



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMACIÓN DEL DESARROLLO  
DE LAS CÉLULAS  $\beta$  PANCREÁTICAS EN EL MODELO  
DE RESTRICCIÓN PROTEICA MATERNA EN RATAS:  
MORFOLOGÍA Y EXPRESIÓN GÉNICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

Q.F.B. ADRIANA RODRÍGUEZ TREJO

TUTORA: DRA. MARTA A. MENJÍVAR IRAHETA



MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012.

**Programación del desarrollo de las células  $\beta$  pancreáticas  
en el modelo de restricción proteica materna en ratas:  
morfología y expresión génica**

**RECONOCIMIENTOS**

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. Marta Menjívar Iraheta en el laboratorio 202, Edificio F, del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Marta A. Menjívar Iraheta	Facultad de Química, UNAM
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría y colaboración de la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, del Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, División de Neurociencia y de la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, del Departamento de Biología Celular, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, para la realización de este proyecto.

Se reconoce la asesoría y colaboración de la Dra. Carmen Méndez Herrera, del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina, UNAM, para la realización de este proyecto.

Se reconoce la colaboración de la Dra. Bernadette Bréant y el Dr. Bertrand Blondeau del Equipo 8: Patologías nutricionales y metabólicas: Diabetes y Obesidad, del Centre de Recherche des Cordeliers, Université Paris VI, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de morfología y proliferación.

El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT (Proyecto No. 78762). Así mismo, la alumna recibió una beca por parte del CONACYT durante sus estudios de doctorado (Beca No. 205417).

La defensa oral de esta tesis fue presentada el día: \_\_\_\_\_

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

PRESIDENTE

*Dra. Victoria Chagoya de Sánchez*  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

VOCAL

*Dra. Amelia Farrés González-Saravia*  
Facultad de Química, UNAM

VOCAL

*Dr. Armando Tovar Palacio*  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

VOCAL

*Dr. Ángel Zarain Herzberg*  
Facultad de Medicina, UNAM

SECRETARIO

*Dra. Patricia Joseph Bravo*  
Instituto de Biotecnología, UNAM

*A mis padres, mi hermano  
y Simon*

# AGRADECIMIENTOS

A la *Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Química y el Posgrado en Ciencias Bioquímicas* por darme la oportunidad de recibir una excelente educación.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* por el apoyo económico que sustentó este proyecto y mi vida durante estos años y al *Centre de Recherche des Cordeliers (CRC)* por recibirme en sus instalaciones.

A la *Dra. Marta Menjívar Iraheta* por el valioso apoyo y la enseñanza que me brindó y por ser de gran ayuda para mi formación profesional.

A las *Dras. Marcia Hiriart Urdanivia y Victoria Chagoya de Sánchez* por sus sabios consejos, su valiosa ayuda y por formar parte de mi comité tutorial.

A los *Dres. Carmen Méndez Herrera y Enrique Pedernera Astegiano* por su invaluable apoyo a lo largo de este proyecto.

Al *Pr. Pascal Ferré* y la *Dra. Bernadette Bréant* por su gran apoyo durante mi estancia en el CRC y al *Dr. Bertrand Blondeau* por su generosa ayuda en este proyecto y por sus enseñanzas.

A los *Dres. Elena Zambrano y Peter W. Nathanielsz* por su valioso apoyo y asesoría.

A los *miembros del jurado de examen de grado* por su apoyo con la revisión de mi tesis.

A las *Dras. Guadalupe Ortiz López y Ángeles Granados Silvestre* y a la *M. en C. Isela Montúfar Robles* por su gran ayuda en la realización del proyecto.

A los *Dres. Samuel Canizales Quinteros y Fausto Sánchez* por su valiosa asesoría.

A *Roxana* por su gran apoyo, comprensión, enseñanzas y grandiosa amistad.

A *Agustín, Nayadé, Helena, Andrea e Ivonne* por su ayuda y la agradable convivencia.

A los *M. en C. Omar Medina y Mario Cárdenas* por sus buenos consejos y ayuda.

A *Lucía Macías* y al *personal del Bioterio de la Facultad de Química* por su asesoría, su ayuda y las facilidades otorgadas para el mantenimiento de los animales.

A *Lety García* por su gran apoyo durante la realización de mis estudios de doctorado.

A *Verónica Rodríguez Mata* y al *Departamento de Histología de la Facultad de Medicina* por su gran apoyo y asesoría.

A *Bérengère, Amrit, Cecilia* y los demás integrantes del *Equipo 8 del CRC* por su valiosa ayuda, comprensión y amistad.

A *Lupita, Carmen, María José, Silvia, Marlon, René y Mara* por su generosa ayuda, sus enseñanzas y su amistad.

A *mi familia* y a *Azucena, Ruth, Yahaira y Nassim* por su cariño, comprensión y apoyo.

A *Simon* por ser parte de mi vida y por su enorme comprensión, apoyo y amor.

# Índice

---

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>6</b>
<b>1. Antecedentes</b>	<b>10</b>
1.1 Homeostasis de la glucosa	10
1.1.1 Producción y utilización de la glucosa	11
1.1.2 Estado postprandial	12
1.1.3 Estado postabsortivo	15
1.2 Regulación de la homeostasis de la glucosa	17
1.2.1 Páncreas	20
1.2.1.1 Síntesis y degradación de la insulina	22
1.2.1.2 Secreción de la insulina	25
1.2.1.3 Masa de células $\beta$ pancreáticas	34
1.2.1.4 Acción de la insulina	35
1.2.2 Contrarregulación de la homeostasis de la glucosa	38
1.3 Diabetes mellitus	39
1.4 Programación del desarrollo y diabetes tipo 2	43
1.5 Desarrollo del páncreas y programación de las células $\beta$ pancreáticas	44
1.5.1 Desarrollo pancreático intrauterino en roedores	45
1.5.2 Desarrollo pancreático intrauterino en humanos	47
1.5.3 Desarrollo postnatal de las células $\beta$ pancreáticas en roedores y humanos	49
1.5.4 Programación del desarrollo de las células $\beta$ pancreáticas	51
1.5.4.1 Modelo de restricción proteica materna	52
1.5.5 Mecanismos de programación: expresión génica	55

<b>2.</b>	<b>Planteamiento del problema</b>	<b>62</b>
<b>3.</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>63</b>
<b>4.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>64</b>
	4.1 Objetivo general	64
	4.2 Objetivos particulares	64
<b>5.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>65</b>
	5.1 Animales	65
	5.2 Cuantificación de glucosa e insulina en suero	67
	5.3 Procesamiento histológico	68
	5.4 Análisis morfométrico de las células $\beta$ pancreáticas	68
	5.5 Análisis de proliferación de las células $\beta$ pancreáticas	69
	5.6 Aislamiento de islotes pancreáticos	70
	5.7 Análisis de expresión génica	70
	5.8 Análisis estadístico	72
<b>6.</b>	<b>Resultados</b>	<b>73</b>
	6.1 Efecto de la restricción proteica materna sobre el peso corporal de las madres y el crecimiento de las crías	73
	6.2 Consecuencias de la restricción proteica materna sobre las concentraciones séricas de glucosa e insulina de las crías	76
	6.3 Alteraciones en el peso del páncreas y la estructura de las células $\beta$ pancreáticas causadas por la restricción proteica materna	77
	6.4 Efecto de la restricción proteica materna sobre la proliferación de las células $\beta$ pancreáticas	82
	6.5 Efecto de la restricción proteica materna sobre la expresión de factores de transcripción y de genes de función de las células $\beta$ pancreáticas	83
<b>7.</b>	<b>Discusión</b>	<b>87</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>97</b>

<b>9.</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>98</b>
<b>10.</b>	<b>Referencias</b>	<b>99</b>
<b>11.</b>	<b>Artículo publicado</b>	<b>112</b>
<b>12.</b>	<b>Capítulo de libro publicado</b>	<b>122</b>

## Resumen

---

Varios estudios epidemiológicos han mostrado que uno de los factores de riesgo asociados con el desarrollo de diabetes tipo 2 y otras enfermedades en la vida adulta es la insuficiencia ponderal al nacimiento y durante la infancia. Con base en estos estudios, se ha postulado que las enfermedades del adulto pueden programarse durante el desarrollo intrauterino y postnatal temprano. Con la finalidad de identificar los mecanismos de programación del desarrollo de la diabetes tipo 2 y otras enfermedades, se han generado varios modelos animales experimentales. En el modelo de restricción proteica materna, las crías de ratas alimentadas con una dieta baja en proteínas durante la gestación y lactancia tienen insuficiencia ponderal al nacimiento y postnatal, bajo peso del páncreas, una masa reducida de células  $\beta$  pancreáticas, una secreción deficiente de insulina estimulada por glucosa y diabetes. La restricción proteica materna impuesta sólo en la gestación o lactancia también afecta el crecimiento corporal, la función de las células  $\beta$  y la homeostasis de la glucosa, aunque los efectos sobre la estructura de las células  $\beta$  están escasamente definidos.

Los mecanismos que causan la programación (i.e. alteraciones estructurales y funcionales) de las células  $\beta$  durante el desarrollo prenatal y/o postnatal temprano aún no están totalmente establecidos. Su funcionamiento inadecuado y masa reducida provocan una secreción deficiente de insulina, la cual contribuye al desarrollo de diabetes tipo 2. La programación de las células  $\beta$  puede reflejar, en parte, cambios en la expresión de genes cruciales para la función de estas células, como *Ins*, *Slc2a2* y *Kcnj11*, así como de factores transcripcionales que regulan la síntesis y secreción de insulina y las distintas etapas del desarrollo pancreático, como *Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a* y *Hnf4a* (involucrados en la especificación pancreática de las células endodérmicas), *Pdx1*, *Rfx6* y *Neurod1* (necesarios para la formación del páncreas y la diferenciación de las células precursoras endocrinas), *Isl1*, *Pax4* y *Nkx6-1* (implicados en la diferenciación y crecimiento de las células  $\beta$  y otros tipos celulares endocrinos).

Por lo tanto, en este proyecto se determinaron los efectos de la restricción proteica materna prenatal y/o postnatal temprana sobre el peso corporal al nacimiento y en la lactancia, las concentraciones en suero de glucosa e insulina, el peso del páncreas, la estructura (fracción, masa, número y tamaño de agregados) y proliferación de las células  $\beta$ , así como los niveles de ARNm de *Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Neurod1*, *Isl1*, *Pax4*, *Nkx6-1*, *Ins*, *Slc2a2* y *Kcnj11* en islotes pancreáticos aislados. La evaluación se realizó a los 7 y 21 días postnatales en las crías macho de ratas Wistar alimentadas con una dieta control ("C"; 20% de proteína) o una dieta isocalórica baja en proteínas ("R"; 6% de proteína) durante la gestación (primera letra) y/o lactancia (segunda letra) para generar cuatro grupos experimentales: CC, RR, RC y CR.

La restricción proteica prenatal y postnatal (RR) redujo el peso corporal y del páncreas, la fracción, masa, número y tamaño de agregados y proliferación de las células  $\beta$ ; las concentraciones de glucosa e insulina fueron similares a las del grupo control (CC), mientras que los niveles de ARNm de *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Isl1* y *Slc2a2* se incrementaron.

La normalización postnatal de la nutrición en las crías con restricción proteica prenatal (RC) provocó la recuperación del crecimiento corporal y del páncreas. En estas crías, la concentración de glucosa no se alteró y la de insulina se incrementó; la fracción, masa, número y tamaño de agregados y proliferación de las células  $\beta$  fueron menores y los niveles de ARNm de *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6* e *Ins* aumentaron.

La restricción proteica postnatal (CR) disminuyó el peso corporal y del páncreas y la concentración de insulina, aunque no afectó la de glucosa. La masa y proliferación de las células  $\beta$  se redujeron y el tamaño de agregados no varió, mientras que la fracción y número de agregados de células  $\beta$  y los niveles de ARNm de *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Rfx6* y *Slc2a2* se incrementaron en estas crías.

Los resultados indican que las alteraciones estructurales de las células  $\beta$ , causadas por la restricción proteica materna, se programan en la vida intrauterina. El incremento en la expresión de *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Isl1* y *Slc2a2* puede ocurrir como un mecanismo de adaptación inicial a la restricción

proteica que mantiene la síntesis y secreción de insulina y promueve la diferenciación de células  $\beta$ , limitando su proliferación de forma que las proteínas sean usadas para mantener las células existentes. Sin embargo, esto resulta en una masa disminuida de células  $\beta$ , lo cual puede contribuir a una secreción deficiente de insulina y al desarrollo subsecuente de diabetes.

## Abstract

---

Several epidemiological studies have shown an association between low birth and childhood weight and an increased risk of developing type 2 diabetes and other diseases in adult life. These studies led to the proposal that adulthood diseases can be programmed during intrauterine and early postnatal development. A variety of experimental animal models have been developed in order to identify the mechanisms underlying developmental programming of adulthood diseases. In the model of maternal protein restriction, offspring of rat dams fed low protein diets in gestation and lactation show low birth and postnatal body and pancreatic weight, reduced pancreatic  $\beta$ -cell mass, impaired glucose-stimulated insulin secretion and diabetes. Maternal protein restriction imposed only in gestation or lactation also affects body growth,  $\beta$ -cell function and glucose homeostasis, although effects on  $\beta$ -cell structure are scarcely defined.

The mechanisms underlying  $\beta$ -cell programming (i.e. structural and functional alterations) during prenatal and/or early postnatal development are not completely elucidated.  $\beta$ -Cell dysfunction and reduced mass lead to insulin secretion impairment, which contributes to type 2 diabetes development. Its programming may reflect changes in expression of key functional genes, like *Ins*, *Slc2a2* and *Kcnj11*, as well as of transcription factors regulating insulin synthesis and secretion and various stages of pancreatic development, such as *Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a* and *Hnf4a* (involved in pancreatic specification of endodermal cells), *Pdx1*, *Rfx6* and *Neurod1* (required for pancreas formation and endocrine precursor cell differentiation), *Isl1*, *Pax4* and *Nkx6-1* (implicated in  $\beta$ -cell and other endocrine lineage divergence and growth).

Therefore, in this project, the effects of prenatal and/or early postnatal maternal protein restriction on body weight at birth and lactation, serum glucose and insulin concentrations, pancreatic weight,  $\beta$ -cell structure (fraction, mass, aggregate number and size) and  $\beta$ -cell proliferation, as well as *Foxa2*,

*Hnf1b*, *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Neurod1*, *Isl1*, *Pax4*, *Nkx6-1*, *Ins*, *Slc2a2* and *Kcnj11* pancreatic islet mRNA levels were assessed at postnatal days 7 and 21 in male offspring of Wistar rat dams fed control (“C”; 20% protein) or isocaloric low protein (“R”; 6% protein) diets throughout gestation (first letter) and/or lactation (second letter) in four experimental groups: CC, RR, RC and CR.

Prenatal and postnatal protein restriction (RR) reduced body and pancreatic weight,  $\beta$ -cell fraction, mass, number and size of aggregates and  $\beta$ -cell proliferation; glucose and insulin concentrations were similar to those of CC (control group), whereas *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Isl1* and *Slc2a2* mRNA levels increased.

Normalizing postnatal nutrition in offspring with prenatal protein restriction (RC) led to body and pancreatic catch-up growth. Pups showed unchanged glucose and increased insulin concentrations, reduced  $\beta$ -cell fraction, mass, number and size of aggregates and  $\beta$ -cell proliferation, and augmented *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6* and *Ins* mRNA levels.

Postnatal protein restriction (CR) diminished body and pancreatic weight and insulin concentration, although it did not affect serum glucose levels. Offspring  $\beta$ -cell mass and proliferation were reduced and aggregate size was unaltered, whereas  $\beta$ -cell fraction and aggregate number, as well as *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Rfx6* and *Slc2a2* mRNA levels increased.

These results show that structural alterations of  $\beta$  cells are programmed by maternal protein restriction during intrauterine life. Induction of *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Isl1* and *Slc2a2* expression may occur as an initial adaptation mechanism to protein restriction which maintains insulin synthesis and secretion and promotes  $\beta$ -cell differentiation, limiting proliferation so protein can be used to maintain the existing cells. However, this results in a decreased  $\beta$ -cell mass, which may contribute to insulin secretion impairment and the subsequent development of diabetes.

## Abreviaturas

---

ABCC8	Cassette de unión a ATP, subfamilia C (CFTR/MRP), miembro 8/receptor de sulfonilureas SUR1
AC	Adenilato ciclasa
ADP	Adenosina bifosfato
Aldob	Aldolasa B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
AMPC-GEFII	Factor II de intercambio de nucleótidos de guanina regulados por AMPC (Epac2)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Arx	Gen de caja homeótica relacionado con aristaless
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Proteínas morfogenéticas de hueso
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Dieta control: 20% de proteína
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración intracelular de calcio
CC	Grupo control: dieta materna 20% de proteína en la gestación y lactancia
ChREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
CoA	Coenzima A
CR	Grupo con restricción proteica materna postnatal: dieta materna 20% de proteína en la gestación y dieta 6% de proteína en la lactancia
DAG	Diacilglicerol
d.p.c.	Días posteriores a la concepción
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
E	Día embrionario
FADH <sub>2</sub>	Flavina adenina dinucleótido
FFA	Ácidos grasos libres

FFAR1	Receptor 1 de ácidos grasos libres o receptor acoplado a proteína G (GPR40)
FGF-2	Factor 2 de crecimiento de fibroblastos
FGF-10	Factor 10 de crecimiento de fibroblastos
fM	Concentración femtomolar: fmol/L
Foxa2	Gen de caja forkhead A2
Gapdh	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
FPG	Concentración plasmática de glucosa en ayuno
Gcg	Glucagon
Gck	Glucocinasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GDP	Guanosina difosfato
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido 1 semejante al glucagon
GLUT	Proteína de transporte facilitado de glucosa
Grb-2	Proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento
GRP	Péptido de liberación de gastrina
GSIS	Secreción de insulina estimulada por glucosa
GTP	Guanosina trifosfato
Hhex	Gen de caja homeótica expresado en la hematopoyesis
Hnf1a	Factor nuclear hepático 1, caja homeótica A
Hnf1b	Factor nuclear hepático 1, caja homeótica B
Hnf4a	Factor nuclear hepático 4 alfa
Hprt1	Hipoxantina fosforribosil-transferasa 1
Iapp	Polipéptido amiloide de islotes
IDE	Enzima de degradación de la insulina
IFG	Concentración alterada de glucosa en ayuno
IGF-1	Factor 1 de crecimiento semejante a insulina
IGFBP-1	Proteína 1 de unión al factor de crecimiento semejante a insulina
IGT	Intolerancia a la glucosa
Ins	Insulina
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato

IRS-1	Sustrato 1 del receptor de insulina
IRS-2	Sustrato 2 del receptor de insulina
Irx2	Gen de caja homeótica iroquois 2
Isl1	Gen homeótico Islet 1, homeodominio LIM
K <sub>ATP</sub>	Canal de potasio sensible a ATP
Kcnj11 (Kir6.2)	Canal de potasio de rectificación interna, subfamilia J, miembro 11
LCFA	Ácidos grasos de cadena larga
LCFA-CoA	Ésteres de acil graso-CoA de cadena larga
MafA	Proteína A de la familia de oncogen de fibrosarcoma músculoaponeurótico v-maf
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
mM	Concentración milimolar: mmol/L
Mtac2d1	Membrane targeting [tandem] C2 domain containing 1
mTOR	Proteína blanco de rapamicina en mamíferos
mV	milivoltios
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Neurod1	Gen de diferenciación neurogénica 1
Neurog3	Neurogenina 3
Nkx6-1	Gen homeótico NK6 -1
OGTT	Prueba oral de tolerancia a la glucosa
Ogdh	Oxoglutarato deshidrogenasa
P	Día postnatal
PACAP	Polipéptido pituitario activador de la adenilato ciclasa
Pax4	Gen de caja pareada 4
Pax6	Gen de caja pareada 6
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
Pdx1	Gen homeótico pancreático y duodénico 1
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa

PKA	Proteína cinasa A
PKB (Akt)	Proteína cinasa B
PKC	Proteína cinasa C
Pklr	Piruvato cinasa de hígado
PLC	Fosfolipasa C
pM	Concentración picomolar: pmol/L
PPAR $\gamma$	Receptor gama activado por proliferadores de peroxisomas
R	Dieta baja en proteínas: 6% de proteína
RA	Ácido retinoico
RC	Grupo con restricción proteica materna prenatal: dieta materna 6% de proteína en la gestación y dieta 20% de proteína en la lactancia
RER	Retículo endoplasmático rugoso
Rfx6	Factor regulador X, 6
RR	Grupo con restricción proteica materna prenatal y postnatal: dieta materna 6% de proteína en la gestación y lactancia
SH2	Src-homology-2
Shh	Sonic Hedgehog
SHP-2	Proteína tirosina fosfasa 2 que contiene SH2
SLC2A1 (GLUT1)	Transportador de glucosa (transporte facilitado) de la familia 2 de transportadores de soluto, miembro 1
Slc2a2 (Glut2)	Transportador de glucosa (transporte facilitado) de la familia 2 de transportadores de soluto, miembro 2
SNAP-25	Proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa
SNARE	Receptor de proteína soluble de unión al factor sensible a N-etilmaleimida
s.p.c.	Semanas posteriores a la concepción
TBS	Solución salina amortiguadora - Tris
TG	Triacilgliceroles
Ucp2	Proteína 2 desacoplada
Vabp	Proteína de vesícula asociada a membrana - proteína asociada B
VAMP-2	Proteína 2 de membrana asociada a vesícula
VIP	Polipéptido vasoactivo intestinal
5-HT	5-hidroxitriptamina o serotonina

# 1. Antecedentes

---

## 1.1 Homeostasis de la glucosa

La glucosa es un carbohidrato cuya oxidación constituye uno de los procesos principales de obtención de energía e intermediarios metabólicos para las reacciones de biosíntesis en el organismo (Nelson DL y Cox MM, 2006). Su concentración plasmática se mantiene, normalmente, en un rango de 4.0-9.0 mM durante el día, a pesar de fluctuaciones en la demanda y aporte de glucosa (e.g. ejercicio e ingesta de alimentos, respectivamente) (Gerich JE, 2000).

La homeostasis de la glucosa en sangre provee una fuente constante de energía a todos los órganos, particularmente al cerebro, el cual depende de la glucosa para producir ATP, y previene la hipoglucemia e hiperglucemia (Tirone TA y Brunnicardi C, 2001). La disminución severa de la concentración plasmática de glucosa (i.e.  $<2.6$  mM) puede provocar disfunción neurológica, convulsiones, coma y muerte (Abdelmalik PA y cols., 2007; Auer RN, 1986; Koh TH y cols., 1988), mientras que su elevación persistente (i.e. concentración plasmática casual  $\geq 11.1$  mM ó  $\geq 7.0$  mM en ayuno  $\geq 8$  h) favorece el desarrollo de complicaciones como retinopatía, nefropatía y neuropatía (American Diabetes Association, 2007).

Durante los estados postabsortivo (8-16 h de ayuno) y postprandial (período de 5-7 h posterior a la ingesta de alimentos), la homeostasis de la glucosa en sangre depende del balance entre la liberación (producción e ingesta) y remoción (utilización o almacenamiento) de la glucosa de la circulación sistémica (Gerich JE, 1993).

### ***1.1.1 Producción y utilización de la glucosa***

Además de ser ingerida en la dieta, la glucosa que entra a la circulación sistémica puede ser obtenida mediante dos procesos: (1) gluconeogénesis, i.e. la formación de nuevas moléculas de glucosa a partir de glicerol, lactato y aminoácidos, y (2) glucogenólisis, i.e. la ruptura de glucógeno (polímero de glucosa) (Gerich JE, 1993; Jahoor F y cols., 1992; Junglas RL y cols., 1992).

La glucosa que se libera a la circulación proviene del hígado y del riñón. Aunque otros tejidos contienen enzimas que generan glucosa-6-fosfato a partir de glucógeno o de precursores gluconeogénicos, sólo estos dos órganos contienen suficiente glucosa-6-fosfatasa para producir cantidades significativas de glucosa disponible para entrar en la circulación sistémica (Gerich JE 2000). El hígado produce glucosa vía glucogenólisis y gluconeogénesis (Klover PJ y Mooney RA, 2004). La glucosa liberada por el riñón proviene casi exclusivamente de gluconeogénesis debido a que éste contiene poco glucógeno y las células que lo sintetizan tienen una actividad disminuida de la enzima glucosa-6-fosfatasa (Stumvoll M y cols., 1997). El músculo esquelético también lleva a cabo glucogenólisis y aunque éste contiene 5 veces más glucógeno que el hígado (400 g vs. 80 g previo a un ayuno de 8 h), la glucosa producida no entra en la circulación como glucosa libre; ésta es de uso endógeno o se libera a la circulación como lactato y alanina, los cuales pueden ser utilizados como precursores gluconeogénicos (Gerich JE, 1993; Kelley D y cols., 1988).

La utilización de la glucosa depende de su concentración plasmática, de los requerimientos de glucosa por parte de los tejidos y de la concentración plasmática de insulina y la sensibilidad a esta hormona en los tejidos que la requieren para captar la glucosa (Gerich JE, 1993).

La captación o transporte de la glucosa al interior de las células ocurre por difusión facilitada a través de proteínas de membrana denominadas transportadores de glucosa (GLUT). A la fecha se han descrito 14 transportadores de distintas características (GLUT1-14), cuya presencia varía entre los tejidos (Thorens B y Mueckler M, 2010; Zhao FQ y Keating AF, 2007).

La captación de la glucosa en el músculo, hígado y tejido adiposo está influenciada por las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina, mientras que en el cerebro, células sanguíneas, piel, tejidos gastrointestinales y riñones es independiente de la insulina (Gerich JE, 1993; Iozzo P y cols., 2003).

La glucosa captada por los tejidos puede ser (1) almacenada como glucógeno (ruta directa, i.e. la glucosa captada es incorporada al glucógeno), (2) oxidada completamente a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  vía glucólisis-ciclo de Krebs-fosforilación oxidativa para producir ATP e intermediarios metabólicos, (3) oxidada para obtener ribosa-5-fosfato (precursor para la síntesis de nucleótidos) y NADPH para procesos biosintéticos reductores (e.g. síntesis de ácidos grasos, colesterol y hormonas esteroideas) mediante la vía de las pentosas fosfato, o (4) convertida a lactato, piruvato y alanina (glucólisis no oxidativa), los cuales pueden ser utilizados para producir glucosa vía gluconeogénesis. La glucosa generada puede ser almacenada como glucógeno (ruta indirecta, i.e. la glucosa es formada a partir de precursores gluconeogénicos y, posteriormente, es incorporada al glucógeno) o liberada a la circulación sistémica (Gerich JE, 1993; Nelson DL y Cox MM, 2006; Woerle HJ y cols., 2003). La proporción en la cual la glucosa entra en alguna de estas rutas varía entre los tejidos y depende del grado de ayuno, del medio hormonal y de la presencia de sustratos alternativos como los ácidos grasos libres (Gerich JE, 1993).

### ***1.1.2 Estado postprandial***

El estado postprandial es el período de 5-7 h que transcurre después de ingerir alimentos. Debido a que la asimilación completa de los constituyentes de una comida mixta (grasas, proteínas y carbohidratos) y el reestablecimiento del estado postabsortivo (8-16 h de ayuno) toma, al menos, 6 h, los individuos que ingieren 3 alimentos al día están en estado postprandial la mayoría del tiempo (Gerich JE, 2000).

La glucosa es un monosacárido que puede ser ingerido como tal o como componente de disacáridos (e.g. maltosa, lactosa, trehalosa, sacarosa) o polisacáridos (e.g. almidón y glucógeno) presentes en los alimentos. Los disacáridos y polisacáridos son hidrolizados por enzimas digestivas, principalmente en el intestino delgado, para formar glucosa y otros monosacáridos (e.g. fructosa, manosa, galactosa). Los monosacáridos se transportan al interior de las células epiteliales del intestino y, posteriormente, son liberados a la sangre y captados por los tejidos, cuyas células los fosforilan y canalizan hacia la glucólisis. La fructosa, manosa y galactosa pueden entrar en la vía glucolítica al ser transformadas en algún intermediario de esta ruta metabólica (Nelson DL y Cox MM, 2006).

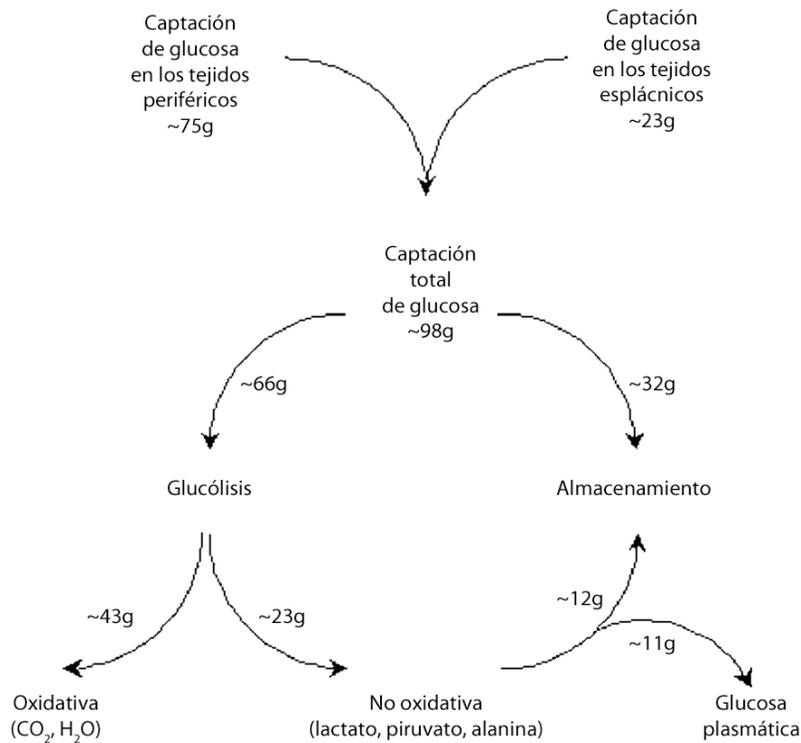
Después de una ingesta de glucosa (75 g), su concentración plasmática se incrementa durante los primeros 15 min, tiene un pico máximo a los 45-90 min (normalmente, no mayor a 9 mM) y regresa a valores postabsortivos a los 180 min (Mitrakou A y cols., 1990). La concentración plasmática postprandial de glucosa está determinada por los cambios en las tasas de aparición y remoción de la glucosa de la circulación sistémica. La tasa de aparición representa la glucosa ingerida que no es captada en el primer paso de extracción esplácnica (órganos espláncnicos: hígado, intestinos, estómago, páncreas y bazo) y la liberación residual de glucosa endógena por parte del hígado y del riñón (Gerich JE, 2000; Parks DA y Jacobson ED, 1985). La tasa de aparición de glucosa en la circulación sistémica excede la de su remoción en los primeros 80-100 min. Por lo tanto, la concentración plasmática de glucosa se incrementa. Después de este período, la tasa de remoción aumenta y, en consecuencia, la concentración plasmática de glucosa disminuye (Gerich JE, 2000).

La homeostasis postprandial de la glucosa está influenciada principalmente por la supresión de la liberación endógena de glucosa (i.e. de la glucogenólisis y gluconeogénesis) y la captación esplácnica y post-esplácnica de glucosa en los tejidos (Meyer C y cols., 2002; Woerle HJ y cols., 2003).

La liberación endógena de glucosa en el período postprandial se suprime en un 60%. La liberación hepática es suprimida en un 82% y, como resultado, 30 g menos de glucosa alcanzan la circulación sistémica en este intervalo. La liberación renal, sin embargo, se incrementa y contribuye en un 60% a la liberación endógena postprandial de glucosa. Este incremento podría permitir una supresión importante de la liberación de glucosa y promover una formación de glucógeno más eficiente en el hígado (Meyer C y cols., 2002).

En la ingesta de una comida con un contenido aproximado de 78 g de glucosa,  $\approx 98$  g son utilizados. Los tejidos esplácnicos extraen  $\approx 23$  g, mientras que  $\approx 75$  g entran en la circulación sistémica ( $\approx 54$  de los 78 g ingeridos y  $\approx 21$  g que provienen de la liberación endógena de glucosa) y son captados por los tejidos periféricos (Woerle HJ y cols., 2003). El 35-40% es captado por el músculo esquelético, inicialmente para su oxidación en sustitución de los ácidos grasos libres y, posteriormente, para su almacenamiento como glucógeno; 20% es captado por el cerebro como sustituto de la glucosa endógena que normalmente se hubiera tomado en este período; 20% es extraído de la circulación sistémica por el hígado como glucosa intacta o como lactato, alanina y glutamina para la formación de glucógeno;  $\approx 10\%$  es captado por los riñones y 7-15%, por el tejido adiposo y otros tejidos (Gerich JE 2000; Mårin P y cols., 1992; Meyer C y cols., 2002; Taylor R y cols., 1993; Taylor R y cols., 1996).

De la glucosa captada por los tejidos ( $\approx 98$  g) en el período postprandial (Figura 1), 33% es almacenado directamente como glucógeno y 67% entra en la vía glucolítica: 44% es oxidado a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , mientras que el 23% restante es liberado a la circulación como lactato, piruvato y alanina para la formación de glucógeno (12%) o glucosa (11%) (Woerle HJ y cols., 2003).



**Figura 1.** Rutas de utilización postprandial de la glucosa (modificado de Woerle HJ y cols., 2003).

### 1.1.3 Estado postabsortivo

La concentración plasmática de glucosa es relativamente estable ( $\approx 5$  mM) en el estado postabsortivo (8-16 h de ayuno). Su tasa de liberación (producción) en la circulación es semejante a la de remoción (utilización), i.e.  $\approx 10 \mu\text{mol}/\text{Kg}^{-1}/\text{min}^{-1}$ . Sin embargo, la tasa de remoción excede ligeramente a la de liberación. Por lo tanto, si el ayuno se prolonga, la concentración plasmática de glucosa disminuye gradualmente; en un ayuno de 20-24 h, ésta puede reducirse 10-15% (i.e. 4.0-4.5 mM), aunque se mantiene  $>2.8$  mM después de 72 h (Consoli A y cols., 1987; Gerich JE, 2000).

El 80% de la glucosa producida en este estado proviene del hígado (glucogenólisis:  $\approx 50\%$ ; gluconeogénesis:  $\approx 50\%$ ) y el resto es generada por el

riñón (gluconeogénesis). La proporción correspondiente a la gluconeogénesis aumenta con la duración del ayuno (14 h-47%; 22 h- 67%; 42 h-93%), conforme la cantidad de glucógeno se reduce (100 mg/min o 9%/h). Sin embargo, ambos órganos liberan aproximadamente la misma cantidad de glucosa (2.5-3.0  $\mu\text{mol/Kg}^{-1}/\text{min}^{-1}$ ) a partir de gluconeogénesis (Gerich JE, 2000; Landau BR y cols., 1996; Stumvoll M y cols., 1997; Tirone TA y Brunicardi FC, 2001).

En el estado postabsortivo no hay almacenamiento de glucosa; ésta es captada por los tejidos (Tabla 1) y oxidada completamente o metabolizada a lactato, alanina y glutamina, los cuales son liberados en la circulación para producir glucosa (Gerich JE, 2000; Perriello G y cols., 1995).

**Tabla 1.** Captación de glucosa en el estado postabsortivo

	% del total
Cerebro	45-60
Músculo esquelético	15-20
Riñones	10-15
Células sanguíneas	5-10
Órganos esplácnicos*	3-6
Tejido adiposo	2-4

\*Hígado, estómago, intestinos, páncreas y bazo (Parks DA y Jacobson ED, 1985)

En un ayuno más prolongado al del estado postabsortivo, se utilizan aminoácidos como sustratos gluconeogénicos e intermediarios en el ciclo de Krebs para la producción de ATP. Después de un período de 3 días de inanición, la utilización de glucosa como fuente energética en los tejidos disminuye y las proteínas se conservan, por lo que la homeostasis energética se mantiene mediante la utilización de ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos (Owen OE y Reichard GA, 1971; Owen OE y cols., 1979; Owen OE y cols., 1998).

## ***1.2 Regulación de la homeostasis de la glucosa***

La homeostasis de la glucosa en sangre durante los estados postabsortivo y postprandial está controlada por señales nerviosas y hormonales, las cuales son activadas por cambios en la concentración plasmática de glucosa. Estas señales promueven o suprimen la producción, utilización y almacenamiento de la glucosa en el organismo.

Durante el período postprandial, la ingesta de glucosa induce varias respuestas neuronales y endocrinas desde el momento en el que aparece en la cavidad oral hasta su absorción en el intestino y el aumento de su concentración en la circulación sistémica (Marty N y cols., 2007; Thorens B, 2008).

En la boca, la glucosa estimula un reflejo nervioso mediante la activación de receptores del gusto y de sus fibras aferentes, las cuales proyectan al tronco encefálico. Este reflejo induce la fase cefálica de la secreción de la hormona insulina en las células  $\beta$  pancreáticas, i.e. la concentración plasmática de insulina aumenta antes de que la concentración de glucosa en sangre se incremente. La estimulación de la secreción de insulina durante la fase cefálica ocurre a través de mecanismos colinérgicos (activación de receptores muscarínicos por la acetilcolina liberada de las fibras nerviosas postganglionares que inervan los islotes pancreáticos) y no colinérgicos (posiblemente mediados por los neurotransmisores VIP [polipéptido vasoactivo intestinal], PACAP [polipéptido pituitario activador de la adenilato ciclasa] y GRP [péptido de liberación de gastrina], liberados por nervios parasimpáticos en los islotes). La concentración plasmática de insulina aumenta 2 minutos después de la estimulación oral, alcanza un pico máximo a los 4 minutos y regresa al nivel basal a los 10 minutos, aproximadamente (Ahrén B, 2000; Ahrén B y Holst JJ, 2001; Just T y cols., 2008; Marty N y cols., 2007; Thorens B, 2008).

En el intestino, la presencia de glucosa induce cambios en la función del tracto gastrointestinal, e.g. inhibición del vaciado gástrico e ingesta de comida y estimulación de la secreción pancreática e intestinal. La glucosa es absorbida en

el lumen intestinal por los enterocitos y detectada principalmente por células enteroendocrinas y neuronas del sistema nervioso entérico. En las células enteroendocrinas, la glucosa estimula la liberación de péptidos y neurotransmisores, como la serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT), GLP-1 (péptido 1 semejante al glucagon) y GIP (polipéptido insulínico dependiente de glucosa), los cuales se unen a sus receptores en las neuronas entéricas y las activan. Estas neuronas pueden activar vías especializadas de reflejos en el sistema nervioso entérico que regulan la secreción epitelial y los patrones de motilidad intestinal. La 5-HT incrementa la motilidad intestinal mediante su acción en neuronas motoras y está involucrada en la secreción de electrolitos. Además de los efectos mediados por la 5-HT, la glucosa puede estimular los reflejos epiteliales y musculares del intestino a través de la activación directa de las neuronas entéricas (Berner Hansen M y Witte AB, 2008; Pfannkuche H y Gäbel G, 2009; Raybould HE, 2007). GIP induce la secreción de insulina y regula el metabolismo de lípidos, mientras que GLP-1 estimula la secreción de insulina y promueve la remoción de glucosa de la circulación, lo cual favorece la formación de glucógeno hepático. Además, GLP-1 inhibe la secreción de glucagon, prolonga el vaciado gástrico y disminuye la producción hepática de glucosa (Aronoff SL y cols., 2004; Lam CK y cols., 2009; Marty N y cols., 2007; Thorens B y Larsen PJ, 2004).

Después de su absorción en el intestino, la glucosa es transportada a la vena mesentérica. Posteriormente, entra al hígado a través de la vena porta hepática y, finalmente, es distribuida al resto del cuerpo. En las venas mesentérica y porta hepática, la glucosa también es detectada por células entéricas sensibles a glucosa, las cuales transmiten señales endocrinas y neuronales hacia los tejidos periféricos.

En la vena porta hepática, las células sensibles a glucosa son activadas por la presencia de este carbohidrato y, en consecuencia, disminuyen la actividad de disparo de nervios vagos aferentes que proyectan al tronco encefálico y al hipotálamo. Posteriormente, la señal de detección de glucosa se transmite a las células blanco pertinentes, provocando varias respuestas de adaptación, como la estimulación de la primera fase de secreción de la insulina

y de la captación de la glucosa en el hígado, músculo, corazón y tejido adiposo, la inhibición de la secreción de glucagon y la terminación de la alimentación (Knauf C y cols., 2008; Marty N y cols., 2007; Thorens B, 2008; Thorens B y Larsen PJ, 2004).

En el hígado, la captación de glucosa induce respuestas que favorecen su almacenamiento en forma de glucógeno (inhibición de la glucógeno fosforilasa y activación de la glucógeno sintasa). La glucosa también puede estimular la formación de ácidos grasos mediante la acción de la xilulosa 5-fosfato, generada a partir del catabolismo de la glucosa por la vía de las pentosas fosfato. La xilulosa 5-fosfato activa a la proteína fosfatasa A2 (PP2A), la cual desfosforila al factor transcripcional ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) localizado en el citoplasma, provocando su translocación al núcleo. Esta proteína promueve la transcripción de genes implicados en la glucólisis (L-piruvato cinasa) y la síntesis de ácidos grasos (sintasa de ácidos grasos y acetil-CoA carboxilasa) (Marty N y cols., 2007; Thorens B., 2008).

