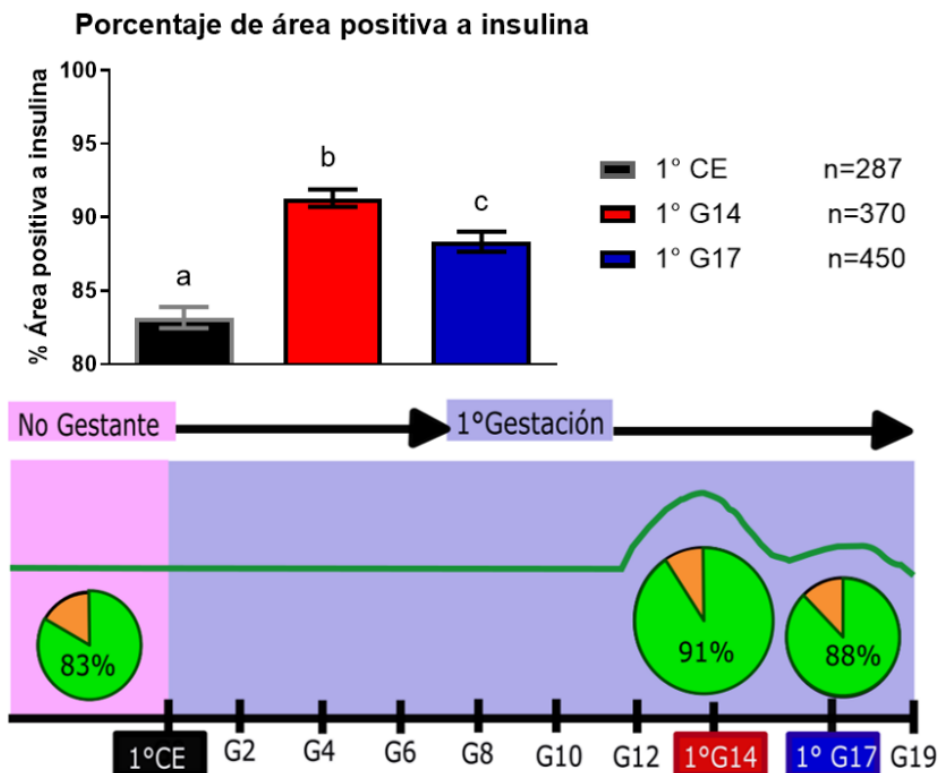


Figura 21. Porcentaje de área positiva a insulina por islote pancreático materno durante la primera gestación. El porcentaje de área positiva a insulina aumenta un 8% durante el día 14 de gestación, comparado con el primer control edad no gestante, y del día 14 al día 17 disminuye aproximadamente un 3%, sin llegar a niveles no gestacionales. Los datos representan la media \pm SEM. N=4 ratones por grupo. * $p < 0.05$. *Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

7.1.c Cambios en la composición celular del islote pancreático durante la primera gestación: Cuantificación del número y tamaño individual de las células-β.

A pesar de que el porcentaje de área positiva a insulina es informativo de la composición del islote pancreático, con este parámetro no es posible determinar si los cambios en el área positiva a insulina son proporcionales con el tamaño de las células individuales o con el número de células-β. Por lo que, se procedió a evaluar estos últimos 2 parámetros mediante la cuantificación de núcleos presentes en el área positiva a insulina. Con respecto al área individual de las células-β, cuantificado en μm^2 , se observó un aumento de aproximadamente un 40% al día 14 de la primera gestación (123 ± 7.58) en comparación con el primer control edad nulíparo (87.9 ± 7.58). De manera interesante, el tamaño individual de la célula-β en el día 14 se mantiene sin cambios durante el día 17 (115 ± 2.84).

De manera similar, el número de células-β aumenta aproximadamente al doble en el día 14 (87.7 ± 5.58) comparado con el control edad (45.9 ± 3.57), pero disminuye un 25% del día 14 al día 17 (66.1 ± 4.43) de la primera gestación.

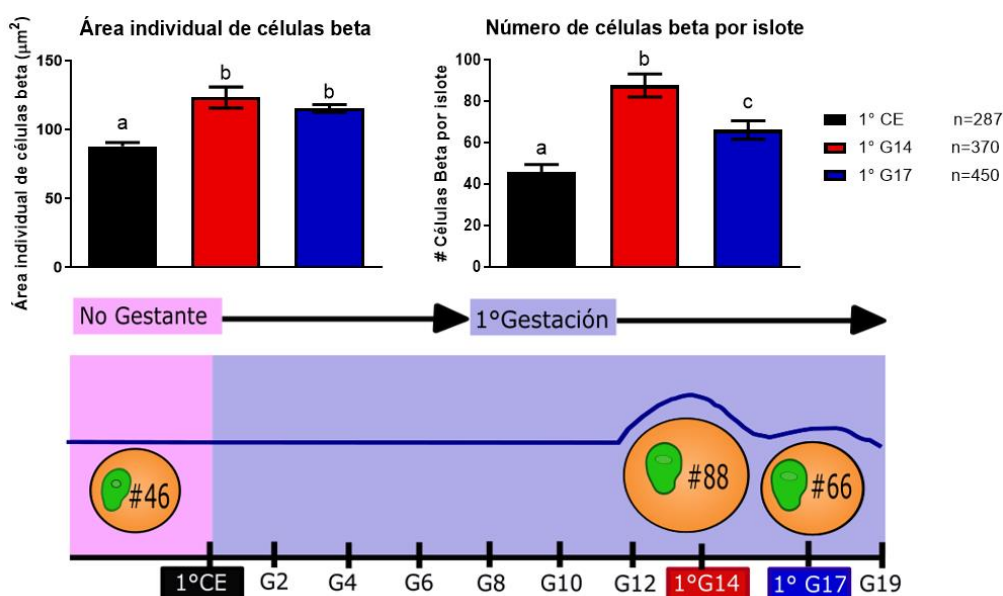


Figura 22. Área individual y número de células β en los islotes maternos de roedores durante la primera gestación. El área individual de las células-β aumenta aproximadamente un 40% al día 14 y se mantiene así hasta el día 17 de la primera gestación. Similarmente, número de células-β aumenta al día 14 y disminuye al día 17 del primer evento gestacional. Los datos representan la media \pm SEM. N=4 ratones por grupo. * $p < 0.05$. *Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

7.1.d Cambios en la composición celular del islote pancreático durante la primera gestación: Cuantificación del número y tamaño individual de las células- α .

A diferencia del tamaño individual de las células- β , el área individual de las células- α no cambia durante el día 14 (48.7 ± 7.58) en comparación con el control nulípara pareado por edad (49.3 ± 1.57). Empero, el área individual de las células- α presenta un aumento del día 14 (48.7 ± 7.58) al día 17 (52.5 ± 6.81). Contrastadamente, se presenta el mismo número promedio de células- α durante el día 14 (16 ± 1.62), el día 17 (14.8 ± 1.10) y el control edad (11.4 ± 0.94).

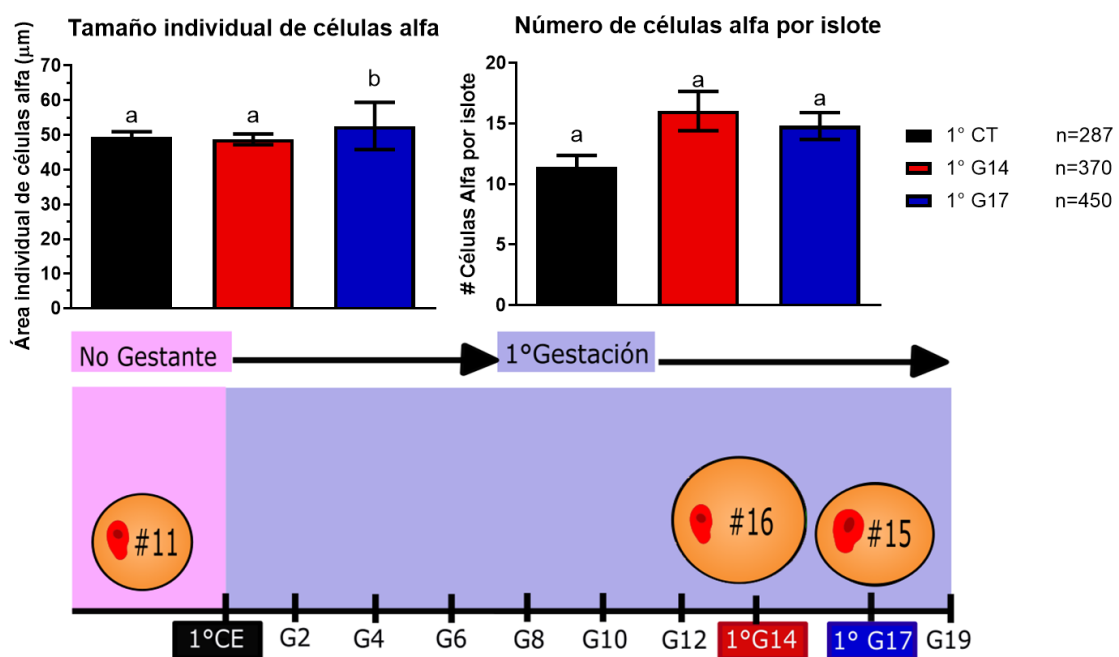


Figura 23. Área individual y número de células- α en los islotes maternos durante la primera gestación. El tamaño de células- α no cambia al día 14 de gestación, comparada con el control nulípara pareada por edad, pero del día 14 al día 17 se presenta un aumento en este parámetro. El número de células- α no presenta diferencias significativas durante el día 14 o día 17 del primer evento gestacional, con respecto al primer control edad nulípara. Los datos representan la media \pm SEM. N=4 ratones por grupo. * $p < 0.05$. *Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

7.1.e Efecto de la primera gestación en la tolerancia a la glucosa

Con base en los resultados anteriores, analizamos si los cambios en el tamaño y composición del islote pancreático durante los días 14 y 17, podrían repercutir en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa a nivel sistémico. Para este fin, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en los días 14 y 17 de la primera gestación.

No se encontraron diferencias en las concentraciones de glucosa para ninguno de los tiempos posteriores a la inyección de glucosa, ni en el área bajo la curva, entre el día 14 de la primera gestación comparado con el día 17 de gestación y el control edad nulípara. Sin embargo, se observó un aumento significativo en las concentraciones de glucosa a los 15, 30 y 60 min posteriores a la inyección de glucosa en el día 17 de gestación comparada con el control nulípara. De manera similar, al evaluar el área bajo la curva de glucosa, encontramos que los ratones al día 17 de gestación exhiben una mayor área bajo la curva que los ratones control nulíparos, indicando una menor tolerancia a la glucosa (Fig. 24).