En el sistema nervioso central, principalmente en el hipotálamo y el tronco encefálico, existen neuronas responsivas a la concentración extracelular de glucosa. Estas neuronas están involucradas en la homeostasis de la glucosa y la energía debido a que regulan la secreción de hormonas del páncreas endocrino, la producción hepática de glucosa, el comportamiento alimentario y el gasto de energía. Las neuronas excitadas por glucosa incrementan su tasa de disparo al aumentar la concentración de glucosa, mientras que las neuronas inhibidas por glucosa son activadas por una disminución en su concentración (Marty N y cols., 2007; Thorens B., 2008). Se ha propuesto como mecanismo responsable a las unidades formadas por astrocitos y neuronas acopladas metabólicamente; la glucosa es captada y catabolizada a lactato en los astrositos, el cual se transfiere a las neuronas para producir ATP y regular la actividad de disparo. Las señales provocadas por cambios en la concentración extracelular de glucosa se integran en el hipotálamo y las neuronas responsivas envían eferentes al tallo cerebral, en el cual activan fibras eferentes simpáticas y

parasimpáticas. La inervación simpática es responsable de inhibir la secreción de insulina y de estimular la secreción de glucagon en el páncreas y la de epinefrina en la médula adrenal. Las fibras parasimpáticas promueven la secreción de insulina e inhiben la producción hepática de glucosa (gluconeogénesis y glucogenólisis), lo cual provoca la disminución de la concentración de glucosa en sangre (Lam CK y cols., 2009; Lam TK y cols., 2005; Marty N y cols., 2007).

### **1.2.1 Páncreas**

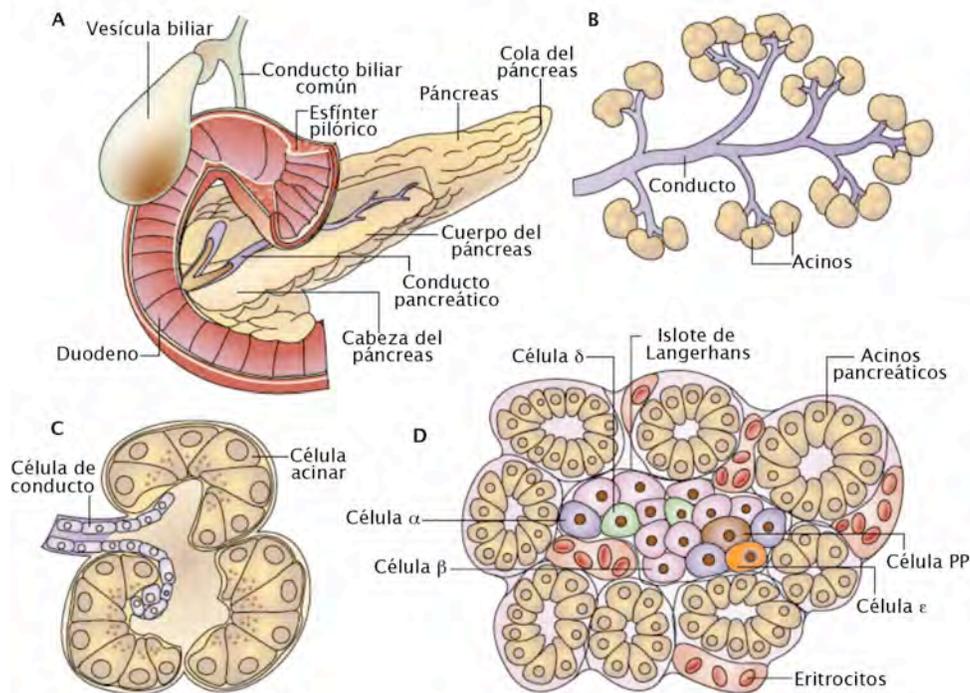
El páncreas (Figura 2) es crítico en la regulación de la homeostasis de la glucosa (tejido endocrino) y participa en la digestión de los alimentos (tejido exocrino). Las regiones proximal a distal de este órgano están asignadas con los términos cabeza (región cercana al duodeno), cuerpo y cola (región cercana al bazo) (Slack JMW, 1995).

El tejido exocrino constituye alrededor del 95% del páncreas y está formado por células acinares y de conductos. Las células acinares, organizadas en acinos, producen enzimas digestivas que promueven la absorción de nutrientes. Estas enzimas son secretadas hacia el duodeno a través de un sistema ramificado de conductos, cuyas células añaden mucosa y bicarbonato a la mezcla de enzimas (Bardeesy N y DePinho RA, 2002; Grappin-Botton A, 2005; Kume S, 2005).

El tejido endocrino (1-2% del páncreas) sintetiza y secreta hormonas a la circulación sistémica. Está formado principalmente por 5 tipos celulares, caracterizados por las hormonas que producen: células  $\alpha$  (glucagon), células  $\beta$  (insulina y amilina), células  $\delta$  (somatostatina), células PP (polipéptido pancreático) y células  $\epsilon$  (greлина). Las células endocrinas están organizadas en agregados esféricos denominados islotes de Langerhans, los cuales están distribuidos a lo largo del tejido exocrino (Slack JMW, 1995; Spagnoli FM, 2007). La composición de células en los islotes varía dependiendo de la región del páncreas y de la especie. En promedio, el tipo celular más abundante son las células  $\beta$  (50–80%); las células  $\alpha$  constituyen el 20–40%, mientras que las células

$\delta$ , PP y  $\epsilon$  están en menor proporción (Aguayo-Mazzucato C y cols., 2006; Cabrera O y cols., 2006; Kulkarni RN, 2004).

Además del tejido glandular exocrino y endocrino, el páncreas tiene un flujo importante de sangre arterial, un extenso drenaje linfático e inervaciones simpáticas y parasimpáticas (Slack JMW, 1995).



**Figura 2.** Anatomía del páncreas (modificado de Bardeesy N y DePinho RA, 2002): (A) Regiones proximal a distal del páncreas: cabeza, cuerpo y cola; (B) Tejido exocrino formado por acinos y conductos; (C) Células acinares y de conductos; (D) Islote pancreático (células endocrinas) rodeado de tejido exocrino.

El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en sangre depende, en gran medida, de la acción de las hormonas pancreáticas insulina y glucagon.

La hiperglucemia, la estimulación nerviosa y la liberación de GIP y GLP-1 después de una ingesta de glucosa (75 g) promueven la secreción de insulina y suprimen la de glucagon. La concentración plasmática de insulina sigue un patrón similar al de la glucosa durante este período; su concentración se incrementa  $\approx 4$  veces los valores basales (de 90 a 360 pM aproximadamente)

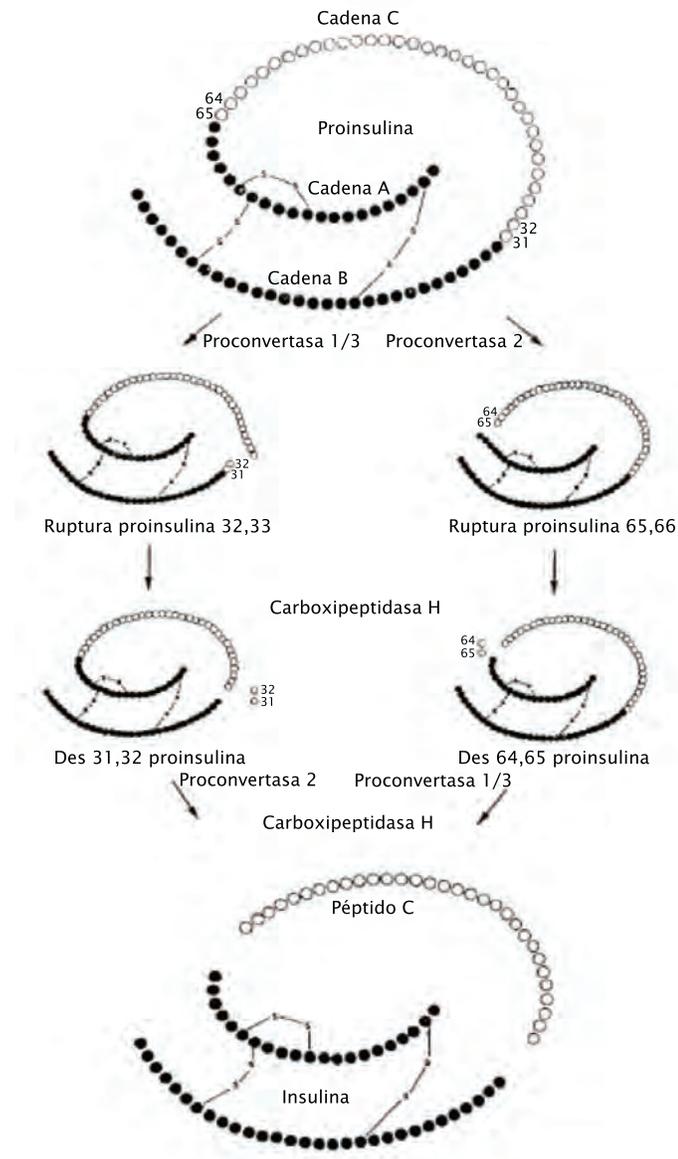
entre los 45-90 min después de la ingesta de glucosa y regresa a niveles postabsortivos a los 180 min. En cambio, la concentración plasmática de glucagon se reduce un 50% (concentración basal promedio: 45 fM) entre los 45 y 90 minutos posteriores a la ingesta de glucosa y regresa a su concentración basal después de 180 min (Gerich JE, 1993; Mitrakou A y cols., 1990).

### ***1.2.1.1 Síntesis y degradación de la insulina***

La insulina es una hormona peptídica de 51 aminoácidos (5808 Da) formada por dos cadenas, A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos), las cuales están unidas por dos puentes disulfuro (Chevenne D y cols., 1999).

Esta hormona es sintetizada en las células  $\beta$  pancreáticas a partir de un precursor de cadena simple denominado preproinsulina (11500 Da). La preproinsulina (100 aminoácidos), producida en ribosomas asociados con el retículo endoplasmático rugoso (RER), está constituida por un péptido señal, la cadena B, un péptido conector (C) y la cadena A. El péptido señal promueve la translocación de la preproinsulina del citosol al lumen del RER. La eliminación del péptido señal mediante la acción de enzimas microsomales genera la proinsulina (86 aminoácidos; 9600 Da), cuyo plegamiento está acoplado a la formación de 3 puentes disulfuro: uno intracadena en la cadena A (A6-A11) y dos que conectan las cadenas A y B (A7-B7 y A20-B19). En la pre-proinsulina y la proinsulina, el péptido C (35 aminoácidos) está entre las cadenas A y B. La proinsulina es transferida del RER al aparato de Golgi, en el cual se lleva a cabo su almacenamiento, junto con las enzimas procesadoras, en gránulos de secreción recubiertos de clatrina. La maduración de los gránulos de secreción consiste en la pérdida del recubrimiento de clatrina y la conversión de la proinsulina a insulina y péptido C mediante procesamiento proteolítico (Figura 3). Las endoproteasas proconvertasa 2 y 1/3 rompen la proinsulina en dos residuos dibásicos distintos: los aminoácidos Arg<sup>64</sup>-Lys<sup>65</sup>, los cuales están entre el péptido C y la cadena A (proconvertasa 2) y Arg<sup>31</sup>-Arg<sup>32</sup>, localizados entre la cadena B y el péptido C (proconvertasa 1/3). La carboxipeptidasa H elimina los 2 pares de aminoácidos dibásicos de los dos sitios de ruptura. El péptido C y la

insulina se producen cuando la ruptura enzimática se completa en ambos sitios de unión (Chevenne D y cols., 1999; Goodge KA y Hutton JC, 2000; Uchizono Y y cols., 2007; Weiss MA, 2009; Wilcox G, 2005).



**Figura 3.** Procesamiento proteolítico de la proinsulina (modificado de Chevenne D y cols., 1999).

La insulina madura queda almacenada en los gránulos de secreción en forma de hexámeros estables que contienen  $Zn^{2+}$ . Cuando la insulina es liberada mediante exocitosis, los hexámeros se disocian en la circulación portal para producir monómeros bioactivos de la hormona (Weiss MA, 2009).

La vida media de la insulina en circulación es de 4-6 min. Su eliminación de la circulación y la degradación celular se llevan a cabo principalmente por el hígado y el riñón, aunque cualquier tejido que contenga receptores de insulina puede degradar esta hormona. Aproximadamente el 50% de la insulina portal es removida por el hígado. El proceso principal de captación y degradación de la insulina en los hepatocitos está mediado por la unión a su receptor e internalización. La insulina de la circulación sistémica es removida principalmente por el riñón ( $\approx 50\%$ ) a través de dos mecanismos: filtración glomerular y reabsorción tubular proximal y degradación. La eliminación glomerular de la insulina puede ocurrir por difusión y por transporte mediado por receptor. Después de su entrada en el lumen tubular, la insulina filtrada es reabsorbida, mediante endocitosis, por las células proximales tubulares.

La insulina que se une a su receptor en los tejidos blanco puede ser liberada a la circulación o internalizada en endosomas para su degradación (diacitosis) o liberación (retroendocitosis). Los endosomas degradan esta hormona mediante la acción de la enzima IDE (enzima de degradación de la insulina), aunque la insulina intacta o parcialmente degradada por los endosomas puede ser captada por los lisosomas, en los que se completa su degradación. El paso inicial de degradación consiste en una o más rupturas de la cadena B. Posteriormente los enlaces disulfuro son reducidos por la acción de la enzima PDI (proteína disulfuro isomerasa) o alguna enzima relacionada. Los productos de esta degradación inicial consisten en una cadena A intacta y varios fragmentos de la cadena B, los cuales son degradados posteriormente por varias enzimas proteolíticas (Duckworth WC y cols., 1998).

### 1.2.1.2 *Secreción de la insulina*

El acoplamiento estímulo-secreción es esencial para la respuesta adecuada de las células  $\beta$  pancreáticas. La secreción de insulina es estimulada por glucosa y está influenciada por la acción de otros nutrientes (e.g. aminoácidos, ácidos grasos), hormonas (e.g. GLP-1, GIP) y neurotransmisores (e.g. acetilcolina). Estos factores generan señales de activación y amplificación de la secreción de insulina a través de distintas vías de señalización en las células  $\beta$  (Figura 4) (Ahrén B, 2000; Bratanova-Tochkova TK y cols., 2002; Drucker DJ, 2006; Henquin JC, 2000; Kahn SE y cols., 2006; Newsholme P y cols., 2006; Nolan CJ y cols., 2006).

#### *Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS)*

La glucosa estimula la liberación de la insulina mediante vías de señalización de activación y amplificación, las cuales son complementarias. La vía de activación (incremento de  $[Ca^{2+}]_i$ ) induce la secreción de insulina, mientras que la vía de amplificación sirve para optimizar la respuesta secretora generada por la señal de activación (Henquin JC y cols., 2003).

#### *A) Vía de activación*

En presencia de una concentración extracelular basal de glucosa (5-6 mM), la tasa metabólica de las células  $\beta$  es relativamente baja y su membrana plasmática está polarizada a un potencial de reposo que oscila alrededor de -60 mV. Este potencial se mantiene debido a la actividad de la bomba electrogénica  $Na^+K^+$ -ATPasa y de canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ), los cuales preservan el gradiente de cationes. Los canales  $K_{ATP}$  son hetero-octámeros formados por 4 subunidades del receptor de sulfonilureas SUR1 (*ABCC8*) y 4 subunidades del canal de  $K^+$  de rectificación interna Kir6.2 (*KCNJ11*). Los cambios en el cociente ATP/ADP intracelular regulan la actividad de los canales  $K_{ATP}$ ; la unión de ATP a Kir6.2 cierra el canal, mientras que la unión de ADP a SUR1 lo abre. Hay suficientes canales  $K_{ATP}$  abiertos en la membrana plasmática que contrarrestan las corrientes de despolarización y mantienen el potencial de

membrana a valores más negativos que el límite para abrir los canales de calcio dependientes de voltaje. Por lo tanto, el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  es mínimo, la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) es baja y la secreción de insulina es basal (Henquin JC y cols., 2003; Henquin JC, 2009; Hiriart M y Aguilar-Bryan L, 2008).

Al incrementarse la concentración extracelular de glucosa, hay una primera fase de acoplamiento en la que la glucosa es transportada al citoplasma de la célula  $\beta$  y metabolizada (Hiriart M y Aguilar-Bryan L, 2008). El transporte ocurre a través de transportadores de glucosa (transporte facilitado) de la familia 2 de transportadores de soluto, miembro 1 (SLC2A1/GLUT1) en humanos, o miembro 2 (Slc2a2/Glut2) en roedores. Una vez en el interior de la célula, la glucosa es fosforilada por la glucocinasa a glucosa 6-fosfato, lo cual incrementa el flujo glucolítico y la producción de piruvato. El piruvato que se genera es transportado a la mitocondria, en la cual  $\approx 50\%$  es descarboxilado a acetil-CoA y el resto es carboxilado a oxalacetato. La acetil-CoA y el oxalacetato son metabolizados en el ciclo de ácidos tricarbónicos/ciclo de Krebs, con lo cual se produce NADH y  $\text{FADH}_2$ . Ambos equivalentes reductores son oxidados en la cadena respiratoria (fosforilación oxidativa) para generar ATP. La producción de ATP incrementa el cociente ATP/ADP en el citoplasma, lo que provoca el cierre de canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  y la subsecuente despolarización de la membrana plasmática (Jitrapakdee S y cols., 2010; MacDonald MJ y cols., 2005). La despolarización del potencial de membrana a  $-40$  mV promueve la apertura de canales de sodio y calcio (tipo T) dependientes de voltaje. La entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula causa una mayor despolarización de la membrana plasmática. Alrededor de  $-20$  mV, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de alto voltaje (tipo L y probablemente otros tipos) se abren, permitiendo un mayor influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y, en consecuencia, un aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Este evento provoca la exocitosis de los gránulos de secreción de insulina (Hiriart M y Aguilar-Bryan L, 2008).

La exocitosis de las vesículas o gránulos de secreción de insulina implica el reclutamiento y transporte de los gránulos del citoplasma hacia la membrana plasmática, su acumulación cerca de la membrana plasmática (“docking”), la

preparación de los gránulos para su liberación mediante reacciones dependientes de ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ , tiempo y temperatura (“priming”) y, finalmente, la fusión de las membranas plasmática y de los gránulos para liberar la insulina. La fusión está mediada por el complejo proteico central SNARE (receptor de proteína soluble de unión al factor sensible a N-etilmaleimida). La formación del complejo SNARE requiere el apareamiento de las proteínas syntaxina y SNAP-25 (proteína asociada a sinaptosomas de 25 kDa) de la membrana plasmática (proteínas target-SNAREs o t-SNAREs) con la proteína VAMP-2 (proteína 2 de membrana asociada a vesícula) o sinaptobrevina-2 de la membrana de los gránulos de secreción (proteína vesicle-SNARE o v-SNARE) (Bratanova-Tochkova TK y cols., 2002; Easom RA, 2000; Lang J, 1999; Rorsman P y Renström E, 2003).

#### *B) Vía de amplificación*

Además de la señal de activación (aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), la glucosa genera señales que amplifican la acción del  $\text{Ca}^{2+}$  en el proceso de exocitosis de los gránulos de insulina (Henquin JC y cols., 2003). Esto se observó en experimentos en islotes de roedores en los que, dada una concentración elevada de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , la glucosa aumenta la secreción de insulina sin que los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  se cierren (Gembal M y cols., 1992; Sato Y y cols., 1992), o bien, cuando ya están completamente cerrados (Panten U y cols., 1988; Sato Y y cols., 1999). Esta vía también es funcional en líneas de células  $\beta$  (Hohmeier HE y cols., 2000) e islotes humanos (Henquin JC y cols., 2006; Straub SG y cols., 1998). Bajo estas condiciones, i.e. en las que no hay un efecto sobre los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  y el potencial de membrana de la célula  $\beta$ , la glucosa promueve la secreción de insulina sin que exista un mayor incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La vía de amplificación requiere el metabolismo de la glucosa y también es activada por otros nutrientes metabolizados. Esta vía confiere una mayor eficiencia a la exocitosis inducida por la señal de activación y contribuye en un 50% a la secreción de insulina estimulada por glucosa, aunque aún se desconocen los mecanismos involucrados (Henquin JC, 2000; Henquin JC y cols., 2003; Henquin JC, 2009).

En roedores y humanos, la secreción de insulina estimulada por glucosa presenta un patrón bifásico. La primera fase consiste en un aumento rápido y transitorio de la liberación de insulina en respuesta al incremento en la concentración extracelular de glucosa durante los primeros minutos de estimulación. La segunda fase inicia unos minutos después de la primera; la secreción se estabiliza o se incrementa gradualmente (aunque con menor intensidad que en la primera fase) y se sostiene hasta que la euglicemia se restablece (Henquin JC y cols., 2002; Hiriart M y Aguilar-Bryan L, 2008). Ambas vías de señalización, i.e. de activación y amplificación, están implicadas en la primera y segunda fase de la secreción de insulina estimulada por glucosa (Henquin JC, 2009).

En humanos, la secreción de la insulina por las células  $\beta$  de todos los islotes es pulsátil y se refleja en las oscilaciones de la concentración de insulina en sangre. Además del patrón rápido de secreción pulsátil de insulina, el cual tiene una periodicidad de 5-15 min (Pørksen N, 2002), se han descrito oscilaciones ultradianas que ocurren en períodos de 120 min y pueden deberse a un mecanismo de retroalimentación entre la producción de glucosa y la secreción de insulina (Sturis J y cols., 1991).

#### *Secreción de insulina: aminoácidos, ácidos grasos, hormonas y neurotransmisores*

Además de la glucosa, varios sustratos, como aminoácidos, ácidos grasos, hormonas y neurotransmisores, pueden estimular o incrementar la secreción de insulina.

#### *Aminoácidos*

La ingestión de proteínas induce la secreción de insulina mediante la acción de aminoácidos provenientes de su degradación. El efecto de las proteínas de la dieta sobre la secreción de insulina depende de su tipo y cantidad. El consumo de proteínas vegetales, como la soya, estimula en menor

medida la secreción de insulina en comparación con las proteínas animales como la caseína. La ingesta de dietas con un contenido bajo de proteínas está relacionada con una secreción reducida de insulina, mientras que las dietas con alto contenido de proteínas provocan un aumento en la secreción de esta hormona. Algunos de los aminoácidos derivados de las proteínas de la dieta y de los que se liberan de las células epiteliales del intestino potencian la secreción de insulina a través de varios mecanismos (Newsholme P y cols., 2007; Torres N y cols., 2009).

La arginina despolariza la membrana plasmática al ser transportada al interior de la célula  $\beta$ , permitiendo el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, lo cual incrementa la señal de activación ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) de la secreción de insulina estimulada por glucosa (Henquin JC y cols., 2003; Newsholme P y cols., 2007; Smith PA y cols., 1997).

La leucina induce la secreción de insulina y la glutamina lo hace en conjunto con la leucina. En un estado de energía disminuido (concentración baja de glucosa), las células  $\beta$  se sensibilizan a la estimulación de la secreción de insulina por leucina. Esto puede contribuir a la secreción basal de insulina, la cual representa  $\approx 50\%$  de la insulina liberada cada día. La leucina incrementa el catabolismo de la glutamina a través de la activación de las enzimas glutaminasa (oxidación de glutamina a glutamato) y glutamato deshidrogenasa (GDH), la cual convierte el glutamato a  $\alpha$ -cetoglutarato. El  $\alpha$ -cetoglutarato es metabolizado en el ciclo de Krebs, con lo cual se forma ATP y, en consecuencia, se promueve el aumento de ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) y la exocitosis de insulina. En contraste, la concentración elevada de glucosa inhibe la secreción de insulina inducida por leucina mediante la supresión de la actividad de ambas enzimas (Li C y cols., 2003; Gao Z y cols., 1999).

La alanina potencia la secreción de insulina en presencia de glucosa. El co-transporte de la alanina con  $\text{Na}^+$  al interior de la célula despolariza la membrana plasmática, lo cual provoca el incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la exocitosis de insulina. El glutamato y aspartato provenientes del metabolismo de la alanina pueden incrementar la concentración de sustratos de la lanzadera aspartato-malato, potenciando la transferencia de NADH derivado de la glucólisis a la mitocondria y la subsecuente formación de ATP y liberación de insulina.

Además, la alanina induce un incremento en el catabolismo de la glucosa, posiblemente, a través del aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  provocado por su co-transporte con  $Na^+$ . La enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) es activada por  $Ca^{2+}$ , por lo que la oxidación del piruvato proveniente de la glucosa se potencia. Esto aumenta el cociente ATP/ADP, lo cual induce la exocitosis de insulina (Bender K y cols., 2009; Brennan L y cols., 2002; Newsholme P y cols., 2006).

### *Ácidos grasos*

Los ácidos grasos libres (FFA) potencian la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS). El aporte de FFA a la célula  $\beta$  puede provenir de fuentes exógenas (FFA y lipoproteínas plasmáticas) o endógenas (triacilglicerol [TG] y fosfolípidos intracelulares). Los FFA pueden activar vías de señalización que inducen la exocitosis de la insulina en las células  $\beta$  a través de su metabolismo intracelular o la unión de los FFA con el receptor 1 de ácidos grasos libres o receptor acoplado a proteína G (FFAR1/GPR40) en la membrana plasmática (Nolan CJ y cols., 2006).

*Activación del receptor FFAR1/GPR40.* La activación de este receptor en las células  $\beta$  por FFA exógenos promueve una mayor  $[Ca^{2+}]_i$  y, en consecuencia, aumenta la GSIS. Esto puede ocurrir como consecuencia de la activación de la vía  $G\alpha_q$ -fosfolipasa C, la cual promueve la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico (Nolan CJ y cols., 2006; Shapiro H y cols., 2005).

*Vía de señalización malonil-CoA/LCFA-CoA.* El malonil-CoA derivado del metabolismo de la glucosa inhibe la oxidación de ácidos grasos mediante la inactivación de la carnitina acil transferasa 1, lo cual permite la acumulación de ésteres de acil graso-CoA de cadena larga (LCFA-CoA) en el citoplasma (Nolan CJ y cols., 2006; Roduit R y cols., 2004).

*Ciclo TG/FFA.* La glucosa promueve la esterificación de los LCFA-CoA con glicerol 3-fosfato para formar lípidos complejos (TG, diacilglicerol (DAG) y fosfolípidos) y estimula la lipólisis de TG intracelulares, la cual renueva los FFA intracelulares para su reactivación a LCFA-CoA en las células  $\beta$ . A estos procesos

se les denomina ciclo TG/FFA. Su inhibición (supresión de la síntesis de LCFA-CoA o de la lipólisis), disminuye el incremento de la GSIS inducido por los FFA.

Se ha propuesto que los LCFA-CoA e intermediarios del ciclo TG/FFA (TG, DAG y fosfolípidos) contribuyen a la potenciación de los FFA sobre la GSIS. Los LCFA-CoA puede unirse a proteínas “target-SNARE” de la membrana plasmática, como SNAP-25, potenciando su fusión con la membrana vesicular. El DAG activa isoformas de proteína cinasa C (PKC) que forman asociaciones reversibles con los gránulos de insulina y el citoesqueleto, lo cual puede incrementar la secreción de insulina. Los TG y FFA pueden influenciar el metabolismo de glicerofosfolípidos de membrana, afectando la secreción de insulina a través de alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de la membrana (Jones PM y Persaud SJ, 1998; Nolan CJ y cols., 2006).

### *Hormonas y neurotransmisores*

Varias hormonas y neurotransmisores influyen sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa y potenciada por otros nutrientes a través de la unión a sus receptores en la membrana plasmática y la subsecuente activación de vías de señalización en las células  $\beta$ .

Las hormonas incretinas GIP y GLP-1 potencian la GSIS, promueven la proliferación e inhiben la apoptosis de las células  $\beta$ , lo cual provoca un aumento en la masa de células  $\beta$ . GLP-1 y GIP incrementan la GSIS a través de la unión con sus receptores acoplados vía proteína G a la adenilato ciclasa (AC) en la membrana plasmática de las células  $\beta$ . Esto activa a la AC, la cual cataliza la formación de AMPc a partir de ATP. El AMPc activa a la enzima proteína cinasa A (PKA), cuya acción de fosforilación de proteínas potencia la secreción de insulina a través del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Drucker DJ, 2006; Jones PM y Persaud SJ, 1998). GLP-1 y GIP también activan vías de señalización independientes de PKA acopladas a factores de intercambio de nucleótidos de guanina regulados por AMPc, particularmente AMPc-GEFII (Epac2), cuya

reducción de expresión génica atenúa el efecto de las incretinas sobre la secreción de insulina (Kashima Y y cols., 2001). Además, GLP-1 induce la expresión génica de la insulina a través de mecanismos dependientes de AMPc que incrementan la expresión del factor de transcripción Pdx1 (gen homeótico pancreático y duodénico 1) y estimulan la unión de Pdx1 al promotor del gen de la insulina. Las acciones proliferativas y antiapoptóticas que ejerce GLP-1 sobre las células  $\beta$  dependen de la expresión de Pdx1 (Drucker DJ, 2006; Miki T y cols., 2005).

La acetilcolina potencia la GSIS a través de su acción sobre la exocitosis de insulina. Su unión al receptor muscarínico m3 acoplado, vía proteína G, a la enzima fosfolipasa C (PLC) activa a esta enzima. La PLC hidroliza al fosfolípido fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ), con lo cual se forma DAG e inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ). El DAG activa a la enzima PCK, lo cual incrementa la eficiencia del  $Ca^{2+}$  sobre la exocitosis de los gránulos de insulina. El  $IP_3$  se une a su receptor en el retículo endoplásmico, provocando la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  y la subsecuente liberación e incremento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  (Ahrén B, 2000; Guilon P y Henquin JC, 2001; Henquin JC y cols., 2003).

Los receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos son receptores acoplados a proteína G cuya activación por agonistas potencia la GSIS a través de la formación de AMPc y la inducción de la expresión de Pdx1, Glut2 y del receptor gama activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ) (Santulli G y cols., 2012).

En cambio, la liberación de noradrenalina inhibe la GSIS. Esto ocurre a través de su unión a los receptores  $\alpha$ 2-adrenérgicos, lo cual hiperpolariza a las células  $\beta$  a través de la apertura de los canales  $K_{ATP}$  y, en consecuencia, inhibe la captación de  $Ca^{2+}$  y el incremento en su concentración necesario para inducir la exocitosis de la insulina. También se ha mostrado que la activación del receptor  $\alpha$ 2-adrenérgico inhibe la secreción de insulina a través de la disminución de la formación de AMPc (Ahrén B, 2000).

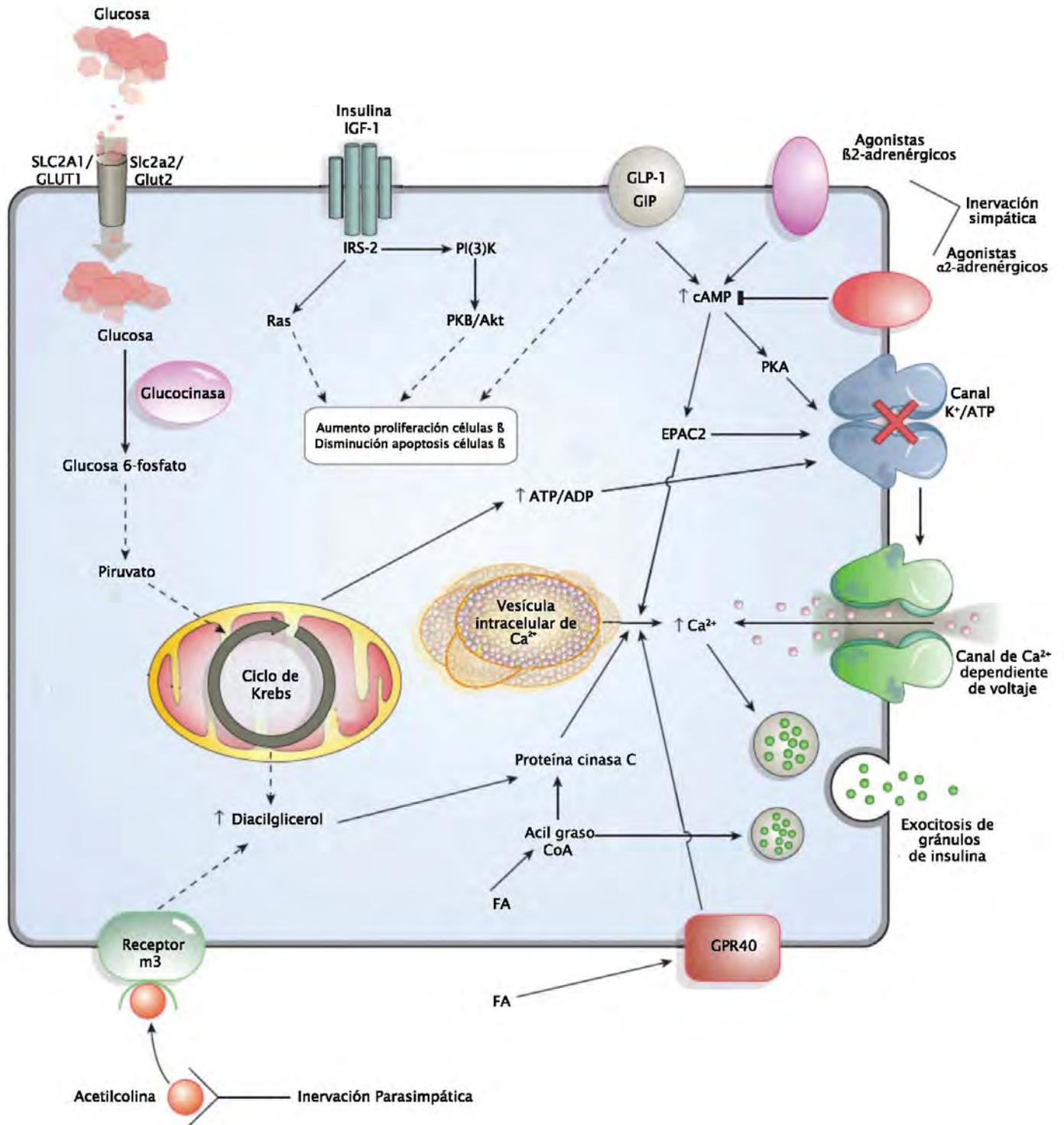


Figura 4. Mecanismos de secreción de la insulina (modificado de Kahn SE y cols., 2006).

Las células  $\beta$  son dinámicas: aumentan y disminuyen en función y masa para regular la secreción de insulina y, en consecuencia, mantener la homeostasis de la glucosa (Bonner-Weir S y cols., 2010).

### ***1.2.1.3 Masa de células $\beta$ pancreáticas***

La masa de células  $\beta$  de un organismo está determinada por el número y tamaño de estas células y regulada por varios mecanismos. La neogénesis (i.e. diferenciación de células precursoras), proliferación o replicación (i.e. división mitogénica de células  $\beta$  existentes) e hipertrofia (incremento del tamaño celular) aumentan la masa de células  $\beta$ . En cambio, esta puede reducirse por muerte celular (principalmente a través de apoptosis) y atrofia (reducción de tamaño celular). La contribución de estos mecanismos al mantenimiento de la masa de células  $\beta$  es variable y cambia en diferentes etapas de la vida (desarrollo intrauterino, etapa postnatal temprana y adulta) y en relación con la adaptación a cambios metabólicos fisiológicos o patológicos.

La masa de células  $\beta$  aumenta en respuesta a cambios metabólicos como los que ocurren en el embarazo y la obesidad. Durante el embarazo, los roedores tienen un incremento aproximado del 50% en su masa de células  $\beta$  causado por una mayor proliferación de estas células, con lo cual se compensa el aumento en la demanda metabólica del feto. Los principales estímulos de la proliferación de las células  $\beta$  son los lactógenos placentarios, la prolactina y la hormona del crecimiento. En los primeros 10 días después del nacimiento, la masa de células  $\beta$  disminuye a niveles normales a través de un incremento en su apoptosis, una disminución en la proliferación y atrofia celular. En contraste, la adaptación del incremento en la masa de células  $\beta$  durante el embarazo en humanos es menor (1.4 veces), no hay cambios en la replicación o apoptosis de las células  $\beta$  y el tamaño de los islotes está disminuido. El aumento de la masa de células  $\beta$  se debe probablemente a la formación de nuevos islotes pequeños. En humanos y roedores, la obesidad también provoca un aumento en la masa de células  $\beta$ . En humanos, es posible que esto se deba a hipertrofia y una mayor proliferación y neogénesis de las células  $\beta$ . Sin embargo, los roedores

desarrollan diabetes y tienen una disminución en su masa de células  $\beta$  debido a un incremento en la apoptosis y reducción de la proliferación. La compensación inadecuada de la expansión de células  $\beta$  predispone a las personas a la falla de las células  $\beta$  y el subsecuente desarrollo de diabetes gestacional o de tipo 2 en caso de obesidad (Ackermann AM y Gannon M, 2007; Butler AE y cols., 2010; Rhodes CJ, 2005).

#### ***1.2.1.4 Acción de la insulina***

La insulina tiene un papel central en la regulación de la homeostasis de la glucosa debido a que estimula su captación, almacenamiento y utilización en los tejidos en respuesta a la elevación de glucosa en sangre, con lo cual disminuye su concentración plasmática.

Esta hormona induce la captación de glucosa en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, inhibe la glucogenólisis hepática (disminución de la actividad de la glucógeno fosforilasa) y favorece la síntesis de glucógeno (activación de la glucógeno sintasa) en el músculo y el hígado. Además, estimula la glucólisis y suprime la gluconeogénesis hepática a través de la inhibición de la actividad de la piruvato carboxilasa y el aumento de fructosa-2,6-bifosfato y de la actividad de la PDH y la fosfofructocinasa.

La insulina limita la disponibilidad de sustratos y activadores gluconeogénicos en el hígado y el riñón (e.g. supresión de ácidos grasos libres y glucógeno) y suprime la secreción de glucagon, lo cual contribuye a la inhibición de la producción de glucosa hepática vía glucogenólisis y gluconeogénesis (Aronoff SL y cols., 2004; Bollen M y cols., 1998; Gerich JE, 2000; Højlund K y Beck-Nielsen H, 2006; Thorens B, 2008).

Además de estas acciones, la insulina tiene otros efectos metabólicos. En el tejido adiposo, estimula la síntesis y almacenamiento de triacilgliceroles e inhibe la lipólisis durante el período postprandial, con lo cual disminuye la concentración de ácidos grasos en la circulación. Esto reduce la disponibilidad

de ácidos grasos como competidores de la glucosa en la producción de energía. La insulina también promueve la síntesis de proteínas en el hígado y músculo y la proliferación, crecimiento y supervivencia celular (Aronoff SL y cols., 2004; Gerich JE 2000; Rhodes CJ y White MF, 2002).

En el estado postabsortivo, la concentración plasmática de insulina disminuye. En este estado, la insulina previene la lipólisis y proteólisis acelerada y permite una captación limitada de glucosa en los tejidos sensibles a insulina (Gerich JE, 1993).

La insulina ejerce sus acciones a través de la unión a su receptor y la subsecuente activación de varias vías de señalización (Figura 5). El receptor de la insulina está constituido por dos subunidades  $\alpha$  extracelulares que contienen los sitios de unión a la insulina y dos subunidades  $\beta$  transmembranales que tienen actividad de proteína tirosina cinasa. La unión de la insulina a su receptor activa a la tirosina cinasa, lo cual provoca la autofosforilación de los residuos de tirosina de las subunidades  $\beta$ . Este evento induce la fosforilación de las proteínas IRS-1 e IRS-2 (sustratos 1 y 2 del receptor de insulina). Los sitios de fosforilación de tirosina de las proteínas IRS se unen a los dominios SH2 (Src-homology-2) de varias moléculas de señalización, incluyendo el fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), la proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento (Grb-2) y la proteína tirosina fosfata 2 que contiene SH2 (SHP-2).

El efecto de la acción de la insulina en las células depende de las moléculas que son expresadas, reclutadas y activadas en las vías de señalización. En el músculo esquelético y el tejido adiposo, la estimulación de la vía PI3K/proteína cinasa B (PKB o Akt) potencia la utilización de la glucosa a través de la regulación de la expresión o localización subcelular (translocación de vesículas intracelulares hacia la membrana plasmática) de los transportadores GLUT4 y GLUT1 y estimula el almacenamiento de glucosa en forma de glucogeno o lípidos (Clarke JF y cols., 1994; Dugani CB y Klip A, 2005; Rhodes CJ y White MF, 2002). La vía PI3K/PKB activa la síntesis de proteínas en la mayoría de los tipos celulares que son regulados por la enzima mTOR (proteína blanco de rapamicina en mamíferos). La activación de la vía Grb-

2/Sos-Ras estimula la transcripción génica a través de la activación de la vía MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos) (Rhodes CJ y White MF, 2002).

Además, la insulina e IGF-1 (factor 1 de crecimiento semejante a insulina) inducen la secreción de insulina a través de la fosforilación de IRS-1 e IRS-2 y la subsecuente activación de las vías PI3K/PKB y Grb2/Sos-Ras (Figura 4). La ausencia de alguno de los receptores de estas hormonas (insulina o IGF-1) en las células  $\beta$  o de IRS-2 provoca una secreción deficiente de insulina. Los sustratos IRS-1 e IRS-2 están implicados en el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, mientras que IRS-2 también promueve la proliferación, neogénesis y supervivencia de las células  $\beta$  (Borge PD Jr y Wolf BA, 2003; Hennige AM y cols., 2003; Rhodes CJ, 2005).

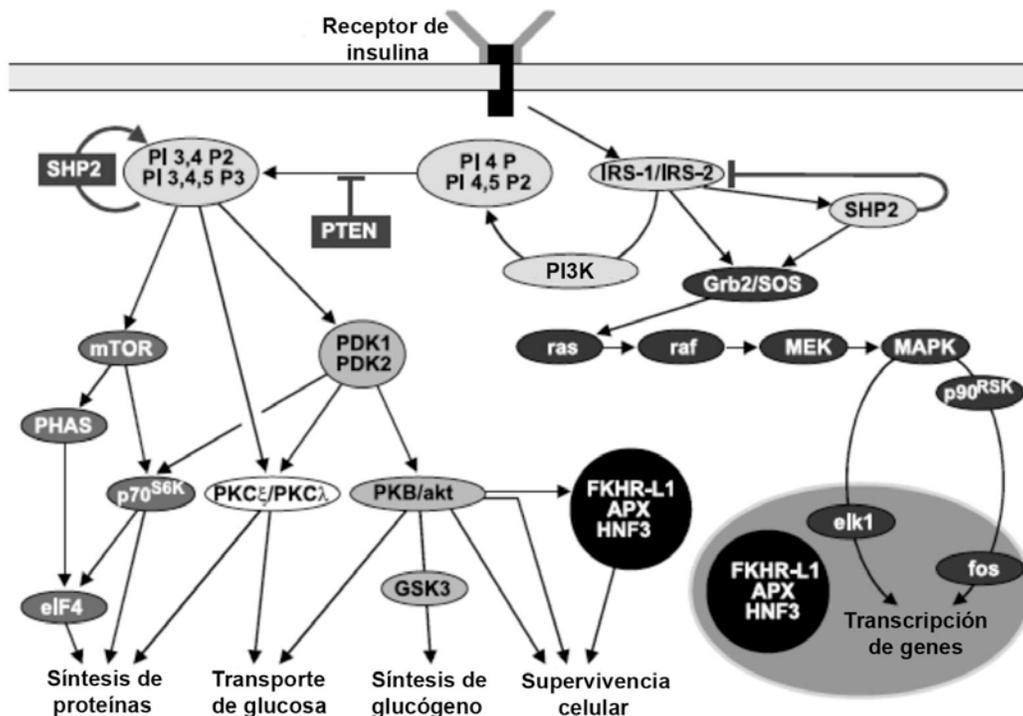


Figura 5. Vías de señalización de la insulina (modificado de Rhodes CJ y White MF, 2002).

### ***1.2.2 Contrarregulación de la homeostasis de la glucosa***

La disminución de la concentración plasmática de glucosa a  $\approx 4$  mM induce la contrarregulación de la homeostasis de la glucosa, i.e. la activación de procesos mediante los cuales el organismo reestablece la euglicemia (Gerich JE, 1993).

La hipoglucemia puede ser detectada por neuronas aferentes de la vena porta hepática y en el sistema nervioso central (hipotálamo y tronco encefálico), el cual induce la respuesta contrarregulatoria a través de la activación de nervios aferentes autónomos que estimulan la secreción de glucagon.

La disminución de la concentración de glucosa en sangre también provoca un incremento en la secreción de adrenalina, hormona del crecimiento y cortisol (Gerich JE, 1993; Marty N y cols., 2007; Thorens B., 2008).

El glucagon promueve la glucogenólisis e inhibe la síntesis de glucógeno en el hígado mediante la activación de la glucógeno fosforilasa e inactivación de la glucógeno sintasa. Además, estimula la gluconeogénesis e inhibe la glucólisis hepática a través de la disminución de la actividad de la PDH, piruvato cinasa y fosfofructocinasa, la activación de la piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxicinas y la inhibición de la formación de fructosa-2,6-bifosfato, aunque no afecta la producción renal de glucosa.

La acción del glucagon está potenciada por la epinefrina, mientras que el cortisol y la hormona del crecimiento promueven la gluconeogénesis a través de la inducción de la síntesis de enzimas y la disponibilidad de precursores de la gluconeogénesis en circulación (Aronoff SL y cols., 2004; Bollen M y cols., 1998; Gerich JE, 1993; Stumvoll M y cols., 1998).

### **1.3 Diabetes mellitus**

La alteración más común de la homeostasis de la glucosa es la diabetes mellitus. Esta se define como un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizado por hiperglucemia crónica en el cual se presentan alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas como consecuencia de una secreción y/o acción deficiente de la insulina. A largo plazo, los individuos con diabetes presentan disfunción de varios órganos (e.g. ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos) y mueren, principalmente, por enfermedades cardiovasculares (American Diabetes Association, 2007; Morrish NJ y cols., 2001).

La diabetes tiene una alta prevalencia mundial (>346 millones de personas). Se estima que >80% de las muertes por complicaciones asociadas a la diabetes ocurren en países con ingresos bajos y medios ( $\approx$ 3.4 millones en 2004) y que éstas se duplicarán en 2030 (Danaei G y cols., 2011; Organización Mundial de la Salud, 2011a). En México, la diabetes está considerada como una de las principales causas de muerte (>77,000 muertes en 2009) (SINAVE/DGE/SALUD, 2009).

El diagnóstico de diabetes puede establecerse a partir de uno de los siguientes criterios (American Diabetes Association, 2007):

1. Síntomas de diabetes (poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicable) y una concentración plasmática casual de glucosa  $\geq$  200 mg/dL (11.1 mM). El término casual se refiere a cualquier hora del día sin considerar el tiempo transcurrido desde la última comida;

2. Concentración de glucosa plasmática  $\geq$  126 mg/dL (7.0 mM) en ayuno (ausencia de ingesta calórica en un período mínimo de 8 h);

3. Concentración de glucosa plasmática  $\geq$  200 mg/dL (11.1 mM) 2 h después de la ingesta de una carga oral de glucosa (75 g de glucosa anhidra disuelta en agua) durante una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT).

Existen individuos que tienen una concentración plasmática alta de glucosa, aunque menor a la establecida en los criterios de diagnóstico de diabetes. Estas personas tienen una concentración plasmática de glucosa en ayuno (FPG)  $\geq 100$  mg/dL (5.6 mM) y  $< 126$  mg/dL (7.0 mM), o bien, presentan valores  $\geq 140$  mg/dL (7.8 mM) y  $< 200$  mg/dL (11.1 mM).

De acuerdo a esto, los individuos con una FPG  $< 100$  mg/dL (5.6 mM) tienen una concentración plasmática normal de glucosa en ayuno; si los valores de FPG están entre 100 y 125 mg/dL (5.6-6.9 mM), las personas presentan una concentración alterada de glucosa en ayuno (IFG) y si la FPG es  $\geq 126$  mg/dL (7.0 mM), se realiza un diagnóstico provisional de diabetes, el cual debe ser confirmado de acuerdo a los criterios descritos anteriormente.

Las categorías en el uso de la OGTT son las siguientes: se considera una tolerancia normal a la glucosa si la concentración plasmática de glucosa 2 h después de la carga oral de glucosa es  $< 140$  mg/dL (7.8 mM); si ésta es de 140-199 mg/dL (7.8-11.1 mM), la tolerancia a la glucosa es deficiente (intolerancia a la glucosa o IGT) y si es  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mM), se diagnostica diabetes provisionalmente y se confirma con los criterios previamente indicados.

La IFG y/o IGT incrementa el riesgo de desarrollar diabetes. Las personas intolerantes a la glucosa mantienen la homeostasis de glucosa en sangre habitualmente y manifiestan hiperglucemia solo cuando son retados con una carga oral de glucosa, como la utilizada en la OGTT (American Diabetes Association, 2007).

La gran mayoría de los casos de diabetes se clasifican en dos categorías etiopatogénicas: diabetes tipo 1 (DT1) y tipo 2 (DT2). La DT1 está caracterizada por una deficiencia absoluta de secreción de insulina, la cual se debe a la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas. En cambio, los individuos con DT2 tienen resistencia a la insulina y una secreción deficiente de esta hormona (American Diabetes Association, 2007). La resistencia a la insulina se define como la incapacidad de una cantidad conocida de insulina exógena o

endógena de insulina para incrementar la captación de glucosa y su utilización en un individuo en comparación con una población normal (Lebovitz HE, 2001).

La actividad secretora individual de las células  $\beta$  y su masa se incrementan inicialmente en respuesta a la resistencia a la insulina para mantener la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, la función y masa de las células  $\beta$  disminuyen progresivamente, lo cual provoca una secreción deficiente de insulina que contribuye al desarrollo de DT2. La reducción de la masa de células  $\beta$  está causada por un incremento en su apoptosis, la cual es mayor que la replicación y neogénesis de estas células. Eventualmente, en los casos más severos de DT2, la reducción de la masa de células  $\beta$  puede ser permanente y los individuos deben ser tratados con una terapia de reemplazo de insulina (Kargar C y Ktorza A, 2008; Matveyenko AV y Butler PC, 2008; Rhodes CJ, 2005).

En las personas con diabetes, la hiperglucemia en ayuno se debe principalmente a la liberación elevada de glucosa hepática formada por gluconeogénesis. La hiperglucemia postprandial excesiva ocurre debido a que la tasa de aparición de glucosa en la circulación sistémica excede la tasa de remoción. Por lo tanto, la aparición excesiva de glucosa en sangre es resultado de la inhibición deficiente de la liberación hepática de glucosa. Esto puede deberse a un incremento en la gluconeogénesis como consecuencia de un retraso en la secreción y disminución de la cantidad de insulina liberada y la deficiencia en la supresión de la secreción de glucagon, aunque la resistencia hepática a la insulina también podría estar involucrada (Bruce D y cols., 1988; Dinneen S y cols., 1992; Gerich JE, 1993; Mitrakou A y cols., 1992; Mitrakou A y cols., 1990). Se ha mostrado que la primera fase de secreción de la insulina es deficiente en las personas con DT2, lo cual indica disfunción de las células  $\beta$  (Henquin JC y cols., 2002). Además, la remoción postprandial de la glucosa de la circulación es inadecuada y, aún cuando hay hiperglucemia, la captación y oxidación de la glucosa en los tejidos es deficiente, la cantidad de glucosa almacenada como glucógeno está reducida y la cantidad de glucosa liberada como lactato y alanina aumenta (Boden G y cols., 1983; Firth RG y cols., 1986; Mitrakou A y cols., 1992; Mitrakou A y cols., 1990). La reducción de la remoción de glucosa de la circulación debido a la resistencia a la insulina y la deficiencia

en la liberación de insulina en respuesta al incremento en la concentración plasmática de glucosa contribuye en la determinación de la magnitud de la hiperglucemia. La remoción de la glucosa de la circulación en una persona con diabetes incluye glucosuria y una captación mayor de glucosa que no es mediada por la insulina en los tejidos debido al exceso en la cantidad de glucosa (Dinneen S y cols., 1992; Gerich JE, 1993).

Las personas con diabetes tienen una mayor oxidación de ácidos grasos. Esto incrementa el contenido de acetil-CoA en la mitocondria y de citrato en el citoplasma. El aumento de acetil-CoA inhibe a la PDH, con lo cual se reduce la oxidación de piruvato y, en consecuencia, su oxidación. La elevación de citrato inhibe a la fosfofructocinasa, lo cual provoca un aumento de glucosa 6-fosfato en el citoplasma. La glucosa 6-fosfato inhibe a la hexocinasa. Esto provoca un aumento de glucosa intracelular y la subsecuente inhibición del transporte (captación) de glucosa. Por lo tanto, la disminución en la supresión de oxidación de lípidos puede alterar la formación de glucógeno debido a la deficiencia en la captación de glucosa. Además, el incremento en la oxidación de lípidos induce la gluconeogénesis. En este sentido, las alteraciones en el metabolismo de lípidos pueden afectar la producción y utilización de la glucosa (Clare JN y cols., 1991; Gerich JE, 1993).

La forma más común de diabetes entre las personas que la padecen es la DT2 (90-95%), mientras que la DT1 tiene una prevalencia de 5-10% (American Diabetes Association, 2007). En 2006, la prevalencia de DT2 en adultos mexicanos mayores de 20 años fue de 14.42% (7.3 millones de personas) (Villalpando S y cols., 2010).

Existen factores genéticos (variaciones en la secuencia génica) y ambientales que incrementan el riesgo de desarrollar DT2. Los factores ambientales incluyen una dieta alta en carbohidratos y lípidos, la obesidad, la falta de actividad física y el bajo peso al nacimiento (Huang TT y Goran MI, 2003; Lithell HO y cols., 1996; World Health Organization, 2011).

#### **1.4 Programación del desarrollo y diabetes tipo 2**

El bajo peso o insuficiencia ponderal al nacimiento (<2.5 Kg) e infantil está asociado con un mayor riesgo de desarrollar intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y DT2 en la vida adulta (Hales CN y cols., 1991; Phipps K y cols., 1993; McCance DR y cols., 1994; Lithell HO y cols., 1996; Ravelli AC y cols., 1998; McKeigue PM y cols., 1998).

Con base en los estudios epidemiológicos que asociaron el bajo peso al nacimiento con la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades como la DT2, hipertensión, enfermedades cardiovasculares y obesidad en la vida adulta, se propuso que estas enfermedades pueden programarse durante el desarrollo intrauterino y postnatal temprano (Warner MJ y Ozanne SE, 2010).

La programación del desarrollo se refiere al proceso mediante el cual un estímulo o insulto ambiental, en un período crítico del desarrollo, induce cambios permanentes o a largo plazo en la estructura y función de órganos y tejidos de un organismo (Lucas A, 1991).

La hipótesis de que el ambiente tiene un papel crucial en la asociación entre el bajo peso al nacimiento y la intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y DT2 es sustentada por estudios realizados en gemelos. En gemelos monocigóticos en los que uno tuvo DT2 y el otro no, el gemelo con diabetes tuvo el menor peso al nacimiento (Poulsen P y cols., 1997; Bo S y cols., 2000). Además, la intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina se asocian con el bajo peso al nacimiento en gemelos adultos, independientemente de que éstos presenten alteraciones genéticas u obesidad (Grunnet L y cols., 2007).

Debido a la dificultad inherente para determinar los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo la programación del desarrollo de la DT2 en humanos, se han generado modelos animales de experimentación que causan restricción intrauterina y/o postnatal temprana del crecimiento. Algunos de estos modelos incluyen los de desnutrición materna (restricción calórica o proteica), insuficiencia uteroplacentaria o exposición fetal a altas dosis de

glucocorticoides, en los cuales la descendencia tiene insuficiencia ponderal al nacimiento e intolerancia a la glucosa y/o diabetes en la vida adulta (Garofano A y cols., 1999; Nyirenda MJ y Seckl JR, 1998; Petry CJ y cols, 2001; Simmons RA y cols., 2001; Warner MJ y Ozanne SE, 2010). Se ha mostrado que la intolerancia a la glucosa y diabetes que presentan las crías al ser adultas es consecuencia, en parte, de una secreción deficiente de insulina causada por un desarrollo inadecuado del páncreas y la subsecuente programación de las células  $\beta$  pancreáticas (Blondeau B y cols., 2001; Garofano A y cols, 1998; Garofano A y cols, 1999; Heywood WE y cols., 2004; Petrik J y cols., 1999; Styrod J y cols., 2005).

### ***1.5 Desarrollo del páncreas y programación de las células $\beta$ pancreáticas***

La fecundación es el inicio del desarrollo de un organismo multicelular. Después de la fecundación, se llevan a cabo los procesos de segmentación y gastrulación. Durante la segmentación, divisiones celulares rápidas hacen que el citoplasma del gameto femenino fecundado (cigoto) forme varias células denominadas blastómeras. En la gastrulación, estas células migran y se reorganizan, generando tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. El endodermo se cierra para formar el intestino primitivo, el cual se regionaliza en intestino anterior, medio y posterior y da origen a los tubos respiratorio y digestivo (esófago, estómago, intestino delgado y grueso). El endodermo forma el revestimiento de ambos tubos y de tres órganos derivados del tubo digestivo que se desarrollan inmediatamente caudales al estómago: hígado, vesícula biliar y páncreas (Cano DA y cols., 2007; Gilbert SF, 2005).

El desarrollo del páncreas es un proceso complejo que comprende una secuencia de eventos morfogenéticos, los cuales conducen a la formación de un órgano maduro y funcional (Spagnoli FM, 2007). El estudio de su desarrollo se ha llevado a cabo principalmente en roedores debido a restricciones éticas y al acceso limitado a tejido humano (Piper K y cols., 2004).

### **1.5.1 Desarrollo pancreático intrauterino en roedores**

El desarrollo *in utero* del páncreas en el ratón y la rata se divide en dos etapas denominadas transición primaria y secundaria (Figura 6).

#### *Transición primaria*

La transición primaria inicia en el día embrionario (E) 8-8.5 en el ratón (E10-10.5 en la rata) con la especificación o determinación de las células endodérmicas del intestino primitivo anterior que formarán el páncreas. En esta etapa se generan 2 primordios pancreáticos: uno dorsal y uno ventral. Estas estructuras forman yemas epiteliales densas rodeadas por mesénquima, las cuales se desarrollan en respuesta a señales de tejidos mesodérmicos adyacentes, como la notocorda, la aorta y el mesodermo cardiogénico.

La yema dorsal se forma posterior al primordio del estómago y cerca de la notocorda. Las señales de la notocorda (e.g. factor 2 de crecimiento de fibroblastos [FGF-2] y ligandos de activina) inducen la especificación de la yema dorsal mediante la inhibición de la expresión de la proteína Sonic Hedgehog (Shh), la cual promueve la formación de órganos adyacentes al páncreas, como el estómago y el duodeno. La notocorda es desplazada por la fusión de los dos primordios de la aorta, cuyas señales también promueven el desarrollo de la yema dorsal. La yema ventral se desarrolla adyacente a los primordios hepático y del conducto biliar en la cara ventral del intestino anterior. La formación de esta yema está inducida por señales de la placa del mesodermo lateral (e.g. activina, proteínas morfogenéticas de hueso [BMP] y ácido retinoico [RA]) y la proteína Hhex (gen de caja homeótica expresado en la hematopoyesis), la cual controla la proliferación de las células endodérmicas ventrales, permitiendo su localización lejos del mesodermo cardiogénico.

Después de la especificación y la formación y crecimiento inicial de las yemas (E9-9.5 en el ratón; E10.5-11 en la rata), el epitelio pancreático interactúa con señales del mesénquima (e.g. factor 10 de crecimiento de fibroblastos [FGF-

10]) para la proliferación, ramificación y diferenciación de las células de los conductos, acinares y endocrinas. El epitelio de las dos yemas se ramifica formando un árbol de conductos (E10.5-11.5 en el ratón; E12-13 en la rata). Ambas estructuras son visibles en el día E12 en el ratón y E14 en la rata.

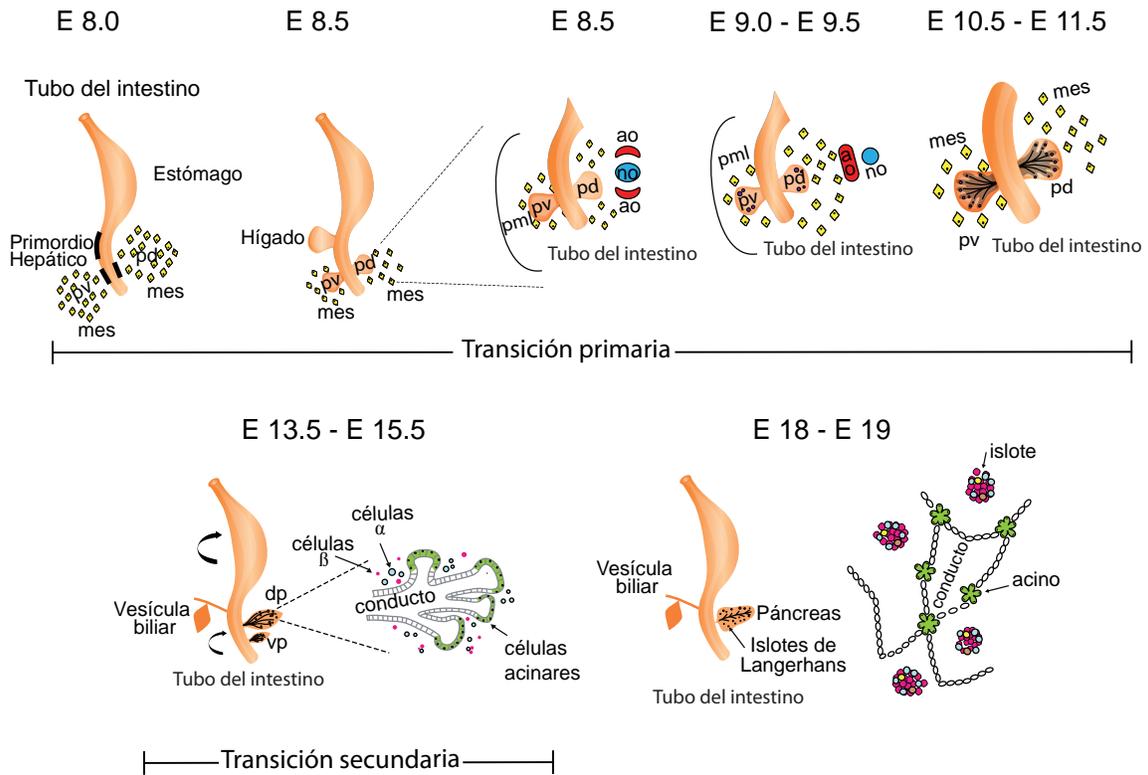
Durante los días E9.5 a E13.5 en el ratón (E11-15 en la rata) se lleva a cabo una primera ola de diferenciación de células endocrinas; algunas de estas células expresan glucagon o insulina, mientras que otras coexpresan ambas hormonas. Se ha propuesto que esta población celular es transitoria y que las células que constituyen los islotes maduros provienen de la segunda ola de diferenciación, la cual ocurre durante la transición secundaria. El ARNm de la somatostatina y polipéptido pancreático también se detecta en las células formadas durante la transición primaria, aunque las proteínas respectivas se detectan hasta los días E15.5 y E16 en el ratón (E17 y 17.5 en la rata).

#### *Transición secundaria*

En la segunda etapa de transición (E13.5-15.5 en el ratón; E15-17 en la rata), las yemas ventral y dorsal giran debido a la rotación del intestino y se fusionan, formando un solo órgano. Las células epiteliales de los conductos (células progenitoras) se diferencian a células acinares, las cuales se organizan en acinos, células de los conductos y células endocrinas. Las células endocrinas se encuentran en forma individual adyacentes a los conductos.

En el día E16 en el ratón (E17.5 en la rata), las células endocrinas migran y comienzan a organizarse en agregados tipo islote. Los islotes se forman completamente hacia el final de la gestación (E18-E19 en el ratón y E19.5-20.5 en la rata; Figura 6). En esta etapa, las células exocrinas y endocrinas diferenciadas tienen una alta actividad proliferativa, lo cual aumenta su masa (Ackermann AM y Gannon M, 2007; Cano DA y cols., 2007; Habener JF y cols.,

2005; Jensen J, 2004; Murtaugh LC, 2007; Piper K y cols., 2004; Slack JMW, 1995; Spagnoli FM, 2007).



**Figura 6.** Desarrollo intrauterino del páncreas en roedores. El día embrionario (E) está indicado para el desarrollo pancreático del ratón. Primordio/yema ventral (pv); primordio/yema dorsal (pd); mesénquima (mes); aorta (ao); notocorda (no).

### 1.5.2 Desarrollo pancreático intrauterino en humanos

El páncreas también se desarrolla a partir de dos primordios pancreáticos, dorsal y ventral, que se originan del endodermo del intestino anterior en los humanos. La diferenciación del páncreas inicia en el día 26 posterior a la concepción (d.p.c.), con la formación y crecimiento del primordio dorsal. El primordio ventral se desarrolla adyacente al primordio del conducto

biliar entre los 30-35 d.p.c. Ambas yemas dorsales están rodeadas por mesénquima y crecen durante el período embrionario. En el día 37 d.p.c. la yema ventral rota a la derecha y luego hacia atrás del primordio duodenal. Al final de este período (56 d.p.c.), el estómago y el duodeno rotan. En consecuencia, la yema ventral y el orificio hepato-pancreático giran hasta estar en contacto y se fusionan con la yema dorsal. En la etapa embrionaria, las células epiteliales del páncreas se organizan como estructuras tubulares dentro del estroma mesenquimal, mientras que, en el período fetal temprano, están como agregados epiteliales ramificados.

Las yemas dorsal y ventral contribuyen a distintas partes del páncreas. La yema ventral forma la parte posterior de la cabeza, o proceso uncinado, mientras que la yema dorsal forma el cuerpo y la cola del páncreas. El conducto ventral se fusiona con la parte distal del conducto dorsal para formar el conducto pancreático principal (conducto de Wirsung) y la parte proximal del conducto dorsal forma un conducto accesorio pequeño denominado conducto de Santorini, el cual se une al duodeno.

La formación de los islotes inicia a las 12-13 semanas después de la concepción (s.p.c.). La insulina y el glucagón se detectan aproximadamente a las 8 s.p.c., aunque la expresión de la insulina inicia antes que la de glucagón. Poco después, se detecta el polipéptido pancreático. Sin embargo, las células positivas a insulina son el tipo celular predominante en humanos durante el desarrollo fetal temprano. A las 10 s.p.c. se detectan los cuatro tipos celulares endocrinos, i.e. las células que expresan insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático (Bocian-Sobkowska J y cols., 1999; Lerch MM y cols., 2006; Piper K y cols., 2004; Slack JMW, 1995; Spagnoli FM, 2007).

### ***1.5.3 Desarrollo postnatal de las células $\beta$ pancreáticas en roedores y humanos***

#### *Maduración funcional de las células $\beta$*

En los roedores, las células  $\beta$  fetales tienen una actividad secretora inmadura caracterizada por una sensibilidad disminuida a la glucosa y una secreción reducida de insulina. Además, en las ratas, la secreción de insulina en respuesta a la glucosa no presenta el patrón bifásico característico de las células  $\beta$  adultas. La maduración de la función de las células  $\beta$  (i.e. aumento en la secreción de insulina en respuesta al aumento en la concentración de glucosa) ocurre en los primeros días de vida postnatal en el ratón y al final del primer mes en la rata. Las células  $\beta$  de las ratas secretan la misma cantidad de insulina a los 6 y 20 días postnatales en respuesta a una concentración de 5.6mM (concentración basal) o 15.6mM (concentración estimuladora) de glucosa. En cambio, a los 28 días, las células  $\beta$  son sensibles a la glucosa, i.e. secretan el doble de insulina en respuesta a una concentración alta de glucosa (15.6mM) en comparación con la concentración basal (Aguayo-Mazzucato C y cols., 2006; Hughes SJ, 1994; Lernmark A y Wenngren BI, 1972).

En contraste, las células  $\beta$  fetales humanas responden a distintas concentraciones de glucosa desde la primera mitad de la gestación, aunque la secreción de insulina presenta un patrón bifásico hasta en la etapa neonatal (Otonkoski T y cols., 1988).

#### *Cambios estructurales de las células $\beta$*

La estructura de las células  $\beta$  (masa, tamaño y número de agregados) cambia en el primer mes de vida postnatal. En las ratas, la masa de células  $\beta$  aumenta entre 2 y 4 veces en los días postnatales (P) 6-20 y continúa incrementándose en la vida adulta. La mayoría de los agregados de células  $\beta$  son pequeños ( $<10,000 \mu\text{m}^2$ ) a cualquier edad; su frecuencia es mayor en el día P6 y similar en el día P20 comparada con la etapa adulta. Además, 25-50% de

los agregados aislados de células  $\beta$  no forman islotes, mientras que el resto se agrupan en estructuras tipo islote, conformadas por un 50-90% de células  $\beta$  (Aguayo-Mazzucato C y cols., 2006).

El incremento de la masa de células  $\beta$  en los roedores se debe a la neogénesis y proliferación de estas células (Nakamura K y cols., 2011). Un estudio mostró que >90% de células  $\beta$  en ratas adultas se forman después del nacimiento por neogénesis (30,000 agregados con un diámetro <50 $\mu$ m y células individuales) y por crecimiento (proliferación) de los agregados (5,500) a un mayor tamaño (Chintinne M y cols., 2010). Además, se mostró recientemente que las células  $\beta$  y otros tipos celulares endocrinos se originan a partir de neogénesis de células progenitoras de conductos durante el crecimiento intrauterino, pero no después del nacimiento debido a que estas células no se localizan en los islotes (Kopine D y Murtaugh C, 2010). La proliferación de las células  $\beta$  disminuye progresivamente desde el día P2 ( $\approx$ 4.7%) hasta el día P31 ( $\approx$ 1.8%) y la etapa adulta ( $\approx$ 0.38%; 5 semanas postnatales). Aproximadamente 1-4% de las células  $\beta$  se replican por día en ratas de 30 a 100 días de edad, mientras que el 1% se replican por día en ratones de 1 año. Esto puede deberse a diferencias en el porcentaje de células que se reclutan para entrar en el ciclo celular. La apoptosis tiene una tasa basal de  $\approx$ 1.5% durante el primer mes después del nacimiento, aunque esta tiene un aumento transitorio ( $\approx$ 3.6%) a los 13 y 17 días. Sin embargo, la tasa de apoptosis es baja, por lo que el efecto total es un aumento marcado del crecimiento de las células  $\beta$ . El incremento en la apoptosis puede estar relacionado con la remodelación de los islotes pancreáticos y/o con cambios en la maduración de la actividad secretora de las células  $\beta$ . En la vida adulta, la neogénesis de células  $\beta$  disminuye y el porcentaje de apoptosis de las células  $\beta$  es bajo, mientras que el tamaño promedio de las células  $\beta$  es estable durante el período postnatal y se incrementa en la etapa adulta (Ackermann AM y Gannon M, 2007; Rhodes CJ, 2005; Scaglia L y cols., 1997).

En humanos de 4 semanas a 21 años de edad se ha mostrado que la masa de células  $\beta$  se incrementa  $\approx$ 30 veces desde el nacimiento y hasta la vida adulta. Este aumento ocurre principalmente por proliferación (88.3%), aunque la

neogénesis contribuye en un 11.7%. La tasa de replicación es mayor durante la infancia (2.6%) y disminuye en la vida adulta ( $\approx 0.1\%$ ), mientras que la tasa de apoptosis es baja en cualquier etapa ( $\approx 0.0025$  células/mm<sup>2</sup> de área de células  $\beta$ ), a diferencia de lo observado en roedores (Meier JJ y cols., 2008).

#### ***1.5.4 Programación del desarrollo de las células $\beta$ pancreáticas***

En modelos animales como los de restricción calórica y proteica materna, insuficiencia uteroplacentaria y exposición fetal a altas dosis de glucocorticoides, se han observado alteraciones morfológicas y funcionales de las células  $\beta$  pancreáticas en la descendencia, i.e. reducción de su masa y deficiencia en la actividad secretora estimulada por glucosa. La programación del desarrollo de estas células resulta en una secreción deficiente de insulina, lo cual contribuye al desarrollo de DT2 en la vida adulta (Blondeau B y cols., 2001; Garofano A y cols, 1998; Garofano A y cols, 1999; Heywood WE y cols., 2004; Petrik J y cols., 1999; Styrud J y cols., 2005).

La programación de las células  $\beta$  puede ser consecuencia del efecto del insulto sobre la embriogénesis pancreática y formación de células precursoras endocrinas en la gestación temprana, la diferenciación de células endocrinas en la segunda transición del desarrollo intrauterino y la expansión de la masa de células  $\beta$  y su maduración funcional al final de la gestación y en la etapa postnatal temprana (Chamson-Reig A y cols., 2006).

La formación de células  $\beta$  por neogénesis y proliferación en la vida adulta es baja en comparación con la gran expansión que ocurre durante el desarrollo intrauterino y postnatal temprano. Por lo tanto, un organismo que nace con una masa reducida de células  $\beta$  es susceptible a desarrollar diabetes debido a que tiene menos células  $\beta$  disponibles para entrar al ciclo celular (Ackermann AM y Gannon M, 2007) y probablemente un menor número de células precursoras que se diferencien a células  $\beta$  en la etapa postnatal temprana y adulta.

#### **1.5.4.1 Modelo de restricción proteica materna**

Los modelos animales de desnutrición materna simulan la situación de los países en desarrollo (i.e. con ingresos económicos bajos y medios), los cuales tienen una alta prevalencia de diabetes ( $\approx 11\%$ ) y de insuficiencia ponderal al nacimiento y durante la infancia (Danaei G y cols, 2011; Organización Mundial de la Salud, 2011b). Esta se atribuye principalmente a la restricción del crecimiento causada por desnutrición intrauterina e infantil, la cual puede ser consecuencia de una alimentación materna insuficiente (restricción calórica) o no balanceada, como una dieta baja en proteínas. En los países en desarrollo, la pobreza limita la cantidad de proteínas consumidas y se estima que, durante el embarazo, su ingesta es menor con respecto a la de países desarrollados (Blössner M y de Onis M, 2005; Symonds ME y cols., 2009).

En el modelo de restricción proteica materna en ratas, los animales son alimentados con dietas bajas en proteínas (dietas isocalóricas con un contenido de 4-10% de proteína vs. 20% de proteína en una dieta control) durante la gestación y lactancia.

En la etapa fetal, las crías de estas ratas tienen bajo peso corporal, una secreción disminuida de insulina en respuesta a una concentración basal de glucosa (5.6 mM), una menor masa y proliferación de células  $\beta$  y una reducción del tamaño y vascularización de los islotes en comparación con el grupo control (Cherif H y cols., 1998; Dumortier O y cols., 2007; Snoeck A y cols., 1990).

Las crías lactantes con restricción proteica materna prenatal y postnatal temprana tienen insuficiencia ponderal al nacimiento y postnatal, reducción del peso del páncreas, de la masa y proliferación de las células  $\beta$ , del tamaño y vascularización de los islotes y del contenido pancreático de insulina, un aumento en la apoptosis de estas células y una secreción deficiente de insulina estimulada por glucosa (Arantes VC y cols., 2002; Bennis-Taleb N y cols., 1999; Heywood WE y cols., 2004; Petrik J y cols., 1999).

Las ratas jóvenes adultas muestran una mayor tolerancia a la glucosa y tienen una menor concentración plasmática de insulina con respecto al grupo control (Shepherd PR y cols., 1997). A los 3-4 meses de edad, las crías con

restricción proteica prenatal y postnatal temprana no presentan alteraciones en la GSIS o tolerancia a la glucosa, excepto cuando son alimentadas con dietas hipercalóricas (Wilson MR y Hughes SJ, 1997). Sin embargo, la vascularización de los islotes permanece reducida (Bennis-Taleb N y cols., 1999). El flujo sanguíneo de los islotes en estado basal es menor en el grupo con restricción proteica prenatal y postnatal en comparación con el del grupo control. En respuesta a una carga de glucosa, el flujo sanguíneo y la concentración plasmática de insulina aumentan y son semejantes en ambos grupos. Sin embargo, el grupo con restricción proteica tiene un mayor incremento de flujo sanguíneo, con lo cual alcanza el mismo nivel que el de las crías control. El aumento de flujo sanguíneo de los islotes en respuesta a la glucosa está influenciado por mecanismos colinérgicos. En las crías con restricción proteica, es posible que estos mecanismos promuevan el incremento elevado de flujo sanguíneo, favoreciendo una liberación adecuada de insulina (Iglésias-Barreira V y cols., 1996; Jansson L y Hellerström C, 1986).

A los 8 meses de edad, la descendencia aún presenta una tolerancia normal a la glucosa y una concentración plasmática de insulina semejante a la del grupo control, aunque tienen una secreción deficiente de insulina en respuesta a una carga oral de glucosa (Bieswal F y cols., 2006). Sin embargo, estas crías desarrollan intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina a los 15 meses de edad y diabetes a los 17 meses (Hales CN y cols., 1996; Ozanne SE y cols., 2003; Petry CJ y cols., 2001).

La restricción proteica materna limitada a la gestación o lactancia también afecta el crecimiento corporal, la función de las células  $\beta$  y la homeostasis de la glucosa.

Las crías con restricción proteica materna prenatal y normalización postnatal de la nutrición (dieta control) tienen una recuperación del crecimiento postnatal. Además, la GSIS y la vascularización y flujo sanguíneo de los islotes se restablecen (Arantes VC y cols., 2002; Bennis-Taleb N y cols., 1999; Heywood WE y cols., 2004; Iglésias-Barreira V y cols., 1996; Zambrano E y cols., 2006). A las 6-9 semanas de edad, estas crías tienen una menor concentración

plasmática de insulina y una mayor tolerancia a la glucosa en comparación con animales control (Langley SC y cols., 1994; Shepherd PR y cols., 1997). La concentración plasmática de insulina se incrementa, aunque la concentración de glucosa es normal y la secreción de insulina en respuesta a una carga oral de glucosa no está alterada a las 36 semanas de edad. Sin embargo, las crías adultas que son alimentadas con una dieta hipercalórica presentan intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Bieswal F y cols., 2006).

La exposición a una dieta materna baja en proteínas durante la lactancia provoca restricción del crecimiento, una disminución en la concentración plasmática de insulina, deficiencia de la GSIS e intolerancia a la glucosa en la vida adulta (Gravena C y cols., 2007; Moura AS y cols., 1997; Moura AS y cols., 1996; Zambrano E y cols., 2006).

Los efectos de la restricción proteica materna limitada a la gestación o lactancia sobre la estructura de las células  $\beta$  están escasamente definidos. Por lo tanto, se evaluó este parámetro en el presente estudio, utilizando como dieta baja en proteínas, una dieta comercial con un contenido de 6% de proteína. Se eligió esta dieta con la finalidad de hacer referencia, principalmente, a las características funcionales de las células  $\beta$  reportadas por Moura AS y cols. (1997) y Gravena C y cols. (2007), los cuales utilizaron una dieta con 4% de proteína, así como a las evaluaciones realizadas por Heywood WE y cols. (2004) y Arantes VC y cols. (2002), en las que se empleó una dieta con 6% de proteína.

La restricción proteica materna prenatal y/o postnatal temprana también afecta la estructura y función de otros órganos y tejidos implicados en la homeostasis de la glucosa, como el hígado, músculo, tejido adiposo y cerebro, cuyas alteraciones pueden promover el desarrollo de diabetes en la vida adulta.

El hígado tiene un peso reducido y la liberación de glucosa estimulada por glucagon es deficiente en este órgano. Además, la actividad de la enzima gluconeogénica fosfoenolpiruvato carboxinasa está incrementada y la de la enzima glucolítica glucocinasa está reducida. La supresión de la liberación

hepática de glucosa por la insulina es baja, aún cuando hay un aumento en la expresión de su receptor.

El músculo esquelético tiene una masa reducida, aunque la sensibilidad a la insulina aumenta en términos de su capacidad para estimular la captación de glucosa en las crías jóvenes adultas (3 meses de edad) debido a un aumento en la cantidad de receptores de insulina. Sin embargo, a los 15 meses de edad, la captación de glucosa estimulada por insulina se reduce, probablemente, como resultado de alteraciones en las vías señalización activadas por la unión de la insulina a su receptor (reducción de expresión de la enzima PKC).

Los adipocitos tienen un tamaño reducido. La captación de glucosa estimulada por insulina está disminuida en estas células, las cuales también presentan resistencia al efecto de la insulina sobre la supresión de la lipólisis. La resistencia a la insulina está asociada con la reducción de la expresión de PI3K y la disminución de la actividad de PKB (Martin-Gronert MS y Ozanne SE, 2007).

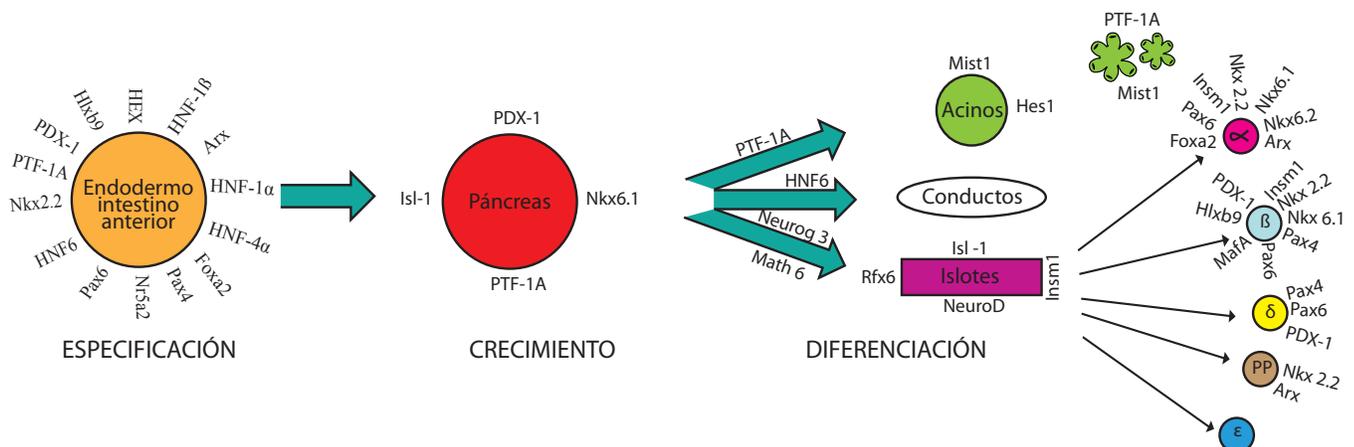
El cerebro de ratas con restricción proteica materna también presenta alteraciones anatómicas y fisiológicas. El número de dendritas y los potenciales sensoriales córtico-cortical y tálamo-cortical están reducidos. Además, el tejido cerebral tiene un aumento de aminas biogénicas con modificaciones en el metabolismo del triptófano. La corteza cerebral tiene una densidad vascular disminuida, la cual permanece reducida en la etapa adulta, independientemente de la dieta impuesta en la lactancia (control o baja en proteínas). Los mecanismos involucrados en las alteraciones vasculares del cerebro y su relación con el aumento en la susceptibilidad a hipoxia, hiperglucemia o hipoglucemia en la etapa adulta se desconocen (Bennis-Taleb N y cols., 1999).

### ***1.5.5 Mecanismos de programación: expresión génica***

Los mecanismos que causan la programación de las células  $\beta$  en la gestación y/o lactancia aún no están totalmente establecidos.

Un ambiente intrauterino y postnatal temprano adverso puede afectar el desarrollo de las células  $\beta$  del feto y neonato a través de modificaciones en la expresión de genes de células pluripotenciales y diferenciadas (Simmons RA, 2007). Por lo tanto, es posible que la programación del desarrollo de las células  $\beta$  se deba, en parte, a alteraciones en la expresión de genes que regulan el desarrollo pancreático y la función de las células  $\beta$ .

La especificación pancreática de las células endodérmicas del intestino anterior, el crecimiento de las yemas pancreáticas, la diferenciación y crecimiento de los distintos tipos celulares que constituyen el órgano están controlados por varios factores transcripcionales (Figura 7) (Habener JF y cols., 2005; Jensen J, 2004; Murtaugh LC, 2007; Smith SB y cols., 2010).



**Figura 7.** Factores de transcripción involucrados en el desarrollo del páncreas.

En este estudio se eligió evaluar la expresión génica de factores de transcripción que participan en la regulación de las distintas etapas del desarrollo pancreático y la síntesis y secreción de insulina (*Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Neurod1*, *Isl1*, *Pax4* y *Nkx6-1*) y de los genes de función de las células  $\beta$  *Ins* (insulina), *Slc2a2* (*Glut2*) y *Kcnj11* (*Kir6.2*).