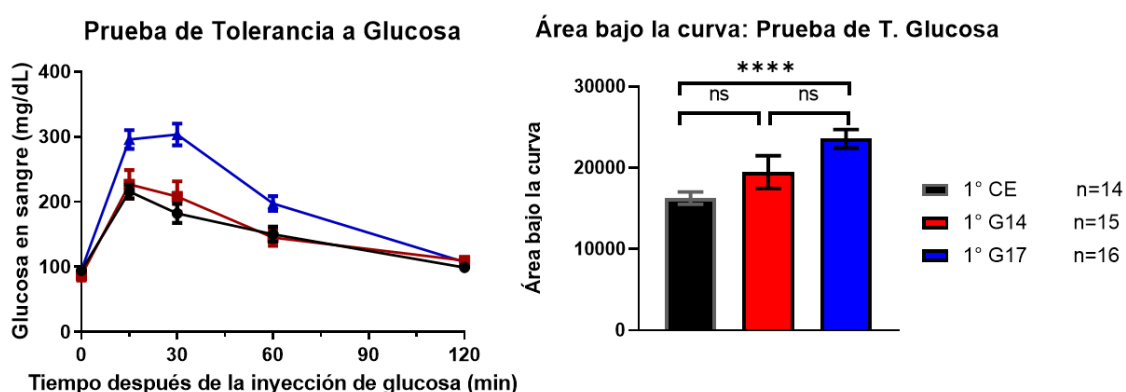


Figura 24. En el día 17 de gestación se presenta menor tolerancia a la glucosa que en el día 14 y que en control nulípara. Concentraciones de glucosa (izquierda) y área bajo la curva (derecha) durante la curva intraperitoneal de tolerancia a la glucosa en ratones control nulíparos (círculos/barra negra) y en los días 14 (cuadrados/ barra roja) y 17 (triángulos/barra azul) de la primera gestación. Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0.0001$.

7.1.f Curva de tolerancia a la insulina durante la primera gestación

La tolerancia a la glucosa depende principalmente de dos componentes: la secreción de insulina en respuesta a la glucosa administrada y la sensibilidad a la insulina. Con el fin de identificar cuál de estos dos componentes estaba participando en la disminución de tolerancia a glucosa en el día 17 de gestación, se realizó una curva de tolerancia a la insulina. Se encontró una menor

sensibilidad a la insulina es decir, la capacidad de los tejidos periféricos para captar glucosa exógena administrada en el día 17 de gestación comparada con el día 14 de gestación y el control nulíparo pareado por edad. (Fig. 25).

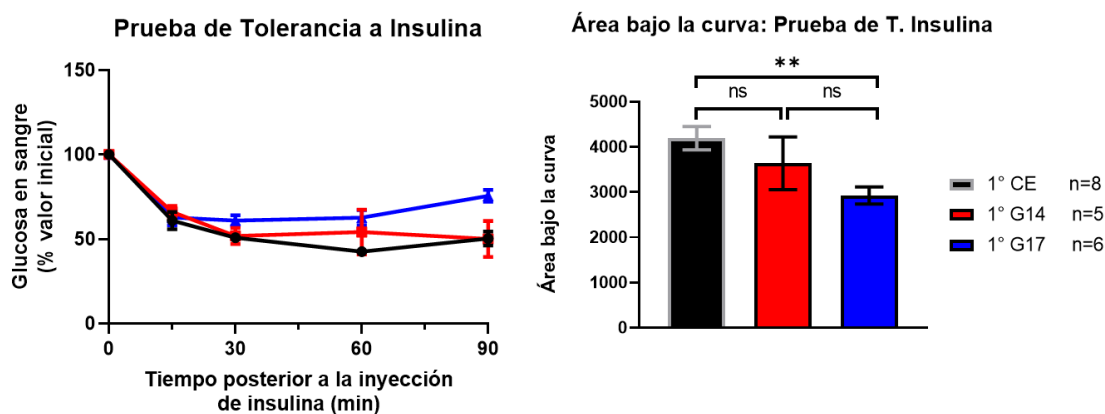


Figura 25. En el día 17 de gestación se presenta menor sensibilidad a la insulina que en el día 14 y que en control nulíparo. Concentraciones de glucosa (izquierda) y área bajo la curva inversa (derecha) durante la curva intraperitoneal de tolerancia a la insulina en ratones control nulíparos (círculos/barra negra) y en los días 14 (cuadrados/ barra roja) y 17 (triángulos/barra azul) de la primera gestación. Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0.01$.

7.2 Comparación de los cambios morfológicos de los islotes pancreáticos maternos entre la primera y la segunda gestación cuando existió proceso de lactancia

Previo a seleccionar el día de estudio en la segunda gestación, se evaluó el día 14 que equivale al inicio de la gestación tardía y el día 17 que corresponde al final de la gestación tardía. Se evaluaron estos días debido a que en la literatura se había reportado que la resistencia a la insulina aumenta progresivamente hacia el final del embarazo con el fin de suplir las necesidades energéticas del feto. Por lo que, se esperaba que el tamaño del islote y el número de células- β fuera mayor en el día 17 que en el día 14. Sorpresivamente no fue así, sino que se observó la mayor área total del islote con mayor número (hiperplasia) y tamaño celular (hipertrofia) de células- β en el día 14 de la primera gestación, por lo que se seleccionó estudiar el día 14 en la segunda gestación en dos grupos que se habían sometido o no al proceso de lactancia. A continuación, se describirá lo observado para el grupo lactante.

7.2.a Comparación del área total del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió proceso de lactancia

Durante el día 14 de la segunda gestación, el tamaño total del islote pancreático (μm^2) disminuye ($10,134 \pm 1088$) comparado con el día 14 de la primera gestación ($11,443 \pm 756$); sin embargo, no muestra diferencias significativas con el tamaño del islote que presentan los ratones pareados por edad (2do control edad = $9,489 \pm 799$). (Fig. 26). Por lo tanto, el aumento en el área del islote pancreático se da en el día 14 de la primera gestación, pero no en el día 14 de la segunda gestación.

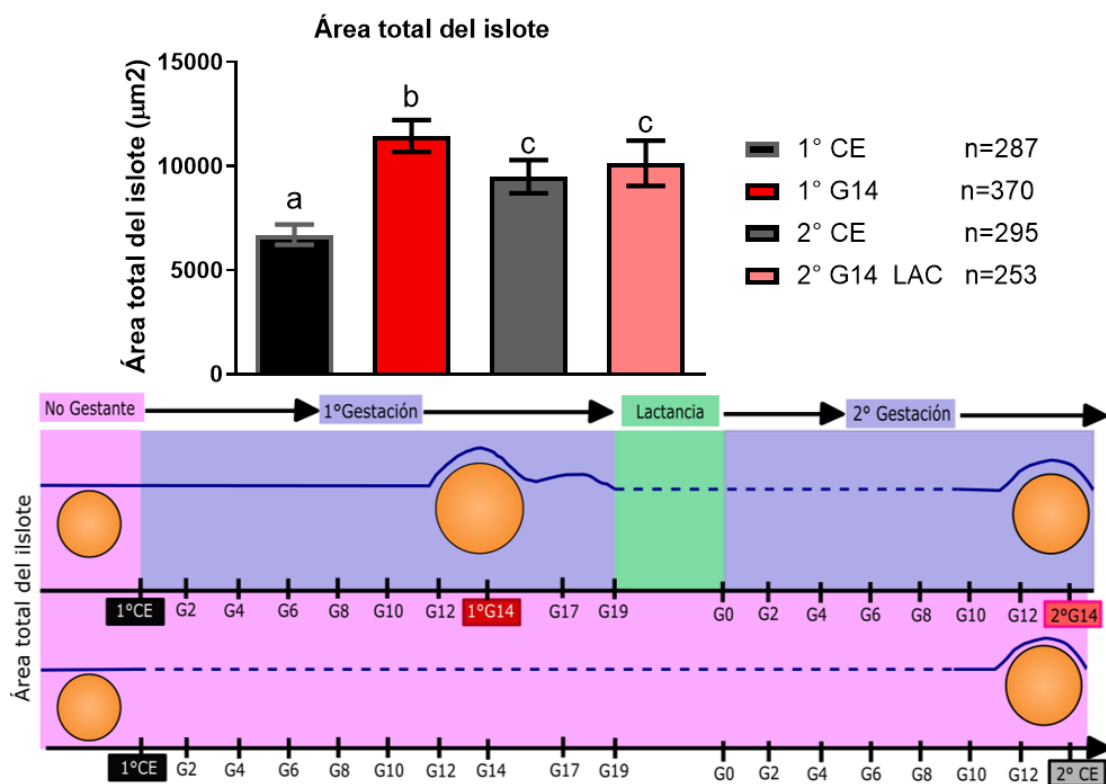


Figura 26. Dinámica de tamaño del islote pancreático materno durante la primera y segunda gestación. Área total del islote pancreático materno durante el día 14 de la primera y segunda gestación; comparados con dos controles tiempo pareados por edad con cada uno de los días gestacionales. Los datos representan la media \pm SEM. N=4 ratones por grupo. * $p < 0.05$. *Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

7.2.b Comparación del área positiva a insulina entre la primera y la segunda gestación cuando existió proceso de lactancia

El porcentaje de área positiva a insulina en el día 14 de la segunda gestación (91.1 ± 0.58) no cambia con respecto al día 14 de la primera gestación (91.3 ± 0.59), lo que indica que este efecto es producto del estímulo de la segunda gestación (y/o la lactancia) e independiente de la edad, debido a que el segundo control edad (86.4 ± 0.73) muestra un área positiva a insulina menor que la presente al día 14 del segundo embarazo.

Por lo tanto, a pesar de que el porcentaje en el área positiva a insulina es igual en el día 14 de la primera y segunda gestación, hay un mayor aumento en este parámetro, entre el primer control edad nulípara y el día 14 de la primera gestación que en el segundo control edad nulípara y el día 14 de la segunda gestación, sugiriendo que el efecto de la primera gestación es más “potente” a modificar el área positiva a insulina que el de la segunda gestación.

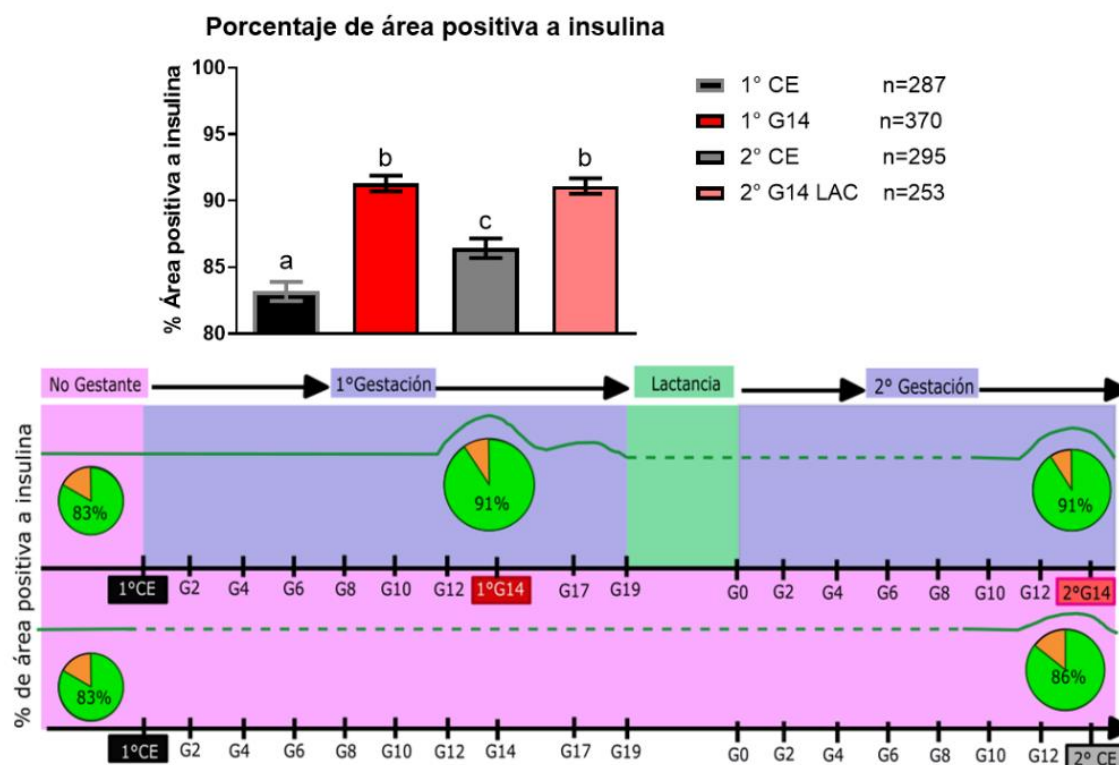


Figura 28. Porcentaje de área positiva a insulina por islote pancreático materno durante el día 14 la primera y segunda gestación. El porcentaje de área positiva a insulina en el día 14 de la segunda gestación para el grupo lactante no cambia en comparación con el día 14 de la primera gestación, dicho efecto independiente de la edad. Los datos representan la media \pm SEM. N=4 ratones por grupo. * $p < 0.05$. *Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

7.2.c Comparación de la composición celular del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió el proceso de lactancia: cuantificación del número y tamaño individual de las células-β

En el día 14 de la segunda gestación el área individual de la célula-β disminuye (92.9 ± 1.51) en comparación con el día 14 de la primera gestación (123 ± 7.58). El efecto en la segunda gestación está dado por el factor edad debido a que en los islotes del control edad nulípara pareado por edad (segundo control edad= 93.6 ± 1.38) no presenta diferencias significativas con el área de la célula-beta en el día 14 de la segunda gestación. Sorprendentemente, el número de células-β en el día 14 de la segunda gestación (96.7 ± 9.24) no presenta diferencias significativas comparado con el día 14 de la primera gestación (87.7 ± 5.58). (Fig. 29).

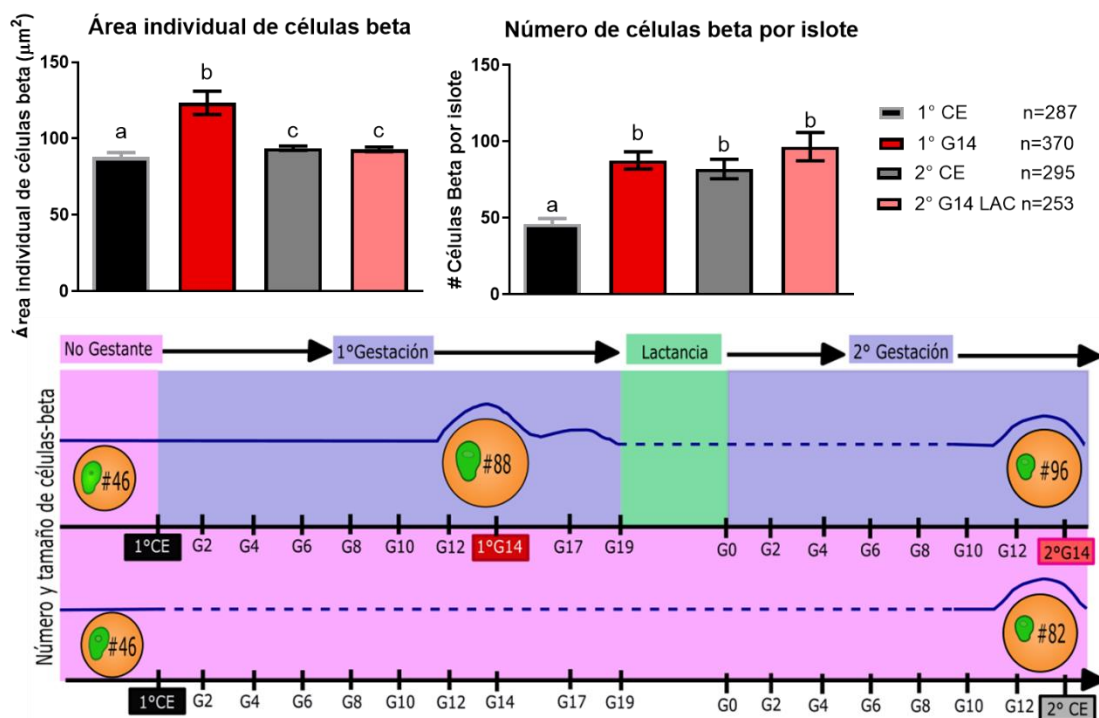


Figura 29. Tamaño y número de células β en los islotes maternos de roedores durante el día 14 de la primer y segunda gestación. Los datos representan la media \pm SEM. N=4 ratones por grupo. * $p < 0.05$. *Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

7.2.d Comparación en la composición celular del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió el proceso de lactancia: Cuantificación del número y tamaño individual de las células- α

El área individual de las células- α (μm^2), no cambia durante el día 14 de la primera gestación (48.7 ± 7.58) en comparación con el primer control edad nulípara (49.3 ± 1.57). Sin embargo, presenta un aumento equivalente en los grupos del día 14 de la segunda gestación (46.2 ± 1.81) y en el segundo control edad nulípara (46.74 ± 1.3).

También, se presenta el mismo número de células- α durante el día 14 (16 ± 1.62), el día 17 (14.8 ± 1.11), el primer control edad (11.4 ± 0.95) y el día 14 de la segunda gestación (13.5 ± 1.40), la única diferencia significativa se presenta en el segundo control edad (19.3 ± 1.51), que exhibe un aumento en el número de células α comparado con los tiempos anteriores.(Fig. 30).

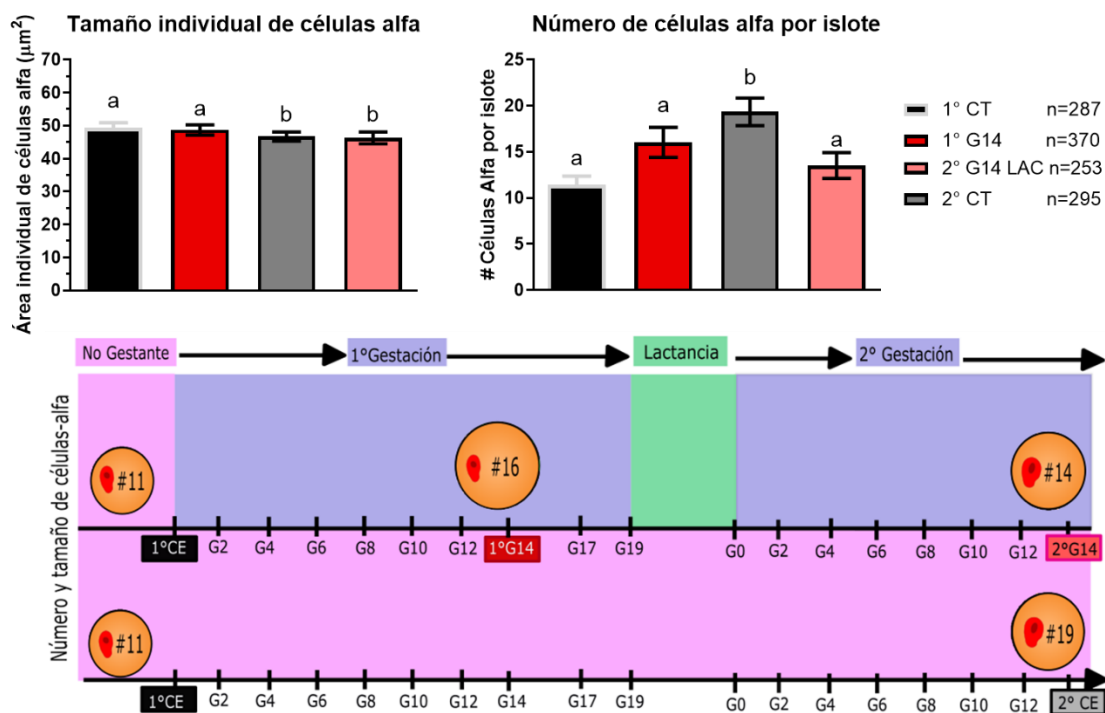


Figura 30. Área individual y Número de células α en los islotes maternos de roedores durante la primera y segunda gestación. El área individual de las células- α está dado por la edad tanto en la primera, como en la segunda gestación, mientras que el número de células α no presenta diferencias significativas entre los grupos del día 14 de la primera ni segunda gestación, ni en el primer control edad nulípara. El único grupo que presentó diferencias significativas es el segundo control edad nulípara, en el que se observó un aumento en el número de células alfa por islote. Los datos representan la media \pm SEM. N=4 ratones por grupo. * $p < 0.05$. *Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

7.3 Efecto de la lactancia en los cambios morfológicos de los islotes pancreáticos en el día 14 de la segunda gestación: Comparación de la segunda gestación entre el grupo en el que si existió lactancia contra el no lactante

7.3.a Comparación del aumento en el tamaño del islote pancreático materno durante la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia

Con el fin de determinar el efecto de la lactancia sobre los cambios morfológicos de los islotes pancreáticos maternos en la segunda gestación, se compararon los parámetros morfológicos de estudio entre un grupo de ratones que no lactaron a sus crías después del primer parto con respecto al grupo lactante.

Los resultados demuestran que al día 14 de la segunda gestación para el grupo no lactante (8331 ± 1011) el área total del islote pancreático es 17% menor que en el día 14 de la segunda gestación para el grupo lactante (10134 ± 1088). Esto indica que la lactancia favorece el crecimiento del islote en el día 14 de la segunda gestación. (Fig. 31).