*Foxa2* (gen de caja forkhead A2) es esencial para el desarrollo del endodermo debido a que las células precursoras que expresan este gen forman células endodérmicas. Este factor también está involucrado en la especificación pancreática de las células del endodermo y se expresa en las células endocrinas y exocrinas a lo largo del desarrollo y en la etapa adulta. *Foxa2* activa la expresión de *Pdx1*, *Hnf4a* y *Hnf1a*, lo cual sugiere que *Foxa2* es un regulador central de esta jerarquía transcripcional (Jensen J, 2004; Shih DQ y cols., 2001). *Foxa2* está implicado en la diferenciación fetal de las células  $\alpha$  y  $\beta$ , en la oscilación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por nutrientes y en la acumulación de los gránulos de insulina cerca de la membrana plasmática (“docking”) a través de la regulación de la expresión de genes como *Mtac2d1* (membrane targeting [tandem] C2 domain containing 1) y *Vabp* (vesicle-associated membrane protein-associated protein B), los cuales posiblemente controlan el movimiento de las vesículas de insulina y las interacciones de las proteínas v-SNARE. Además, *Foxa2* activa la expresión de *Sur1* y *Kcnj11* en las células  $\beta$  maduras (Cerf ME, 2006; Gao N y cols., 2007).

Después de la especificación del endodermo, ciertos genes, incluyendo los factores nucleares de hepatocito (HNF) *Foxa2* (*Hnf3b*), *Hnf1b*, *Hnf1a* y *Hnf4a*, interactúan en las células del endodermo y están involucradas en la regulación de especificación de tejidos derivados del endodermo como el páncreas. A este conjunto de genes se le denomina programa central del endodermo (Jensen J, 2004).

*Hnf1b* (factor nuclear hepático 1, caja homeótica B) está implicado en el desarrollo de las células del endodermo visceral y regula la transcripción de *Hnf1a*, *Hnf4a* y *Pdx1*. En las células  $\beta$ , también regula la expresión de *Ins* y la GSIS (Jensen J, 2004; Wang L y cols., 2004).

*Hnf1a* (factor nuclear hepático 1, caja homeótica A) se expresa en las células precursoras pancreáticas y en las células exocrinas y endocrinas adultas (Jensen J, 2004). *Hnf1a* activa la expresión de *Hnf4a*, *Pdx1*, *Neurod1*, *Slc2a2*, *Pklr* (piruvato cinasa de hígado) e *Ins* en los islotes en desarrollo y maduros.

Además, *Hnf1a* y *Hnf4a* co-regulan su expresión (Boj SF y cols, 2001; Shih DQ y cols., 2001).

*Hnf4a* (factor nuclear hepático 4 alfa) está implicado en el desarrollo del endodermo visceral y se expresa durante el desarrollo pancreático y en el páncreas adulto (Jensen J, 2004). En las células  $\beta$ , *Hnf4a* regula la expresión de genes como *Slc2a2*, *Aldob* (aldolasa B), *Gapdh* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), *Pklr*, la subunidad E1 mitocondrial *Ogdh* (oxoglutarato deshidrogenasa), *Ucp2* (proteína 2 desacoplada), *Ins* y *Kcnj11*, los cuales están involucrados en el transporte de la glucosa, la glucólisis y la secreción de insulina (Erdmann S y cols, 2007; Stoffel M y Duncan SA, 1997).

*Pdx1* (gen homeótico pancreático y duodénico 1) es esencial para la formación del páncreas a partir de células precursoras endodérmicas y se expresa inicialmente en las células epiteliales de los primordios pancreáticos dorsal y ventral. *Pdx1* es necesario para la expansión de las células pancreáticas precursoras después de la formación de las yemas y para la diferenciación de las células endocrinas. Este factor continua expresándose en el epitelio pancreático durante el desarrollo temprano de este órgano, aunque su expresión se restringe a las células  $\beta$  y  $\delta$  diferenciadas. En las células  $\beta$ , *Pdx1* activa la transcripción de *Ins*, *Slc2a2*, *Iapp* (polipéptido amiloide de islotes) y *Nkx6-1* (Cerf ME, 2006; Jensen J, 2004; Wang H y cols., 2001).

*Rfx6* (factor regulador X, 6) se expresa en las células del endodermo durante el desarrollo temprano y, posteriormente, su expresión se restringe a las células pancreáticas y del intestino. En el páncreas, la transcripción de *Rfx6* es activada por el gen pro-endocrino *Neurog3* (neurogenina 3) en las células progenitoras endocrinas y se expresa en todos los tipos celulares de los islotes adultos. *Rfx6* es esencial para la diferenciación de las células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Además, este factor regula la expresión de *Irx2* (gen de caja homeótica iroquois 2), *Arx* (gen de caja homeótica relacionado con aristaless), *Pax6* (gen de caja pareada 6), *Mafa* (proteína A de la familia de oncogen de fibrosarcoma

músculoaponeurótico v-maf), *Neurod1*, *Pdx1* y *Pax4* (Smith SB y cols., 2010; Soyer J y cols., 2010).

*Neurod1* (gen de diferenciación neurogénica 1) es necesario para la diferenciación de las células endocrinas. Durante el desarrollo pancreático, se expresa corriente abajo del gen pro-endocrino *Neurog3* en todas las células de los islotes. La expresión de *Neurod1* precede a la de otros factores transcripcionales endocrinos como *Pax6* e *Isl1* y se restringe principalmente a las células  $\beta$  maduras. En estas células, *Neurod1* está implicado en la transcripción de *Ins* y *Gck* (glucocinasa) y es esencial para el mantenimiento del fenotipo adulto de las células  $\beta$  y una GSIS eficiente (Cerf ME, 2006; Jensen J, 2004; Gu C y cols., 2010).

*Isl1* (gen homeótico Islet 1, homeodominio LIM) está implicado en el desarrollo del endodermo pancreático y la diferenciación de las células endocrinas. Este factor se expresa en el mesénquima pancreático dorsal durante el desarrollo temprano. Sin embargo, su expresión se restringe a las células postmitóticas endocrinas, lo cual sugiere que no está involucrado en la selección de células precursoras endocrinas. *Isl1* activa la transcripción de *Ins*, *Gcg* (glucagon), *Mafa* y *Arx* en las células de los islotes y es necesario para la formación, proliferación y supervivencia de las células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y PP en la transición secundaria del desarrollo pancreático y en la vida postnatal (Du A y cols., 2009; Jensen J, 2004; Liu J y cols., 2011).

*Pax4* (gen de caja pareada 4) se expresa en las yemas pancreáticas dorsal y ventral durante el desarrollo temprano y controla la diferenciación de las células  $\beta$  y  $\delta$ . La pérdida de la función de *Pax4* da lugar a la formación de las células  $\alpha$  y  $\epsilon$ . La expresión de *Pax4* es activada por *Neurog3* en las células precursoras endocrinas y es regulada por *Hnf4a*, *Hnf1a*, *Pdx1* y *Neurod1*. *Pax4* también se expresa en los islotes adultos y regula la masa de células  $\beta$  durante el desarrollo y en la etapa adulta (Brun T y Gauthier BR, 2008; Cerf ME, 2006; Jensen J, 2004; Sosa-Pineda B, 2004).

*Nkx6-1* (gen homeótico NK6 -1) se expresa exclusivamente en las células endodérmicas que forman el páncreas. Este factor se expresa durante el desarrollo de las yemas dorsal y ventral, posterior a la activación de la transcripción de *Pdx1*. Aunque su expresión inicia en una etapa temprana del desarrollo pancreático, sólo se requiere corriente abajo de la selección de células endocrinas para la expansión y diferenciación final de las células  $\beta$  progenitoras. En el páncreas adulto, *Nkx6-1* se expresa sólo en las células  $\beta$ , en las cuales regula la expresión de *Hnf1a* y se requiere para una GSIS adecuada (Donelan W y cols., 2010; Jensen J, 2004; Schisler JC y cols., 2010).

De acuerdo a la función y jerarquía de estos factores de transcripción en el desarrollo pancreático, alteraciones en la expresión de *Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a* y *Hnf4a* probablemente afectan la especificación pancreática de las células endodérmicas y de *Pdx1*, *Rfx6* y *Neurod1*, la formación del páncreas y la diferenciación de las células precursoras endocrinas en la gestación temprana. En cambio, variaciones en la expresión de *Isl1*, *Pax4* y *Nkx6-1* pueden influenciar, principalmente, la diferenciación y crecimiento de las células  $\beta$  y otros tipos celulares endocrinos en la segunda transición del desarrollo intrauterino, al final de la gestación y en la etapa postnatal temprana.

Los cambios de expresión de todos estos factores y de *Ins*, *Slc2a2* y *Kcnj11* también pueden afectar la función de las células  $\beta$ .

Además, variaciones en la secuencia génica de estos factores transcripcionales y de *KCNJ11* pueden causar diabetes en humanos (Barat-Houari M y cols., 2002; Cerf ME, 2006; Jensen J, 2004; Nielsen EM y cols., 2003; Smith SB y cols., 2010; Tabassum R y cols., 2008; Tokuyama Y y cols., 2006; Yokoi N y cols., 2006). En este sentido, cambios en su expresión pueden contribuir a la programación del desarrollo de las células  $\beta$  debido a que son cruciales para su adecuado desarrollo y función.

Los aminoácidos regulan la expresión génica. Por lo tanto, la limitación de su disponibilidad, como consecuencia de la restricción proteica materna, puede alterar la expresión de éstos y otros genes. Por ejemplo, estudios previos

han mostrado que la limitación de aminoácidos, como la que presentan animales con una deficiencia proteica en la dieta, induce la expresión hepática de la proteína IGFBP-1 (proteína 1 de unión al factor de crecimiento semejante a insulina), lo cual está asociado a un retraso en el crecimiento prenatal y postnatal (Fafournoux P y cols., 2000). En roedores con restricción proteica materna, la limitación de la disponibilidad de aminoácidos puede deberse a una actividad disminuida de transportadores de aminoácidos en la placenta (Malandro MS y cols., 1996) y a una reducción en la concentración plasmática materna de varios aminoácidos esenciales (fenilalanina, leucina, isoleucina y valina) (Bhasin KK y cols., 2009).

## **2. Planteamiento del problema**

El modelo animal de restricción proteica materna prenatal y postnatal temprana en ratas ejemplifica el consumo limitado de proteínas en países con bajos ingresos económicos, los cuales tienen una alta prevalencia de diabetes y de insuficiencia ponderal al nacimiento e infantil.

Este modelo es ampliamente utilizado para evaluar la programación prenatal y postnatal temprana de las células  $\beta$  pancreáticas asociada a la susceptibilidad al desarrollo de diabetes tipo 2 en la vida adulta.

No obstante, los efectos de la restricción proteica materna limitada a la gestación o lactancia sobre la estructura de las células  $\beta$  y los mecanismos que causan su programación (i.e. alteraciones estructurales y funcionales) en uno o ambos períodos aún no están totalmente definidos. Su funcionamiento inadecuado y masa reducida causan una secreción deficiente de insulina, la cual contribuye al desarrollo de diabetes tipo 2. Es probable que la programación de las células  $\beta$  esté relacionada con cambios en la expresión de genes cruciales para su diferenciación, crecimiento y función. Por lo tanto, en este estudio se evaluó la estructura de estas células y la expresión, en islotes pancreáticos, de 13 genes involucrados en el desarrollo pancreático, la síntesis y secreción de insulina en las crías de ratas alimentadas con una dieta baja en proteínas durante la gestación y/o lactancia.

El conocimiento de la etiología de la deficiencia en la secreción de insulina causada por un desarrollo inadecuado de las células  $\beta$  puede ser útil en el diseño y evaluación de tratamientos que mejoren su capacidad funcional para disminuir el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2.

### 3. Hipótesis

---

La restricción proteica materna provoca alteraciones estructurales en las células  $\beta$  de la descendencia que son específicas del período de exposición a la dieta baja en proteínas (gestación o lactancia), afectando de manera distinta la capacidad funcional de las células  $\beta$ .

La exposición a una dieta materna con un contenido bajo de proteínas durante la gestación y/o lactancia altera la expresión de los genes *Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Neurod1*, *Isl1*, *Pax4*, *Nkx6-1*, *Ins*, *Slc2a2* y *Kcnj11* en los islotes pancreáticos de la descendencia, lo cual afecta la programación de las células  $\beta$ .

## 4. Objetivos

---

### 4.1 *Objetivo general*

Determinar el efecto de la exposición prenatal y/o postnatal temprana a una dieta materna baja en proteínas sobre la estructura de las células  $\beta$  y la expresión de genes implicados en su desarrollo y función en los islotes pancreáticos de las crías macho lactantes de ratas Wistar.

### 4.2 *Objetivos particulares*

Evaluar el efecto de la restricción proteica materna en la gestación y/o la lactancia a los 7 y 21 días postnatales sobre el peso corporal, las concentraciones séricas de glucosa e insulina, el peso del páncreas, la estructura (fracción, masa, número y tamaño de agregados) y proliferación de las células  $\beta$  y los niveles de ARNm de los genes *Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Neurod1*, *Isl1*, *Pax4*, *Nkx6-1*, *Ins*, *Slc2a2* y *Kcnj11* en islotes pancreáticos.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Animales**

Los procedimientos se realizaron conforme a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y fueron aprobados por el Comité Ético Institucional (CICUAL).

Los animales empleados fueron ratas Wistar (Laboratorios Harlan, México), las cuales tuvieron acceso libre al agua y se mantuvieron a 22-24 °C con ciclos de 12 h de luz y 12 h de obscuridad durante el experimento.

Se aparearon hembras nulíparas de 225-250 g de peso (90-110 días de edad) con machos de 240-260 g de peso.

En el período de apareamiento (6 días), las ratas recibieron una dieta estándar de laboratorio (dieta Chow) y se realizaron frotis vaginales diarios.

Las hembras cuyos frotis mostraron la presencia de espermatozoides se consideraron gestantes (día 1 de gestación), se pesaron y se colocaron en cajas individuales.

Las madres fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta control (dieta "C"; 20% de proteína, TD.91352, Harlan Teklad, Madison, WI, EE.UU.) o una dieta isocalórica baja en proteínas (dieta "R"; 6% de proteína, TD. 90016, Harlan Teklad) durante la gestación (22 madres/grupo).

La composición de ambas dietas se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Componentes de las dietas control y baja en proteínas

	Dieta C (g/Kg)	Dieta R (g/Kg)
Caseína (87g/100g)	230.0	69.0
DL-metionina	3.0	0.9
Sacarosa	431.7	571.8
Almidón de maíz	200.0	200.0
Aceite de maíz	52.3	53.9
Celulosa	37.9	57.8
Mezcla de minerales	13.4	13.4
Fosfato de calcio dibásico	16.7	21.6
Carbonato de calcio	5.1	1.6
Mezcla de vitaminas	10.0	10.0
Etoxiquina (antioxidante)	0.01	0.01
Kcal/g	3.8	3.8

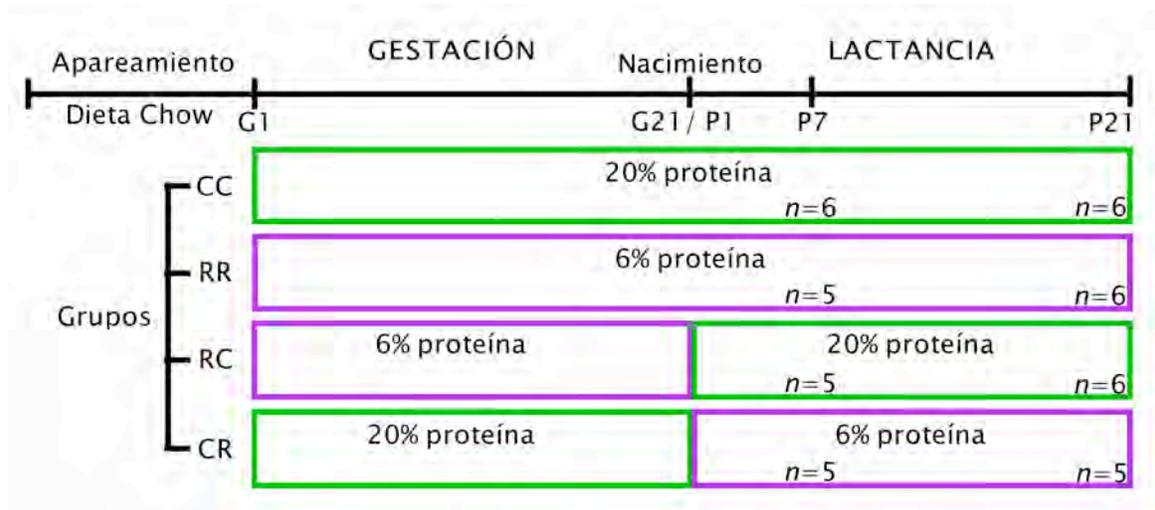
C - dieta control; R - dieta baja en proteínas

La ingesta de comida se midió 3 veces por semana, a las 7:00 h, para calcular la ingesta diaria promedio en la gestación y se registró el peso corporal materno al final de este período. El día del nacimiento, las crías macho fueron pesadas y se contó el número de crías por camada. Cada camada fue ajustada a 10 crías, manteniendo, en lo posible, una relación de 5 machos y 5 hembras.

En la lactancia, algunas madres continuaron recibiendo la misma dieta que en la gestación, mientras que otras tuvieron un cambio de dieta, por lo que se generaron 4 grupos experimentales: CC, RR, RC y CR (Figura 8).

A los 7 (P7) y 21 (P21) días postnatales, se registró el peso corporal materno, se determinó la ingesta diaria promedio de comida y se seleccionaron aleatoriamente 3 machos de cada camada (P7: 5-6 camadas/grupo y P21: 5-6 camadas/grupo; Figura 8). Estas crías se separaron de sus madres, se pesaron y, después de 4 horas de ayuno, se anestesiaron vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (25 µg/g de peso). Su sangre fue recolectada por punción

cardiaca para la obtención de suero y posterior cuantificación de las concentraciones de glucosa e insulina. El páncreas de 1 macho/camada se disecó para su procesamiento histológico y análisis morfométrico y de proliferación de células  $\beta$  y se aislaron los islotes pancreáticos de 2 machos/camada para evaluar la expresión génica.



**Figura 8.** Grupos experimentales generados en el estudio. La evaluación se realizó a los 7 (P7) y 21 (P21) días postnatales en las crías macho de los grupos (1) control (CC; dieta materna control: día 1 de gestación (G1)-P7 ó P21), (2) con restricción proteica prenatal y postnatal (RR; dieta materna baja en proteínas: G1-P7 ó P21), (3) con restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (RC; dieta materna baja en proteínas: G1-día 21 de gestación (G21), dieta materna control: día postnatal 1 (P1)-P7 ó P21) y (4) con restricción proteica postnatal (CR; dieta materna control: G1-G21, dieta materna baja en proteínas: P1-P7 ó P21). Dieta control (C): 20% de proteína; dieta baja en proteínas (R): 6% de proteína. El valor de *n* indica el número de madres o camadas evaluadas en cada fecha.

## 5.2 Cuantificación de glucosa e insulina en suero

La sangre, colectada por punción cardiaca, se dejó coagular durante 30 min y se centrifugó a 280 g por 10 min para separar el suero. Los sueros se almacenaron a -20°C previo a la determinación de las concentraciones de glucosa e insulina.

La concentración de glucosa se determinó a través del método de oxidación enzimática con glucosa oxidasa, utilizando un kit comercial (Randox

Laboratories, Crumlin, Co. Antrim, Reino Unido). El coeficiente de variación intra-ensayo fue < 2%.

La medición de la concentración de insulina se realizó con un ELISA ultrasensible para insulina de rata (MercoDIA, Uppsala, Suecia). El coeficiente de variación intra-ensayo fue < 4%.

### **5.3 *Procesamiento histológico***

Los páncreas fueron disecados y pesados. La cola de cada páncreas se fijó en paraformaldehído 4% - PBS durante 2 h, se deshidrató con soluciones de etanol - H<sub>2</sub>O (30-90%), etanol absoluto y xileno, se incluyó en parafina y se cortó completamente en secciones de 5 µm de espesor. Las secciones se recolectaron en laminillas cargadas con poli-L-lisina, se dejaron secar a 37°C durante la noche y se almacenaron hasta ser procesadas para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

### **5.4 *Análisis morfométrico de las células β pancreáticas***

Para analizar la estructura de las células β, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para insulina en 8 secciones (240 µm de separación) de cada páncreas. Las secciones se desparafinaron, se hidrataron y se incubaron durante 30 min con una solución amortiguadora de bloqueo (BSA 3% - Tween 20 0.1% - TBS). Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo de cobayo anti-insulina (1:200; Dako, Carpinteria, CA, EE.UU.) durante 1 h y con un anticuerpo anti-IgG de cobayo conjugado con HRP (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, CA, EE.UU.) por 1 h a temperatura ambiente. Ambos anticuerpos se diluyeron en solución amortiguadora de bloqueo. La reacción se reveló con diaminobencidina (Dako) y las secciones se contra-tiñeron con hematoxilina y se montaron en medio glycergel (Dako).

El análisis morfométrico consistió en la determinación de la fracción y masa de células β y de la densidad y tamaño de los agregados de células β. El área de las células positivas a insulina y del tejido pancreático de cada sección

se cuantificó a través de mediciones por computadora (Garofano A y cols., 1998), utilizando un microscopio Leica DMRB (Deerfield, IL, EE.UU.) equipado con una cámara de video a color conectada a una computadora Quantimet 500 MC (amplificación en pantalla: 24x) y el software Leica Qwin (Wetzlar, Alemania).

Para la determinación de la fracción de células  $\beta$  (porcentaje de células  $\beta$  en el páncreas), se calculó el cociente del área total de células positivas a insulina y el área total de tejido pancreático. La masa de células  $\beta$  se obtuvo mediante la multiplicación de la fracción de células  $\beta$  por el peso del páncreas y se calculó la masa de células  $\beta$  por unidad de peso corporal. Los agregados de más de 3 células positivas a insulina (diámetro  $> 25 \mu\text{m}$ ) se contaron y midieron en las secciones para determinar el número de agregados de células  $\beta$  por área de tejido pancreático y el tamaño promedio de los agregados de células  $\beta$ .

### ***5.5 Análisis de proliferación de las células $\beta$ pancreáticas***

Para determinar el porcentaje de proliferación de las células  $\beta$ , se realizó la co-localización, por inmunofluorescencia doble, de las proteínas Ki-67 e insulina en 3-6 secciones (240  $\mu\text{m}$  de separación) por páncreas. Las secciones se desparafinaron, se hidrataron y se incubaron en una solución amortiguadora de citratos 10 mM durante 3 min a 90°C en un horno de microondas. Luego de dejar enfriar las secciones, éstas se permeabilizaron con una solución TBS - Tritón 0.3% durante 20 min y se bloquearon con una solución BSA 3% - Tritón 0.3% - TBS por 30 min a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con un anticuerpo de ratón anti-Ki-67 (1:50; BD Pharmingen, CA, EE.UU.) y con el anticuerpo de cobayo anti-insulina (1:100; Dako, Carpinteria, CA, EE.UU.) a 4°C durante la noche. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos anti-IgG de ratón conjugado con Texas Red y anti-IgG de cobayo conjugado con FITC (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, CA, EE.UU.) durante 3 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos se diluyeron en la solución de bloqueo. Las secciones se montaron con medio de montaje para fluorescencia y se observaron en un microscopio Reichert Polyvar (Viena, Austria).

Se contaron, al menos, 50 células que co-localizaran para Ki-67 e insulina en cada páncreas. El porcentaje de proliferación se calculó a partir del cociente del número de células positivas a Ki-67 e insulina y el número total de células positivas a insulina.

## **5.6 Aislamiento de islotes pancreáticos**

Los islotes pancreáticos se aislaron por digestión con colagenasa (Li DS y cols., 2009). Los páncreas se perfundieron con una solución de 1 mg/mL de colagenasa XI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) disuelta en HBSS 1X (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU.). La digestión se llevó a cabo durante 20 min a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se añadió HBSS 1X frío a la suspensión de tejido para detener la digestión. La suspensión se centrifugó a 290 g por 30 s a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El botón se resuspendió en HBSS 1X y se centrifugó nuevamente a 290 g por 30 s a 4°C. Después de retirar el sobrenadante, se añadió una solución de suero fetal bovino (FBS; Gibco-Invitrogen) 10% - HBSS 1X para resuspender el botón. La suspensión se vertió en un filtro de 70 µm (BD Falcon, BD Biosciences, San Diego, CA, EE.UU.) colocado en un tubo de 50 mL para separar los islotes del tejido exocrino. El filtro se colocó invertido sobre una caja Petri y se vertió la solución de FBS 10% - HBSS 1X para desprender los islotes del filtro y recuperarlos en la caja. Los islotes se recolectaron y se lavaron con PBS.

## **5.7 Análisis de expresión génica**

El ARN de los islotes recién aislados se extrajo con el kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE.UU.) y se sintetizaron 200 ng de ADNc mediante transcripción reversa del ARN con el kit SuperScript II (Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU.), utilizando oligonucleótidos hexaméricos aleatorios.

La evaluación de la expresión génica de *Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Neurod1*, *Isl1*, *Pax4*, *Nkx6-1*, *Ins*, *Slc2a2* y *Kcnj11* se hizo a través de

la cuantificación relativa de los niveles de ARNm por PCR cuantitativa (qPCR), empleando el gen *Hprt1* como constitutivo.

Las reacciones se realizaron en un equipo LightCycler 2.0 con sondas de hidrólisis UPL (Universal Probe Library) marcadas con fluoresceína (FAM), oligonucleótidos específicos diseñados con el software ProbeFinder (<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtqpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>) y el kit LightCycler TaqMan Master (Roche Applied Science, Hague Road, IN, EE.UU.). Las secuencias de los oligonucleótidos y la sonda utilizada para cada gen se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos y sondas utilizados en el ensayo de qPCR

Gen	Secuencia de referencia	Oligonucleótido sentido (5'-3')	Oligonucleótido anti-sentido (3'-5')	Sonda UPL
<i>Foxa2</i>	NM_012743.1	CCAGACAACGCGAGTCCT	ACGGCTCCCAGCATACTTT	95
<i>Hnf1b</i>	NM_013103.1	AGAGCCCAGGCAGTCACA	GGGGGCTCCTGCTTATGT	107
<i>Hnf1a</i>	NM_012669.1	TCAGCACCAGTCCCACAGT	ATGACACCGTGGTTGGATG	83
<i>Hnf4a</i>	NM_022180.1	CAAGAGGTCCATGGTGTTC	CCGAGGGACGATGTAGTCAT	68
<i>Pdx1</i>	NM_022852.3	TAAGGCCTGGCTTGTAGCTC	TAAGGCCTGGCTTGTAGCTC	68
<i>Rfx6</i>	NM_001106388.1	GGGAGCTTCAATTCCTCAGT	TGTGCCTCTGGGTAGTTTATATTG	68
<i>Neurod1</i>	NM_019218.2	ACGCAGAAGGCAAGGTGT	TTTGGTCATGTTTCCACTTCC	1
<i>Isl1</i>	NM_017339.3	AGCAACCCAACGACAAAAC	CCATCATGTCTCTCCGGACT	83
<i>Pax4</i>	NM_031799.1	CAAGGCTCCCAGTGTATCCT	GAAGAGCTGGAGCCAAAACA	130
<i>Nkx6-1</i>	NM_031737.1	GAGAAGACTTTCGAACAAACGAA	CGATTCTGGAACCAGACCTT	126
<i>Ins</i>	NM_019129.2	GACCTTGGCACTGGAGGTT	CCAGTTGGTAGAGGGAGCAG	29
<i>Slc2a2</i>	NM_012879.2	TTTCTGTGCCGTCTTCATGT	CCGTCATGCTCACATAACTCA	95
<i>Kcnj11</i>	NM_031358.3	TCGTAGGGCTAATGATCAACG	TGCTGAAGATGAGGGTTTCTG	107
<i>Hprt1</i>	NM_012583.2	GGTCCATTCTATGACTGTAGATTTT	CAATCAAGACGTTCTTTCCAGTT	22

*Foxa2*, gen de caja forkhead A2; *Hnf1b*, factor nuclear hepático 1, caja homeótica B; *Hnf1a*, factor nuclear hepático 1, caja homeótica A; *Hnf4a*, factor nuclear hepático 4 alfa; *Pdx1*, gen homeótico pancreático y duodenal 1; *Rfx6*, factor regulador X, 6; *Neurod1*, gen de diferenciación neurogénica 1; *Isl1*, gen homeótico Islet 1, homeodominio LIM; *Pax4*, gen de caja pareada 4; *Nkx6-1*, gen homeótico NK6 -1; *Ins*, insulina; *Slc2a2 (Glut2)*, transportador de glucosa (transporte facilitado) de la familia 2 de transportadores de soluto, miembro 2; *Kcnj11 (Kir6.2)*, canal de potasio de rectificación interna, subfamilia J, miembro 11; *Hprt1*, hipoxantina fosforribosil transferasa 1.

## 5.8 *Análisis estadístico*

Los datos están representados como el promedio  $\pm$  el error estándar. El valor de  $n$  indica el número de madres o camadas evaluadas en cada medición.

El peso corporal inicial y la ingesta de comida de las madres en la gestación se analizaron con la prueba  $t$  de Student. El peso corporal materno al final de la gestación ajustado al tamaño de camada se evaluó con un análisis de varianza univariado. El tamaño de camada y el peso corporal de las crías macho al nacimiento se analizaron con la prueba de Mann-Whitney.

El peso corporal e ingesta de comida de las madres y todos los datos de las crías macho en la lactancia se evaluaron con un ANOVA de 1 vía y la prueba Post-Hoc Games-Howell, excepto por los datos de expresión génica, para los cuales se hizo un ANOVA de 2 vías.

El programa estadístico empleado fue SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Las diferencias se consideraron como significativas con un valor de  $P < 0.05$ .

## 6. Resultados

---

### ***6.1 Efecto de la restricción proteica materna sobre el peso corporal de las madres y el crecimiento de las crías***

La disminución del aporte de proteínas en la dieta materna afectó la ganancia de peso gestacional.

Aunque ambos grupos tuvieron el mismo peso corporal inicial (día 1) y su ingesta de comida y tamaño de camada fueron semejantes, el peso de las madres del grupo con restricción proteica (R) fue 7% menor al de las madres del grupo control (C) en el día 21 de gestación (Tabla 4).

Así mismo, el crecimiento intrauterino de las crías con restricción proteica fue limitado, lo cual se reflejó en la disminución (15%) del peso corporal al nacimiento (Tabla 4).

Durante la lactancia, el peso corporal de las madres y el de sus crías varió en relación con la dieta consumida en este período (Tabla 4):

#### *Restricción proteica pre- y postnatal (RR)*

El peso corporal de las madres alimentadas con la dieta baja en proteínas en la gestación y la lactancia fue aproximadamente 20% menor a los 7 y 21 días de lactancia en comparación con los valores del grupo control (CC) y del grupo con restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (RC).

La ingesta de comida de las madres RR no fue distinta a la de las madres CC o RC en el día 7 de lactancia, aunque disminuyó en un 43% a los 21 días.

La dieta materna baja en proteínas restringió el crecimiento postnatal de las crías RR. Con respecto a las crías CC y RC, éstas fueron 45% más pequeñas a los 7 días de lactancia y su peso fue casi 3 veces menor en el día 21.

#### *Restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (RC)*

El peso corporal y la ingesta de comida fueron semejantes en las madres RC y CC en las dos fechas evaluadas.

Las crías RC tuvieron un crecimiento postnatal similar al de las crías CC; ambos grupos tuvieron el mismo peso corporal a los 7 y 21 días de edad.

#### *Restricción proteica postnatal (CR)*

El consumo de la dieta baja en proteínas durante la lactancia causó una reducción del 20% en el peso corporal y del 40% en la ingesta de comida de las madres CR en comparación con los valores de los grupos CC y RC en el día 21, aunque ambos fueron semejantes en el día 7 postnatal.

Al igual que las crías RR, las del grupo CR tuvieron restricción del crecimiento; su peso disminuyó en un 30% comparado con el del grupo CC en el día 7 postnatal y fue aproximadamente 50% menor en el día 21 con respecto al de las crías CC y RC.

**Tabla 4.** Peso corporal de las madres y de sus crías, ingesta de comida y tamaño de la camada

	GESTACIÓN				
	Día	C	R		
Peso corporal de las madres (g)	1	246.8±2.5	248.6±2.3		
	21	336.8±4.1	313.2±2.4*		
Ingesta de comida de las madres (g/día)		18.0±0.3	18.8±0.4		
Tamaño de la camada (crías/camada)		11.8±0.2	11.6±0.3		
Peso corporal de las crías al nacimiento (g)		6.0±0.1	5.1±0.1*		
	LACTANCIA				
	Día	CC	RR	RC	CR
Peso corporal de las madres (g)	7	268.5±5.0	228.5±7.2*	266.7±7.2†	261.4±5.0†
	21	259.1±8.8	210.5±4.8*	261.3±5.2†	203.5±7.0*‡
Ingesta de comida de las madres (g/día)	7	23.4±1.0	18.1±1.9	25.8±2.4	23.3±1.3
	21	44.6±1.7	25.3±0.6*	43.5±1.6†	25.3±1.0*‡
Peso corporal de las crías (g)	7	13.7±0.5	7.4±0.5*	13.1±0.8†	9.7±1.0*
	21	38.2±2.4	13.2±0.5*	37.1±1.8†	17.6±1.8*‡

Los datos están representados como el promedio ± el error estándar. Grupos control (C) y con restricción proteica (R) en la gestación:  $n = 22$ /grupo. CC, grupo control; RR, grupo con restricción proteica en la gestación y la lactancia; RC, grupo con restricción proteica en la gestación y normalización de la nutrición en la lactancia; CR, grupo con restricción proteica en la lactancia. Día 7 de lactancia: CC,  $n = 6$ ; RR, RC y CR,  $n = 5$ /grupo. Día 21 de lactancia: CC, RR y RC,  $n = 6$ /grupo; CR,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs. C ó CC, † $P < 0.05$  vs. RR y ‡ $P < 0.05$  vs. RC en el mismo día de evaluación.

## ***6.2 Consecuencias de la restricción proteica materna sobre las concentraciones séricas de glucosa e insulina de las crías***

En la tabla 5 se muestran los valores promedio de las concentraciones de glucosa e insulina en suero de los grupos control y con restricción proteica materna.

### *Restricción proteica pre- y postnatal (RR)*

Las crías RR no mostraron cambios significativos en las concentraciones de glucosa o insulina con respecto a las del grupo CC en ninguna de las edades evaluadas.

### *Restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (RC)*

En las crías RC, el cambio postnatal a la dieta control no alteró la concentración de glucosa a los 7 ó 21 días postnatales ni la concentración de insulina en el día 7, aunque ésta fue 65 y 37% mayor a la de las crías CC y RR, respectivamente, al final de la lactancia.

### *Restricción proteica postnatal (CR)*

La concentración de glucosa en ambas edades y la de insulina a los 7 días postnatales de las crías CR fueron semejantes a las de los demás grupos.

Sin embargo, a los 21 días, su concentración de insulina disminuyó aproximadamente en un 45% con respecto a la de los grupos CC y RR, y fue casi tres veces menor que la del grupo RC.

**Tabla 5.** Concentraciones séricas de glucosa e insulina de las crías a los 7 y 21 días postnatales

	Día	CC	RR	RC	CR
Glucosa (mM)	7	6.0±0.5	5.3±0.5	6.2±0.8	4.8±0.5
	21	7.1±0.9	7.1±1.3	7.8±0.5	7.4±1.4
Insulina (pM)	7	38.0±3.8	33.3±3.1	39.7±3.6	39.9±5.5
	21	234.5±24.0	283.5±28.8	387.8±32.4*†	143.2±11.6*†‡

Los datos están representados como el promedio ± el error estándar. CC, grupo control; RR, grupo con restricción proteica prenatal y postnatal; RC, grupo con restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición; CR, grupo con restricción proteica postnatal. Día 7 postnatal: CC,  $n = 6$ ; RR, RC y CR,  $n = 5$ /grupo. Día 21 postnatal: CC, RR y RC,  $n = 6$ /grupo; CR,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs. CC, † $P < 0.05$  vs. RR y ‡ $P < 0.05$  vs. RC de la misma edad.

### **6.3 Alteraciones en el peso del páncreas y la estructura de las células $\beta$ pancreáticas causadas por la restricción proteica materna**

La restricción proteica materna afectó el desarrollo pancreático de las crías, lo cual se reflejó en alteraciones en el peso del páncreas (Figura 9A) y la morfología de las células  $\beta$  (Figura 11).

#### **Peso del páncreas**

##### *Restricción proteica pre- y postnatal (RR)*

Las crías RR tuvieron un crecimiento limitado del páncreas; su peso fue 50 y 60% menor con respecto al del grupo CC a los 7 y 21 días postnatales, respectivamente.

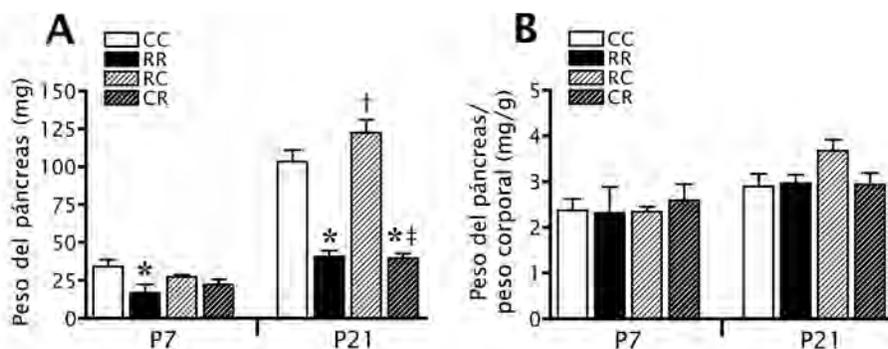
### *Restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (RC)*

La recuperación de la nutrición en la lactancia favoreció el crecimiento del páncreas en las crías RC. Su peso fue significativamente mayor al de las crías RR a los 21 días y similar al del grupo CC en ambas edades.

### *Restricción proteica postnatal (CR)*

El peso del páncreas de las crías CR no se redujo de manera significativa en el día 7 postnatal. Sin embargo, a los 21 días, su peso fue semejante al del grupo RR, es decir, un 60% menor en comparación con el de los grupos CC y RC.

A los 7 y 21 días postnatales, la masa de tejido pancreático por unidad de peso corporal fue semejante en todos los grupos experimentales (Figura 9B).



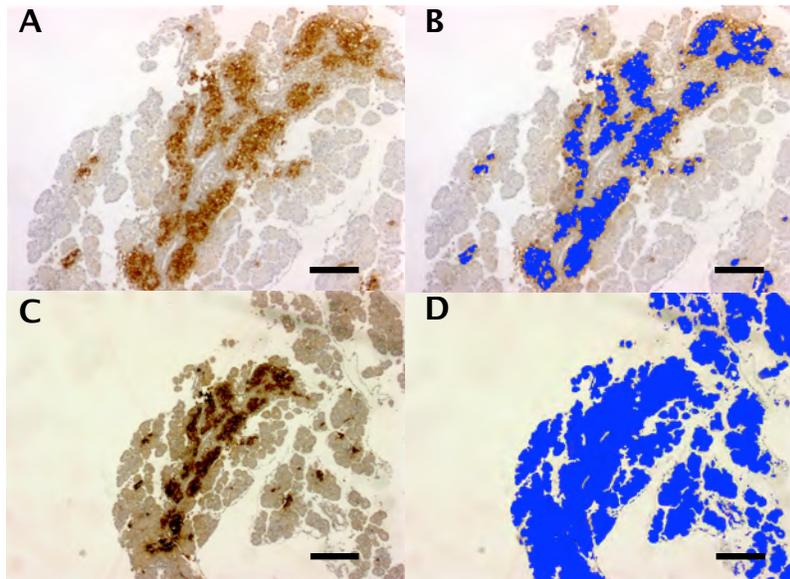
**Figura 9.** Peso del páncreas (A) y peso del páncreas por unidad de peso corporal (B) de las crías control (CC), con restricción proteica prenatal y postnatal (RR), con restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (RC) y con restricción proteica postnatal (CR) a los 7 (P7) y 21 (P21) días postnatales. Los datos están representados como el promedio  $\pm$  el error estándar. P7: CC,  $n = 6$ ; RR, RC y CR,  $n = 5$ /grupo. P21: CC, RR y RC,  $n = 6$ /grupo; CR,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs. CC, † $P < 0.05$  vs. RR y ‡ $P < 0.05$  vs. RC de la misma edad.

## Estructura de las células $\beta$ pancreáticas

La evaluación de la estructura de las células  $\beta$  se realizó mediante un análisis morfométrico por computadora.

En la Figura 10 se muestran imágenes representativas de la detección del área de células positivas a insulina (A-B) y del área de tejido pancreático (C-D). Con los datos de las áreas, se obtuvo el porcentaje células  $\beta$  en el páncreas (fracción de células  $\beta$ ) y la masa de células  $\beta$  (fracción de células  $\beta$  multiplicada por el peso del páncreas).

El análisis morfométrico también incluyó la determinación del número de agregados de células  $\beta$  (agregados de células positivas a insulina con un diámetro  $> 25 \mu\text{m}$ ) y su tamaño promedio.



**Figura 10.** Imágenes representativas del análisis morfométrico por computadora para la evaluación de la estructura de las células  $\beta$  pancreáticas. En cada sección, se obtuvieron imágenes digitales de los agregados de células positivas a insulina (A) y del tejido pancreático (C). El área de las células  $\beta$  (B) y del tejido pancreático (D), así como el número y tamaño de los agregados de células positivas a insulina, se midieron utilizando un software de análisis de imágenes. Barras de escala A y B =  $100 \mu\text{m}$ ; barras de escala C y D =  $200 \mu\text{m}$ .

Los resultados del análisis morfométrico de las células  $\beta$  de los 4 grupos experimentales se muestran en la Figura 11.