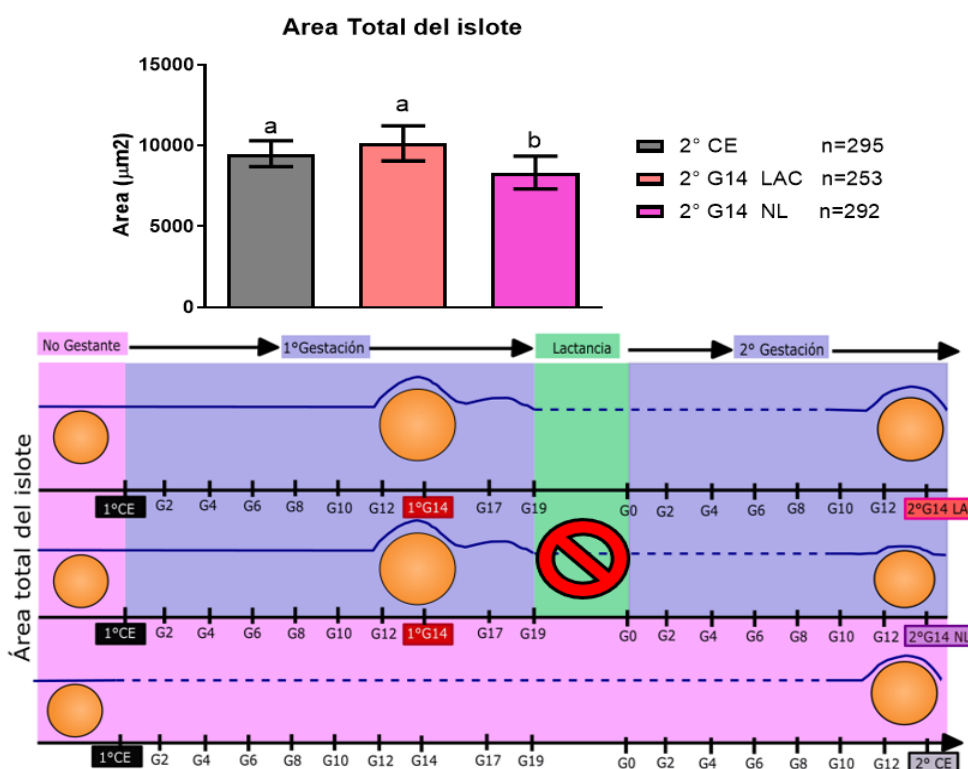


Figura 31. Área total del islote pancreático materno en la segunda gestación media es favorecida con la lactancia. En el día 14 de la segunda gestación para el grupo No Lactante el área total del islote pancreático es 17% menor que en el día 14 de la segunda gestación para el grupo lactante. Esto indica que la lactancia favorece el crecimiento del islote en la segunda gestación media. Los datos representan la media \pm SEM. N=4 ratones por grupo. * $p < 0.05$. *Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

7.3.b Comparación del número de células-β y de su tamaño individual durante el día 14 la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia

El tamaño individual de la célula-β no se modifica en ausencia de lactancia, dado que no hay diferencia significativa entre el día 14 de la segunda gestación en el grupo lactante (92.9 ± 1.5) y al día 14 de la segunda gestación en el grupo no lactante (104 ± 7.6). No obstante, el número de células-β disminuye significativamente, un 19% en el día 14 de la segunda gestación para el grupo no lactante (78.5 ± 7.8), con respecto al día 14 de la segunda gestación para el grupo lactante (96.7 ± 9.2). (Fig. 32).

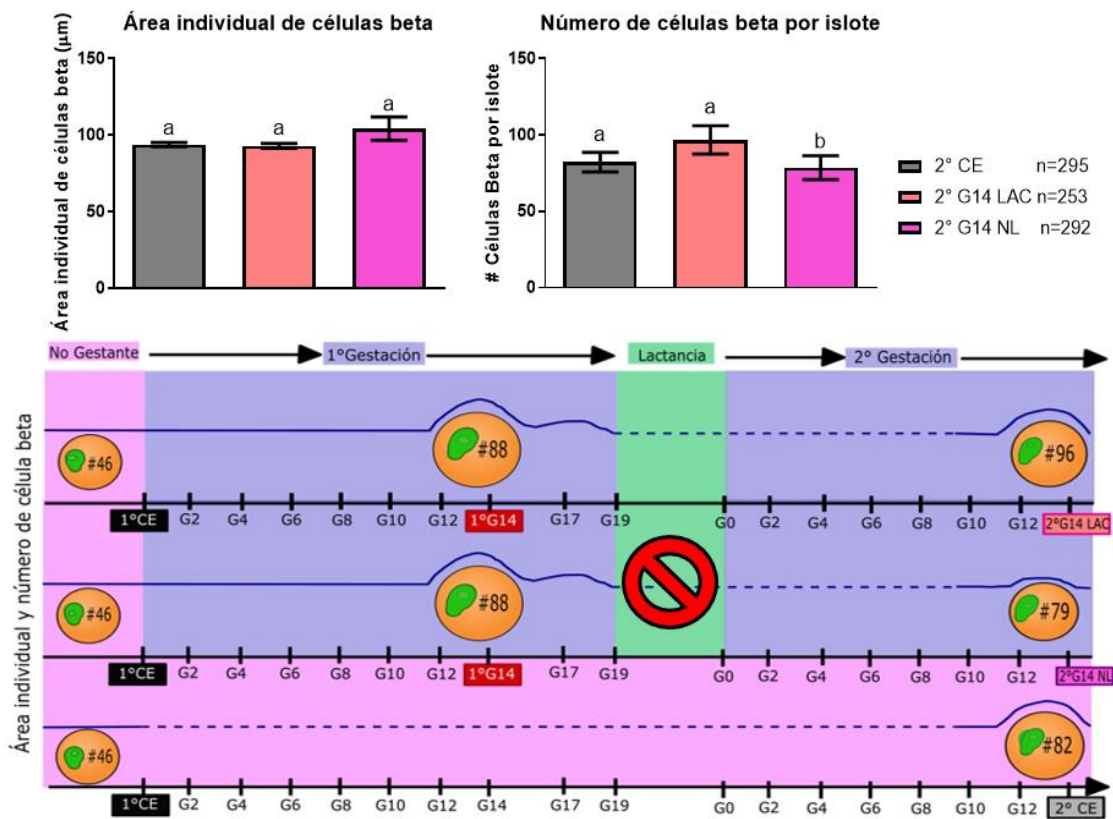


Figura 32. El número de células β, pero no el tamaño individual de éstas, se modifica en ausencia de lactancia. El número de células β disminuye aproximadamente un 19% en el día 14 de la segunda gestación para el grupo No Lactante, con respecto al grupo lactante. No obstante, el tamaño individual de las células β no se modifica en ausencia de lactancia. Los datos representan la media ± SEM. N=4 ratones por grupo. *p<0.05

7.3.c Comparación del número de células- α y de su área individual durante el día 14 de la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia

El tamaño individual de la célula- α no disminuye en ausencia de lactancia, dado que hay disminución del 33% entre el día 14 de la segunda gestación en el grupo lactante (46.2 ± 1.8) y al día 14 de la segunda gestación en el grupo no lactante (30.7 ± 2.6). Igualmente, el número de células- β disminuye un 42% en el día 14 de la segunda gestación para el grupo no lactante (7.8 ± 1), con respecto al día 14 de la segunda gestación para el grupo lactante (13.5 ± 1.4) (Fig. 33).

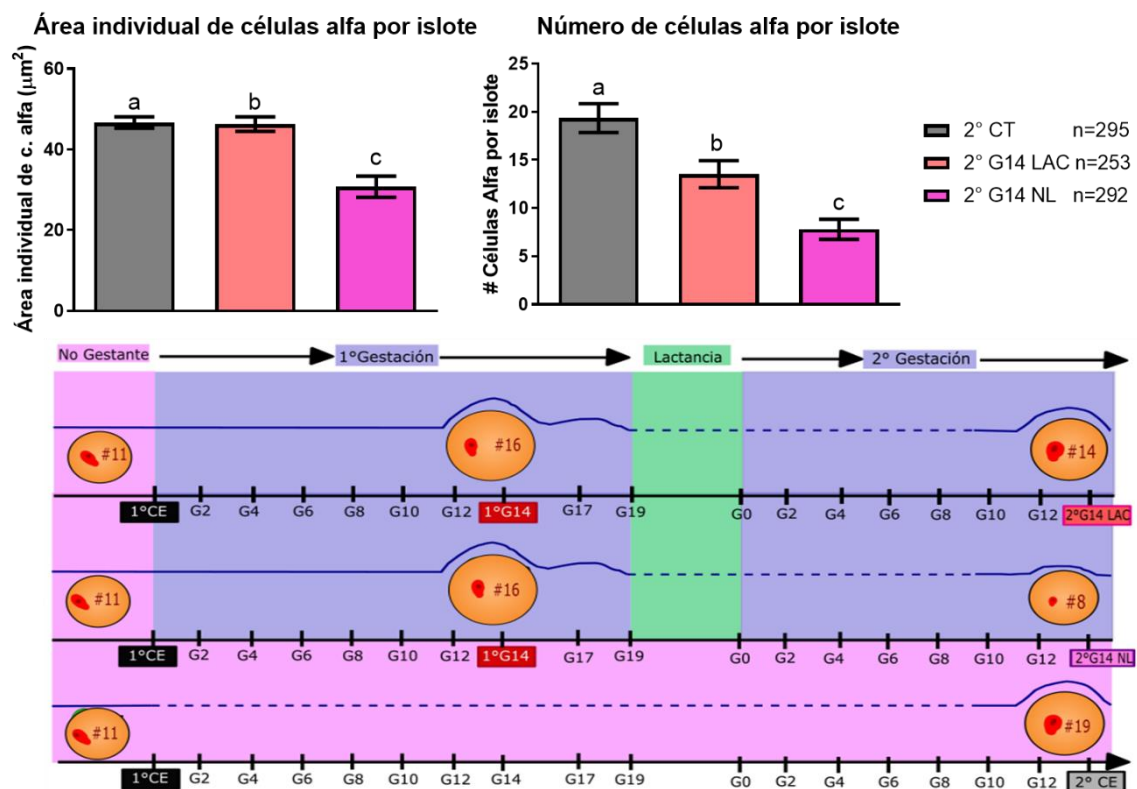


Figura 33. El área individual y el número de células- α disminuyen en ausencia de lactancia. El número de células- α disminuye aproximadamente un 42% en el día 14 de la segunda gestación en ausencia de lactancia, con respecto al grupo lactante. Similarmente, el tamaño individual de las células- α se reduce un 33% en ausencia de lactancia. Los datos representan la media \pm SEM. N=4 ratones por grupo. * $p < 0.05$

7.4 Anexo: Cuadros de resultados estadísticos.

*Sección 7.1: Cambios morfológicos de los islotes pancreáticos maternos durante la primera gestación

• 7.1.a Área total del islote pancreático en la primera gestación

Área total del islote pancreático en la primera gestación			
Column B	1° G14	1° G17	1° G17
vs.	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	1° CT	1° G14
Mann Whitney test			
P value	<0,0001	0,3379	<0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate
P value summary	****	ns	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	No	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	119280 , 151200	145717 , 186804	166696 , 169914
Mann-Whitney U	52485	78922	68439
Difference between medians			
Median of column A	3240, n=365	3240, n=365	5590, n=370
Median of column B	5590, n=370	3193, n=450	3193, n=450
Difference: Actual	2350	-46,3	-2397
Difference: Hodges-Lehmann	1403	163,2	-1081

• 7.1.c Cambios en la composición celular del islote pancreático durante la primera gestación:

Cuantificación del número de las células-β.