En las crías del grupo control (CC), la fracción de células  $\beta$  (Fig. 11A) y el número de agregados de células  $\beta$  (Fig. 11D) disminuyeron del día 7 al 21 de lactancia, mientras que la masa de células  $\beta$  (Fig. 11B) aumentó y el tamaño de los agregados de células  $\beta$  (Fig. 11E) no varió en este período.

La restricción proteica materna alteró la estructura de las células  $\beta$  de las crías. Sin embargo, estas alteraciones ocurrieron de manera específica dependiendo del período de exposición a la dieta baja en proteínas.

#### *Restricción proteica pre- y postnatal (RR)*

En comparación con el grupo CC, las crías RR tuvieron una fracción de células  $\beta$  45 y 25% menor a los 7 y 21 días postnatales, respectivamente, y su masa de células  $\beta$  se redujo en un 70% en ambas edades (Fig. 11A-B). El número y tamaño de agregados de células  $\beta$  (Fig. 11D-E) fue 25% menor a los 7 días postnatales. En el día 21, la cantidad de agregados de células  $\beta$  se incrementó y fue semejante a la del grupo CC, mientras que su tamaño permaneció reducido.

#### *Restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (RC)*

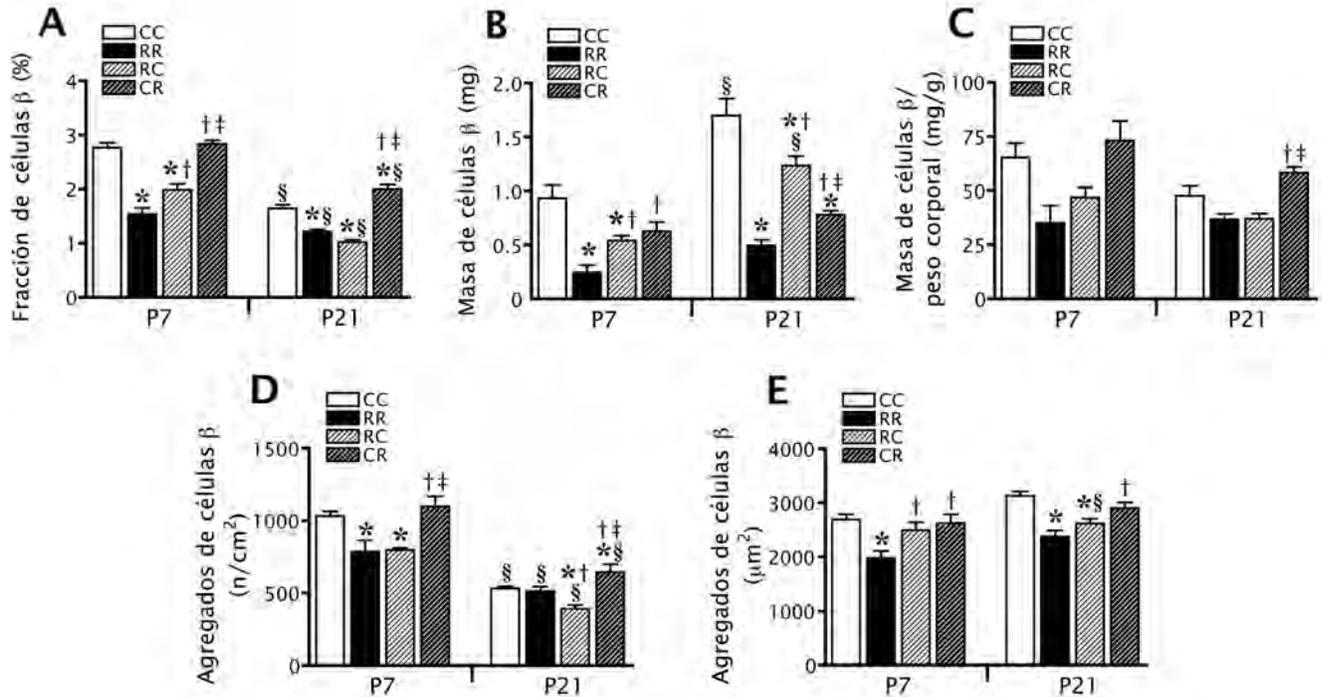
Con respecto al grupo CC, las crías RC mostraron una disminución del 30-40% en la fracción y masa de células  $\beta$  a los días 7 y 21 de lactancia (Fig. 11A-B). El número de agregados de células  $\beta$  fue 25% menor en ambas edades y su tamaño se redujo en un 16% en el día 21 postnatal (Fig. 11C-D).

En comparación con las crías con restricción proteica prenatal y postnatal (RR), la recuperación de la nutrición materna en la lactancia provocó un incremento en la masa de células  $\beta$  de las crías RC en ambas edades y de la fracción y tamaño de agregados de células  $\beta$  en el día 7 de lactancia.

### Restricción proteica postnatal (CR)

La exposición a la dieta baja en proteínas en la lactancia provocó la disminución (45%) de la masa de células  $\beta$  en las crías CR con respecto a las crías CC en el día 21 postnatal (Fig. 11B), mientras que la fracción de células  $\beta$  y el número de agregados de células  $\beta$  se incrementó en un 20% (Fig. 11A,D) y el tamaño de agregados de células  $\beta$  no varió (Fig. 11E).

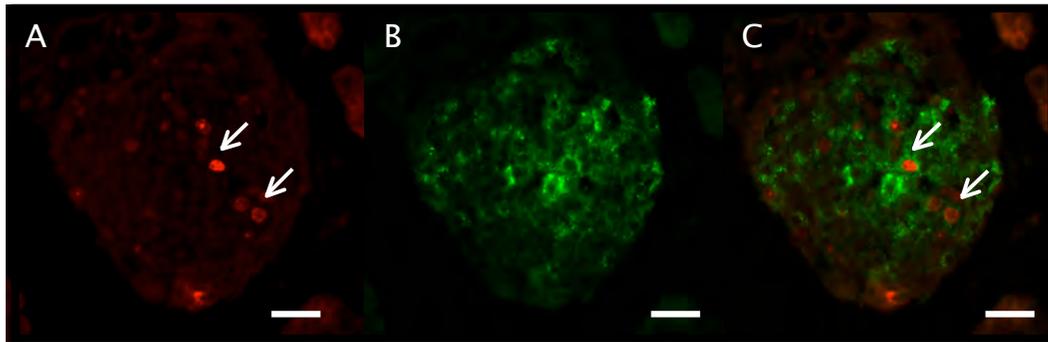
La masa de células  $\beta$  relativa al peso corporal no fue distinta entre los grupos (Fig. 11C).



**Figura 11.** Morfología de las células  $\beta$  de las crías control (CC), con restricción proteica prenatal y postnatal (RR), con restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (RC) y con restricción proteica postnatal (CR) a los 7 (P7) y 21 (P21) días postnatales. (A) Porcentaje de células  $\beta$  en el tejido pancreático (fracción de células  $\beta$ ), (B) Masa de células  $\beta$ , (C) Masa de células  $\beta$  por unidad de peso corporal, (D) Número de agregados de células  $\beta$  por área de tejido pancreático, (E) Tamaño promedio de agregados de células  $\beta$ . Los datos están representados como el promedio  $\pm$  el error estándar. P7: CC,  $n = 6$ ; RR, RC y CR,  $n = 5$ /grupo. P21: CC, RR y RC,  $n = 6$ /grupo; CR,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs. CC,  $\dagger P < 0.05$  vs. RR y  $\ddagger P < 0.05$  vs. RC de la misma edad.  $\S P < 0.05$  vs. P7 del mismo grupo.

#### 6.4 Efecto de la restricción proteica materna sobre la proliferación de las células $\beta$ pancreáticas

La reducción del tamaño de los agregados de células  $\beta$  y, en consecuencia, de la masa de células  $\beta$ , puede deberse, en parte, a alteraciones en la proliferación de estas células. Por lo tanto, se realizó la co-localización de la proteína Ki-67 y la insulina por inmunofluorescencia doble (Figura 12) para determinar el porcentaje de proliferación de las células  $\beta$ . La proteína Ki67 se detecta en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2, M), excepto G0, por lo que se utiliza comúnmente como marcador de proliferación (Scholzen T y Gerdes J, 2000).



**Figura 12.** Inmunofluorescencia doble para Ki-67 (A) e insulina (B). Para obtener el porcentaje de proliferación, se determinó el número de células que co-localizaron para Ki-67 e insulina (C) y el número total de células positivas a insulina. Barras de escala = 25  $\mu$ m.

En la Figura 13 se muestra el porcentaje de proliferación de las células  $\beta$  de los cuatro grupos experimentales. En el grupo control (CC), la proliferación disminuyó en un 50% aproximadamente entre los días 7 y 21 postnatales.

##### *Restricción proteica pre- y postnatal (RR)*

La proliferación de las células  $\beta$  en estas crías fue 60 y 50% menor a los 7 y 21 días postnatales, respectivamente, con respecto a los valores del grupo CC.

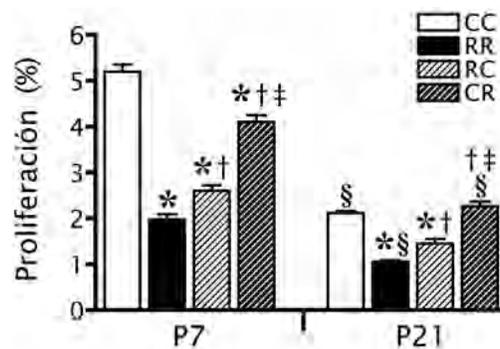
##### *Restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (RC)*

En comparación con el grupo control, la proliferación disminuyó en un 50 y 30% a los 7 y 21 días postnatales, respectivamente, en las crías RC.

No obstante, la proliferación en el grupo RC fue mayor que la del grupo con restricción proteica prenatal y postnatal (RR) en ambas edades.

#### *Restricción proteica postnatal (CR)*

Aunque las crías CR no tuvieron una reducción del tamaño de los agregados de células  $\beta$ , se observó una disminución del 10% en la proliferación de éstas células a los 7 días de edad. Sin embargo, el porcentaje de proliferación fue semejante al del grupo CC en el día 21.



**Figura 13.** Proliferación de las células  $\beta$  de las crías control (CC), con restricción proteica prenatal y postnatal (RR), con restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (RC) y con restricción proteica postnatal (CR) a los 7 (P7) y 21 (P21) días postnatales. Los datos están representados como el promedio  $\pm$  el error estándar. P7: CC,  $n = 6$ ; RR, RC y CR,  $n = 5$ /grupo. P21: CC, RR y RC,  $n = 6$ /grupo; CR,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs. CC, † $P < 0.05$  vs. RR y ‡ $P < 0.05$  vs. RC de la misma edad. § $P < 0.05$  vs. P7 del mismo grupo.

### **6.5 Efecto de la restricción proteica materna sobre la expresión de factores de transcripción y de genes de función de las células $\beta$ pancreáticas**

Las alteraciones estructurales y de proliferación de las células  $\beta$ , así como la deficiencia en su actividad secretora (Cherif H y cols.,1998; Heywood WE y cols.,2004; Moura AS y cols., 1997) causadas por la restricción proteica materna podrían ocurrir, en parte, como consecuencia de variaciones en la expresión de genes involucrados en el desarrollo pancreático y la función de las células  $\beta$ .

Por lo tanto, se cuantificaron los niveles de ARNm de los factores de transcripción *Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Neurod1*, *Isl1*, *Pax4* y *Nkx6-1* y de los genes *Ins*, *Slc2a2* y *Kcnj11* en los islotes pancreáticos de las crías control y con restricción proteica prenatal y/o postnatal.

### **Factores de transcripción**

En los grupos con restricción proteica se calculó la expresión para cada gen relativa a la del grupo CC en la misma edad (Figura 14B-D).

En las crías del grupo control (CC), la expresión de todos los factores de transcripción evaluados disminuyó significativamente entre los días 7 y 21 postnatales (Figura 14A), a excepción de *Pax4*, cuya expresión tendió a disminuir aunque el cambio no fue significativo ( $P = 0.08$ ).

La expresión de *Foxa2*, *Hnf1b*, *Neurod1*, *Pax4* y *Nkx6-1* no fue distinta entre los grupos a los 7 y 21 días postnatales (Figura 14). En cambio, los niveles de ARNm de *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6* e *Isl1* fueron mayores en las crías con restricción proteica con respecto al grupo control en una o ambas edades:

#### *Restricción proteica pre- y postnatal (RR)*

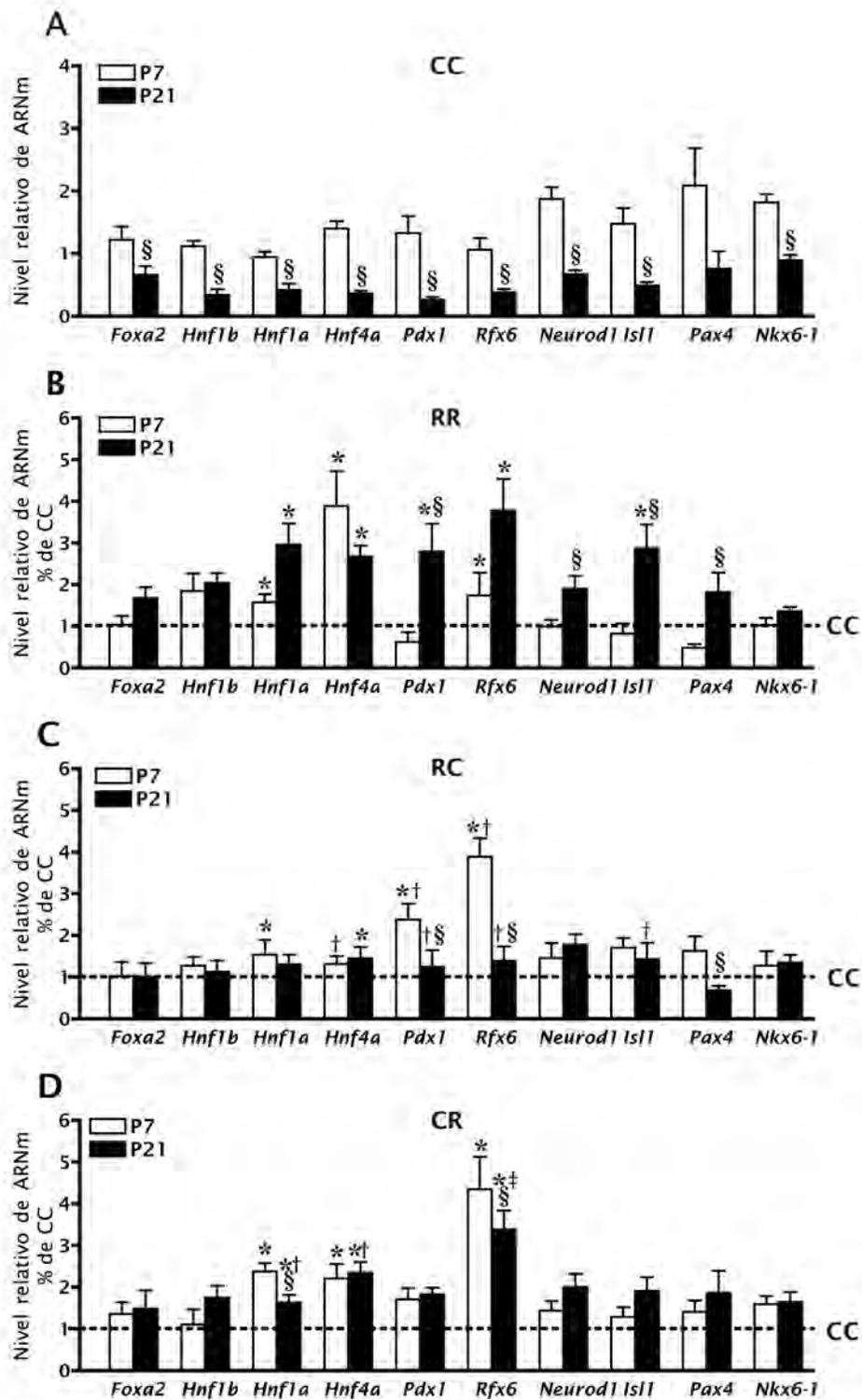
Los niveles de ARNm de *Hnf1a*, *Hnf4a* y *Rfx6* en ambas edades y de *Pdx1* e *Isl1* a los 21 días postnatales se incrementaron en las crías RR (Figura 14B) en comparación con los valores del grupo CC (Figura 14A).

#### *Restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (RC)*

Con respecto al grupo CC, las crías RC mostraron un incremento en la expresión de *Hnf1a*, *Pdx1* y *Rfx6* en el día postnatal 7 y de *Hnf4a* en el día 21 (Figura 14C).

#### *Restricción proteica postnatal (CR)*

Los niveles de ARNm de *Hnf1a*, *Hnf4a* y *Rfx6* fue mayor en las crías CR que en las crías CC (Figura 14D) a los 7 y 21 días de edad.

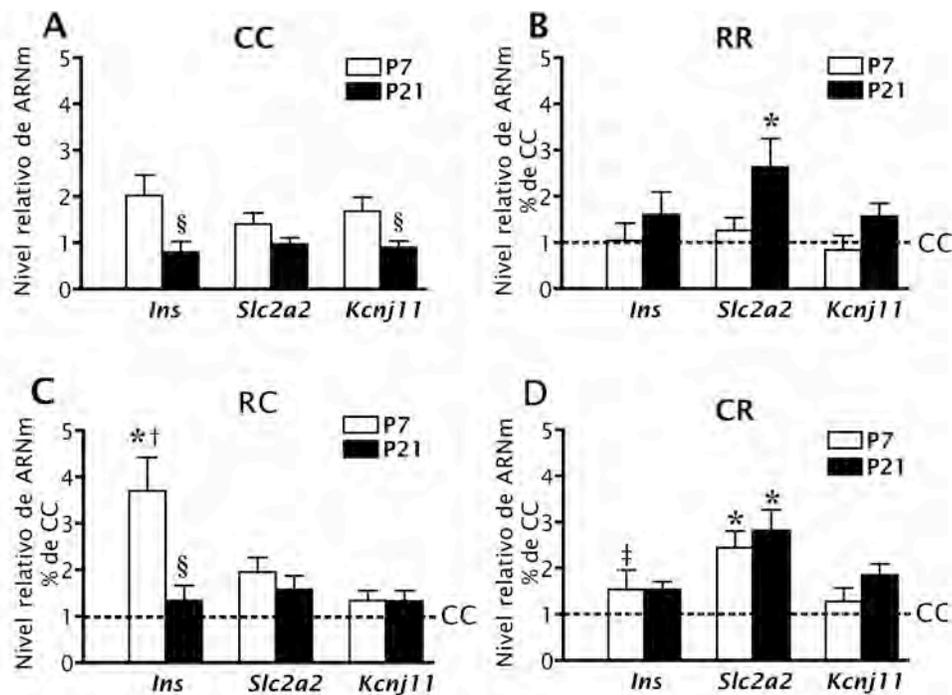


**Figura 14.** Expresión génica de *Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Neurod1*, *Isl1*, *Pax4* y *Nkx6-1* en islotes pancreáticos de las crías control (A), con restricción proteica prenatal y postnatal (B), con restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (C) y con restricción proteica postnatal (D) a los 7 (P7) y 21 (P21) días postnatales. Los valores de ARNm de los grupos con restricción proteica se normalizaron con los valores promedio del grupo CC (línea punteada) en cada edad. Los datos están representados como el promedio  $\pm$  el error estándar. P7: CC,  $n = 6$ ; RR, RC y CR,  $n = 5$ /grupo. P21: CC, RR y RC,  $n = 6$ /grupo; CR,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs. CC, † $P < 0.05$  vs. RR y ‡ $P < 0.05$  vs. RC de la misma edad. § $P < 0.05$  vs. P21 del mismo grupo.

## Genes de función de las células $\beta$ pancreáticas

En la Figura 15 se muestra la expresión de los genes *Ins* (insulina), *Slc2a2* (*Glut2*) y *Kcnj11* (*Kir6.2*) en las crías control y con restricción proteica prenatal y/o postnatal. En las crías control (CC), los niveles de ARNm de *Ins* y *Kcnj11* se redujeron del día 7 al 21 de lactancia, mientras que la expresión de *Glut2* no varió en este período (Figura 15A).

En comparación con las crías CC, la expresión de *Ins* fue mayor a los 7 días postnatales en las crías RC (Figura 15C), mientras que el nivel de ARNm de *Slc2a2* aumentó a los 21 días en las crías RR y en ambas edades en las crías CR (Figura 15B y D). La expresión de *Kcnj11* no se alteró en ningún grupo con restricción proteica.



**Figura 15.** Expresión génica de *Ins* (insulina), *Slc2a2* (*Glut2*) y *Kcnj11* (*Kir6.2*) en los islotes pancreáticos de las crías control (A), con restricción proteica prenatal y postnatal (B), con restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (C) y con restricción proteica postnatal (D) a los 7 (P7) y 21 (P21) días postnatales. Los valores de ARNm de los grupos con restricción proteica se normalizaron con los valores promedio del grupo CC (línea punteada) en cada edad. Los datos están representados como el promedio  $\pm$  el error estándar. P7: CC,  $n = 6$ ; RR, RC y CR,  $n = 5$ /grupo. P21: CC, RR y RC,  $n = 6$ /grupo; CR,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs. CC, † $P < 0.05$  vs. RR y ‡ $P < 0.05$  vs. RC de la misma edad. § $P < 0.05$  vs. P21 del mismo grupo.

## 7. Discusión

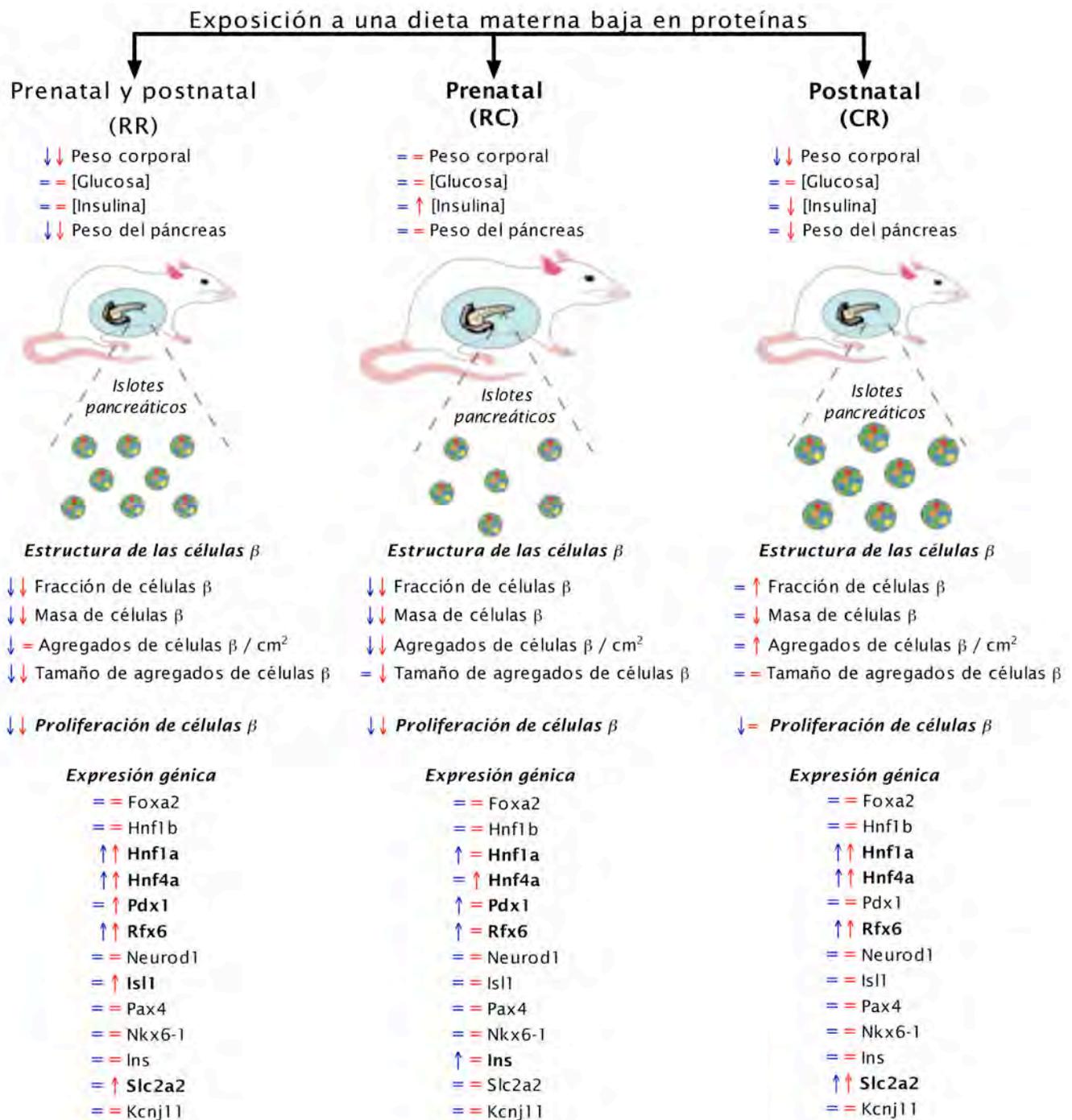
---

La restricción del crecimiento intrauterino y durante la etapa postnatal temprana incrementa el riesgo de desarrollar intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y, eventualmente, diabetes tipo 2 en la vida adulta, de acuerdo a lo observado en varios estudios epidemiológicos (Hales CN y cols., 1991; Lithell HO y cols., 1996; McCance DR y cols., 1994; McKeigue PM y cols., 1998; Phipps K y cols., 1993; Ravelli AC y cols., 1998).

La susceptibilidad a la diabetes tipo 2 en individuos con restricción del crecimiento puede estar relacionada con la disfunción y/o reducción de la masa de las células  $\beta$  pancreáticas (Hales CN y cols., 1991) debido a un desarrollo inadecuado del páncreas.

En modelos animales de restricción del crecimiento intrauterino y postnatal temprano se ha mostrado que un ambiente nutricional inadecuado provoca alteraciones estructurales y funcionales en las células  $\beta$  que favorecen el desarrollo de intolerancia a la glucosa e incrementan la susceptibilidad a la diabetes en la vida adulta (Valtat B y cols, 2011; Tarry-Adkins JL y cols, 2010; Simmons RA y cols., 2001). No obstante, los mecanismos que conducen a la programación de las células  $\beta$  siguen siendo investigados.

En este proyecto se utilizó el modelo de restricción proteica materna durante las etapas prenatal y postnatal temprana en ratas, el cual induce diabetes en sus crías (Petry CJ y cols, 2001), para determinar, durante la vida postnatal temprana, los cambios en la estructura de las células  $\beta$  y la expresión de varios genes implicados en su desarrollo y función como posible mecanismo de programación de las células  $\beta$ . Los resultados obtenidos están representados en la figura 16.



**Figura 16.** Efecto de la restricción proteica materna prenatal y/o postnatal temprana sobre el peso corporal, la concentración en suero de glucosa e insulina, el peso del páncreas, estructura y proliferación de las células β pancreáticas y expresión en islotes pancreáticos de genes implicados en la regulación del desarrollo pancreático y la función de las células β. La evaluación se hizo a los 7 y 21 días postnatales en las crías macho de madres alimentadas con una dieta control y/o baja en proteínas durante la gestación y la lactancia. La flecha “↑” indica aumento, la flecha “↓” indica disminución y el signo “=” indica que no hubo variación con respecto al grupo control (CC). Los signos en color azul representan el día 7 postnatal y los signos en color rojo, el día 21 postnatal.

En este estudio, las crías con restricción proteica materna prenatal y postnatal temprana (RR) tuvieron bajo peso al nacimiento y durante la lactancia, aunque sus concentraciones de glucosa e insulina no se alteraron. Esto es consistente con estudios previos (Petrik J y cols., 1999; Petry CJ y cols, 2001) y muestra que la restricción proteica materna restringió el crecimiento en estas crías y que la homeostasis de la glucosa se mantiene en la vida postnatal temprana. Sin embargo, la descendencia adulta de ratas alimentadas con una dieta baja en proteínas durante la gestación y la lactancia tiene una respuesta disminuida de secreción de insulina en pruebas de tolerancia a la glucosa (Bieswal F y cols., 2008) y desarrollan intolerancia a la glucosa y diabetes (Petry CJ y cols, 2001). La disminución de la respuesta de secreción de insulina en la etapa adulta puede ser consecuencia de una persistente deficiencia de la actividad secretora y reducción de la masa de células  $\beta$ , alteraciones que se originan durante la vida intrauterina y postnatal temprana en estas crías (Cherif H y cols., 1998; Heywood WE y cols., 2004; Petrik J y cols., 1999; Snoeck A y cols., 1990).

La restricción proteica materna prenatal y postnatal (RR) provocó una disminución del peso del páncreas y de la fracción, número y tamaño de agregados de las células  $\beta$ . Estas alteraciones estructurales resultaron en una masa reducida de células  $\beta$ . El peso del páncreas y la masa de células  $\beta$  fueron proporcionales al peso corporal en todos los grupos experimentales. En este sentido, aún cuando la masa de células  $\beta$  es adecuada para el peso corporal en la lactancia, ésta podría no incrementarse en la vida adulta y ser insuficiente para responder a las demandas metabólicas en esta etapa, como ocurre en el modelo de programación por restricción calórica (Garofano A y cols., 1999).

La masa de células  $\beta$  de las ratas adultas se incrementa, en gran medida, después del nacimiento (Chintinne M y cols., 2010) y la maduración de la secreción de la insulina ocurre en la vida postnatal temprana (Aguayo-Mazzucato C y cols., 2006). Cualquier estímulo o insulto en esta ventana crítica del desarrollo puede tener consecuencias a largo plazo sobre la estructura y función de las células  $\beta$ . La restricción proteica materna limitada a la gestación o lactancia afecta el crecimiento corporal, la función de las células  $\beta$  y la

homeostasis de la glucosa (Arantes VC y cols., 2002; Moura AS y cols., 1997; Zambrano E y cols., 2006). Sin embargo, los efectos sobre la estructura de las células  $\beta$  no están completamente establecidos. Por lo tanto, en este estudio se evaluaron las posibles alteraciones estructurales de las células  $\beta$  en las crías con restricción proteica materna prenatal y normalización postnatal de la nutrición (grupo RC) y en las crías con restricción proteica materna postnatal (grupo CR).

Las crías con restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (grupo RC) tuvieron una recuperación postnatal del crecimiento. La concentración de glucosa en suero no se alteró, mientras que la concentración sérica de insulina y su expresión se incrementaron. Sin embargo, la expresión de *Ins* aumentó en el día 7 postnatal y la concentración de insulina, en el día 21. El aumento en la expresión de *Ins* en el día 7 postnatal podría indicar un aumento en la síntesis de esta hormona. Esto favorecería la rápida recuperación del crecimiento que tienen las crías RC después del nacimiento debido a que la insulina actúa como factor anabólico del crecimiento corporal, estimulando la síntesis de proteínas durante el desarrollo intrauterino y neonatal (Davis TA y cols., 2008; Milner RD y Hill DJ, 1984). Debido a que no hay un aumento en el nivel de ARNm de la insulina en el día 21 postnatal, la alta concentración de insulina en suero en esta edad sugiere que el incremento es causado por un desarrollo temprano de resistencia a la insulina. Estudios previos han mostrado que la concentración de insulina está elevada en las crías RC adultas y que éstas desarrollan resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa cuando reciben dietas hipercalóricas (Bieswal F y cols., 2006; Zambrano E y cols., 2006). No obstante, la insulina podría seguir actuando como factor anabólico al final de la lactancia.

El crecimiento del páncreas fue semejante al del grupo control (CC), mientras que todos los parámetros morfológicos evaluados fueron menores en las crías RC con respecto al grupo control CC, pero mayores a los del grupo RR. Aunque la normalización postnatal de la nutrición recuperó parcialmente las alteraciones estructurales de las células  $\beta$  (con respecto al grupo RR), estas persisten después del nacimiento en las crías RC. Esto indica que la

programación de la estructura de las células  $\beta$  ocurre principalmente durante la vida intrauterina.

En contraste, las crías con un desarrollo intrauterino adecuado (dieta control) y restricción proteica postnatal (grupo CR) tuvieron un crecimiento limitado (bajo peso corporal) en la lactancia y una menor concentración de insulina en suero en el día 21 postnatal. La disminución de la concentración de insulina sugiere una o ambas situaciones: (1) en concordancia con el papel de la insulina como factor anabólico en la etapa postnatal temprana, la disminución de su concentración puede ocasionar una menor síntesis de proteínas que resulta en un crecimiento corporal reducido; (2) la baja concentración de insulina refleja una secreción disminuida de la insulina y una mayor sensibilidad de los tejidos blanco a la hormona en estas crías. Estas alteraciones se han observado en las crías adultas con restricción proteica materna en la lactancia (Gravena C y cols., 2007; Moura AS y cols., 1997).

El peso del páncreas y la masa de células  $\beta$  disminuyeron al final de la lactancia en las crías CR en el día 21 postnatal. La disminución de la masa de células  $\beta$  sólo podría atribuirse a la disminución del peso del páncreas y no ser el resultado de alteraciones estructurales de las células  $\beta$ . Esto es debido a que no se observaron cambios morfológicos en la fracción, número y tamaño de agregados que contribuyeran a la reducción de la masa de células  $\beta$  y a que su proliferación sólo disminuyó 10% en el día postnatal 7 con respecto al grupo CC. Se ha reportado que las crías adultas con restricción proteica en la lactancia tienen una concentración elevada de las hormonas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) en suero (Lisboa PC y cols., 2008). Algunos estudios en líneas celulares han mostrado que T3, la hormona metabólicamente activa, promueve la proliferación de las células  $\beta$  (Furuya F y cols., 2010). En este sentido, es probable que la concentración de T3 también esté incrementada en las crías CR durante la lactancia y que esta hormona estimule la proliferación de las células  $\beta$ , resultando en un porcentaje semejante al del grupo CC hacia el final de este período. Por el contrario, en los grupos RR y RC, la fracción, número y tamaño de agregados de células  $\beta$  están disminuidos y, en consecuencia, su masa es menor en comparación con las crías CC. Esta reducción se observa a los 7 y 21

días postnatales y se debe, en parte, a la baja proliferación de estas células en ambas edades.

Estos resultados sugieren que la restricción proteica postnatal (CR) afecta principalmente el crecimiento del páncreas exocrino, disminuyendo en gran medida el peso del páncreas. En cambio, la restricción proteica prenatal, independientemente de la dieta postnatal (RR y RC), tiene efectos deletorios sobre el desarrollo de las células  $\beta$ .

Las alteraciones estructurales y la deficiencia de la actividad secretora de las células  $\beta$  contribuyen al desarrollo de intolerancia a la glucosa y diabetes. Estos defectos pueden ocurrir como consecuencia de cambios en la expresión de genes involucrados en la diferenciación, crecimiento y función de las células  $\beta$ .

De los 13 genes evaluados, la expresión de *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6*, *Ins* y *Slc2a2* se alteró en los islotes pancreáticos de al menos uno de los grupos con restricción proteica materna en una o ambas edades, lo cual sugiere que su expresión está regulada por la disminución de la disponibilidad de aminoácidos. Estos cambios de expresión también podrían ocurrir en otros tipos celulares de los islotes.

De acuerdo a la función que se conoce de *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* y *Slc2a2*, el aumento de su expresión, causado por la restricción proteica materna, podría afectar en el desarrollo pancreático y función de las células  $\beta$  como se describe a continuación.

Los factores de transcripción *Hnf1a* y *Hnf4a* están implicados en el desarrollo del páncreas y regulan la secreción de la insulina, en parte, a través del control de la transcripción del transportador de glucosa *Slc2a2* (Shih DQ y cols., 2001; Boj SF y cols., 2001; Stoffel M y Duncan SA, 1997). Por lo tanto, es posible que la restricción proteica materna afecte la función de las células  $\beta$  a través del aumento en la expresión de *Hnf1a*, *Hnf4a* y *Slc2a2*. El incremento de

la expresión de estos genes podría tener un efecto positivo de adaptación inicial a la limitación de proteínas sobre la función de las células  $\beta$ , manteniendo la secreción de insulina para preservar la glucemia. No obstante, el aumento de la expresión de *Hnf1a* y *Hnf4a* podría tener un efecto negativo sobre la estructura de las células  $\beta$ . Estudios previos han mostrado que el incremento de la expresión de estos factores transcripcionales disminuye la proliferación de las células  $\beta$  e induce su apoptosis, lo cual provoca una reducción de la masa de células  $\beta$  (Luco RF y cols.,2006; Erdmann S y cols.,2007).

El factor de transcripción *Pdx1* es crucial para el desarrollo pancreático, la diferenciación de las células endocrinas y la expresión de la insulina y neogénesis de las células  $\beta$  en la etapa adulta (Holland AM y cols., 2005). En un estudio realizado en una línea de células  $\beta$  se mostró que el incremento de la expresión de *Pdx1* promueve la producción de la insulina sin afectar su expresión génica (Wang H y cols., 2001). En este sentido, la restricción proteica materna podría favorecer la síntesis de insulina y la diferenciación de las células  $\beta$  (y probablemente de otros tipos celulares endocrinos) a través del aumento en la expresión de *Pdx1*.

El factor de transcripción *Rfx6* es esencial para la diferenciación de las células de los islotes pancreáticos durante el desarrollo intrauterino y regula la expresión de factores transcripcionales involucrados en la expresión de la insulina (Soyer J y cols., 2010; Smith SB y cols., 2010). La exposición a la dieta materna baja en proteínas en la gestación y lactancia también podría inducir la neogénesis de las células  $\beta$  y la síntesis de insulina mediante el aumento en la expresión de *Rfx6*.

El factor transcripcional *Isl1* promueve la transcripción de la insulina y la diferenciación, proliferación y mantenimiento de la masa de células endocrinas durante el desarrollo intrauterino y postnatal temprano (Du A y cols., 2009). El incremento de su expresión, inducido por la restricción proteica materna, podría inducir la producción de insulina y la formación y maduración de las células endocrinas, incluyendo las de las células  $\beta$ .

La restricción proteica materna prenatal y postnatal (RR) provocó un aumento en la expresión de *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* y *Slc2a2*, el cual ocurrió o se mantuvo hacia el final de la lactancia. La restricción proteica postnatal (CR) causó un incremento en la expresión de *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Rfx6* y *Slc2a2*, el cual se observó en ambas edades, pero no indujo la expresión de *Pdx1* o *Isl1*. En las crías con restricción proteica prenatal y normalización postnatal de la nutrición (RC), excepto *Hnf4a*, la expresión de *Hnf1a*, *Pdx1*, *Rfx6* e *Ins* aumentó en el día 7 postnatal, aunque fue semejante a la del grupo CC en el día 21. Esto sugiere que su expresión está regulada por la restricción proteica y que ocurre una desensibilización a la limitación de proteínas entre la primera y tercera semana de la lactancia. La restricción proteica impuesta en la etapa prenatal induce su expresión, la cual disminuye al final de la lactancia por la falta de este estímulo después del nacimiento (cambio a la dieta control).

Las ratas con restricción proteica materna durante la gestación y la lactancia (RR) tiene una secreción deficiente de insulina estimulada por glucosa (Heywood WE y cols., 2004), al igual que aquellas con restricción proteica materna en la lactancia (CR) (Moura AS y cols., 2007). Esto contribuye al desarrollo de intolerancia a la glucosa y diabetes que se presenta en estos grupos en la vida adulta (Gravena C y cols., 2007; Petry CJ y cols., 2001). En cambio, la normalización postnatal de la nutrición en las crías con restricción proteica materna prenatal (RC) reestablece la secreción de insulina estimulada por glucosa (Arantes VC y cols., 2002), la cual esta disminuida en la vida fetal (Cherif H y cols., 1998). Esto sugiere que la secreción de insulina en las ratas se programa durante la lactancia. Las células  $\beta$  adquieren una maduración funcional (actividad secretora en respuesta a distintas concentraciones de glucosa) entre los días 20 y 28 de vida postnatal (Aguayo-Mazzucato C y cols., 2006). Por lo tanto, la restricción proteica materna en la lactancia puede afectar esta maduración funcional y resultar en una secreción deficiente de insulina.

Los grupos RR y CR tuvieron un incremento en la expresión de *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Rfx6* y *Slc2a2*, el cual podría ocurrir como un mecanismo de adaptación que mantiene, aunque reducida, la síntesis y secreción de insulina. En las crías RC, aunque la expresión de *Hnf1a* y *Rfx6* aumenta en el día 7 de lactancia, esta disminuye en el día 21; sólo *Hnf4a* tiene una expresión elevada a los 21 días

postnatales. Además, no hay un incremento significativo de la expresión de *Slc2a2*. Esto sugiere que la inducción de su expresión no se requiere en la maduración funcional de las células  $\beta$  hacia el final de la lactancia, como puede ocurrir con las crías con restricción proteica postnatal (RR y CR).

La masa y proliferación de las células  $\beta$  están disminuidas en las crías con restricción proteica prenatal (RR y RC), aún cuando no se impone la restricción proteica en la lactancia (RC). Ambos grupos tuvieron un aumento en la expresión de *Pdx1* y *Rfx6*. Esto sugiere que la restricción proteica prenatal programa el desarrollo intrauterino de las células  $\beta$ , promoviendo la diferenciación de células progenitoras endocrinas para la formación de células  $\beta$  y limitando su proliferación mediante la inducción de la expresión de estos factores de transcripción. Por lo tanto, la restricción proteica limita el crecimiento o expansión de la masa de células  $\beta$  de tal manera que las proteínas pueden ser usadas para el mantenimiento de las células  $\beta$  existentes.

La expresión de *Hnf1a*, *Hnf4a* aumentó en los tres grupos con restricción proteica. Estos factores de transcripción podrían estar involucrados en la diferenciación prematura y disminución de la proliferación de las células  $\beta$  causadas por la restricción proteica prenatal (RR y RC). Sin embargo, la inducción de su expresión podría afectar principalmente la síntesis y secreción de insulina, como se mencionó anteriormente, debido a que la reducción de la masa de células  $\beta$  en las crías con restricción proteica postnatal (CR) no está relacionada con una disminución en la fracción, número o tamaño de agregados y proliferación de las células  $\beta$ .