Cuantificación del número de las células-β.			
Column B	1° G14	1° G17	1° G17
vs.	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	1° CT	1° G14
Mann Whitney test			
P value	<0,0001	0,0799	<0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate
P value summary	****	ns	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	No	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	78057 , 138096	100969 , 170985	168649 , 167962
Mann-Whitney U	36729	59641	66487
Difference between medians			
Median of column A	22,00, n=287	22,00, n=287	43,00, n=370
Median of column B	43,00, n=370	28,00, n=450	28,00, n=450
Difference: Actual	21	6	-15
Difference: Hodges-Lehmann	15	3	-10

Cuantificación del tamaño individual de las células-β.

Cuantificación del tamaño individual de las células-β.			
Column B	1° G14	1° G17	1° G17
vs.	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	1° CT	1° G14
Mann Whitney test			
P value	<0,0001	<0,0001	0,908
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate
P value summary	****	****	ns
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Yes	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	71007 , 145146	78395 , 193558	152276 , 184335
Mann-Whitney U	29679	37067	82860
Difference between medians			
Median of column A	84,16, n=287	84,16, n=287	103,9, n=370
Median of column B	103,9, n=370	107,5, n=450	107,5, n=450
Difference: Actual	19,78	23,34	3,561
Difference: Hodges-Lehmann	23,26	23,73	-0,2913

- **7.1.d Cambios en la composición celular del islote pancreático durante la primera gestación:**

Cuantificación del número de las células-α.

Cuantificación del número de las células-α			
Column B	1° G14	1° G17	1° G17
vs.	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	1° CT	1° G14
Mann Whitney test			
P value	0,1927	0,6754	0,4202
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate
P value summary	ns	ns	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	91290 , 124864	104727 , 167227	154595 , 182015
Mann-Whitney U	49962	63399	80540
Difference between medians			
Median of column A	5,000, n=287	5,000, n=287	7,000, n=370
Median of column B	7,000, n=370	6,000, n=450	6,000, n=450
Difference: Actual	2	1	-1
Difference: Hodges-Lehmann	1	0	0

Cuantificación del tamaño individual de las células- α .

Cuantificación del tamaño individual de las células- α			
Column B	1° G14	1° G17	1° G17
vs.	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	1° CT	1° G14
Mann Whitney test			
P value	0,5645	0,0057	0,0022
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate
P value summary	ns	**	**
Significantly different (P < 0.05)?	No	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	92755 , 122086	113364 , 157117	160562 , 172774
Mann-Whitney U	51427	56541	72198
Difference between medians			
Median of column A	52,40, n=287	52,40, n=287	54,78, n=368
Median of column B	54,78, n=368	47,47, n=448	47,47, n=448
Difference: Actual	2,377	-4,935	-7,312
Difference: Hodges-Lehmann	0	-4,243	-4,664

- 7.1.e Efecto de la primera gestación en la tolerancia a la glucosa

Área bajo la curva de glucosa			
Column B	1° G14	1° G17	1° G17
vs.	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	1° CT	1° G14
Unpaired t test			
P value	0,1589	<0,0001	0,0813
P value summary	ns	****	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No	Yes	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=1,449, df=27	t=5,189, df=28	t=1,806, df=29
How big is the difference?			
Mean of column A	16273	16273	19478
Mean of column B	19478	23584	23584
Difference between means (B - A)	3205 \pm 2212	7311 \pm 1409	4106 \pm 2274
95% confidence interval	-1334 to 7744	4425 to 10197	-543,9 to 8757
R squared (eta squared)	0,07212	0,4902	0,1011
F test to compare variances			
F, DFn, Dfd	7,489, 14, 13	2,542, 15, 13	2,947, 14, 15
P value	0,0008	0,0988	0,0462
P value summary	***	ns	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	No	Yes

- 7.1.f Curva de tolerancia a la insulina durante la primera gestación

Área bajo la curva de insulina			
Column B	1° G14	1° G17	1° G17
vs.	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	1° CT	1° G14
Unpaired t test			
P value	0,343	0,003	0,2393
P value summary	ns	**	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No	Yes	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=0,9910, df=11	t=3,709, df=12	t=1,260, df=9
How big is the difference?			
Mean of column A	4192	4192	3639
Mean of column B	3639	2925	2925
Difference between means (B - A) ± SEM	-552,8 ± 557,8	-1267 ± 341,5	-714,0 ± 566,5
95% confidence interval	-1780 to 674,9	-2011 to -522,7	-1996 to 567,6
R squared (eta squared)	0,08196	0,5341	0,15
F test to compare variances			
F, DFn, Dfd	3,197, 4, 7	2,480, 7, 5	7,928, 4, 5
P value	0,1718	0,3345	0,0433
P value summary	ns	ns	*
Significantly different (P < 0.05)?	No	No	Yes

***Sección 7.2: Comparación de los cambios morfológicos de los islotes pancreáticos maternos entre la primera y la segunda gestación cuando existió proceso de lactancia**

- 7.2.a Comparación del área total del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió proceso de lactancia

Comparación del área total del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió proceso de lactancia				
Column C	2° CT	2° CT	1° G14	2° CT
vs.	vs,	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	2° G14	2° G14	1° G14
Mann Whitney test				
P value	0,0048	0,4432	0,004	0,0372
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate	Approximate
P value summary	**	ns	**	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	No	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	113768 , 104362	82395 , 68031	121798 , 72579	128340 , 93105
Mann-Whitney U	46973	35900	40448	49445
Difference between medians				
Median of column A	3240, n=365	4220, n=295	5590, n=370	5590, n=370
Median of column C	4220, n=295	3581, n=253	3581, n=253	4220, n=295
Difference: Actual	980,3	-639,1	-2009	-1370
Difference: Hodges-Lehmann	719,2	-208,5	-816,2	-629,4

- 7.2.b Comparación del área positiva a insulina entre la primera y la segunda gestación cuando existió proceso de lactancia

Comparación del área positiva a insulina entre la primera y la segunda gestación cuando existió proceso de lactancia				
Column C	2° CT	2° CT	1° G14	2° CT
vs.	vs,	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	2° G14	2° G14	1° G14
Mann Whitney test				
P value	0,0008	<0,0001	0,4015	<0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate	Approximate
P value summary	***	****	ns	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Yes	No	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	106430 , 87946	57197 , 72089	106446 , 73254	119522 , 65006
Mann-Whitney U	39635	23786	41879	31595
Difference between medians				
Median of column A	86,47, n=365	89,12, n=258	94,05, n=349	94,05, n=349
Median of column C	89,12, n=258	92,90, n=250	92,90, n=250	89,12, n=258
Difference: Actual	2,652	3,775	-1,154	-4,928
Difference: Hodges-Lehmann	2,805	3,937	-0,02581	-4,49

- 7.2.c Comparación de la composición celular del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió el proceso de lactancia

Cuantificación del número de las células-β

Comparación de la composición celular del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió el proceso de lactancia: Cuantificación del número de las células-β				
Column C	2° CT	2° CT	1° G14	2° CT
vs.	vs,	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	2° G14	2° G14	1° G14
Mann Whitney test				
P value	<0,0001	0,7044	0,1358	0,2338
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate	Approximate
P value summary	****	ns	ns	ns
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	No	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	73026 , 96628	81679 , 68747	118731 , 75645	126141 , 95305
Mann-Whitney U	31698	36616	43514	51645
Difference between medians				
Median of column A	22,00, n=287	40,00, n=295	43,00, n=370	43,00, n=370
Median of column C	40,00, n=295	36,00, n=253	36,00, n=253	40,00, n=295
Difference: Actual	18	-4	-7	-3
Difference: Hodges-Lehmann	12	-1	-4	-3

Cuantificación del tamaño individual de las células-β

Comparación de la composición celular del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió el proceso de lactancia: Cuantificación del tamaño individual de las células-β				
Column C	2° CT	2° CT	1° G14	2° CT
vs.	vs,	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	2° G14	2° G14	1° G14
Mann Whitney test				
P value	<0,0001	0,3702	<0,0001	<0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate	Approximate
P value summary	****	ns	****	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	No	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	74800 , 94853	82634 , 67792	130778 , 63598	139147 , 82298
Mann-Whitney U	33472	35661	31467	38638
Difference between medians				
Median of column A	84,16, n=287	92,23, n=295	103,9, n=370	103,9, n=370
Median of column C	92,23, n=295	89,29, n=253	89,29, n=253	92,23, n=295
Difference: Actual	8,067	-2,939	-14,65	-11,71
Difference: Hodges-Lehmann	8,059	-1,637	-16,25	-15,12

- 7.2.d Comparación en la composición celular del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió el proceso de lactancia Cambios en la segunda gestación cuando existió un proceso de lactancia:

Cuantificación del número de las células-α

Comparación de la composición celular del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió el proceso de lactancia: Cuantificación del número de las células-α				
Column C	2° CT	2° CT	1° G14	2° CT
vs.	vs,	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	2° G14	2° G14	1° G14
Mann Whitney test				
P value	<0,0001	0,0003	0,1971	0,0119
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate	Approximate
P value summary	****	***	ns	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Yes	No	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	75586 , 94067	87675 , 62751	118274 , 76102	117037 , 104408
Mann-Whitney U	34258	30620	43971	48402
Difference between medians				
Median of column A	5,000, n=287	9,000, n=295	7,000, n=370	7,000, n=370
Median of column C	9,000, n=295	6,000, n=253	6,000, n=253	9,000, n=295
Difference: Actual	4	-3	-1	2
Difference: Hodges-Lehmann	3	-3	0	2

Cuantificación del tamaño individual de las células- α

Comparación de la composición celular del islote pancreático entre la primera y la segunda gestación cuando existió el proceso de lactancia: Cuantificación del área individual de las células-α				
Column C	2° CT	2° CT	1° G14	2° CT
vs.	vs,	vs,	vs,	vs,
Column A	1° CT	2° G14	2° G14	1° G14
Mann Whitney test				
P value	0,1117	0,2708	0,2912	0,0271
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate	Approximate	Approximate
P value summary	ns	ns	ns	*
Significantly different (P < 0.05)?	No	No	No	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	86883 , 82771	78948 , 71479	116758 , 76373	127581 , 92536
Mann-Whitney U	39111	35288	44242	48876
Difference between medians				
Median of column A	52,40, n=287	50,88, n=295	54,78, n=368	54,78, n=368
Median of column C	50,88, n=295	53,78, n=253	53,78, n=253	50,88, n=295
Difference: Actual	-1,528	2,908	-0,9967	-3,905
Difference: Hodges-Lehmann	-1,936	0,9632	-0,4322	-3,051

***Sección 7.3: Efecto de la lactancia en los cambios morfológicos de los islotes pancreáticos en el día 14 de la segunda gestación: Comparación de la segunda gestación entre el grupo en el que si existió lactancia vs. el no lactante**

- 7.3.a Comparación del aumento en el tamaño del islote pancreático materno durante la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia**

Comparación del aumento en el tamaño del islote pancreático materno durante la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia		
Column C	2° CT	2° G14-LAC
vs.	vs,	vs,
Column A	2° G14-NL	2° G14-NL
Mann Whitney test		
P value	0,0001	0,0026
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate
P value summary	***	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	94810 , 78357	74726 , 74605
Mann-Whitney U	35286	31534
Difference between medians		
Median of column A	4220, n=295	3581, n=253
Median of column C	2274, n=293	2274, n=293
Difference: Actual	-1946	-1307
Difference: Hodges-Lehmann	-1026	-565,7