El aumento en la expresión de *Rfx6* en las crías CR sugiere que, además del efecto que pudiera tener sobre la diferenciación de las células endocrinas, la inducción de su expresión puede favorecer la síntesis de insulina en la etapa postnatal.

En conjunto, los resultados sugieren que el desarrollo de intolerancia a la glucosa causado por la restricción proteica prenatal en la descendencia con normalización postnatal de la nutrición (RC) podría deberse a la masa

disminuida de células  $\beta$ , programada durante la vida intrauterina, y a la resistencia a la insulina que pudiera presentarse desde la etapa postnatal temprana. En cambio, la pérdida de tolerancia a la glucosa en la descendencia con restricción proteica postnatal puede ser causada por la deficiencia en la actividad secretora de las células  $\beta$  (como se ha descrito en estudios previos) y no por alteraciones estructurales de las células  $\beta$ .

La estructura de las células  $\beta$  se programa durante el desarrollo intrauterino, en parte, mediante la inducción de la expresión de *Pdx1* y *Rfx6*, mientras que el aumento en la expresión de *Hnf1a*, *Hnf4a* y *Slc2a2*, aunque también de *Rfx6*, puede influenciar principalmente la función de las células  $\beta$ . La expresión de *Isl1* sólo se induce si la restricción proteica materna ocurre en la gestación y la lactancia (RR). El aumento en su expresión podría favorecer la formación y maduración postnatal de las células endocrinas, incluyendo las de las células  $\beta$ .

## 8. Conclusiones

---

La restricción proteica materna en la gestación, independientemente de la dieta impuesta en la lactancia, reduce la fracción, tamaño y número de agregados de las células  $\beta$  pancreáticas y, en consecuencia, su masa es menor. Esto se debe, en parte, a la disminución de la proliferación de estas células. En cambio, la restricción proteica postnatal tiene un efecto menor sobre la estructura y proliferación de las células  $\beta$ , por lo que la disminución de su masa probablemente refleja el peso reducido del páncreas. Por lo tanto, las alteraciones estructurales de las células  $\beta$ , causadas por la restricción proteica materna, se originan principalmente durante la vida intrauterina.

La restricción proteica materna induce la expresión génica de *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Isl1*, *Ins* y *Glut2* en los islotes pancreáticos de la descendencia. El incremento en la expresión de *Pdx1*, *Isl1*, *Ins* y *Slc2a2* es específico del período de exposición a la dieta baja en proteínas (gestación y/o lactancia), lo cual puede afectar de manera distinta la estructura y función de las células  $\beta$ . El aumento en la expresión de estos genes puede representar un mecanismo de adaptación inicial que mantiene la síntesis y secreción de insulina y que promueve la diferenciación de las células endocrinas, a expensas de su proliferación. Esto asegura la maduración del páncreas endocrino y la homeostasis de la glucosa, aunque resulta en una masa reducida de células  $\beta$ , lo cual puede contribuir a la deficiencia en la secreción de insulina y el subsecuente desarrollo de diabetes en la vida adulta.

Este estudio provee algunos mecanismos potenciales de la programación del desarrollo de las células  $\beta$  que podrán ser útiles la investigación futura y destaca la importancia de las intervenciones nutricionales durante el embarazo y la lactancia para prevenir alteraciones estructurales y funcionales en las células  $\beta$  pancreáticas.

## 9. Perspectivas

---

Este trabajo permitió establecer el efecto de la restricción proteica materna prenatal o postnatal sobre las alteraciones estructurales de las células  $\beta$  y la identificación de varios genes cuya expresión se incrementa en los islotes pancreáticos debido a la limitación de proteínas en la dieta materna.

Sin embargo, se requieren más estudios para evaluar el efecto de la expresión elevada de *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6* y *Slc2a2* sobre la estructura y función de las células  $\beta$  en esta etapa y en la vida adulta.

La expresión de otros genes implicados en el desarrollo pancreático también podría estar afectada, por lo que se deben hacer evaluaciones de expresión de múltiples genes mediante el uso de microarreglos.

## 10. Referencias

---

- Abdelmalik PA, Shannon P, Yiu A, Liang P, Adamchik Y, Weisspapir M, Samoilova M, Burnham WM, Carlen PL.** *Hypoglycemic seizures during transient hypoglycemia exacerbate hippocampal dysfunction.* *Neurobiol Dis* 2007; 26: 646-660.
- Ackermann AM, Gannon M.** *Molecular regulation of pancreatic  $\beta$ -cell mass development, maintenance, and expansion.* *J Mol Endocrinol* 2007; 38: 193-206.
- Aguayo-Mazzucato C, Sánchez-Soto C, Godinez-Puig V, Gutiérrez-Ospina G, Hiriart M.** *Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window.* *PLoS ONE* 2006; 1: e35.
- Ahrén B.** *Autonomic regulation of islet hormone secretion – implications for health and disease.* *Diabetologia* 2000; 43: 393-410.
- Ahrén B, Holst JJ.** *The cephalic insulin response to meal ingestion in humans is dependent on both cholinergic and noncholinergic mechanisms and is important for postprandial glycemia.* *Diabetes* 2001; 50: 1030-1038.
- American Diabetes Association.** *Diagnosis and classification of Diabetes mellitus.* *Diabetes Care* 2007; 30: S42-S47.
- Arantes VC, Teixeira VP, Reis MA, Latorraca MQ, Leite AR, Carneiro EM, Yamada AT, Boschero AC.** *Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation.* *J Nutr* 2002;132:3030-3035.
- Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B, Want L.** *Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon.* *Diabetes Spectr* 2004; 17: 183-190.
- Auer RN.** *Progress review: hypoglycemic brain damage.* *Stroke* 1986; 17: 699-708.
- Barat-Houari M, Clément K, Vatin V, Dina C, Bonhomme G, Vasseur F, Guy-Grand B, Froguel P.** *Positional candidate gene analysis of Lim domain homeobox gene (*Isl-1*) on chromosome 5q11-q13 in a French morbidity obese population suggests indication for association with type 2 diabetes.* *Diabetes* 2002; 51: 1640-1643.
- Bardeesy N, DePinho RA.** *Pancreatic cancer biology and genetics.* *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 897-909.
- Bender K, Maechler P, McClenaghan NH, Flatt PR, Newsholme P.** *Overexpression of the malate-aspartate NADH shuttle member Aralar 1 in the clonal  $\beta$ -cell line BRIN-BDII enhances amino-acid-stimulated insulin secretion and cell metabolism.* *Clin Sci* 2009; 117: 321-330.
- Bennis-Taleb, Remacle C, Hoet JJ, Reusens B.** *A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring.* *J Nutr* 1999; 129: 1613-1619.
- Berner Hansen M, Witte AB.** *The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion.* *Acta Physiol* 2008; 193: 311-323.

- Bhasin KK, van Nas A, Martin LJ, Davis RC, Devaskar SU, Lusic AJ.** *Maternal low-protein diet or hypercholesterolemia reduces circulating essential amino acids and leads to intrauterine growth restriction.* Diabetes 2009; 58: 559-566.
- Bieswal F, Ahn MT, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, Remacle C.** *The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat.* Obesity 2006; 14: 1330-1343.
- Blondeau B, Lesage J, Czernichow P, Dupouy JP, Bréant B.** *Glucocorticoids impair fetal beta-cell development in rats.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2001; 281: E592-E599.
- Blössner M, de Onis M.** *Malnutrition: quantifying the health impact at national and local levels.* Geneva, World Health Organization, 2005 (WHO Environmental Burden of Diseases Series, No. 12).
- Bo S, Cavelli-Perin P, Scaglione L, Ciccone G, Pagano G.** *Low birth weight and metabolic abnormalities in twins with increased susceptibility to Type 2 diabetes mellitus.* Diabet Med 2000; 5: 365-370.
- Bocian-Sobkowska J, Zabel M, Wozniak W, Surdyk-Zasada J.** *Polyhormonal aspect of the endocrine cells of the human fetal pancreas.* Histochem Cell Biol 1999; 112: 147-153.
- Boden G, Roy T, Smith R, Owen O.** *Carbohydrate oxidation and storage in obese noninsulin-dependent diabetic patients: effects of improving glycemic control.* Diabetes 1983; 32: 982-987.
- Boj SF, Párrizas M, Maestro MA, Ferrer J.** *A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells.* Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 14481-14486.
- Bollen M, Keppens S y Stalmans W.** *Specific features of glycogen metabolism in the liver.* Biochem J 1998; 336: 19-31.
- Bonner-Weir S, Li WC, Ouziel-Yahalom L, Guo L, Weir GC, Sharma A.**  *$\beta$ -cell growth and regeneration: replication is only part of the story.* Diabetes 2010; 59: 2340-2348.
- Borge PD Jr, Wolf BA.** *Insulin receptor substrate 1 regulation of sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase3 in insulin-secreting  $\beta$ -cells.* J Biol Chem 2003; 278: 11359-11368.
- Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, Gunawardana S, Liu YJ, Mulvaney-Musa J, Schermerhorn T, Straub SG, Yajima H, Sharp GWG.** *Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion.* Diabetes 2002; 51: S83-S90.
- Brennan L, Shine A, Hewage C, Malthouse JP, Brindle KM, McClenaghan N, Flatt PR, Newsholme P.** *A nuclear magnetic resonance-based demonstration of substantial oxidative L-alanine metabolism and L-alanine-enhanced glucose metabolism in a clonal pancreatic  $\beta$ -cell line: metabolism of L-alanine is important to the regulation of insulin secretion.* Diabetes 2002; 51: 1714-1721.
- Bruce D, Chisholm D, Storlien L, Kraegen E.** *Physiologic importance of deficiency in early prandial insulin secretion in non-insulin dependent diabetes.* Diabetes 1988; 37: 736-744.
- Brun T, Gauthier BR.** *A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet  $\beta$ -cell expansion and survival in health and disease.* J Mol Endocrinol 2008; 40: 37-45.
- Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, Butler PC.** *Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy.* Diabetologia 2010; 53: 2167-2176.

- Cano DA, Hebrok M, Zenker M.** *Pancreatic development and disease.* Gastroenterology 2007; 132: 745-762.
- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A.** *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function.* Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 2334-2339.
- Cerf ME.** *Transcription factors regulating beta-cell function.* Eur J Endocrinol 2006; 155: 671-679.
- Chamson-Reig A, Thyssen SM, Arany E, Hill DJ.** *Altered pancreatic morphology in the offspring of pregnant rats given reduced dietary protein is time and gender specific.* J Endocrinol 2006; 191: 83-92.
- Cherif H, Reusens B, Ahn MT, Hoet JJ, Remacle C.** *Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low-protein diet.* J Endocrinol 1998; 159: 341-348.
- Chevenne D, Trivin F, Porquet D.** *Insulin assays and reference values.* Diabetes Metab 1999; 25: 459-476.
- Chintinne M, Stangé G, Denys B, Veld I, Hellemans K, Piperleers-Marichal M, Ling Z, Piperleers D.** *Contribution of postnatally formed small beta cell aggregates to functional beta cell mass in adult rat pancreas.* Diabetologia 2010; 53: 2380-2388.
- Clarke JF, Young PW, Yonezawa K, Kasuga M, Holman GD.** *Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin.* Biochem J 1994; 300: 631-635.
- Clore JN, Glickman PS, Nestler JE, Blackard WG.** *In vivo evidence for hepatic autoregulation during FFA-stimulated gluconeogenesis in normal humans.* Am J Physiol 261: E425-E429.
- Consoli A, Kennedy F, Miles J, Gerich J.** *Determination of Krebs cycle metabolic carbon exchange in vivo and its use to estimate the individual contributions of gluconeogenesis and glycogenolysis to overall glucose output in man.* J Clin Invest 1987; 80: 1303-1310.
- Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M; Global Burden of Metabolic Risk factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose).** *National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants.* Lancet 2011; 378: 31-40.
- Davis TA, Suryawan RA, Orellana HV, Nguyen HV, Fiorotto ML.** *Postnatal ontogeny of skeletal muscle protein synthesis in pigs.* J Anim Sci 2008; 86: E13-E18.
- Dinnen S, Gerich J, Rizza R.** *Carbohydrate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus.* N Engl J Med 1992; 327: 707-713.
- Donelan W, Koya V, Li SW, Yang LJ.** *Distinct regulation of hepatic nuclear factor 1 $\alpha$  by NKX6.1 in pancreatic beta cells.* J Biol Chem 2010; 285: 12181-12189.
- Drucker DJ.** *The biology of incretin hormones.* Cell Metab 2006; 3: 153-165.
- Du A, Hunter CS, Murray J, Noble D, Cai CL, Evans SM, Stein R, May CL.** *Islet-1 is required for the maturation, proliferation, and survival of the endocrine pancreas.* Diabetes 2009; 58: 2059-2069.

- Duckworth WC, Bennet RG, Hamel FG.** *Insulin degradation: progress and potential.* Endocr Rev 1998; 19: 608-624.
- Dugani CB y Klip A.** *Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies.* EMBO Rep 2005; 6: 1137-1142.
- Dumortier O, Blondeau B, Duvillié B, Reusens B, Bréant B, Remacle C.** *Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet.* Diabetologia 2007; 50: 2495-2503.
- Easom RA.** *B-granule transport and exocytosis.* Semin Cell Dev Biol 2000; 11: 253-266.
- Erdmann S, Senkel S, Tanja A, Lucas B, Lausen, Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Thomas H.** *Tissue-specific transcription factor HNF4a inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the pancreatic INS-1  $\beta$ -cell line.* Biol Chem 2007; 388: 91-106.
- Fafournoux P, Bruhat A, Jousse C.** *Amino acid regulation of gene expression.* Biochem J 2000; 351: 1-12.
- Firth RG, Bell PM, Marsh HM, Hansen I, Rizza RA.** *Postprandial hyperglycemia in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. Role of hepatic and extrahepatic tissues.* J Clin Invest 1986; 77: 1525-1532.
- Furuya F, Shimura H, Yamashita S, Endo T, Kobayashi T.** *Liganded thyroid hormone receptor-alpha enhances proliferation of pancreatic  $\beta$ -cells.* J Biol Chem 2010; 285: 24477-24486.
- Gao Z, Li G, Najafi H, Wolf BA, Matschinsky FM.** *Glucose regulation of glutaminolysis and its role in insulin secretion.* Diabetes 1999; 48: 1535-1542.
- Gao N, White P, Doliba N, Golson ML, Matschinsky FM, Kaestner KH.** *Foxa2 controls vesicle docking and insulin secretion in mature  $\beta$  cells.* Cell Metab 2007; 6: 267-279.
- Garofano A, Czernichow P, Bréant B.** *Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat.* Diabetologia 1998; 41: 1114-1120.
- Garofano A, Czernichow P, Bréant B.** *Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period.* Diabetologia 1999; 42: 711-718.
- Gembal M, Gilon P, Henquin JC.** *Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive  $K^+$  in mouse  $\beta$  cells.* J Clin Invest 1992; 89: 1288-1295.
- Gerich JE.** *Control of glycaemia.* Baillieres Clin Endocrinol Metab 1993; 7: 551-586.
- Gerich JE.** *Physiology of glucose homeostasis.* Diabetes Obes Metab 2000; 2: 345-350.
- Gilbert SF.** *Desarrollo temprano en invertebrados seleccionados; Desarrollo temprano en los vertebrados: peces, aves y mamíferos; Lámina del mesodermo lateral y endodermo.* En *Biología del desarrollo*. Séptima edición. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, 2005.
- Gilon P, Henquin JC.** *Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic  $\beta$ -cell function.* Endocr Rev 2001; 22: 565-604.
- Goodge KA, Hutton JC.** *Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic  $\beta$ -cell.* Semin Cell Dev Biol 2000; 11: 235-242.
- Grapin-Botton A.** *Ductal cells of the pancreas.* Int J Biochem Cell Biol 2005; 37: 504-510.
- Gravena C, Andreazzi AE, Mecabo FT, Grassioli S, Scantamburlo VM, Mathias PC.** *Protein restriction during lactation alters the autonomic nervous system control on glucose-induced insulin secretion in adult rats.* Nutr Neurosci 2007; 10: 79-87.

- Grunnet L, Vielworth S, Vaag AA, Poulsen P.** *Birth weight is nongenetically associated with glucose intolerance in elderly twins, independent of adult obesity.* J Int Med 2007; 262: 96-103.
- Gu C, Stein GH, Pan N, Goebbels S, Hörnberg H, Nave KA, Herrera P, White P, Kaestner KH, Sussel L, Lee JE.** *Pancreatic  $\beta$ -cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity.* Cell Metab 2010; 11: 298-310.
- Habener JF, Kemp DM, Thomas MK.** *Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development.* Endocrinology 2005; 146: 1025-1034.
- Hales CN, Barker DJP, Clark PMS, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD.** *Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64.* BMJ 1991; 303: 1019-1022.
- Hales CN, Desai M, Ozanne SE, Crowther NJ.** *Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis.* Biochem Soc Trans 1996; 24: 341-350.
- Hennige AM, Burks DJ, Ozcan U, Kulkarni RN, Ye J, Park S, Schubert M, Fisher TL, Dow MA, Leshan R, Zakaria M, Mossa-Basha M, White MF.** *Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic  $\beta$  cells prevents diabetes.* J Clin Invest 2003; 112: 1521-1532.
- Henquin JC.** *Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose.* Diabetes 2000; 49: 1751-1760.
- Henquin JC.** *Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation.* Diabetologia 2009; 52: 739-751.
- Henquin JC, Dufrane D, Nenquin M.** *Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets.* Diabetes 2006; 55: 3470-3477.
- Henquin JC, Ishiyama N, Nenquin M, Ravier MA, Jonas JC.** *Signals and pools underlying biphasic insulin secretion.* Diabetes 2002; 51: S60-S67.
- Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, Jonas JC, Gilon P.** *Hierarchy of the  $\beta$ -cell signals controlling insulin secretion.* Eur J Clin Invest 2003; 33: 742-750.
- Heywood WE, Mian N, Milla PJ, Lindley KJ.** *Programming of defective rat pancreatic  $\beta$ -cell function in offspring from mothers fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods.* Clin Sci 2004; 107: 37-45.
- Hiriart M, Aguilar-Bryan L.** *Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2008; 295: E1298-E1306.
- Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB.** *Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive  $K^+$  channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion.* Diabetes 2000; 49: 424-430.
- Højlund K, Beck-Nielsen H.** *Impaired glycogen synthase activity and mitochondrial dysfunction in skeletal muscle: markers or mediators of insulin resistance in type 2 diabetes?* Curr Diabetes Rev 2006; 2: 375-395.
- Holland AM, Goñez LJ, Naselli G, MacDonald RJ, Harrison LC.** *Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of  $\beta$ -cells in the adult pancreas.* Diabetes 2005; 54: 2586-2595.
- Huang TT, Goran MI.** *Prevention of type 2 diabetes in young people: a theoretical perspective.* Pediatr Diabetes 2003; 4: 38-56.
- Hughes SJ.** *The role of reduced glucose transporter content and glucose metabolism in the immature secretory responses of fetal rat pancreatic islets.* Diabetologia 1994; 37: 134-140.

- Iglésias-Barreira V, Ahn MT, Reusens B, Dahri S, Hoet JJ, Remacle C. *Pre- and postnatal low protein diet affect pancreatic islet blood flow and insulin release in adult rats.* *Endocrinology* 1996; 137: 3797-3801.
- Iozzo P, Geisler F, Oikoen V, Mäki M, Takala T, Solin O, Ferrannini E, Knuuti J, Nuutila P. *Insulin stimulates liver glucose uptake in humans: an <sup>18</sup>F-FDG PET study.* *J Nucl Med* 2003; 44: 682-689.
- Jahoor F, Klein S, Wolfe R. *Mechanism of regulation of glucose production by lipolysis in humans.* *Am J Physiol* 1992; 262: E353-E358.
- Jansson L, Hellerström C. *Glucose-induced changes in pancreatic islet blood flow mediated by central nervous system.* *Am J Physiol* 1986; 251: E644-E647.
- Jensen J. *Gene regulatory factors in pancreatic development.* *Dev Dyn* 2004; 229: 176-200.
- Jitrapakdee S, Witthisathapornchai A, Wallace JC, MacDonald MJ. *Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling.* *Diabetologia* 2010; 53: 1019-1032.
- Jones PM, Persaud SJ. *Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells.* *Endocr Rev* 1998; 19: 429-461.
- Junglas RL, Halperin ML, Brosnan JT. *Quantitative analysis of aminoacid oxidation and related gluconeogenesis in humans.* *Physiol Rev* 1992; 72: 419-448.
- Just T, Pau HW, Engel U, Hummel T. *Cephalic phase insulin release in healthy humans after taste stimulation?* *Appetite* 2008; 51: 622-627.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.* *Nature* 2006; 444: 840-846.
- Kargar C, Ktorza A. *Anatomical versus functional beta-cell mass in experimental diabetes.* *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 43-53.
- Kashima Y, Miki T, Shibasaki T, Ozaki N, Miyazaki M, Yano H, Seino S. *Critical role of cAMP-GEFII-Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion.* *J Biol Chem* 2001; 276: 46046-46053.
- Kelley D, Mitrakou A, Marsh H, Schwenk F, Benn J, Sonnenberg G, Arcangeli M, Aoki T, Sorensen J, Berger M, Sonksen P, Gerich J. *Skeletal muscle glycolysis, oxidation and storage of an oral glucose load.* *J Clin Invest* 1988; 81: 1563-1571.
- Klover PJ, Mooney RA. *Hepatocytes: critical for glucose homeostasis.* *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 753-758.
- Knauf C, Cani PD, Kim DH, Iglesias MA, Chabo C, Waget A, Colom A, Rastrelli S, Delzenne NM, Drucker DJ, Seeley RJ, Burcelin R. *Role of central nervous system glucagon-like peptide-1 receptors in enteric glucose sensing.* *Diabetes* 2008; 57: 2603-2612.
- Koh TH, Aynsley-Green A, Tarbit M, Eyre JA. *Neural dysfunction during hypoglycaemia.* *Arch Dis Child* 1988; 63: 1353-1358.
- Kopine D, Murtaugh LC. *Exocrine-to-endocrine differentiation is detectable only prior to birth in the uninjured mouse pancreas.* *BMC Dev Biol* 2010; 10:38.
- Kulkarni RN. *The islet  $\beta$ -cell.* *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 365-371.
- Kume S. *The molecular basis and prospects in pancreatic development.* *Dev Growth Differ* 2005; 47: 367-374.
- Lam CK, Chari M, Lam TK. *CNS regulation of glucose homeostasis.* *Physiology* 2009; 24: 159-170.

- Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Pocai A, Rossetti L.** *Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism.* Science 2005; 309: 943-947.
- Lang J.** *Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion.* Eur J Biochem 1999; 259: 3-17.
- Landau BR, Wahren J, Chandramouli V, Schumann WC, Ekberg K, Kalhan SC.** *Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state.* J Clin Invest 1996; 98: 378-385.
- Langley SC, Browne RF, Jackson AA.** *Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero.* Comp Biochem Physiol Physiol 1994; 109: 223-229.
- Lebovitz HE.** *Insulin resistance: definition and consequences.* Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001; 109: S135-S148.
- Lerch MM, Zenker M, Turi S, Mayerle J.** *Developmental and metabolic disorders of the pancreas.* Endocrinol Metab Clin North Am 2006; 35: 219-241.
- Lernmark A, Wenngren BI.** *Insulin and glucagon release from the isolated pancreas of foetal and newborn mice.* J Embryol Exp Morphol 1972; 28: 607-614.
- Li C, Najafi H, Daikhin Y, Nissim IB, Collins HW, Yudkoff M, Matschinsky FM, Stanley CA.** *Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets.* J Biol Chem 2003; 278: 2853-2858.
- Li DS, Yuan YH, Tu HJ, Liang QL, Dai LJ.** *A protocol for islet isolation from mouse pancreas.* Nat Protoc 2009; 4: 1649-1652.
- Lisboa PC, Fagundes AT, Denolato AT, Oliveira E, Bonomo IT, Alves SB, Curty FH, Passos MC, Moura EG.** *Neonatal low-protein diet changes deiodinase activities and pituitary TSH response to TRH in adult rats.* Exp Biol Med 2008; 233: 57-63.
- Lithell HO, McKeigue PM, Berglund L, Mohsen R, Lithell UB, Leon DA.** *Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years.* BMJ 1996, 312: 406-410.
- Liu J, Hunter CS, Du A, Ediger B, Walp E, Murray J, Stein R, May CL.** *Islet-1 regulates Arx transcription during pancreatic islet  $\alpha$ -cell development.* J Biol Chem 2011; 286: 15352-15360.
- Lucas A.** *Programming by early nutrition in man.* Ciba Found Symp 1991; 156: 38-50.
- Luco RF, Maestro MA, del Pozo N, Philbrick WM, Perez de la Ossa P, Ferrer J.** *A conditional model reveals that induction of hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  in Hnf1 $\alpha$ -null mutant  $\beta$ -cells can activate silenced genes postnatally, whereas overexpression is deleterious.* Diabetes 2006; 55: 2202-2211.
- MacDonald MJ, Fahien LA, Brown LJ, Hasan NM, Buss JD, Kendrick MA.** *Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2005; 288: E1-E15.
- Malandro MS, Beveridge MJ, Kilberg MS, Novak DA.** *Effect of low-protein diet-induced intrauterine growth retardation on rat placental amino acid transport.* Am J Physiol 1996; 271: C295-C303.
- Mårin P, Högh-Kristiansen I, Jansson S, Krotkiewski M, Holm G, Björntorp P.** *Uptake of glucose carbon in muscle glycogen and adipose tissue triglycerides in vivo in humans.* Am J Physiol 1992; 263: E437-480.
- Martin-Gronert MS, Ozanne SE.** *Experimental IUGR and later diabetes.* J Intern Med 2007; 261: 437-452.

- Marty N, Dallaporta M, Thorens B.** *Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis.* *Physiology* 2007; 22: 241-251.
- Matveyenko AV, Butler PC.** *Relationship between beta-cell mass and diabetes onset.* *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 23-31.
- McCance DR, Pettitt DJ, Hanson RL, Jacobsson LTH, Knowler WC, Bennet PH.** *Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype?* *BMJ* 1994; 308: 942-945.
- McKeigue PM, Lithell HO, Leon DA.** *Glucose tolerance and resistance to insulin-stimulated glucose uptake in men aged 70 years in relation to size at birth.* *Diabetologia* 1998; 41: 1133-1138.
- Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, Rizza RA, Butler PC.**  *$\beta$ -cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of  $\beta$ -cell mass in humans.* *Diabetes* 2008; 57: 1584-1594.
- Meyer C, Dostou JM, Welle SL, Gerich JE.** *Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis.* *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E419-E427.
- Miki T, Minami K, Shinozaki H, Matsumura K, Saraya A, Ikeda H, Yamada Y, Holst JJ, Seino S.** *Distinct effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide 1 on insulin secretion and gut motility.* *Diabetes* 2005; 54: 1056-1063.
- Milner RD, Hill DJ.** *Fetal growth control: the role of insulin and related peptides.* *Clin Endocrinol* 1984; 21: 415-433.
- Mittrakou A, Kelley D, Mokan M, Veneman T, Pangburn T, Reilly J, Gerich J.** *Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance.* *N Engl J Med* 1992; 326: 22-29.
- Mittrakou A, Kelley D, Veneman T, Jenssen T, Pangburn T, Reilly J, Gerich J.** *Contribution of abnormal muscle and liver glucose metabolism to postprandial hyperglycemia in NIDDM.* *Diabetes* 1990; 39: 1381-1390.
- Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H.** *Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Diseases in Diabetes.* *Diabetologia* 2001; 44: S14-S21.
- Moura AS, Caldeira Filho JS, de Freitas Mathias PC, de Sá CC.** *Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation.* *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 96: 179-192.
- Moura AS, Carpinelli AR, Barbosa FB, Gravena C, Mathias PC.** *Undernutrition during early lactation as an alternative model to study the onset of diabetes mellitus type II.* *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1996; 92: 73-84.
- Murtaugh LC.** *Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible.* *Development* 2007; 134: 427-438.
- Nakamura K, Minami K, Tamura K, Iemoto K, Miki T, Seino S.** *Pancreatic  $\beta$ -cells are generated by neogenesis from non- $\beta$ -cells after birth.* *Biomed Res* 2011; 32: 167-174.
- Nelson DL, Cox MM.** *Glucólisis, gluconeogénesis y ruta de las pentosas fosfato; Catabolismo de los ácidos grasos; Biosíntesis de lípidos.* En *Lehninger Principios de Bioquímica*. Cuarta edición. Barcelona, España: Ediciones Omega, 2006.
- Newsholme P, Bender K, Kiely A, Brennan L.** *Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes.* *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1180-1186.

- Newsholme P, Brennan L, Bender K.** *Amino acid metabolism,  $\beta$ -cell function, and diabetes.* Diabetes 2006; 55: S39-S47.
- Nielsen EM, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T, Glümer C, Thorsteinsson B, Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O.** *The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes.* Diabetes 2003; 52: 573-577.
- Nolan CJ, Madiraju MSR, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M.** *Fatty acid signaling in the  $\beta$ -cell and insulin secretion.* Diabetes 2006; 55: S16-S23.
- Nyirenda MJ, Seckl JR.** *Intrauterine events and the programming of adulthood disease: the role of fetal glucocorticoid exposure.* Int J Mol Med 1998; 2:607-614.
- Organización Mundial de la Salud (2011a).** *Nota descriptiva No. 312*, Septiembre de 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>
- Organización Mundial de la Salud (2011b).** *Estadísticas sanitarias mundiales 2011.* Catalogación por la Biblioteca de la OMS.
- Otonkoski T, Andersson S, Knip M, Simell O.** *Maturation of insulin response to glucose during human fetal and neonatal development. Studies with perfusion of pancreatic isletlike cell clusters.* Diabetes 1988; 37: 286-291.
- Owen OE, Reichard GA.** *Human forearm metabolism during progressive starvation.* J Clin Invest 1971; 50: 1536-1545.
- Owen OE, Reichard GA Jr, Patel MS, Boden G.** *Energy metabolism in feasting and fasting.* Adv Exp Med Biol 1979; 111: 169-188.
- Owen OE, Smalley KJ, D'Alessio DA, Mozzoli MA, Dawson EK.** *Protein, fat and carbohydrate requirements during starvation: anaplerosis and cataplerosis.* Am J Clin Nutr 1998; 68: 12-34.
- Ozanne SE, Olsen GS, Hansen LL, Tingey KJ, Nave BT, Wang CL, Hartil K, Petry CJ, Buckley AJ, Mosthaf-Seedorf LM.** *Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle.* J Endocrinol 2003; 177: 235-241.
- Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, Smith GD.** *Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats.* Am J Physiol 1996; 271: E1128-E1134.
- Panten U, Schwanstecher M, Wallasch A, Lenzen S.** *Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1988; 338: 459-462.
- Parks DA, Jacobson ED.** *Physiology of the splanchnic circulation.* Arch Intern Med 1985; 145: 1278-1281.
- Perriello G, Jorde R, Nurjhan N, Stumvoll M, Dailey G, Jenssen T, Bier DM, Gerich JE.** *Estimation of glucose-alanine-lactate-glutamine cycles in postabsorptive humans: role of skeletal muscle.* Am J Physiol 1995; 269: E443-E450.
- Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho J, Hoet JJ, Hill DJ.** *A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor II.* Endocrinology 1999; 140: 4861-4873.
- Petry CJ, Dorling MW, Pawlak DB, Ozanne SE, Hales CN.** *Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet.* Int J Exp Diabetes Res 2001; 2: 139-143.

- Pfannkuche H, Gäbel G.** *Glucose, epithelium, and enteric nervous system: dialogue in the dark.* J Anim Physiol Anim Nutr 2009; 93: 277-286.
- Phipps K, Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Clark PM.** *Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women.* Diabetologia 1993; 36: 225-228.
- Piper K, Brickwood S, Turnpenny LW, Cameron IT, Ball SG, Wilson DI, Hanley NA.** *Beta cell differentiation during early human pancreas development.* J Endocrinol 2004; 181: 11-23.
- Pørksen N.** *The in vivo regulation of pulsatile insulin secretion.* Diabetologia 2002; 45: 3-20.
- Poulsen P, Vaag AA, Kyvik KK, Moller-Jensen D, Beck-Neilsen H.** *Low birth weight is associated with NIDDM in discordant monozygotic and dzygotic twin pairs.* Diabetologia 1997; 40: 439-446.
- Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP.** *Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine.* Lancet 1998;351:173-177.
- Raybould HE.** *Sensing of glucose in the gastrointestinal tract.* Auton Neurosci 2007; 133: 86-90.
- Rhodes CJ.** *Type 2 diabetes - a matter of  $\beta$ -cell life and death?* Science 2005; 307: 380-384.
- Rhodes CJ, White MF.** *Molecular insights into insulin action and secretion.* Eur J Clin Invest 2002; 32: 3-13.
- Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A, Delghingaro-Augusto V, Przybykowski E, Morin J, Massé F, Massie B, Ruderman N, Rhodes C, Poitou V, Prentki M.** *A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli.* Diabetes 2004; 53: 1007-1019.
- Rorsman P, Renström E.** *Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells.* Diabetologia 2003; 46: 1029-1045.
- Santulli G, Lombardi A, Sorriento D, Anastasio A, Del Giudice C, Formisano P, Béguinot F, Trimarco B, Miele C, Iaccarino G.** *Age-related impairment in insulin release: the essential role of  $\beta(2)$ -adrenergic receptor.* Diabetes 2012; 61: 692-701.
- Sato Y, Aizawa T, Komatsu M, Okada N, Yamada T.** *Dual function role of membrane depolarization/ $Ca^{2+}$  influx in rat pancreatic  $\beta$ -cell.* Diabetes 1992; 41: 438-443.
- Sato Y, Anello M, Henquin JC.** *Glucose regulation of insulin secretion independent of the opening or closure of adenosine triphosphate-sensitive  $K^+$  channels in  $\beta$  cells.* Endocrinology 1999; 140: 2252-2257.
- Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S.** *Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonate rat.* Endocrinology 1997; 138:1736-1741.
- Schisler JC, Jensen PB, Taylor DG, Becker TC, Knop FK, Takekawa S, German M, Weir GC, Lu D, Mirmira RG, Newgard CB.** *The Nkx6.1 homeodomain transcription factor suppresses glucagon expression and regulates glucose-stimulated insulin secretion in islet beta cells.* Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 7297-7302.
- Scholzen T, Gerdes J.** *The Ki-67 protein: from the known and the unknown.* J Cell Physiol 2000; 182: 311-322.

- Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershfinkel M, Walker MD.** *Role of GPR40 in fatty acid action on the  $\beta$  cell line INS-1E.* Biochem Biophys Res Commun 2005; 335: 97-104.
- Shepherd PR, Crowther NJ, Desai M, Hales CN, Ozanne SE.** *Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats.* Br J Nutr 1997; 78: 121-129.
- Shih DQ, Screenan S, Munoz KN, Philipson L, Pontoglio M, Yaniv M, Polonsky KS, Stoffel M.** *Loss of HNF-1 $\alpha$  function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism.* Diabetes 2001; 50: 2472-2480.
- Simmons RA.** *Role of metabolic programming in the pathogenesis of  $\beta$ -cell failure in postnatal life.* Rev Endocr Metab Disord 2007; 8: 95-104.
- Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ.** *Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat.* Diabetes 2001; 50: 2279-2286.
- SINAVE/DGE/SALUD/Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad en México 2009.**  
[http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/ANUARIOS/PANO\\_EPID\\_ESTADIS\\_MORTALIDAD\\_MEX\\_2009.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/ANUARIOS/PANO_EPID_ESTADIS_MORTALIDAD_MEX_2009.pdf)
- Slack JMW.** *Developmental biology of the pancreas.* Development 1995; 121: 1569-1580.
- Smith SB, Qu HQ, Taleb N, Kishimoto NY, Scheel DW, Lu Y, Patch AM, Grabs R, Wang J, Lynn FC, Miyatsuka T, Mitchell J, Seerke R, Désir J, Eijnden SV, Abramowicz M, Kacet N, Weill J, Renard ME, Gentile M, Hansen I, Dewar K, Hattersley AT, Wang R, Wilson ME, Johnson JD, Polychronakos C, German MS.** *Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans.* Nature 2010; 463: 775-780.
- Smith PA, Sakura H, Coles B, Gummerson N, Proks P, Ashcroft FM.** *Electrogenic arginine transport mediates stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic  $\beta$ -cells.* J Physiol 1997; 499: 625-635.
- Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ.** *Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas.* Biol Neonate 1990; 57: 107-118.
- Sosa-Pineda B.** *The gene Pax4 is an essential regulator of pancreatic  $\beta$ -cell development.* Mol Cells 2004; 18: 289-294.
- Soyer J, Flasse L, Raffelsberger W, Beucher A, Orvain C, Peers B, Ravassard P, Vermot J, Voz ML, Mellitzer G, Gradwohl G.** *Rfx6 is an Ngn3-dependent winged helix transcription factor required for pancreatic islet cell development.* Development 2010; 137: 203-212.
- Spagnoli FM.** *From endoderm to pancreas: a multistep journey.* Cell Mol Life Sci 2007; 64: 2378-2390.
- Stoffel M, Duncan SA.** *The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 $\alpha$  regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism.* Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 13209-13214.
- Straub SG, James RF, Dunne MJ, Sharp GW.** *Glucose activates both K<sub>ATP</sub> channel-dependent and K<sub>ATP</sub> channel-independent signaling pathways in human islets.* Diabetes 1998; 47: 758-763.
- Stumvoll M, Meyer C, Kreider M, Perriello G, Gerich J.** *Effects of glucagon on renal and hepatic glutamine gluconeogenesis in normal postabsorptive humans.* Metabolism 1998; 47: 1227-1232.

- Stumvoll M, Meyer C, Mitrakou A, Nadkarni V, Gerich JE.** *Renal glucose production and utilization: new aspects in humans.* Diabetologia 1997; 40: 749-757.
- Sturis J, Van Cauter E, Blackman JD, Polonsky KS.** *Entrainment of pulsatile insulin secretion by oscillatory glucose infusion.* J Clin Invest 1991; 87: 439-445.
- Styrud J, Eriksson UJ, Grill V, Swenne I.** *Experimental intrauterine growth retardation in the rat causes a reduction of pancreatic  $\beta$ -cell mass, which persists into adulthood.* Biol Neonate 2005; 88: 122-128.
- Symonds ME, Sebert SP, Hyatt MA, Budge H.** *Nutritional programming of the metabolic syndrome.* Nat Rev Endocrinol 2009; 5: 604-610.
- Tabassum R, Chavali S, Dwivedi OP, Tandon N, Bharadwaj D.** *Genetic variants of FOXA2: risk of type 2 diabetes and effect on metabolic traits in North Indians.* J Hum Genet 2008; 53: 957-965.
- Tarry-Adkins JL, Chen JH, Jones RH, Smith NH, Ozanne SE.** *Poor maternal nutrition leads to alterations in oxidative stress, antioxidant defense capacity and markers of fibrosis in rat islets: potential underlying mechanisms for development of the diabetic phenotype in later life.* FASEB J 2010; 24: 2762-2771.
- Taylor R, Magnusson I, Rothman DL, Cline GW, Caumo A, Cobelli C, Shulman GI.** *Direct assessment of liver glycogen storage by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy and regulation of glucose homeostasis after a mixed meal in normal subjects.* J Clin Invest 1996; 97: 126-132.
- Taylor R, Price TB, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI.** *Direct measurement of change in muscle glycogen concentration after a mixed meal in normal subjects.* Am J Physiol 1993; 265: E224-229.
- Thorens B.** *Glucose sensing and the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes.* Int J Obes (Lond) 2008; 32: S62-S71.
- Thorens B, Larsen PJ.** *Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2004; 7: 471-478.
- Thorens B, Mueckler M.** *Glucose transporters in the 21<sup>st</sup> century.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2010; 298: E141-145.
- Tirone TA, Brunicardi C.** *Overview of glucose regulation.* World J Surg 2001; 25: 461-467.
- Tokuyama Y, Matsui K, Ishizuka T, Egashira T, Kanatsuka A.** *The Arg121Trp variant in PAX4 gene is associated with beta-cell dysfunction in Japanese subjects.* Metabolism 2006; 55: 213-216.
- Torres N, Noriega L, Tovar AR.** *Nutrient modulation of insulin secretion.* Vitam Horm 2009; 80: 217-244.
- Uchizono Y, Alarcón C, Wicksteed BL, Marsh BJ, Rhodes CJ.** *The balance between proinsulin biosynthesis and insulin secretion: where can imbalance lead?.* Diabetes Obes Metab 2007; 9: 56-66.
- Valtat B, Dupuis C, Zenaty D, Singh-Estivalet A, Tronche F, Bréant B, Blondeau B.** *Genetic evidence of the programming of beta cell mass and function by glucocorticoids in mice.* Diabetologia 2011; 54: 350-359.
- Villalpando S, de la Cruz V, Rojas R, Shamah-Levi T, Ávila MA, Gaona B, Rebollar R, Hernandez L.** *Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey.* Salud Pública Mex 2010; 52: S19-26.

- Wang H, Maechler P, Ritz-Laser B, Hagenfeldt KA, Ishihara H, Philippe J, Wollheim CB.** *Pdx1 level defines pancreatic gene expression pattern and cell lineage differentiation.* J Biol Chem 2001; 276: 25279-25286.
- Wang L, Coffinier C, Thomas MK, Gresh L, Eddu G, Manor T, Levitsky LL, Yaniv M, Rhoads DB.** *Selective deletion of the Hnf1beta (MODY5) gene in beta-cells leads to altered gene expression and defective insulin release.* Endocrinology 2004; 145: 3941-3949.
- Warner MJ, Ozanne SE.** *Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease.* Biochem J 2010; 427: 333-347.
- Weiss MA.** *Proinsulin and the genetics of diabetes mellitus.* J Biol Chem 2009; 284: 19159-19163.
- Wilcox G.** *Insulin and insulin resistance.* Clin Biochem Rev 2005; 26: 19-39.
- Wilson MR, Hughes SJ.** *The effect of maternal protein deficiency during pregnancy and lactation on glucose tolerance and pancreatic islet function in adult rat offspring.* J Endocrinol 1997; 154: 177-185.
- Woerle HJ, Meyer C, Dostou JM, Gosmanov NR, Islam N, Popa E, Wittlin SD, Welle SL, Gerich JE.** *Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2003; 284: E716-725.
- World Health Organization.** *Global status report on noncommunicable diseases 2010.* WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2011.
- Yokoi N, Kanamori M, Horikawa Y, Takeda J, Sanke T, Furuta H, Nanjo K, Mori H, Kasuga M, Hara K, Kadowaki T, Tanizawa Y, Oka Y, Iwami Y, Ohgawara H, Yamada Y, Seino Y, Yano H, Cox NJ, Seino S.** *Association studies of variants in the genes involved in pancreatic  $\beta$ -cell function in type 2 diabetes in Japanese subjects.* Diabetes 2006; 55:2379-2386.
- Zambrano E, Bautista CJ, Déas M, Martínez-Samayoa PM, González-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz PW.** *A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure- specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat.* J Physiol 2006; 571: 221-230.
- Zhao FQ, Keating AF.** *Functional properties and genomics of glucose transporters.* Curr Genomics 2007; 8: 113-128.

## **11. Artículo publicado**

**Rodríguez-Trejo A, Ortiz-López MG, Zambrano E, Granados-Silvestre MA, Méndez-Herrera C, Blondeau B, Bréant B, Nathanielsz PW, Menjívar M.** *Developmental programming of neonatal pancreatic  $\beta$  cells by a maternal low protein diet in rats involves a switch from proliferation to differentiation.* Am J Physiol Endocrinol Metab 2012; 302: E1431–1439.

## Developmental programming of neonatal pancreatic $\beta$ -cells by a maternal low-protein diet in rats involves a switch from proliferation to differentiation

Adriana Rodríguez-Trejo,<sup>1</sup> María Guadalupe Ortiz-López,<sup>2</sup> Elena Zambrano,<sup>3</sup> María de los Ángeles Granados-Silvestre,<sup>2</sup> Carmen Méndez,<sup>4</sup> Bertrand Blondeau,<sup>5</sup> Bernadette Bréant,<sup>5</sup> Peter W. Nathanielsz,<sup>6</sup> and Marta Menjivar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México; <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Endocrinology, Hospital Juárez de México; <sup>3</sup>Department of Biology of Reproduction, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán; <sup>4</sup>Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; <sup>5</sup>Cordeliers Research Center, Pierre and Marie Curie University-Paris 6, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR-S 872, Paris, France; and <sup>6</sup>Center for Pregnancy and Newborn Research, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas

Submitted 5 December 2011; accepted in final form 13 March 2012

**Rodríguez-Trejo A, Ortiz-López MG, Zambrano E, Granados-Silvestre MA, Méndez C, Blondeau B, Bréant B, Nathanielsz PW, Menjivar M.** Developmental programming of neonatal pancreatic  $\beta$ -cells by a maternal low-protein diet in rats involves a switch from proliferation to differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E1431–E1439, 2012. First published March 20, 2012; doi:10.1152/ajpendo.00619.2011.—Maternal low-protein diets (LP) impair pancreatic  $\beta$ -cell development, resulting in later-life failure and susceptibility to type 2 diabetes (T2D). We hypothesized that intrauterine and/or postnatal developmental programming seen in this situation involve altered  $\beta$ -cell structure and relative time course of expression of genes critical to  $\beta$ -cell differentiation and growth. Pregnant Wistar rats were fed either control (C) 20% or restricted (R) 6% protein diets during pregnancy (1st letter) and/or lactation (2nd letter) in four groups: CC, RR, RC, and CR. At postnatal days 7 and 21, we measured male offspring  $\beta$ -cell fraction, mass, proliferation, aggregate number, and size as well as mRNA level for 13 key genes regulating  $\beta$ -cell development and function in isolated islets. Compared with CC, pre- and postnatal LP (RR) decreased  $\beta$ -cell fraction, mass, proliferation, aggregate size, and number and increased *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6*, and *Slc2a2* mRNA levels. LP only in pregnancy (RC) also decreased  $\beta$ -cell fraction, mass, proliferation, aggregate size, and number and increased *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, and *Ins* mRNA levels. Postnatal LP offspring (CR) showed decreased  $\beta$ -cell mass but increased  $\beta$ -cell fraction, aggregate number, and *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Rfx6*, and *Slc2a2* mRNA levels. We conclude that LP in pregnancy sets the trajectory of postnatal  $\beta$ -cell growth and differentiation, whereas LP in lactation has smaller effects. We propose that LP promotes differentiation through upregulation of transcription factors that stimulate differentiation at the expense of proliferation. This results in a decreased  $\beta$ -cell reserve, which can contribute to later-life predisposition to T2D.

postnatal  $\beta$ -cell growth; nutrition; transcription factors

IMPAIRED INSULIN SYNTHESIS AND SECRETION in type 2 diabetes (T2D) results from  $\beta$ -cell dysfunction and/or reduced  $\beta$ -cell mass (22, 28). Environmental challenges during intrauterine and early postnatal life affect development and can result in persistent, altered, programmed  $\beta$ -cell structure and function. As a result, offspring are predisposed to later-life dysfunction

of glucose and insulin metabolism and a greater T2D risk (26, 49). Compelling data for developmental programming come from human epidemiological (49) and controlled animal studies using challenges such as exposure to low global maternal nutrition (13), maternal protein restriction (37), and fetal exposure to glucocorticoid levels higher than appropriate for the current stage of differentiation and development (4).

Growth-restricted offspring of rat mothers fed isocaloric low-protein diets (LP) through gestation and lactation show impaired glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) (7, 19), reduced  $\beta$ -cell mass (10, 35, 41), and age-dependent development of glucose intolerance, insulin resistance, and diabetes (18, 33, 36). Maternal LP limited to gestation or lactation also induces alterations in growth,  $\beta$ -cell function, and glucose homeostasis, although effects on  $\beta$ -cell structure are less well defined. If prenatal LP is followed by adequate postnatal nutrition after birth, growth recovers and overall GSIS is restored during early life (2, 19, 50), although as adults offspring become glucose intolerant and insulin resistant when challenged with a hypercaloric diet (3). In contrast, offspring of mothers fed a LP only in lactation show growth restriction (50), GSIS impairment, and glucose intolerance in young adult life (16, 30, 31). These observations indicate that both the prenatal and early postnatal periods are separate critical windows of susceptibility for programming glucose and insulin metabolism by dietary interventions and that distinct outcomes in insulin secretion may be due to alterations in different developmental stage-specific mechanisms of  $\beta$ -cell function and mass.

$\beta$ -Cell programming resulting from maternal LP is likely to reflect altered expression of a cassette of key genes controlling various stages of pancreatic development and function of mature  $\beta$ -cells, such as forkhead box A2 (*Foxa2*) (12), hepatocyte nuclear factor (HNF)1 homeobox B (*Hnf1b*) (47), HNF1 homeobox A (*Hnf1a*) (27), HNF4 $\alpha$  (*Hnf4a*) (11, 44), pancreatic and duodenal homeobox 1 (*Pdx1*) (48), regulatory factor X6 (*Rfx6*) (43), neurogenic differentiation 1 (*Neurod1*) (17), ISL LIM homeobox 1 (*Isl1*) (9), NK6 homeobox 1 (*Nkx6-1*) (38), and paired box 4 (*Pax4*) (42), that encode transcription factors. During development, these genes play central roles in endodermal specification of derived pancreatic cells (*Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a*, and *Hnf4a*), pancreas formation, and endocrine cell differentiation (*Pdx1*, *Rfx6*, and *Neurod1*) as well as in

Address for reprint requests and other correspondence: M. Menjivar, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 3000, Facultad de Química, Edificio F, Lab. 202, C. P. 04510, Mexico City, Mexico (e-mail: menjivar@unam.mx).

endocrine lineage divergence and growth (*Isl1*, *Pax4*, and *Nkx6-1*). Their role and position in the hierarchy of transcription factor expression in the developing pancreas has been revealed by studies of gene-specific inactivation in mice. Ablation of these genes has demonstrated that they are also implicated in regulating  $\beta$ -cell mass, insulin production, and secretion. Furthermore, gene sequence variations of these transcription factors can cause diabetes in humans (6, 21, 40). Therefore, it is plausible that alterations in their expression contribute to developmental  $\beta$ -cell programming by LP given that they are crucial for adequate development and function of  $\beta$ -cells.

One general hypothesis relating to developmental programming is that adverse conditions during development promote progenitor cell differentiation at the expense of proliferation, resulting in organ maturation and survival but reduced organ growth. As a result the organ, although mature, may have reduced functional capacity.  $\beta$ -Cells undergo major structural (growth of  $\beta$ -cell mass) and functional changes during early postnatal life (1, 8, 15, 23, 29). Interestingly, recent evidence suggests that the marked neonatal  $\beta$ -cell mass increase is achieved by both proliferation of preexisting  $\beta$ -cells and differentiation or neogenesis from progenitor cells (32). These precursor cells may be located within the islets since it has been suggested that  $\beta$ -cells do not arise from ductal or acinar cells after birth (24). We hypothesized that timing of maternal protein restriction (gestation and/or lactation) results in specific and developmental stage-dependent postnatal alterations in expression of genes important for  $\beta$ -cell function, such as *Ins* (*insulin*), *Slc2a2* [solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2; *Glut2*], and *Kcnj11* (potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11; *Kir6.2*), and in structural features of  $\beta$ -cells. If this is the case, it would influence separate parameters, i.e., the secretory capacity of individual  $\beta$ -cells and/or the functional capacity of all the  $\beta$ -cells. Structural alterations of  $\beta$ -cells may be a consequence of maternal LP affecting timing of gene expression of these transcription factors that play a central role in regulating  $\beta$ -cell differentiation and proliferation. Such changes may promote differentiation but also affect  $\beta$ -cell secretory capacity because they are also implicated in both insulin synthesis and secretion. Therefore, we assessed effects of prenatal and/or postnatal exposure to a maternal LP on  $\beta$ -cell structure and proliferation as well as on islet gene expression of *Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Neurod1*, *Isl1*, *Pax4*, *Nkx6-1*, *Ins*, *Slc2a2*, and *Kcnj11* in male offspring during lactation.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** All procedures followed Mexican regulations for the use and care of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999) and were approved by the Animal Ethics Committee, Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Aut3noma de M3xico. Male and nulliparous female Wistar rats (Harlan Laboratories, Mexico City, Mexico) were housed at 22–24°C on a 12:12-h light-dark cycle with free access to laboratory chow and water. Females weighing 225–250 g (90–110 days of age) were mated. The day on which pregnancy was confirmed by sperm in vaginal smears was considered as gestation day 1. Mothers were housed individually and fed ad libitum either a control diet (“C” diet; 20% protein, Harlan TD.91352; Harlan, Madison, WI) or isocaloric LP (“R” diet; 6% protein, Harlan TD.90016) throughout gestation and/or lactation to establish four experimental groups [1st letter, pregnancy diet (imposed on gestation day 1); 2nd letter,

lactation diet (imposed on the day of delivery)]: CC, control (12 mothers); RR, pre- and postnatal LP (11 mothers); RC, prenatal LP/postnatal control diet (11 mothers); and CR, postnatal LP (10 mothers). Maternal body weight and food intake were measured three times weekly at 7 AM from gestational day 1 until lactation day 21. The day after delivery, litter size was adjusted to 10 pups/litter (5 males and 5 females when possible) and male offspring body weight recorded. Separate litters were studied at postnatal day (PND) 7 and PND 21. Three male pups per litter (5–6 litters/group at PND 7 and 5–6 litters/group at PND 21) were randomly selected, removed from their mothers, weighed, fasted for 4 h, and anesthetized with pentobarbital sodium (25  $\mu$ g/g ip) for blood collection by cardiac puncture and pancreatic dissection (1 male pup/litter) or islet isolation (2 male pups/litter).

**Serum glucose and insulin.** Glucose was measured by the glucose oxidase method (Randox Laboratories, County Antrim, UK) and insulin by rat insulin ELISA kit (Mercodia, Uppsala, Sweden). Intra-assay coefficients of variation were <2 and <4%.

**Immunohistochemistry and immunofluorescence.** Pancreata were removed, weighed, and dissected. The pancreatic tail was fixed (4% paraformaldehyde-PBS) and paraffin embedded, sectioned completely (5  $\mu$ m), and mounted. Insulin immunohistochemical staining was performed to assess  $\beta$ -cell structure (13). Eight sections (240  $\mu$ m apart) per pancreas were incubated with blocking buffer (3% BSA-0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline) for 30 min, followed by guinea pig anti-insulin antibody (Dako, Carpinteria, CA) for 1 h and incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-guinea pig IgG antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) for 1 h. Immunoreactivity was visualized with diaminobenzidine (Dako), and sections were counterstained with hematoxylin. To determine  $\beta$ -cell proliferation, double immunofluorescence staining for Ki-67 and insulin was carried out on three to six sections (240  $\mu$ m apart) per pancreas. Sections were microwaved for 3 min in 10 mmol/l citrate buffer for antigen retrieval, permeabilized with 0.3% Triton X-100 in Tris-buffered saline for 20 min, and incubated with blocking buffer for 30 min. After overnight incubation at 4°C with guinea pig anti-insulin (Dako) and mouse anti-Ki-67 (BD Pharmingen, San Diego, CA) antibodies, detection was performed using FITC-labeled anti-guinea pig IgG and Texas Red-labeled anti-mouse IgG secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

**$\beta$ -Cell morphometric and proliferation analyses.** Area of insulin-positive cells and pancreatic tissue surface was quantified by computer-assisted measurements with a Leica DMRB microscope provided with a camera coupled to a Quantimet 500 MC computer (screen magnification  $\times$ 24) using Leica Qwin software (Wetzlar, Germany) (13).  $\beta$ -Cell fraction (% $\beta$ -cells in the pancreas) was calculated as the ratio of insulin-positive area to total pancreatic tissue area on the entire section.  $\beta$ -Cell mass was obtained by multiplying  $\beta$ -cell fraction by the corresponding pancreatic weight and  $\beta$ -cell mass/body weight determined. Aggregates composed of more than three immunoreactive insulin cells (diameter >25  $\mu$ m) were counted and expressed as number of  $\beta$ -cell aggregates per area of pancreatic tissue ( $\text{cm}^2$ ). The mean area of  $\beta$ -cell aggregates was also measured. The rate of proliferating  $\beta$ -cells was calculated as the ratio of  $\geq$ 50 cells colocalizing for insulin and Ki-67 to the total number of insulin-positive cells visualized with a Reichert Polyvar microscope (Vienna, Austria).

**Islet isolation.** Islets were isolated by collagenase digestion (25). The pancreas was perfused via its duct with 1 mg/ml collagenase XI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in HBSS (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY). Pancreatic digestion was carried out at 37°C for 20 min, after which cold HBSS was added. The suspension was centrifuged at 290 g for 30 s at 4°C, washed twice with HBSS, resuspended in HBSS-10% FBS (Gibco-Invitrogen), and poured onto a 70- $\mu$ m cell strainer (BD Falcon; BD Biosciences, San Diego, CA). Islets were rinsed, hand-picked, and washed twice with PBS.

**Gene expression analysis.** RNA was extracted from freshly isolated islets using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA), following the manufacturer's instructions. RNA was quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE), and cDNA was synthesized by reverse transcription of RNA with the SuperScript II kit (Invitrogen), using random hexamers. Relative gene expression of *Foxa2*, *Hnf1b*, *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Rfx6*, *Neurod1*, *Isl1*, *Pax4*, *Nkx6-1*, *Ins*, *Slc2a2*, and *Kcnj11* was assessed by quantitative PCR with a Light Cycler 2.0 thermal cycler (Roche Applied Science, Hague Road, IN), using the Light Cycler Taqman Master kit, probes from the Universal ProbeLibrary, and specific primers (Table 1) generated with the ProbeFinder design assay software (<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=UP030000>). Data of each gene were normalized to the housekeeping gene *Hprt1* (hipoxantine phosphoribosyltransferase 1).

**Statistical analysis.** Only male offspring were studied. Data are expressed as means  $\pm$  SE; *n* refers to the number of either mothers or litters for each measurement. Body weights at conception and maternal food intake were analyzed using Student's *t*-test. Maternal body weight at the end of gestation adjusted to litter size was assessed by a univariate analysis of variance and litter size and offspring PND 1 body weight with a Mann-Whitney test. One-way ANOVA, followed by Games-Howell post hoc testing, was performed to analyze body weight and food intake of mothers in lactation and all offspring data on PND 7 and 21. Two-way ANOVA test was used to assess gene expression. Statistical analyses were carried out with SPSS 15.0 software (SPSS, Chicago, IL), and *P* values <0.05 were considered statistically significant.

**RESULTS**

**Effect of LP on maternal body weight, daily food intake, and litter size.** Mothers fed control (C) and LP (R) diets throughout pregnancy had similar body weights at conception (Table 2). However, body weight gain was reduced by 7% in R mothers by the end of gestation, although average daily food intake and litter size were unchanged. Maintaining LP in lactation up to PND 21 led to a 15–20% body weight reduction in RR mothers compared with controls (CC). Although food intake rate was similar between groups at PND 7, it was decreased by 43% at PND 21 in RR mothers. Dietary change after delivery (RC and CR) did not affect body weight or food intake in the 1st wk of lactation. However, normalizing nutrition (RC) increased maternal body weight by ~20% at PND 7 and 21 and food intake

by 72% at PND21 compared with continued dietary LP (RR). LP in lactation reduced body weight and food intake by 20 and 40%, respectively, in CR mothers compared with CC and RC mothers at PND 21.

**Effect of maternal LP on male offspring body and pancreatic weight.** On PND 1, male R offspring body weight was decreased by 15% (Table 2). Continued exposure to LP limited the growth of RR pups, which were 46% smaller on PND 7 and nearly one-third the weight of CC pups by PND 21. In contrast, dietary normalization of RC mothers with the C diet in lactation led to similar body weight gain to CC and greater gain than RR offspring at PND 7 and 21. Maternal LP after birth reduced growth in CR pups; body weight decreased by 30% compared with CC at PND 7 and by 50% at PND 21.

Pancreatic weight (Table 2) of RR pups was 50% of CC or RC on PND 7, increasing only slightly by PND 21. Postnatal LP did not decrease pancreatic weight in CR pups at PND 7, although in CR and RR pups the pancreas weighed ~40% of the weight in CC and RC by PND 21. All groups had an equivalent pancreatic tissue mass per unit of body weight at PND 7 and PND 21.

**Effects of maternal LP on offspring serum glucose and insulin concentration.** Serum glucose concentration at both postnatal ages and insulin on PND 7 did not differ by treatment (Table 2). However, on PND 21, insulin levels of RC pups were 65 and 37% higher than in CC and RR, respectively, indicating potentially early development of insulin resistance in RC pups. In CR offspring, serum insulin was 45% lower than CC and RR and 2.7-fold lower than RC in the presence of normal glucose, suggesting early increased insulin sensitivity and/or impaired insulin secretion.

**Effects of maternal LP on  $\beta$ -cell structure and proliferation compared with the control diet.** In CC offspring (Fig. 1),  $\beta$ -cell mass increased from PND 7 to 21, whereas other morphological measurements decreased, except for  $\beta$ -cell aggregate size, which remained unchanged. For each LP group, data were normalized to CC for comparison with CC at PND 7 or 21 as well as the other two LP groups (Fig. 1, upper middle, lower middle, and bottom). In RR offspring (Fig. 1) compared with CC,  $\beta$ -cell fraction decreased by 45 and 25% at PND 7 and PND 21, respectively, whereas  $\beta$ -cell mass was reduced by

Table 1. Primer sequences used for quantitative PCR

Gene	Forward Sequence	Reverse Sequence	Product Size, bp	Probe No.
<i>Foxa2</i>	CCAGACAACGGCAGTCCT	ACGGCTCCCAGCATACTTT	109	95
<i>Hnf1b</i>	AGAGCCCAGGCAGTCACA	GGGGCTCCTGCTTATGT	94	107
<i>Hnf1a</i>	AGGCAGAGGTCCTGTCTCAG	CCCATTGACACCAGAACCA	135	68
<i>Hnf4a</i>	TCAGCACCACTCCACAGT	ATGACACCGTGGTTGGATG	100	83
<i>Pdx1</i>	TAAAGCCCTGGCTGTAGCTC	GGTCCCTGTAGAGCTGTGTG	110	68
<i>Rfx6</i>	GGAGCTTCAATTTCCCTCAGT	TGTCCCTCTGGGTAGTTATATG	113	68
<i>Neurod1</i>	ACGCAGAAGGCAAGGTGT	TTTGGTCATGTTTCCACTTCC	91	1
<i>Isl1</i>	AGCAACCAACGACAAAACCT	CCATCATGTCTCTCCGGACT	79	83
<i>Pax4</i>	CAAGGCTCCCAGTGTATCCT	GAAGAGCTGGAGCCAAAACA	110	130
<i>Nkx6-1</i>	GAGAAGACTTTCGAACAACGAA	CGATTCTGGAACCCAGACCTT	107	126
<i>Ins</i>	GACCTTGGCACTGGAGGTT	CCAGTTGGTAGAGGGAGCAG	83	29
<i>Slc2a2</i>	TTTCTGTGCCGTCTTCATGT	CCGTATGCTCACATAACTCA	77	95
<i>Kcnj11</i>	TCGTAGGCTAATGATCAACG	TGCTGAAGATGAGGGTTTCTG	93	107
<i>Hprt1</i>	GGTCCATTTCATGACTGTAGATTTT	CAATCAACAGCTTCTTTCCAGTT	126	22

*Foxa2*, forkhead box A2; *Hnf1b*, hepatocyte nuclear factor (HNF)1 homeobox B; *Hnf1a*, HNF1 homeobox A; *Hnf4a*, hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  *Pdx1*, pancreatic and duodenal homeobox 1; *Rfx6*, regulatory factor X6; *Neurod1*, neurogenic differentiation 1; *Isl1*, ISL LIM homeobox 1; *Pax4*, paired box 4; *Nkx6-1*, NK6 homeobox 1; *Ins*, insulin; *Slc2a2*, solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2; *Kcnj11*, potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; bp, base pairs.

Table 2. Body weight and food intake of mothers, litter size, and body and pancreas weight, serum glucose, and insulin concentrations of the offspring

	Day	C	R	CC	RR	RC	CR
<i>Mothers</i>							
Gestation							
Body weight, g	G1	246.8 $\pm$ 2.5	248.6 $\pm$ 2.3				
	G21	336.8 $\pm$ 4.1	313.2 $\pm$ 2.4*				
Food intake, g/day		18.0 $\pm$ 0.3	18.8 $\pm$ 0.4				
Litter size, pups/litter		11.8 $\pm$ 0.2	11.6 $\pm$ 0.3				
Lactation							
Body weight, g	L7			268.5 $\pm$ 5.0	228.5 $\pm$ 7.2*	266.7 $\pm$ 7.2†	261.4 $\pm$ 5.0†
	L21			259.1 $\pm$ 8.8	210.5 $\pm$ 4.8*	261.3 $\pm$ 5.2†	203.5 $\pm$ 7.0*‡
Food intake, g/day	L7			23.4 $\pm$ 1.0	18.1 $\pm$ 1.9	25.8 $\pm$ 2.4	23.3 $\pm$ 1.3
	L21			44.6 $\pm$ 1.7	25.3 $\pm$ 0.6*	43.5 $\pm$ 1.6†	25.3 $\pm$ 1.0*‡
<i>Offspring</i>							
Body weight, g	P1	6.0 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.1*				
	P7			13.7 $\pm$ 0.5	7.4 $\pm$ 0.5*	13.1 $\pm$ 0.8†	9.7 $\pm$ 1.0*
	P21			38.2 $\pm$ 2.4	13.2 $\pm$ 0.5*	37.1 $\pm$ 1.8†	17.6 $\pm$ 1.8*‡
Pancreas weight, mg	P7			34.0 $\pm$ 4.8	16.8 $\pm$ 5.7*	27.3 $\pm$ 1.6	22.4 $\pm$ 3.3
	P21			103.4 $\pm$ 7.7	40.8 $\pm$ 3.7*	122.4 $\pm$ 8.6†	39.5 $\pm$ 3.2*‡
Pancreas weight/body weight, mg/g	P7			2.4 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.4
	P21			2.9 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.3
Glucose, mmol/l	P7			6.0 $\pm$ 0.5	5.3 $\pm$ 0.5	6.2 $\pm$ 0.8	4.8 $\pm$ 0.5
	P21			7.1 $\pm$ 0.9	7.1 $\pm$ 1.3	7.8 $\pm$ 0.5	7.4 $\pm$ 1.4
Insulin, pmol/l	P7			38.0 $\pm$ 3.8	33.3 $\pm$ 3.1	39.7 $\pm$ 3.6	39.9 $\pm$ 5.5
	P21			234.5 $\pm$ 24.0	283.5 $\pm$ 28.8	387.8 $\pm$ 32.4*†	143.2 $\pm$ 11.6*†‡

Data are expressed as means  $\pm$  SE;  $n = 22$ /group. C, control group; R, low-protein diet group in gestation period; CC, control group; RR, prenatal and postnatal low-protein diet group; RC, prenatal low-protein diet/postnatal control diet group; CR, postnatal low-protein diet group in lactation period; G1, gestation day 1; G21, gestation day 21; P1, postnatal day 1; L7, lactation day 7; L21, lactation day 21; P7, postnatal day 7; P21, postnatal day 21. L7/P7 CC,  $n = 6$ ; P7 RR, RC, and CR,  $n = 5$ ; L21/P21 CC, RR, and RC,  $n = 6$ ; P21 CR,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs. C or CC; † $P < 0.05$  vs. RR; ‡ $P < 0.05$  vs. RC from the same age.

70% at both ages. The proliferation rate decreased  $\sim 50\%$  at both ages. The mean number of  $\beta$ -cell aggregates was reduced at PND 7, and the size of  $\beta$ -cell aggregates decreased by 25% at both ages. Compared with CC,  $\beta$ -cell fraction and  $\beta$ -cell mass at both ages were decreased in RC offspring (Fig. 1), and the proliferation rate was reduced 50 and 30% at PND 7 and PND 21, respectively. The number of  $\beta$ -cell aggregates was reduced by 25% in RC offspring at both ages, whereas  $\beta$ -cell aggregate size was reduced only at PND21. Interestingly,  $\beta$ -cell mass,  $\beta$ -cell proliferation at both ages, and  $\beta$ -cell fraction and  $\beta$ -cell aggregate size at PND 7 were increased compared with RR offspring, showing the effect of restoring the normal maternal diet (Fig. 1, lower middle). In CR offspring compared with CC (Fig. 1),  $\beta$ -cell mass decreased 45% at PND 21 and  $\beta$ -cell proliferation 10% at PND 7. When normalized for body weight,  $\beta$ -cell mass per unit did not differ between groups (data not shown).

*Effect of maternal LP on male offspring expression of transcription factor and  $\beta$ -cell genes.* There were no dietary group or age-related changes in six genes: *Hnf1b*, *Foxa2*, *Nkx6-1*, *Neurod1*, *Pax4*, and *Kcnj11*. Therefore, we report changes in seven genes: *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6*, *Ins*, and *Slc2a2* (Fig. 2). In the CC group, in the first six of these there was a consistent pattern of decreased expression between PNDs 7 and 21. *Slc2a2* mRNA was unchanged (Fig. 2, top). For the three experimental groups, mRNA expression calculated relative to CC at the same age is shown in Fig. 2, upper middle, lower middle, and bottom. Compared with CC, all significant changes with age in the three experimental groups were in the direction of increased expression (Fig. 2, upper middle, lower middle, and bottom). At PND 7 compared with

CC, RR offspring showed increased mRNA for three genes: *Hnf1a*, *Hnf4a*, and *Rfx6*. At PND 21 the same three genes remained elevated as well as *Pdx1*, *Isl1*, and *Slc2a2* (Fig. 2, upper middle).

A comparison of CC and RC (indicating R effects in pregnancy) showed increased *Hnf1a*, *Pdx1*, *Rfx6*, and *Ins* at PND 7, but only *Hnf4a* was elevated at PND 21. Effects of R in lactation are shown by comparing CC and CR. *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Rfx6*, and *Slc2a2* were increased at PND 7 and PND 21.

## DISCUSSION

Compelling evidence from controlled animal studies indicates that structural and functional alterations in  $\beta$ -cells caused by a suboptimal nutritional environment during early life can contribute to development of glucose intolerance and increased susceptibility to later-life T2D (45, 46). However, the underlying mechanisms remain poorly defined. We used the well-established model of feeding prenatal and early postnatal LP to pregnant rats, which induces diabetes in the offspring (36), to determine early postnatal life changes in  $\beta$ -cell growth and expression of a cassette of genes involved in pancreatic development and  $\beta$ -cell function in relation to their potential role in  $\beta$ -cell programming.

Defective insulin secretion in offspring exposed to prenatal and early postnatal LP (2, 7, 19) may potentially be due to altered structure of  $\beta$ -cells. Growth-restricted preweaning and weaning pups with normal fasting glucose and insulin concentrations showed a marked reduction in pancreatic weight,  $\beta$ -cell fraction, and mass and decreased mean size of  $\beta$ -cell aggregates. By PND 21,  $\beta$ -cell mass was reduced in all three

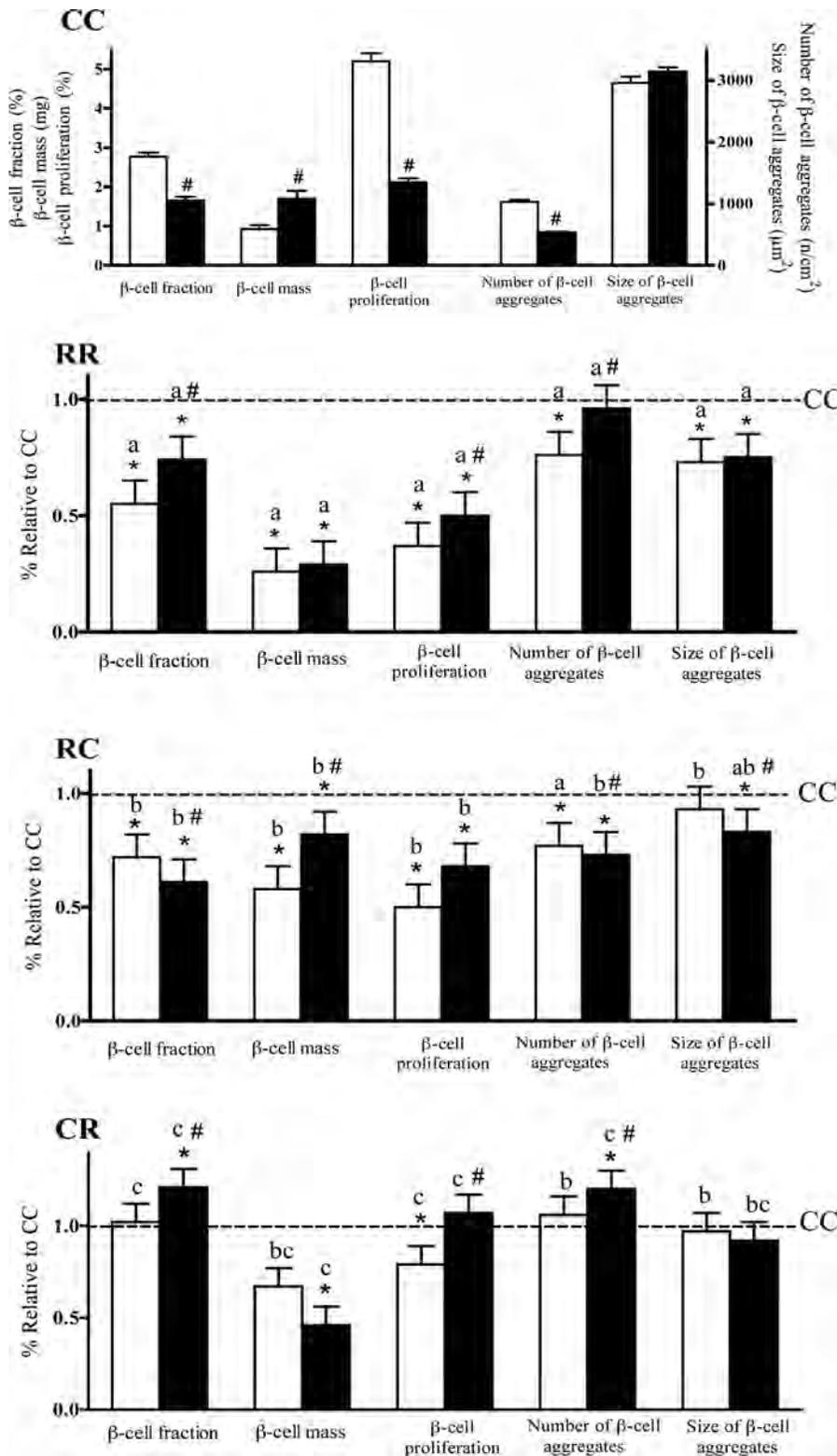


Fig. 1. Consequences of prenatal and/or early postnatal exposure to a maternal low-protein diet on morphological parameters.  $\beta$ -Cell area per unit of pancreatic tissue surface ( $\beta$ -cell fraction),  $\beta$ -cell mass, no. of  $\beta$ -cell aggregates per area of pancreatic tissue, mean size of  $\beta$ -cell aggregates, and proliferation of  $\beta$ -cells on postnatal day (PND) 7 (open bars) and PND 21 (filled bars). Control (CC), pre- and postnatal low-protein diet (RR), prenatal low-protein diet/postnatal control diet (RC), and postnatal low-protein diet (CR) groups are indicated (1st letter, diet in pregnancy; 2nd letter, diet in lactation) and show data normalized to control values (denoted by dotted line) on PND 7 or PND 21 (5 or 6 litters/group). Data are expressed as means  $\pm$  SE; #significant differences ( $P < 0.05$ ) between PND 7 and PND 21. \*Significant differences ( $P < 0.05$ ) vs. CC values. Different letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ) between RR, RC, and CR groups.

experimental groups but was most impaired when restriction occurred prenatally and was not completely recovered when mothers returned to the control diet at birth. Importantly, pancreatic weight and  $\beta$ -cell mass were proportional to body weight in all groups. However,  $\beta$ -cell mass may not increase in later postnatal life in RR pups, as occurs in the model of

maternal caloric restriction in gestation and lactation (14), and thus, adult R offspring would have a decreased reserve of  $\beta$ -cells. The altered pancreatic phenotype demonstrated by LP offspring predisposes them to later-life T2D (36). Offspring weaned onto normal protein diets eventually show decreased insulin responses to glucose, even when normal glucose toler-

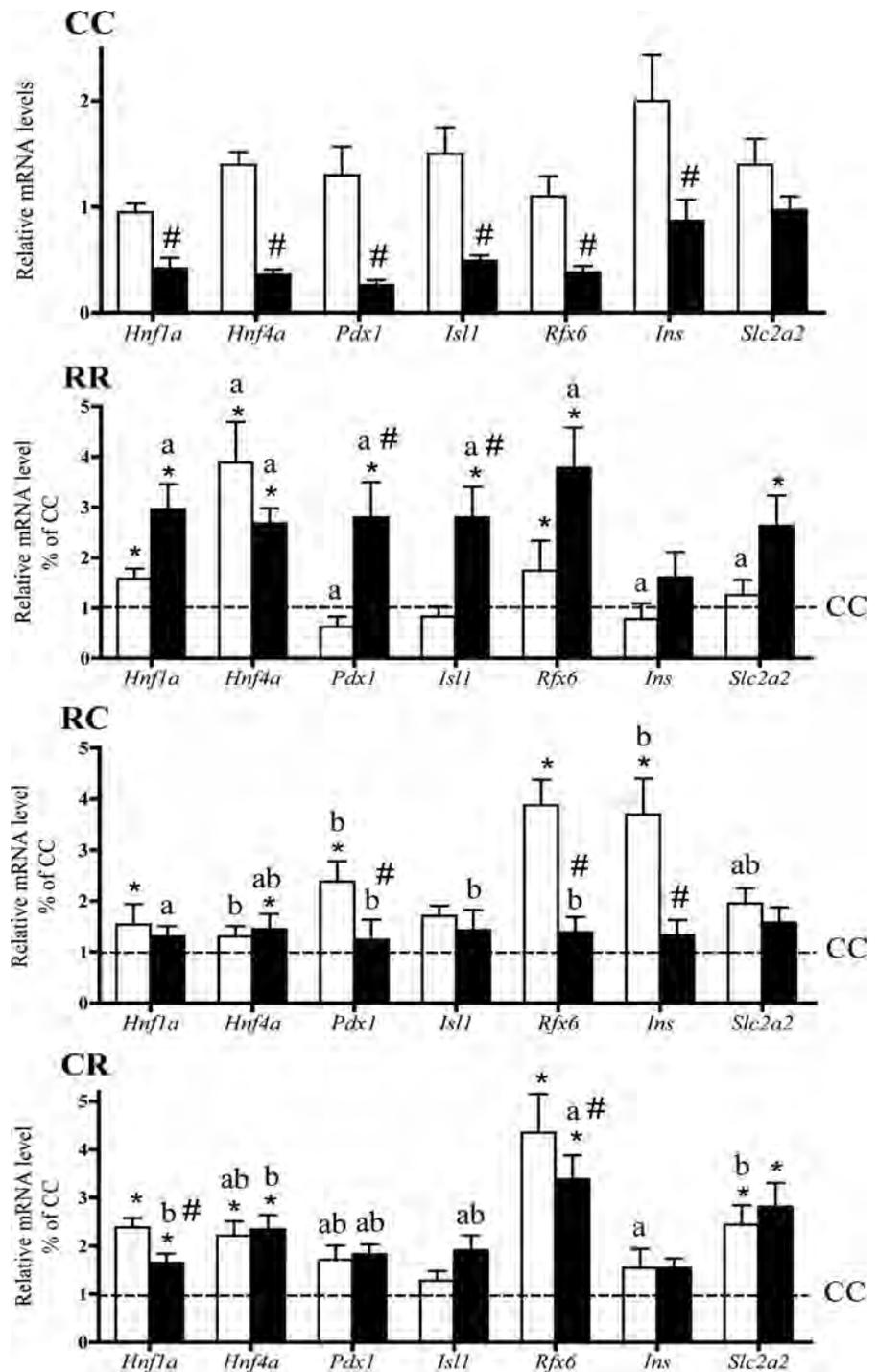


Fig. 2. Effect of exposure to maternal low-protein diet on pancreatic islet gene expression of *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6*, *Ins*, and *Slc2a2* in offspring during lactation. Relative mRNA levels by RT-PCR on PND 7 (open bars) and PND 21 (filled bars). CC, RR, RC, and CR groups are indicated (1st letter, diet in pregnancy; 2nd letter, diet in lactation) and show data normalized to control values (denoted by dotted line) on PND 7 or PND 21 (5 or 6 litters/group). Data are expressed as means  $\pm$  SE. Dotted line denotes the control value. #Significant differences ( $P < 0.05$ ) between PND 7 and PND 21; \*significant differences ( $P < 0.05$ ) vs. control (CC) values. Different letters denote significant differences ( $P < 0.05$ ) between RR, RC, and CR groups.

ance is maintained early in life due to improved insulin sensitivity (3, 34). The decrease in  $\beta$ -cell proliferation and mass will clearly make these pups vulnerable, especially to obesogenic diets (49).

Matching of the trajectory of differentiation and cellular proliferation during development is key to achieving optimal structure and functional capability of all organs, including the pancreas. Impairment of pancreatic insulin secretion could result from altered expression of genes implicated in pancreatic islet growth, cell differentiation, and insulin secretory capacity.

Apart from *Isl1* at PND 21 and *Ins* at PND 7, each of the genes investigated was increased in at least one group of pups at least at one age.

The various gene changes observed may either be a direct response to the nutritional challenge or represent compensation for initial changes. In addition, although the islet is comprised of greater than 90% of  $\beta$ -cells, these changes may take place partially or completely in other cell types. Offspring islet expression of *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Isl1*, *Rfx6*, and *Slc2a2* was affected by prenatal and early postnatal exposure to LP, indi-

cating that their expression is regulated potentially by decreased amino acid availability. Gene overexpression of all of these transcription factors suggests premature differentiation.

*Hnf1a* and *Hnf4a* are implicated in pancreatic development and control insulin secretion partly by regulating glucose transporter *Slc2a2* transcription (5, 39, 44). Their overexpression in RR offspring might occur as a compensatory mechanism to maintain glucose homeostasis during early life since insulin secretion is impaired (2, 7, 19). However, upregulation of *Hnf1a* and *Hnf4a* expression may have detrimental effects on  $\beta$ -cell structure, because previous studies demonstrate that *Hnf1a* and *Hnf4a* overexpression decrease  $\beta$ -cell proliferation and induce apoptosis, leading to a reduction in  $\beta$ -cell mass (11, 27).

*Rfx6* regulates pancreatic islet cell differentiation (43) and expression of genes encoding factors involved in *Ins* transcription (40). Its overexpression in RR offspring might represent a compensatory mechanism to promote transcription of its target genes to sustain insulin production. Message for *Rfx6* was the most affected gene, being increased in four of the six age-by-treatment groups. Since this gene is necessary for specification of several islet cell types (43), caution must be expressed in conclusions solely regarding its role in driving  $\beta$ -cell growth and differentiation.

*Pdx1* is crucial for pancreatic development, endocrine cell differentiation, and adult *Ins* expression and  $\beta$ -cell neogenesis (20). A study in a pancreatic  $\beta$ -cell line showed that its overexpression promotes insulin production without insulin gene expression being affected (48). Hence, upregulation of *Pdx1* expression in RR offspring likely represents accelerated pancreatic maturation that would result in better maintenance of adequate insulin levels, at least initially. Since LP impairs  $\beta$ -cell proliferation, it may lead to premature differentiation, by upregulating *Pdx1* expression, to form  $\beta$ -cells at the expense of proper  $\beta$ -cell expansion. Thus, LP restricts growth of  $\beta$ -cells, so protein can be used for the maintenance of existing  $\beta$ -cells. Indeed, an increased number of differentiated  $\beta$ -cells and fewer precursor cells would support our suggestion of accelerated differentiation of  $\beta$ -cells that have reduced proliferation capability. Further studies will be necessary to elucidate this.