- **7.3.b Comparación del número de células- β y de su tamaño individual durante el día 14 la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia**

Cuantificación del número de las células- β

Comparación del número de células-β y de su tamaño individual durante el día 14 la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia: Cuantificación del número de las células-β		
Column C	2° CT	2° G14-LAC
vs.	vs,	vs,
Column A	2° G14-NL	2° G14-NL
Mann Whitney test		
P value	0,0006	0,0051
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate
P value summary	***	**
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	93747 , 78831	74198 , 74587
Mann-Whitney U	36053	31809
Difference between medians		
Median of column A	40,00, n=295	36,00, n=253
Median of column C	22,50, n=292	22,50, n=292
Difference: Actual	-17,5	-13,5
Difference: Hodges-Lehmann	-8	-6

Cuantificación del tamaño individual de las células- β

Comparación del número de células-β y de su tamaño individual durante el día 14 la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia: Cuantificación del tamaño individual de las células-β		
Column C	2° CT	2° G14-LAC
vs.	vs,	vs,
Column A	2° G14-NL	2° G14-NL
Mann Whitney test		
P value	0,437	0,7569
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate
P value summary	ns	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	88479 , 84687	68626 , 80705
Mann-Whitney U	41616	36495
Difference between medians		
Median of column A	92,23, n=295	89,29, n=253
Median of column C	90,28, n=293	90,28, n=293
Difference: Actual	-1,95	0,9891
Difference: Hodges-Lehmann	-1,37	0,5607

- **7.3.c Comparación del número de células- α y de su área individual durante el día 14 de la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia**

Cuantificación del número de las células- α

Comparación del número de células-β y de su tamaño individual durante el día 14 la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia: Cuantificación del número de las células-α		
Column C	2° CT	2° G14-LAC
vs.	vs,	vs,
Column A	2° G14-NL	2° G14-NL
Mann Whitney test		
P value	<0,0001	<0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate
P value summary	****	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	103995 , 67997	78004 , 70236
Mann-Whitney U	25511	27750
Difference between medians		
Median of column A	9,000, n=295	6,000, n=253
Median of column C	2,000, n=291	2,000, n=291
Difference: Actual	-7	-4
Difference: Hodges-Lehmann	-6	-2

Cuantificación del tamaño individual de las células- α

Comparación del número de células-β y de su tamaño individual durante el día 14 la segunda gestación con y sin un proceso de lactancia: Cuantificación del tamaño individual de las células-α		
Column C	2° CT	2° G14-LAC
vs.	vs,	vs,
Column A	2° G14-NL	2° G14-NL
Mann Whitney test		
P value	<0,0001	<0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate	Approximate
P value summary	****	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column A,C	95226 , 67509	83046 , 66285
Mann-Whitney U	24438	23214
Difference between medians		
Median of column A	50,86, n=277	53,78, n=253
Median of column C	28,77, n=293	28,77, n=293
Difference: Actual	-22,09	-25,02
Difference: Hodges-Lehmann	-19,85	-18,67

8. DISCUSIÓN

El islote pancreático modifica su masa y su capacidad secretora en respuesta a las demandas metabólicas. La gestación es un evento fisiológico que aumenta los requerimientos de insulina a nivel sistémico, lo cual representa un reto metabólico. Durante la gestación, la madre modifica sus islotes pancreáticos aumentando la masa de las células-beta y la secreción de insulina. Existen estudios en humanos, que asocian el número de eventos de gestación con el riesgo de desarrollar diabetes tipo-2 y otros tipos de trastornos metabólicos (Almahmeed et al., 2017; Cure et al., 2015; Fowler-Brown et al., 2010; Guan et al., 2014; Guo et al., 2017; Kharazmi et al., 2012; P. Li et al., 2016a, 2016b; Luis & Nation, 2001), empero los resultados presentan controversia y es difícil discernir, ya que el estilo de vida y condiciones socioeconómicas podrían intervenir también en esta asociación. Por otro lado, existen estudios demostrando que la lactancia produce efectos benéficos en diversos tejidos maternos (Jane et al., 1993; Janney et al. 1997). Este proyecto de tesis tuvo como objetivo estudiar los cambios morfológicos en los islotes pancreáticos maternos durante la primera y segunda gestación en un modelo de roedores de la cepa C57BL/6, en el que se analizaron 2 factores variables: 1) número de gestaciones y 2) presencia o ausencia de lactancia; esto con el fin de determinar si la plasticidad morfológica en la segunda gestación se modifica en ausencia o presencia de lactancia.

Efecto de la primera gestación en la morfología del islote pancreático y la homeostasis de glucosa

Primeramente, evaluamos el efecto de la primera gestación en el área total del islote pancreático, encontrando que aumenta aproximadamente dos veces en el día 14 de gestación en comparación con el control edad no gestante. Este incremento va aparejado con un incremento en el tamaño y número individual de las células- β y $-\alpha$. Estos resultados son similares a los resultados previamente reportados en estudios anteriores (Rieck et al., 2013; Rieck et al., 2009; Sorenson et al., 1997b) que describen que el pico máximo de tamaño en la masa de la célula- β se presenta en los días 14-15. De igual manera, el aumento observado en el número de células- β en el día 14 de nuestro estudio, es acorde

con un estudio (Rieck et al., 2009) que describe un incremento en de los marcadores de proliferación BrdU y a Ki67 y un mayor nivel de expresión de las ciclinas A2, B1,B2,D3,E1,F y Cdk4 en las células- β de ratón de la cepa C57BL/6 durante el día 14.5 de gestación. Este mismo estudio (Rieck et al., 2009) reporta, mediante la misma tecnología de análisis morfométrico que nosotros utilizamos, que en el día 14.5 de gestación se presenta un aumento de 3 veces en el tamaño individual de las células- β , sin embargo, nosotros observamos un aumento del 40%. Esta diferencia en la magnitud de cambio puede deberse a que en el estudio de Sebastian Rieck et al. 2009, se analizan únicamente 20 islotes por páncreas, mientras que el número de islotes que nosotros analizamos fue más de diez veces mayor (al menos 250 islotes por páncreas), lo cual representa un muestreo mayor de los islotes encontrados.

En este estudio también se analizó la etapa tardía de la gestación, el día 17 de ésta y se encontró, que comparados con los datos del día 14, una disminución en el área total del islote pancreático, el área positiva a insulina y número de las células- β , pero sin cambios en el tamaño individual de la célula- β , lo cual sugiere que la disminución de los parámetros antes mencionados podría ser resultado de un aumento en la apoptosis de las células- β y/o una reducción en la tasa proliferativa. Estos mecanismos celulares canónicos se han descrito como los causantes de reducir la masa de las células- β , en la etapa del posparto (día 4 y 10 días después del alumbramiento (Smith et al., 2017) revirtiendo los efectos gestacionales en el islote pancreático.

De manera interesante, se encontró que el tamaño de las células- α se modifica únicamente en el día 17 de gestación, pero no al día 14, sugiriendo que existe una señal que aparece después del día 14 que afecta el tamaño de las células- α , más no a las células- β . Teorizamos que es posible que esta señal sea el Lactógeno Placentario-2, debido a que el patrón de las concentraciones séricas de esta hormona aumenta en la gestación tardía y se mantiene aún con niveles bajos en el día 14 de gestación (Soares et al., 2004).

Relación entre las características morfométricas del islote pancreático materno y sus componentes con la tolerancia a la glucosa e insulina en los días 14 y 17 de la primera gestación

De manera interesante, se encontró que en el día 14 de gestación, no existe correlación directa entre cambios en la sensibilidad a la insulina y el incremento de la morfometría del islote en los parámetros de: área total del islote, área positiva a insulina, número y tamaño de las células- β .

En contraste, el día 17 de gestación disminuye la tolerancia a la insulina concomitantemente con una disminución del tamaño del islote pancreático. Una menor tolerancia a la insulina se ha encontrado en otros estudios en diversas especies de mamíferos (Catalano et al., 2017; Connolly et al., 2007; George et al., 2011; Leturque et al., 1980; Petterson et al., 2018; Ryan et al., 1985), al igual que en estudios previos en nuestro laboratorio (Sánchez-Ramírez E. et. al, Tesis de Maestría) que muestran que después de 30 minutos de la aplicación de 1 UI/Kg de insulina se produce una reducción del 20% en la sensibilidad a la insulina al día 17 de gestación en comparación con el control no gestante. También, coincide con otros estudios recientes en el día 16 de gestación, los cuales encuentran una disminución en la sensibilidad a la insulina medidas tanto por curvas de tolerancia a la insulina (0.75 UI/kg)(Bowe et al., 2014) y por estudios de pinza hiperinsulinémica-euglicémica (Musial et al., 2016).

Resulta interesante señalar que al día 17 de gestación, las disminuciones en la tolerancia a la glucosa y en la sensibilidad a la insulina se presentan concomitantemente con la reducción en el tamaño del islote pancreático y en el número de células- β aunado al aumento en el tamaño de células- α . Este conjunto de características celulares del islote ha sido reportado previamente en ratas, para los islotes pequeños que presentan menor densidad de células- β (número de células/103 μm^2) (Huang et al., 2011) y mayor área positiva a glucagon (Lau et al., 2016) en comparación con los islotes grandes. Diversos estudios que han relacionado las diferencias en el área total del islote con su capacidad secretora de insulina, muestran que los islotes pequeños tienen una capacidad secretora de insulina más alta que los islotes grandes (Farhat et al., 2013; H.-H. & L., 2015; Huang et al., 2011). Especulamos que los islotes más pequeños observados en este trabajo al día 17 de gestación podrían tener una

mejor capacidad secretora de insulina como una medida de compensación contra aumento en la resistencia de insulina de la gestación tardía.

Comparación de la morfología del islote pancreático entre el día 14 de la primera gestación y el día 14 de la segunda gestación

No se conocen estudios que analicen la existencia de cambios morfológicos del islote entre la primera y segunda gestación. En este trabajo por primera vez se documentan estos efectos. Los datos revelaron que los aumentos producidos en la primera gestación sobre el área total del islote, el número y tamaño individual de las células- β , no se presentan en la segunda gestación (en presencia de lactancia), y que estos parámetros en la segunda gestación son similares a los presentados en los ratones control pareados por edad; de lo que se concluye que la morfología del islote únicamente se modifica en la primera gestación. Sería importante analizar la función secretora de las células- β entre las dos gestaciones, ya que podría ser que estos islotes presentasen mejor capacidad secretora de la insulina en la segunda gestación. Será importante que en estudios futuros se analice esta posibilidad.

Cabe señalar que el único parámetro afectado por el segundo evento gestacional en presencia de lactancia, que no está dado por la edad, es el número de células- α , debido a que disminuye en comparación con el segundo control edad. De manera interesante, el número de células- α se mantiene constante durante los días 14 y 17 de la primera gestación y el día 14 de la segunda gestación, lo cual, sugiere que existe una señal que se presenta tanto en la primera como en la segunda gestación que conserva el número de células- α , más no el de las células- β .

Efecto de la lactancia en la morfología del islote pancreático materno durante la segunda gestación

Al estudiar si la lactancia del primer episodio gestante tiene efecto sobre los cambios morfológicos del islote durante la segunda gestación, se observó que los animales que amamantaron a sus crías poseen islotes con mayor tamaño, mayor tamaño de células- β y células- α y más número de células- β , que los

ratones que no pasaron por el evento de lactancia, lo que indica el amamantamiento tiene un efecto positivo de estos parámetros. Este hallazgo es importante debido a que a nivel mundial la práctica de la lactancia ha disminuido significativamente en las últimas dos décadas, de modo que las tasas de lactancia materna exclusiva entre niños menores de 6 meses son muy inferiores al 50 por ciento en la mayoría de los países. Este estudio sienta bases científicas de los efectos benéficos de la lactancia para hacer frente a embarazos futuros. Sin embargo, como hemos señalado anteriormente, no se puede descartar que los islotes pequeños presenten una mejor capacidad secretora de insulina. Serán necesarios estudios futuros para comprobar esta posibilidad.

9. CONCLUSIÓN

En este trabajo se describió por primera vez la dinámica de cambios presente en la primera y segunda gestación en presencia o ausencia de lactancia. Se concluye que el tamaño del islote, área positiva a insulina y número de células- β aumenta 2 veces en la gestación media y disminuye hacia el final de la primera gestación. De manera interesante, se demostró el aumento progresivo en la intolerancia a la glucosa e intolerancia a la insulina en el día 17 de gestación, equivalente a la gestación tardía.

Se observó también que, en el día 14 de la segunda gestación el tamaño del islote disminuye con respecto al día 14 de la primera gestación, sin embargo el porcentaje de área positiva a insulina ni el tamaño de células- β entre estos dos grupos cambia, pero sí hay un aumento en el número de células- β indicando una mayor densidad de células- β (ya que en la segunda gestación el islote es más pequeño que en la primera gestación) lo cual, de acuerdo con estudios previos, podría indicar una mejor capacidad secretora de insulina para contender con una mayor o más eficiente compensación de un segundo evento de demanda a la insulina progresiva y prolongada.

Se reveló también, por primera vez que la lactancia favorece las adaptaciones morfológicas en el día 14 del segundo evento gestacional, debido a que el aumento en el tamaño del islote pancreático y en el número de células- β en el día 14 de la segunda gestación son dependientes de la lactancia.

Este estudio tiene la limitante de desconocer las consecuencias funcionales de la dinámica de cambios observada en el día 14 de la segunda gestación, por lo que es de crucial importancia realizar experimentos futuros como curvas de tolerancia a la insulina y glucosa, cuantificación de insulina en suero mediante ELISA, secreción de insulina in vitro para desentrañar la fisiología de las gestaciones repetidas con el objetivo final de entender las adaptaciones de la gestación y las patologías asociadas a ella, como la diabetes gestacional o el desarrollo después del parto de diabetes mellitus tipo 2.

11. REFERENCIAS

- Aizawa, T., Kaneko, T., Yamauchi, K., Yajima, H., Nishizawa, T., Yada, T., ... Hashizume, K. (2001). Size-related and size-unrelated functional heterogeneity among pancreatic islets. *Life Sciences*, *69*(22), 2627–2639. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01332-7](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01332-7)
- Amaral, M. E. C., Cunha, D. A., Anhô, G. F., Ueno, M., Carneiro, E. M., Velloso, L. A., ... Boschero, A. C. (2004). *Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy*. 469–476. <https://doi.org/10.1677/joe.1.05547>
- Asplund, K., Westman, S., & Hellersteöm, C. (1969). Glucose stimulation of insulin secretion from the isolated pancreas of foetal and newborn rats. *Diabetologia*, *5*(4), 260–262. <https://doi.org/10.1007/BF01212095>
- Auffret, J., Viengchareun, S., Carré, N., Denis, R. G. P., Magnan, C., Marie, P., ... Inserm, U. (2019). *Beige differentiation of adipose depots in mice lacking prolactin receptor protects against high-fat-diet- induced obesity*. <https://doi.org/10.1096/fj.12-204958>
- Baetens, D., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., & Orci, L. (1979). Endocrine pancreas: Three-dimensional reconstruction shows two types of islets of Langerhans. *Science*, *206*(4424), 1323–1325. <https://doi.org/10.1126/science.390711>
- Baeyens, L., Hindi, S., Sorenson, R. L., & German, M. S. (2016). β -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *18*(Suppl 1), 63–70.

<https://doi.org/10.1111/dom.12716>

Bakhti, M., Böttcher, A., & Lickert, H. (2018). Modelling the endocrine pancreas in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*.

<https://doi.org/10.1038/s41574-018-0132-z>

Banerjee, R. R., Cyphert, H. A., Walker, E. M., Chakravarthy, H., Peiris, H., Gu, X., ... Goodrich, L. (2016). *Gestational Diabetes Mellitus From Inactivation of Prolactin Receptor and MafB in Islet β -Cells*. 65(August), 2331–2341.

<https://doi.org/10.2337/db15-1527>

Barbour, L. A., McCurdy, C. E., Hernandez, T. L., Kirwan, J. P., Catalano, P. M., & Friedman, J. E. (2007). Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care*, 30(SUPPL. 2).

<https://doi.org/10.2337/dc07-s202>

Ben-jonathan, N., Hugo, E. R., Brandebourg, T. D., & Lapensee, C. R. (2006). *Focus on prolactin as a metabolic hormone*. 17(3).

<https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.02.005>

Berger, M., Scheel, D. W., Macias, H., Miyatsuka, T., Kim, H., Hoang, P., ... German, M. S. (2015). $G\alpha_{i/o}$ -coupled receptor signaling restricts pancreatic β -cell expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(9), 2888–2893.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1319378112>

Binart, N. (2016). Prolactin and pregnancy in mice and humans. *Annales d'Endocrinologie*, 77(2), 126–127. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.008>

Bonner-Weir, S., & Like, A. A. (1980). A dual population of islets of Langerhans in bovine pancreas. *Cell and Tissue Research*, 206(1), 157–170.

<https://doi.org/10.1007/BF00233616>

Boron W. F., Boulpaep E. L., *Medical Physiology: A cellular and molecular approach*, 2nd Edition, 2014.

Brelje, T. C., Scharp, D. W., Lacy, P. E., Talamantes, F., & Robertson, M. a Y. (1993). Effect of Homologous Placental Islets : Implication for Placental Function

Pregnancy *. *Endocrinology*, 132(2), 879–887.

Brissova, M., Fowler, M. J., Nicholson, W. E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D. M., & Powers, A. C. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 53(9), 1087–1097. <https://doi.org/10.1369/jhc.5C6684.2005>

Bromati, C. R., Lellis-Santos, C., Yamanaka, T. S., Nogueira, T. C. A., 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. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00169.2010>

Burton, G. J., Hempstock, J., & Jauniaux, E. (2001). NUTRITION, GENETICS AND PLACENTAL DEVELOPMENT Nutrition of the Human Fetus during the First Trimester—A Review. *Placenta*, 22(15), 70–76. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0639>

Butler, A. E., Cao-Minh, L., R. Galasso, Rizza, R. A., Corradin, A., Cobelli, C., & Butler, P. C. (2010). Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia*, 53(10), 2167–2176. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1809-6>

Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P.-O., & Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2334–2339. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510790103>

Catalano, P. M., Tyzbir, E. D., Wolfe, R. R., Calles, J., Roman, N. M., Amini, S. B., & Sims, E. A. (2017). Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 264(1), E60–E67. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.264.1.e60>

- Catalano, Patrick M., Huston, L., Amini, S. B., & Kalhan, S. C. (1999). Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *180*(4), 903–916. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(99\)70662-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(99)70662-9)
- Catalano, Patrick M., Kirwan, J. P., Haugel-de Mouzon, S., & King, J. (2018). Gestational Diabetes and Insulin Resistance: Role in Short- and Long-Term Implications for Mother and Fetus. *The Journal of Nutrition*, *133*(5), 1674S-1683S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1674s>
- Charron, M. J., Xing, A. Y., Challier, J. C., Lepercq, J., Cau, M., Girard, J., & Mouzon, S. H. (1998). *Unexpected Expression of Glucose Transporter 4 in Villous Stromal Cells of Human Placenta* *. *83*(11), 4097–4101.
- Cho S., Oyer E. P. Peterson J.D., Steiner D. F., Studies on human proinsulin, *The Journal of Biological chemistry*, Vol. 246. No. 5, 1971.
- Costrini, N. V., & Kalkhoff, R. K. (1971). Relative effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion. *The Journal of Clinical Investigation*, *50*(5), 992–999. <https://doi.org/10.1172/JCI106593>
- Drynda, R., Peters, C. J., Jones, P. M., & Bowe, J. E. (2015). The role of non-placental signals in the adaptation of islets to pregnancy. *Hormone and Metabolic Research*, *47*(1), 64–71. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1395691>
- Eberhard, D., & Lammert, E. (2009). The pancreatic β -cell in the islet and organ community. *Current Opinion in Genetics and Development*, *19*(5), 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.07.003>
- Egea P. F. Stroud R. M. Walter P., Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle, *Current Opinion in Structural Biology* 2005, *15*:213–220.
- Farhat, B., Almelkar, A., Ramachandran, K., Williams, S. J., Huang, H. H., Zamierowski, D., ... Stehno-Bittel, L. (2013). Small human islets comprised of more β -cells with higher insulin content than large islets. *Islets*, *5*(2), 87–94.

<https://doi.org/10.4161/isl.24780>

Farrell, C. L., Yang, J., & Pardridge, W. M. (1992). GLUT-1 glucose transporter is present within apical and basolateral membranes of brain epithelial interfaces and in microvascular endothelia with and without tight junctions. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *40*(2), 193–199.

<https://doi.org/10.1177/40.2.1552163>

Freemark, M., Avril, I., Fleenor, D. O. N., Driscoll, P., Petro, A. N. N., Opara, E., ... Kelly, P. A. (2002). *Targeted Deletion of the PRL Receptor : Effects on Islet Development , Insulin Production , and Glucose Tolerance*. *143*(4), 1378–1385.

Freemark, M., Pediatrics, D., Biology, C., & Endocrinology, P. (2001). *Prolactin Induction of Insulin Gene Transcription : Roles of Glucose and Signal Transducer and Activator of Transcription 5 **. *142*(7), 2805–2810.

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

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22974359><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3934755>

Gallo, L. A., Barrett, H. L., & Dekker Nitert, M. (2017). Review: Placental transport and metabolism of energy substrates in maternal obesity and diabetes. *Placenta*, *54*, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.006>

Georgia, S., & Bhushan, A. (2004). B Cell Replication Is the Primary Mechanism for Maintaining Postnatal B Cell Mass. *Journal of Clinical Investigation*, *114*(7), 963–968. <https://doi.org/10.1172/JCI22098>

Goyvaerts, L., Lemaire, K., Arijs, I., Auffret, J., Granvik, M., Van Lommel, L., ... Schraenen, A. (2015). Prolactin receptors and placental lactogen drive male mouse pancreatic islets to pregnancy-related mRNA changes. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121868>

Group, C., Factors, H., & Cancer, B. (2002). *Breast cancer and breastfeeding : collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30*

countries , including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. 360, 187–195.

Gunderson, E. P. (2015). *NIH Public Access. 14(2), 1–16.*

<https://doi.org/10.1007/s11892-013-0460-2>.Impact

Gunderson, E. P., Jr, D. R. J., Chiang, V., Lewis, C. E., Feng, J., Jr, C. P. Q., & Sidney, S. (2010). *Syndrome in Women of Reproductive Age According to Gestational Diabetes Mellitus Status : A 20-Year Prospective Study in CARDIA (Coronary Artery Risk Development in Young Adults). 59(February), 495–504.*

<https://doi.org/10.2337/db09-1197>.

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), 729–738.*

<https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000252831.06695.03>

Guz, Y., Nasir, I., & Teitelman, G. (2014). *Guz, Nasir, Teitelman_Regeneration of Pancreatic β Cells from Intra-Islet Precursor Cells in an Experimental Model of Diabetes_2001.pdf. 142(April), 4956–4968.*

H.-H., H., & L., S.-B. (2015). Differences in insulin biosynthesis pathway between small and large islets do not correspond to insulin secretion. *Islets, 7(5), 1–8.*

<https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1129097>

Hagedorn, A. (1993). *ANNETTE Hagedorn. 133(3).*

Hiriart, Marcia, Aguilar-Bryan, Lydia, Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic β -cell, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E1298–E1306, 2008.

Holme, A. M., Roland, M. C. P., Lorentzen, B., Michelsen, T. M., & Henriksen, T. (2015). Placental glucose transfer: A human in vivo study. *PLoS ONE, 10(2), 1–11.*

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117084>

Huang, H. H., Novikova, L., Williams, S. J., Smirnova, I. V., & Stehno-Bittel, L. (2011). Low insulin content of large islet population is present in situ and in isolated islets.

Islets, 3(1), 6–13. <https://doi.org/10.4161/isl.3.1.14132>

- Illsley, N. P. (2002). CURRENT TOPIC: Glucose Transporters in the Human Placenta. *Placenta*, 21(1), 14–22. <https://doi.org/10.1053/plac.1999.0448>
- Johansson, M., Mattsson, G., Andersson, A., Jansson, L., & Carlsson, P. O. (2006). Islet endothelial cells and pancreatic β -cell proliferation: Studies in vitro and during pregnancy in adult rats. *Endocrinology*, 147(5), 2315–2324. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0997>
- Jones, C. J. P., & Desoye, G. (1993). Glycogen distribution in the capillaries of the placental villus in normal, overt and gestational diabetic pregnancy. *Placenta*, 14(5), 505–517. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(05\)80204-8](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(05)80204-8)
- Jørgensen, M. C., Ahnfelt-Rønne, J., Hald, J., Madsen, O. D., Serup, P., & Hecksher-Sørensen, J. (2007). An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocrine Reviews*, 28(6), 685–705. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0016>
- KAIHOH, T., MASUDA, T., SASANO, N., & TAKAHASHI, T. (2008). The size and number of Langerhans islets correlated with their endocrine function: A morphometry on immunostained serial sections of adult human pancreases. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 149(1), 1–10. <https://doi.org/10.1620/tjem.149.1>
- Kalhan, S., & Parimi, P. (2000). Gluconeogenesis in the fetus and neonate. *Seminars in Perinatology*, 24(2), 94–106. <https://doi.org/10.1053/sp.2000.6360>
- Kar, Sandip, Ray, Deb Shankar, Sustained simultaneous glycolytic and insulin oscillations in β -cells, *Journal of Theoretical Biology*, Vol. 237, 58-66, 2005.
- Kawai, M., & Kishi, K. (1999). Adaptation of pancreatic islet B-cells during the last third of pregnancy: Regulation of B-cell function and proliferation by lactogenic hormones in rats. *European Journal of Endocrinology*, 141(4), 419–425. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1410419>
- Kilimnik, G., Jo, J., Periwal, V., Zielinski, M. C., & Hara, M. (2012). Quantification of islet size and architecture. *Islets*, 4(2), 167–172. <https://doi.org/10.4161/isl.19256>
- Kilimnik, G., Zhao, B., Jo, J., Periwal, V., Witkowski, P., Misawa, R., & Hara, M. (2011). Altered islet composition and disproportionate loss of large islets in patients with

- type 2 diabetes. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027445>
- Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P., & Hara, M. (2009). Islet architecture: A comparative study. *Islets*, 1(2), 129–136. <https://doi.org/10.4161/isl.1.2.9480>
- Kim, H., Toyofuku, Y., Fujitani, Y., Kawamori, R., Miyatsuka, T., Yang, K., ... German, M. S. (2010). Serotonin Regulates Pancreatic β -Cell Mass during Pregnancy. *Nature Medicine*, 16(7), 804–808. <https://doi.org/10.1038/nm.2173>. Serotonin
- Kodama, S., Kührtreiber, W., Fujimura, S., Dale, E. A., & Faustman, D. L. (2003). Islet Regeneration during the Reversal of Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Science*, 302(5648), 1223–1227. <https://doi.org/10.1126/science.1088949>
- Kou, K., Saisho, Y., Sato, S., Yamada, T., & Itoh, H. (2014). Islet number rather than islet size is a major determinant of α - And β -Cell mass in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(5), 1733–1740. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3731>
- Lau, J., Grapengiesser, E., & Hellman, B. (2016). Small Mouse Islets Are Deficient in Glucagon-Producing Alpha Cells but Rich in Somatostatin-Secreting Delta Cells. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2016/4930741>
- Lee, Y. C., & Nielsen, J. H. (2009). Regulation of beta cell replication. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 297(1–2), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.08.033>
- Lellis-Santos, C., Sakamoto, L. H., Bromati, C. R., Nogueira, T. C. A., 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. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1135>
- Li, W., Zhao, R., Liu, J., Tian, M., Lu, Y., He, T., ... Chen, L. (2014). Small Islets Transplantation Superiority to Large Ones: Implications from Islet Microcirculation and Revascularization. *Journal of Diabetes Research*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/192093>
- Lipsett M., Finegood DT., Beta cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats,

- Diabetes*, 51 (6): 1834-41, 2002.
- Lowe, N. K. (1992). Differences in first and second stage labor pain between nulliparous and multiparous women. *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynecology*, 13(4), 243–253. <https://doi.org/10.3109/01674829209009197>
- Mense, M. G., & Rosol, T. J. (2018). Endocrine Pancreas. In *Boorman's Pathology of the Rat*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391448-4.00036-8>
- Parsons, A., & Sorenson, L. (2014). Dwarf Mice : Effect of Lactogenic Hormones * of. *The Endocrine Society*, 136(5), 2013–2022.
- Parsons, J. A., Clarkbrelje, T., & 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. <https://doi.org/10.1210/endo.130.3.1537300>
- Rieck, S., & Kaestner, K. H. (2013). *NIH Public Access*. 21(3), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.11.001>.Expansion
- Rieck, S., White, P., Schug, J., Fox, A. J., Smirnova, O., Gao, N., ... Kaestner, K. H. (2009). The Transcriptional Response of the Islet to Pregnancy in Mice. *Molecular Endocrinology*, 23(10), 1702–1712. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0144>
- Ryan, E. A., O'Sullivan, M. J., & Skyler, J. S. (1985). Insulin action during pregnancy: Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes*, 34(4), 380–389. <https://doi.org/10.2337/diab.34.4.380>
- Schmidt A., Morales-Priero D. M., Patuscheck J., Fröhlich K., Markert U. R., Only humans have human placentas: molecular differences between mice and humans, *Journal of Reproductive Immunology*, (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2015.03.001>
- Schwarz, E. B., Ray, R. M., & Stuebe, A. M. (2009). *Duration of Lactation and Risk Factors for*. 113(5), 974–982.
- Sherwood Luralee, Human physiology: From cells to systemsn 9th Edition, 2014.
- Smith, E. (2017). *the Post Pax-turn Rat Pancreas * of p Cell Mass in*. 136(12).

- Sonagra, A. D. (2014). Normal Pregnancy- A State of Insulin Resistance. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 3–5.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/10068.5081>
- Sorenson, R. L., & Brelje, T. C. (1997). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: Beta cell growth. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 105(4).
- Sorenson, Robert L., Brelje, T. C., & Roth, C. (1993). Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of langerhans: A new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology*, 133(5), 2227–2234. <https://doi.org/10.1210/endo.133.5.8404674>
- Sreenan, S., Pick, A. J., Levisetti, M., Baldwin, A. C., Pugh, W., & Polonsky, K. S. (1999). Increased β -cell proliferation and reduced mass before diabetes onset in the nonobese diabetic mouse. *Diabetes*, 48(5), 989–996.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.48.5.989>
- Stagner, John I Samols, Ellis Weir, Gordon C., Sustained Oscillations of Insulin , Glucagon , and Somatostatin from the Isolated Canine Pancreas during Exposure to a ... Sustained Oscillations of Insulin , Glucagon , and Somatostatin from the Isolated Canine Pancreas during Exposure to a Constant Glucose Concentration, J. Clin. Invest., Vol. 65, 939-942, 1980.
- Steiner, D. J., Kim, A., Miller, K., & Hara, M. (2010). Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*, 2(3), 135–145. <https://doi.org/10.4161/isl.2.3.11815>
- Vega-Monroy ML., Larrieta E., S German M., Báez-Saldaña A., Fernández-Mejía Cristina, Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion, *J Nutr Biochem*. 2013 Jan;24(1):169-77. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.03.020.
- Watson E. D., Cross J. C., Development of Structures and Transport functions in the mouse placenta, *Physiology*, 20: 180-193, 2005, doi:10.1152/physiol.00001.2005
- Weinhaus, A. J., & Sorenson, R. L. (n.d.). *Islets in Vitro : Mechanisms*. 1640–1649.

- Weissgerber, T. L., & Wolfe, L. A. (2006). Physiological adaptation in early human pregnancy: adaptation to balance maternal-fetal demands. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 31(1), 1–11. <https://doi.org/10.1139/h05-003>
- White, S. A., Hughes, D. P., Contractor, H. H., & London, N. J. M. (1999). A comparison of cross sectional surface area densities between adult and juvenile porcine islets of Langerhans. *Hormone and Metabolic Research*, 31(9), 519–524. <https://doi.org/10.1055/s-2007-978787>
- X., X., Z., C., C., S., K., P., P., G., Y., E.-G., ... J., W. (2013). No evidence for beta cell neogenesis in murine adult pancreas. *Journal of Clinical Investigation*, 123(5), 2207–2217. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1172/JCI66323>
- Young, J., & Binart, N. (n.d.). *Prolactin — a pleiotropic factor in health and disease 1*. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0194-6>
- Yuval Dor, Juliana Brown, Olga I. Martinez, & Douglas A. Melton. (2004). Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, 429(6987), 41–46. <https://doi.org/10.1038/nature02520>