*Isl1* is required for the differentiation, proliferation, and maintenance of endocrine cells during intrauterine pancreatic development and in early postnatal life (9). Accordingly, its overexpression in RR offspring may influence premature islet cell formation, including that of  $\beta$ -cells.

It is known that most of the  $\beta$ -cell mass of adult rats forms after birth and that maturation of insulin secretion occurs in early postnatal life (1, 8). Therefore, any environmental factor in this critical window of development could have long-term consequences on pancreatic function. Offspring exposed to LP in gestation followed by a normal maternal diet during lactation (RC) underwent catchup growth and showed increased serum insulin by weaning, maintaining relatively normal glucose homeostasis since glucose levels were normal. Increased plasma insulin was accompanied in the RC group by increased *Ins* mRNA expression. Increased insulin secretion in the presence of normal glucose suggests that insulin resistance is already present in these neonates by PND 21, and later-life challenges to pancreatic function may well precipitate overt diabetes. Previous studies with animals experiencing this developmental history indicate that increased insulin concentra-

tions are still observed in adulthood and that nutritional challenges lead to glucose intolerance and insulin resistance (3, 50). All the morphometric markers of  $\beta$ -cell development were decreased in RR offspring compared with CC controls. Nutritional recovery in RC only partially restored all variables compared with RR pups, indicating that the underlying mechanisms of  $\beta$ -cell morphological alterations probably originate in fetal life. *Hnf1a*, *Hnf4a*, *Pdx1*, and *Rfx6* expression were upregulated in RC offspring and might also represent a similar mechanism to that seen in weanling offspring with prenatal and postnatal protein restriction. Nevertheless, except for *Hnf4a*, their expression was transiently increased on PND 7, suggesting that these mechanisms set in place in utero are no longer necessary in postnatal life since the offspring recuperates from the effect of prenatal protein restriction. *Ins* expression was also induced at PND 7 in RC, consistent with early development of insulin resistance.

In sharp contrast, offspring of mothers fed a normal diet in pregnancy but LP during lactation (CR) showed growth restriction, decreased insulin concentration (suggesting defective insulin secretion and/or improved insulin sensitivity), and reduced  $\beta$ -cell mass. Decreased  $\beta$ -cell mass in CR pups may reflect only the severe reduction in pancreatic weight rather than a negative effect on  $\beta$ -cell structure since  $\beta$ -cell fraction and aggregate number were slightly increased and  $\beta$ -cell aggregate size was unchanged. Moreover,  $\beta$ -cell proliferation in CR offspring was decreased on PND 7, but it was similar to that of CC by PND 21. Conversely, prenatal LP (RR and RC groups) reduced  $\beta$ -cell fraction, mass, aggregate size, and number partly as a result of decreased  $\beta$ -cell proliferation. Increased  $\beta$ -cell apoptosis could also contribute to reduce  $\beta$ -cell mass in all LP groups. These data suggest that postnatal LP (CR) affects mainly pancreatic weight, whereas prenatal LP, regardless of the postnatal diet (RR and RC), has detrimental effects on  $\beta$ -cell development. *Hnf1a*, *Hnf4a*, and *Slc2a2* expression were upregulated in CR offspring. It is also possible that *Hnf1a* and *Hnf4a* overexpression reduce  $\beta$ -cell mass, although proliferation was not significantly affected. *Rfx6* expression was upregulated as a further potential compensatory mechanism to sustain insulin production.

Taken together, these results suggest that RR and CR pups showing increased gene expression, perhaps as a compensation mechanism for GSIS impairment (2, 7, 16, 19, 30, 31) and decreased  $\beta$ -cell mass, may be predisposed to  $\beta$ -cell exhaustion from later-life attempts to compensate, resulting in glucose intolerance and predisposition to T2D. Conversely, postnatal recuperation of nutrition (RC) restores overall GSIS (2, 19), and because  $\beta$ -cell mass is partially recovered, gene expression is not altered at weaning, and fasting insulin levels are increased, it is likely that glucose intolerance in adult life results mainly from the insulin resistance that appears to develop in early life in the RC offspring.

In conclusion, maternal LP induces gene expression of key transcription factors and  $\beta$ -cell genes, which affect  $\beta$ -cell structure and function in a manner that is dependent on the window of nutrient challenge. Some of these changes may be compensatory mechanisms to maintain survival and glucose homeostasis in early life. The changes we observed would result in the earlier appearance of fewer mature islets with a smaller functional capacity and which, if factors such as overnutrition and associated adiposity occur later in life to-

gether or separately, could lead to later-life diabetes. This study indicates potential mechanisms underlying  $\beta$ -cell programming that are targets for future investigation and highlights the relative and specific importance of dietary interventions during pregnancy and lactation to prevent detrimental structural and functional outcomes in  $\beta$ -cells.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Patricia Joseph Bravo (Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México) and Marcia Hiriart Urdanivia (Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México) for critical reviewing of the manuscript and helpful suggestions. We also thank Dr. Fausto Sánchez (Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología, México) for technical advice and Roxana Gutiérrez (Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México) for technical assistance.

#### GRANTS

The present study was supported by a grant provided by the National Council of Science and Technology of Mexico, CONACYT (78762), A. Rodríguez-Trejo was supported by a graduate studentship from CONACYT (205417) and National Institutes of Health Grant HD-21350.

#### DISCLOSURES

The authors have no conflicts of interest, financial or otherwise, regarding this article.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.R.-T., M.G.O.-L., M.Á.G.-S., and C.M. performed the experiments; A.R.-T., E.Z., and M.M. analyzed the data; A.R.-T., M.G.O.-L., E.Z., M.Á.G.-S., C.M., B. Blondeau, B. Bréant, P.W.N., and M.M. interpreted the results of the experiments; A.R.-T. and M.M. prepared the figures; A.R.-T., P.W.N., and M.M. drafted the manuscript; A.R.-T., M.G.O.-L., E.Z., M.Á.G.-S., C.M., B. Blondeau, B. Bréant, P.W.N., and M.M. approved the final version of the manuscript; M.G.O.-L., E.Z., M.Á.G.-S., C.M., B. Blondeau, B. Bréant, P.W.N., and M.M. edited and revised the manuscript; M.M. did the conception and design of the research.

#### REFERENCES

- Aguayo-Mazzucato C, Sánchez-Soto C, Godínez-Puig V, Gutiérrez-Ospina G, Hiriart M. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS One* 1: e35, 2006.
- Arantes VC, Teixeira VP, Reis MA, Latorraca MQ, Leite AR, Carneiro EM, Yamada AT, Boschero AC. Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. *J Nutr* 132: 3030–3035, 2002.
- Bieswal F, Ahn MT, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, Remacle C. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity* 14: 1330–1343, 2006.
- Blondeau B, Lesage J, Czernichow P, Dupouy JP, Bréant B. Glucocorticoids impair fetal  $\beta$ -cell development in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E592–E599, 2001.
- Boj SF, Párrizas M, Maestro MA, Ferrer J. A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14481–14486, 2001.
- Cerf ME. Transcription factors regulating  $\beta$ -cell function. *Eur J Endocrinol* 155: 671–679, 2006.
- Cherif H, Reusens B, Ahn MT, Hoet JJ, Remacle C. Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low-protein diet. *J Endocrinol* 159: 341–348, 1998.
- Chintinne M, Stangé G, Denys B, Veld PI, Hellemans K, Pipeleers-Marichal M, Ling Z, Pipeleers D. Contribution of postnatally formed small beta cell aggregates to functional beta cell mass in adult rat pancreas. *Diabetologia* 53: 2380–2388, 2010.
- Du A, Hunter CS, Murray J, Noble D, Cai CL, Evans SM, Stein R, May CL. Islet-1 is required for the maturation, proliferation, and survival of the endocrine pancreas. *Diabetes* 58: 2059–2069, 2009.
- Dumortier O, Blondeau B, Duvillé B, Reusens B, Bréant B, Remacle C. Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. *Diabetologia* 50: 2495–2503, 2007.
- Erdmann S, Senkel S, Arndt T, Lucas B, Lausen J, Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Thomas H. Tissue-specific transcription factor HNF4 $\alpha$  inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the pancreatic INS-1  $\beta$ -cell line. *Biol Chem* 388: 91–106, 2007.
- Gao N, Le Lay J, Qin W, Doliba N, Schug J, Fox AJ, Smirnova O, Matschinsky FM, Kaestner KH. Foxa1 and Foxa2 maintain the metabolic and secretory features of the mature beta-cell. *Mol Endocrinol* 24: 1594–1604, 2010.
- Garofano A, Czernichow P, Bréant B. Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. *Diabetologia* 41: 1114–1120, 1998.
- Garofano A, Czernichow P, Bréant B. Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. *Diabetologia* 42: 711–718, 1999.
- Georgia S, Bhushan A. Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J Clin Invest* 114: 963–968, 2004.
- Gravena C, Andreazzi AE, Mecabo FT, Grassioli S, Scantamburlo VM, Mathias PC. Protein restriction during lactation alters the autonomic nervous system control on glucose-induced insulin secretion in adult rats. *Nutr Neurosci* 10: 79–87, 2007.
- Gu C, Stein GH, Pan N, Goebbels S, Hörnberg H, Nave KA, Herrera P, White P, Kaestner KH, Sussel L, Lee JE. Pancreatic  $\beta$ -cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity. *Cell Metab* 11: 298–310, 2010.
- Hales CN, Desai M, Ozanne SE, Crowther NJ. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans* 24: 341–350, 1996.
- Heywood WE, Mian N, Milla PJ, Lindley KJ. Programming of defective rat pancreatic  $\beta$ -cell function in offspring from mothers fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods. *Clin Sci (Lond)* 107: 37–45, 2004.
- Holland AM, Goñez LJ, Naselli G, MacDonald RJ, Harrison LC. Conditional expression demonstrates the role of the homeodomain transcription factor Pdx1 in maintenance and regeneration of  $\beta$ -cells in the adult pancreas. *Diabetes* 54: 2586–2595, 2005.
- Jensen J. Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev Dyn* 229: 176–200, 2004.
- Kargar C, Ktorza A. Anatomical versus functional  $\beta$ -cell mass in experimental diabetes. *Diabetes Obes Metab* 10: 43–53, 2008.
- Kaung HL. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn* 200: 163–175, 1994.
- Kopine D, Murtaugh LC. Exocrine-to-endocrine differentiation is detectable only prior to birth in the uninjured mouse pancreas. *BMC Dev Biol* 10: 38, 2010.
- Li DS, Yuan YH, Tu HJ, Liang QL, Dai LJ. A protocol for islet isolation from mouse pancreas. *Nat Protoc* 4: 1649–1652, 2009.
- Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 156: 38–50, 1991.
- Luco RF, Maestro MA, del Pozo N, Philbrick WM, de la Ossa PP, Ferrer J. A conditional model reveals that induction of hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$  in Hnf1 $\alpha$ -null mutant beta-cells can activate silenced genes postnatally, whereas overexpression is deleterious. *Diabetes* 55: 2202–2211, 2006.
- Matveyenko AV, Butler PC. Relationship between  $\beta$ -cell mass and diabetes onset. *Diabetes Obes Metab* 10: 23–31, 2008.
- Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57: 1584–1594, 2008.
- Moura AS, Caldeira Filho JS, de Freitas Mathias PC, de Sá CC. Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 96: 179–192, 1997.
- Moura AS, Carpinelli AR, Barbosa FB, Gravena C, Mathias PC. Undernutrition during early lactation as an alternative model to study the onset of diabetes mellitus type II. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 92: 73–84, 1996.
- Nakamura K, Minami K, Tamura K, Iemoto K, Miki T, Seino S. Pancreatic  $\beta$ -cells are generated by neogenesis from non- $\beta$ -cells after birth. *Biomed Res* 32: 167–174, 2011.
- Ozanne SE, Olsen GS, Hansen LL, Tingey KJ, Nave BT, Wang CL, Hartil K, Petry CJ, Buckley AJ, Mosthaf-Seedorf L. Early growth restriction leads to down regulation of protein kinase C zeta and insulin resistance in skeletal muscle. *J Endocrinol* 177: 235–241, 2003.

34. **Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, Smith GD.** Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 271: E1128–E1134, 1996.
35. **Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet JJ, Hill DJ.** A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor II. *Endocrinology* 140: 4861–4873, 1999.
36. **Petry CJ, Dorling MW, Pawlak DB, Ozanne SE, Hales CN.** Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res* 2: 139–143, 2001.
37. **Petry CJ, Ozanne SE, Wang CL, Hales CN.** Effects of early low protein restriction and adult obesity on rat pancreatic hormone content and glucose tolerance. *Horm Metab Res* 32: 233–239, 2000.
38. **Sander M, Sussel L, Conners J, Scheel D, Kalamaras J, Dela Cruz F, Schwitzgebel V, Hayes-Jordan A, German M.** Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 127: 5533–5540, 2000.
39. **Shih DQ, Stoffel M.** Dissecting the transcriptional network of pancreatic islets during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14189–14191, 2001.
40. **Smith SB, Qu HQ, Taleb N, Kishimoto NY, Scheel DW, Lu Y, Patch AM, Grabs R, Wang J, Lynn FC, Miyatsuka T, Mitchel J, Seerke R, Désir J, Eijnden SV, Abramowicz M, Kacet N, Weill J, Renard ME, Gentile M, Hansen I, Dewar K, Hattersley AT, Wang R, Wilson ME, Johnson JD, Polychronakos C, German MS.** Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans. *Nature* 463: 775–780, 2010.
41. **Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ.** Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* 57: 107–118, 1990.
42. **Sosa-Pineda B.** The gene Pax4 is an essential regulator of pancreatic  $\beta$ -cell development. *Mol Cells* 18: 289–294, 2004.
43. **Soyer J, Flasse L, Raffelsberger W, Beucher A, Orvain C, Peers B, Ravassard P, Vermot J, Voz ML, Mellitzer G, Gradwohl G.** Rfx6 is an Ngn3-dependent winged helix transcription factor required for pancreatic islet cell development. *Development* 137: 203–212, 2010.
44. **Stoffel M, Duncan SA.** The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 $\alpha$  regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13209–13214, 1997.
45. **Tarry-Adkins JL, Chen JH, Jones RH, Smith NH, Ozanne SE.** Poor maternal nutrition leads to alterations in oxidative stress, antioxidant defense capacity and markers of fibrosis in rat islets: potential underlying mechanisms for development of the diabetic phenotype in later life. *FASEB J* 24: 2762–2771, 2010.
46. **Valtat B, Dupuis C, Zenaty D, Singh-Estivalet A, Tronche F, Bréant B, Blondeau B.** Genetic evidence of the programming of beta cell mass and function by glucocorticoids in mice. *Diabetologia* 54: 350–359, 2011.
47. **Wang L, Coffinier C, Thomas MK, Gresh L, Eddu G, Manor T, Levitsky LL, Yaniv M, Rhoads DB.** Selective deletion of the Hnf1beta (MODY5) gene in beta-cells leads to altered gene expression and defective insulin release. *Endocrinology* 145: 3941–3949, 2004.
48. **Wang H, Maechler P, Ritz-Laser B, Hagenfeldt KA, Ishihara H, Philippe J, Wollheim CB.** Pdx1 level defines pancreatic gene expression pattern and cell lineage differentiation. *J Biol Chem* 276: 25279–25286, 2001.
49. **Warner MJ, Ozanne SE.** Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J* 427: 333–347, 2010.
50. **Zambrano E, Bautista CJ, Deás M, Martínez-Samayoa PM, González-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz PW.** A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* 571: 221–230, 2006.

## **12. Capítulo de libro publicado**

**Menjívar M, Rodríguez-Trejo A.** Transcription factors of pancreas development and diabetes. En *Advances in Selected Topics in Endocrinology*. Editado por Ignacio Camacho-Arroyo. Kerala, India: Research Signpost, 2009.

Research Signpost  
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Advances in Selected Topics in Endocrinology, 2009: 203-222 ISBN: 978-81-308-0363-0  
Editor: Ignacio Camacho-Arroyo

13

## Transcription factors of pancreas development and diabetes

**Marta Menjivar and Adriana Rodríguez-Trejo**  
Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional  
Autónoma de México, México

### Abstract

*Pancreas is a major organ involved in glucose homeostasis. Pancreatic development consists in serial events that begin with the endodermal evagination of dorsal and ventral diverticula. These events include mesenchymal-epithelial interactions and transcriptional regulation achieved by several specific pancreatic transcription factors such as TCF2, Pdx1, Neurog3, NeuroD1, Pax4, MafA, Nkx2.2 and Nkx6.1. Expression pattern of transcription factors*

Correspondence/Reprint request: Dr. Marta Menjivar, Facultad de Química, UNAM, Departamento de Biología  
Lab. 202, Av. Universidad 3000, Col. Copilco, CP 04510, México, DF. México  
E-mail: menjivar@servidor.unam.mx

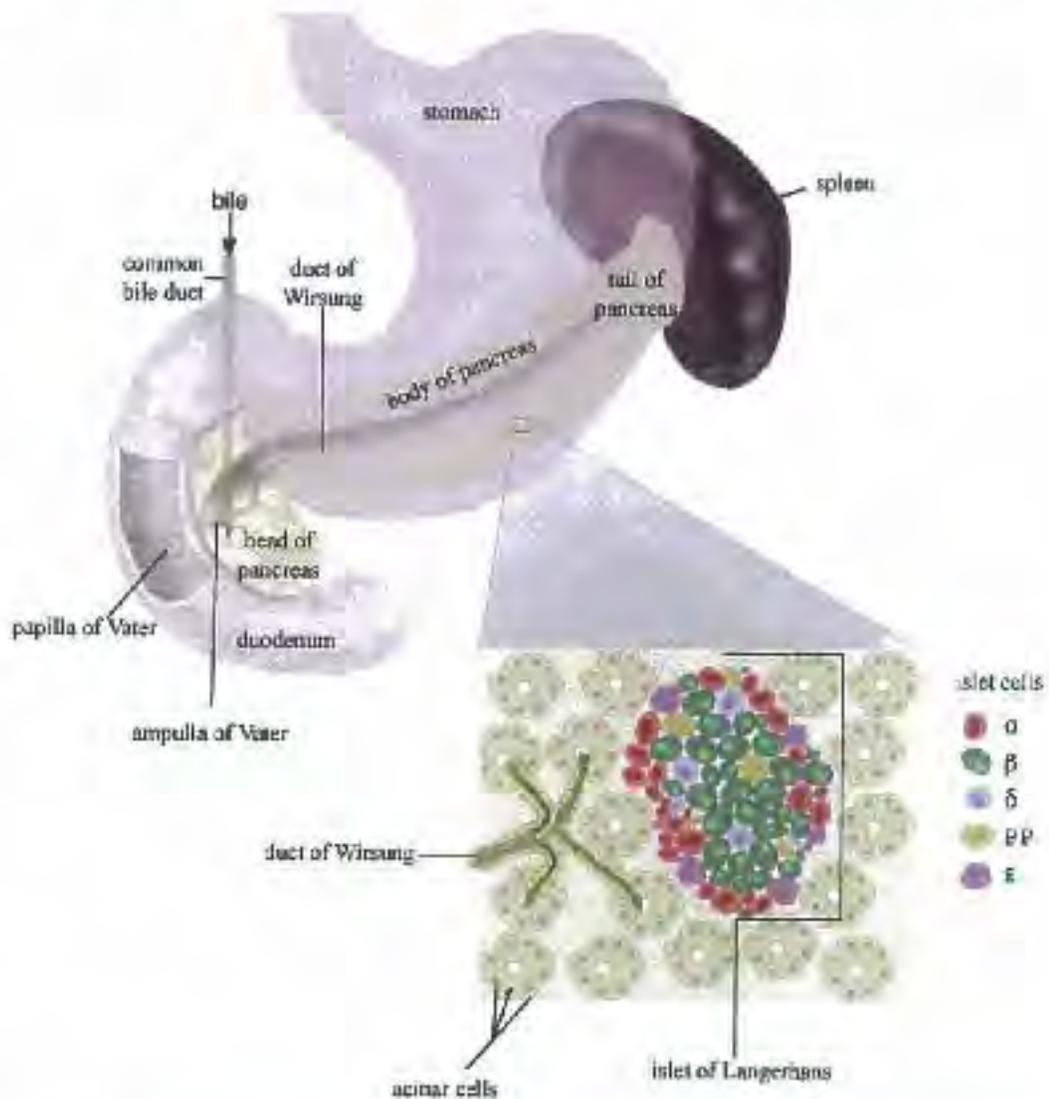
*limits the boundaries of the developing pancreas and determines the differentiation programs of individual cell lineages. A minimal variation on the sequence of one of these genes could lead to major alterations in pancreatic development. Human genetic studies indicate that gene mutations of transcription factors involved in pancreas development cause type 2 diabetes. Several mutations of pancreatic transcription factors have been associated with a particular form of type 2 diabetes, the monogenic MODY type (Maturity-onset diabetes of the young) that includes genes coding for TCF2/HNF1 $\beta$  (MODY5), Pdx1 (MODY4) and NeuroD1 (MODY6). In addition, Pax4 and Nkx2.2 polymorphisms have been linked to a common form of type 2 diabetes. Furthermore, environmental factors contribute to pancreas development. Epidemiological evidence in humans and experimental studies on animals have shown that poor nutrition during pregnancy and early postnatal life is related to modifications on expression of pancreatic transcription factors, such as PDX-1 which expression is reduced in rats fed with a low-protein diet during gestation and lactation periods. This might lead to an increased risk of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in adulthood. However, the mechanisms underlying this phenomenon are unknown. Efforts aiming to identify the relationship between alterations in transcription factors involved in pancreatic development and diabetes onset could disclose in a near future a more precise clinical picture of the disease.*

## **Introduction**

Type 2 diabetes is characterized by hyperglycaemia resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both [1]. This chronic disease affects more than 150 million people worldwide [2]. Studies of the biology of pancreas development have led to a new sight on the cause of type 2 diabetes [3]. Transcriptional networks control early pancreas organogenesis, embryonic endocrine cell formation and the differentiated function of adult beta cells [4]. Genetic polymorphisms or mutations in transcription factor genes involved in such networks have impact on predisposition for diabetes [3]. Dietary modifications during prenatal and early postnatal periods, such as altered composition, excess or restricted intake, can also alter development of the endocrine pancreas and contribute to an increased risk of type 2 diabetes in adulthood [5,6]. Therefore, the aim of this review is to summarize the transcription factors implicated in pancreas development and to address the link among variations in sequence or expression of the genes encoding these transcription factors and the occurrence of diabetes in later life.

## Pancreas anatomy and function

The pancreas is an organ that plays a central role in glucose homeostasis and food digestion [7]. It is located behind the stomach and it is connected to the duodenum by the ampulla of Vater, where the main pancreatic duct (duct of Wirsung) joins with the common bile duct. In the human, the terms head, neck, body and tail are used to designate regions of the organ from proximal to distal (figure 1), while in rodents the shape of pancreas is less defined [8].



**Figure 1.** Anatomy and structure of the pancreas. It is located behind the stomach, between the duodenum and the spleen. It consists of three major cell types: exocrine cells (acinar cells), duct cells and endocrine cells, organized into islets and scattered throughout the exocrine tissue.

The pancreas comprises three major cell types: a) exocrine or acinar cells produce digestive enzymes that promote nutrient absorption and are secreted into the intestine by a branched ductal network; b) duct cells; and c) endocrine cells that control glucose homeostasis. There are four principal endocrine cell types defined by the hormones that they secrete (table 1). Minor cell types are the D1 cells that produce the vasoactive intestinal peptide, enterochromaffin cells that synthesize secretin and the ghrelin-producing epsilon-cells recently described. Endocrine cells are organized into spheroidal aggregates, referred to as islets of Langerhans, which are scattered through the exocrine tissue. Exocrine tissue is organized into epithelial acini and make up over 95% of the pancreas. The islets make up only about 1-2% of the pancreas [9,10], in which the  $\beta$ -cells constitute about 50-80% of the total cells and tend to segregate to the islet core [11].

Glucose homeostasis is maintained by a hormonal network involving the hormones insulin and glucagon. Synthesis and secretion of insulin are stimulated by increased glucose levels. Insulin release allows uptake of glucose from circulation by stimulating its entry into peripheral tissues, mainly in muscle and adipose tissue cells. In addition, insulin increases energy storage by inducing glycogen synthesis in liver and muscle, and fatty acid synthesis in liver and adipose tissue. Low insulin levels, between meals or upon fasting, promotes release of glucagon. This hormone increases the hepatic production and release of glucose by stimulating glycogenolysis and gluconeogenesis [12].

**Table 1.** Endocrine cell types and hormones.

Endocrine cell type	Hormone
alpha	glucagon
beta	insulin
delta	somatostatin
PP	pancreatic polypeptide

## Pancreas development

Studies of human pancreas development are restricted in number by ethical constraints and access to tissue, which makes data from other species, such as mice, reliable [13].

During gastrulation, the epiblast, consisting of multipotential cells, generates the 3 embryo layers: endoderm, mesoderm, and ectoderm [7]. The endoderm is formed by a set of cells in anterior proximity to the node, which take up position on the ventral surface of the egg cylinder in the mouse embryo after migration through the primitive streak [14]. At the completion of gastrulation, endodermal cells undergo morphogenetic movements to

generate a primitive gut tube. Evaginations that arise from different portions of the tube will generate various differentiated organs, such as thyroid, pancreas, liver and lung [10].

The period of pancreatic determination occurs at embryonic day (E) 8.0 in the mouse. The pancreas originates as two distinct thickenings on the anterior endodermal primitive gut tube that form at E9.0-E9.5. One thickening arises dorsally, posterior to the anlage of the stomach, and is referred to as the dorsal pancreatic anlage, while the ventral pancreatic anlage arises adjacent to the hepatic endoderm. These structures evaginate into the surrounding mesenchyme as dense epithelial buds [8,10,11,14].

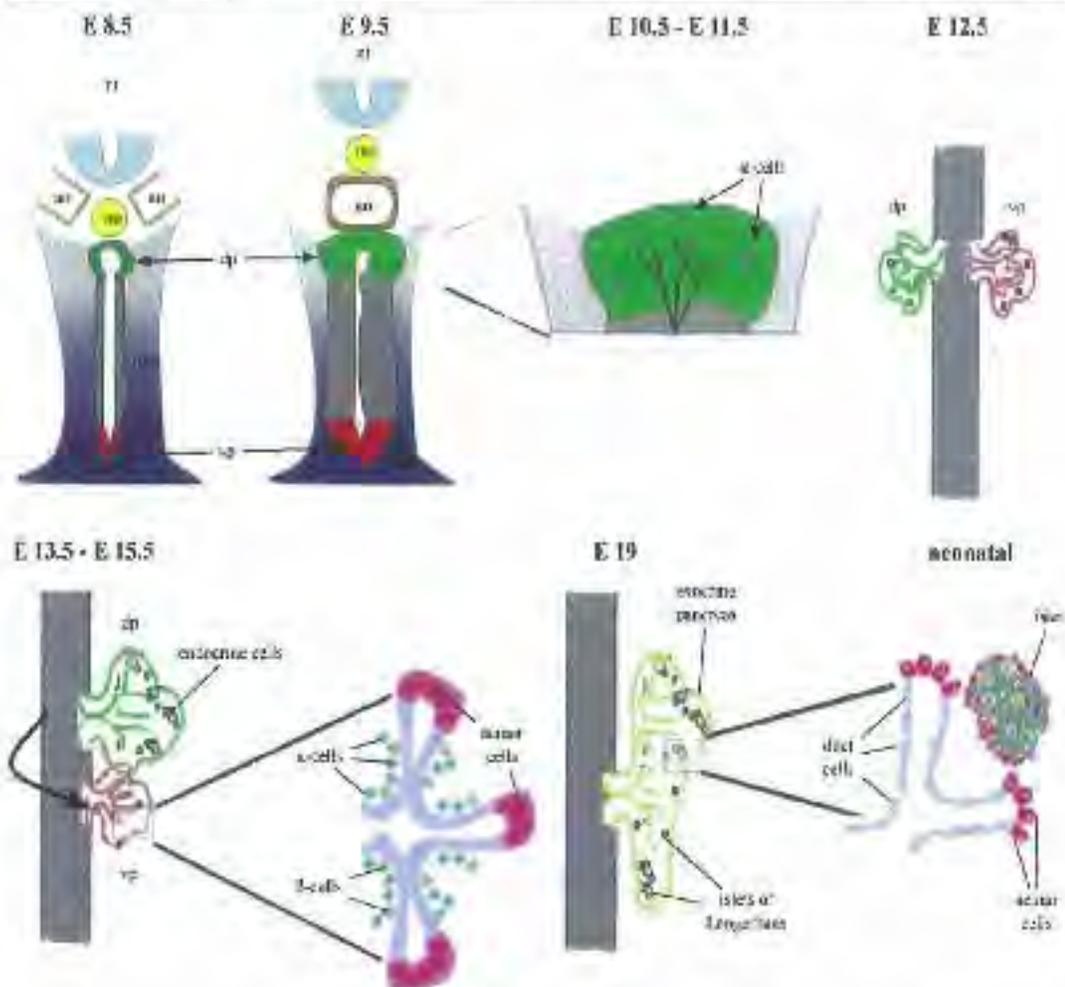
The dorsal and ventral programs of the pancreas are not completely identical and slightly asynchronous, due to the two independent endodermal domains receiving distinct signals from their surrounding tissues [14]. Evagination and development of the ventral pancreatic bud is delayed compared with that of the dorsal bud, and the ventral bud gives rise to fewer endocrine cells than does the dorsal bud [15]. Dorsal pancreatic endoderm lies at the midline of the embryo and develops in close proximity to the notochord [10]. Signals from the notochord, including activin- $\beta$ B and fibroblast growth factor-2 (FGF-2), repress expression of Sonic hedgehog (Shh), an activator of the Hedgehog signaling (Hh) pathway, allowing specification of the dorsal pancreatic bud. In addition, signals from the aorta are required for dorsal pancreas development [7,9]. Fusion of the two aortic rudiments, around E9, displaces the notochord and it is established direct interaction between endothelial cells and dorsal pancreatic anlage. This promotes the appearance of the first differentiated endocrine cells. The ventral pancreatic endoderm develops near to the liver and bile duct epithelium that forms on the ventral face of the gut. It lies close to the prospective hepatic bud and they are both exposed to lateral plate mesoderm and its derivative, the septum transversum mesenchyme [10,14]. After specification and initial bud formation, pancreatic epithelium requires interaction with signals from the mesenchyme, such as FGF10 and FGF7, for subsequent proliferation, branching morphogenesis and cell differentiation into ductal, exocrine and endocrine cells [10, 15, 16]. In addition, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates differentiation and expansion of early pancreatic progenitor cells and it also modulates proliferation of differentiated cells [7].

Rutter and colleagues proposed a model of pancreatic development describing two major transitions in time. During the *primary transition*, cells at the appropriate regions of the gut become destined to form pancreas [14]. The earliest endocrine cells detected in the pancreatic anlage in the foregut (E9.5) express glucagon, peptide YY, pancreatic polypeptide and neuropeptide Y

[3]. The remaining epithelial cells are characterized as being "protodifferentiated" because of the presence of low levels of pancreas-specific terminal gene products, such as insulin and amylase in pancreatic extracts [14]. By E10.5, the partially differentiated epithelium of the two buds undergoes branching morphogenesis into a ductal tree that at E12.5 results in the formation of two primordial pancreas organs consisting predominantly of an undifferentiated ductal epithelium [3]. Cells of the ductal lineage appear to be specified within a short period from E9.5 to E12.5 in mouse [14].

During *secondary transition* (E13.5 and E15.5 in the mouse), gut rotation brings the two lobes in close apposition and the dorsal and ventral buds fuse into a single organ [11,14]. Protein concentrations of  $\beta$ -cell and exocrine products increase between 100- to 1,000-fold [14]. During E14.5 and E15.5 the exocrine pancreas differentiates from the ductal epithelium. Acini and ducts become discernible on E15.5 [3]. After the secondary transition, expansion occurs by growth of fully differentiated cell types. At E15.5, endocrine cells are still largely individual and associated with the ducts [8,14]. Somatostatin and PP cells appear from E15.5 and E16, respectively [13]. Islets are not fully formed until the end of gestation, at about E18-E19. Exocrine cells are strongly proliferating after their differentiation, and endocrine cells show strong mitotic activity closer to birth (Figure 2). The islets undergo additional remodeling and maturation for 2-3 weeks after birth [3,8,14].

In humans, the pancreas also develops as ventral and dorsal anlagen that arise from the foregut endoderm. Pancreatic differentiation begins at 26 days post-conception (26 d.p.c.), when the dorsal primordium appears as a diverticulum of the foregut [17]. The ventral anlage is located close to the bile duct and appears between 30 and 35 d.p.c. During embryogenesis, dorsal and ventral buds extend into the mesenchyme and at 37 d.p.c. the ventral portion rotates to the right and then behind the developing duodenal bud [13,18]. At the end of the embryonic period (56 d.p.c.), as the stomach and duodenum rotate, the ventral bud and hepatopancreatic orifice move around until they come into contact and fuse with the dorsal bud [8]. The epithelial cells of the pancreas are arranged as simple tubular structures within a mesenchymal stroma. In contrast, in the early fetal period, there are more branched epithelial clusters. The dorsal and ventral rudiments contribute to distinct portions of the pancreas. The ventral bud forms the posterior part of the head, or uncinata process, and the dorsal bud contributes mainly to the tail and body of the organ [8,10]. The ventral duct fuses with the distal portion of the dorsal duct to become the main pancreatic duct (duct of Wirsung), and the proximal part of the dorsal duct becomes a small accessory duct (duct of Santorini) with



**Figure 2.** Schematic representation of pancreas development in the mouse. At E8.5, the dorsal pre-pancreatic thickening (dp) interacts with the notochord (no) and the ventral pre-pancreatic thickening (vp) lies within lateral plate mesoderm [10]. By E9.5, endodermal epithelium of the foregut (gray) forms dorsal (dp) and ventral (vp) buds, which are surrounded by mesenchyme (mes) [11]. Dorsal bud interacts with dorsal aorta (ao) and with the mesenchyme. Dorsal and ventral buds develop into branching ducts and undifferentiated epithelium. Single endocrine cells are scattered through the undifferentiated epithelium (primary transition) [3]. Outgrowth produces dense epithelial buds and  $\alpha$ -cells differentiate (E10.5-E11.5) [11]. The buds begin to differentiate into endocrine and exocrine cellular lineages by E14 and proliferate and expand extensively. Subsequent gut rotation brings the ventral pancreatic bud into contact with the dorsal bud and they fuse by E15 [3,10]. Differentiation of  $\beta$ -cells and acinar cells increases (secondary transition) [11]. A nearly fully developed pancreas is formed at E19, with endocrine cells organized into islets of Langerhans [3]. The organ has its mature form by birth with islets of Langerhans dispersed through exocrine tissue and ducts [11].

with its own opening into the duodenum [8,18]. The onset of islet formation is at 12–13 weeks post-conception (w.p.c.). Both insulin and glucagon can be detected by 8 w.p.c., including a slightly delayed detection of PP. Insulin-positive cells are the more prevalent cell type in humans during early fetal development. Insulin expression precedes that of glucagon and the four islet cell hormones (insulin-, glucagon-, somatostatin- and PP-expressing cells) are detected by 10 w.p.c. [13].

## Transcription factors involved in pancreas development

The development and cell differentiation of the pancreas is achieved by sequential modifications in gene expression patterns controlled by transcription factors [7,14]. The first step is the establishment of an endodermal region that responds to subsequent pancreatic inductive signals [10].

### Endodermal specification

The endodermal program is established by several factors, including Mix1 and Nodal/BMP-like signals, such as SMAD2 (*madh2*) and SMAD4 (*madh4*) [14]. Specification of the foregut endoderm that becomes pancreas is influenced by retinoic acid (RA) and TGF- $\beta$  signaling via bone morphogenetic proteins (BMPs) [7].

A transcription factor network interacts in the endodermal cells and it is involved in multiple endodermally derived cell types, including the pancreas. These transcription factors constitute a *core endodermal program*, which includes several hepatocyte nuclear factor (HNF)-type genes (e.g., *Hnf1 $\beta$*  [*tcf2*], *Hnf1 $\alpha$*  [*tcf1*], *Hnf4 $\alpha$* , *Hnf3 $\beta$*  [*Foxa2*], *Hnf6* [*Onecut1*]) [14].

### FoxA2/HNF-3 $\beta$

The winged-helix transcription factor forkhead box A2 (FoxA2), previously named hepatic nuclear factor 3 $\beta$  (HNF-3 $\beta$ ), is crucial for endodermal development and can activate transcription of *Pdx1* [14,15]. This transcription factor regulates the expression of the *Nkx6.1*, *Abcc8* and *Kcnj11* genes [19,20]. A possible downstream target of FoxA2 is the *Hnf4 $\alpha$*  gene [14].

### Nr5a2

The nuclear receptor Nr5a2 is expressed early in endodermal development in the liver and pancreas. *Nr5a2* gene is capable of activating the *Hnf1 $\alpha$* , *Hnf4 $\alpha$* , and *Foxa2* promoters. Additionally, HNF-1 $\beta$  and FoxA2 may activate the *Nr5a2* promoter. *Nr5a2* is only expressed in pancreatic ductal and exocrine cells in the mature organ [14].

### HNF-4 $\alpha$

HNF-4 $\alpha$  is a steroid receptor that plays a key role in the development and differentiation of  $\beta$ -cells. In the mouse, the *Hnf4a* gene is first expressed in primary endoderm at E4.5 but is restricted to the visceral endoderm from E5.5 to E8.5. Thereafter, *Hnf4a* expression is evident in the developing and adult pancreas. HNF-4 $\alpha$  is responsible for the regulation of genes involved in processes such as insulin secretion in adult humans. The human *HNF4A* gene produces nine potential isoforms (*HNF4A1–HNF4A9*). Isoforms *HNF4A1* to *HNF4A6* are coded from the P1 promoter. Isoforms *HNF4A7* to *HNF4A9* are transcribed from the P2 promoter. Transcripts derived from the P1 promoter are not observed in the adult human pancreas but are present in fetal pancreas [21].

### HNF-1 $\alpha$ /TCF1

HNF-1 $\alpha$  is a homeodomain-type factor and POU-like DNA-binding protein expressed in undifferentiated pancreatic precursors and mature exocrine and endocrine cells [14]. The *HNF1A* gene produces three variant isoforms, *HNF1A(A)*, *HNF1A(B)*, and *HNF1A(C)*. The predominant *HNF1A* isoform in human adult pancreas is *HNF1A(B)*, whereas in fetal pancreas it is *HNF1A(A)* [21]. HNF-1 $\alpha$  has been proposed to regulate the genetic expression of insulin, GLUT-2, IGF-1 and L-pyruvate kinase. HNF-1 $\alpha$  is a major regulator of *Hnf4a* expression, acting directly through a distinct cis element in the *Hnf4a* P2 promoter. These two genes are interdependent and the reciprocal activation between them can serve to maintain their activity in a stable state [4,19,22].

### HNF-1 $\beta$ /TCF2

The transcription factor HNF-1 $\beta$  is a POU (Pit-1, Oct-1 and Unc-86)-type homeoprotein which expression is restricted to endodermally derived tissues as liver, lung and pancreas [3,14]. *Hnf1 $\beta$*  is positioned upstream of *Hnf1 $\alpha$*  and *Hnf4 $\alpha$*  and both *Hnf1 $\beta$*  and *Gata6* promote expression of the *Hnf4 $\alpha$*  gene [14].

### HNF6

HNF6 (*oncut*, a CUT-domain homeodomain transcription factor) is expressed in the developing exocrine pancreatic cells and in islets [3]. HNF6 is required to establish *Neurog3* activation within pancreatic progenitor cells and it also activates the *Foxa2* gene. *Hnf6* gene expression itself is activated by both HNF-1 $\beta$  and HNF-4 $\alpha$  [14]. HNF6 also controls the development of pancreatic ducts [7].

## Pancreatic determination

### PDX-1/IPF-1

The transcription factor pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1) is known as the earliest specific marker of pancreatic endoderm in mouse and humans. Several laboratories identified PDX-1 and so, it has multiple names, including Ip1f-1, Stf-1, and Idx-1 [3]. *Pdx1* expression is detected in ventral and dorsal pancreatic anlagen of mouse embryos starting at E8.5 and E9, respectively and it is required for growth of the pancreatic buds [15]. *Pdx1*-expressing cells represent the progenitors of all the mature pancreatic cell types including endocrine, exocrine and duct cells. Cells that express *Pdx1* between E9.5 and E11.5 give rise to all 3 pancreatic cell lineages. However, cells expressing *Pdx1* at E8.5, E12.5, or thereafter, give rise only to acinar and endocrine cells, but not ductal cells [7]. At the onset of the secondary transition, PDX-1 becomes restricted to  $\beta$ -cells (E18.5), where it activates insulin gene transcription [3,10,16]. It is also expressed in a subset of  $\delta$ -cells and PP-cells [3,7,14]. Some activators of *Pdx1* are FoxA2 HNF6, HNF-1 $\alpha$  and HNF-1 $\beta$  [10,14]. In adult  $\beta$ -cells, PDX-1 is a glucose-responsive regulator of insulin gene expression and it also activates islet amyloid polypeptide (*Iapp*), glucokinase (*Gck*) and *Slc2a2*(*Glut-2*) promoters [9]. The activity of PDX-1 is regulated by PBX-1, a member of the TALE family of homeodomain factors. The heterodimeric PBX-1/PDX-1 complex is necessary for the expansion of the pancreatic buds, but not for the specification of the different pancreatic cell types [9,14]. PDX-1 is expressed along with insulin in human fetal pancreas from 8 weeks onwards and loss of PDX-1 may be essential for  $\alpha$ -cell formation [23].

### PTF1A/p48

PTF1A/p48 is an exocrine pancreatic-specific transcription factor of the basic helix-loop-helix (bHLH) type [3]. *Ptf1a* gene is expressed in the developing pancreas of the mouse embryo on E9.5 and it is required for the growth of the pancreatic buds [15]. Both PTF1A and PDX-1 define the pancreatic precursor cell status in the endoderm [10]. *Ptf1a* is expressed in ductal, endocrine and exocrine progenitors. *Ptf1a* is later downregulated in ductal and endocrine cells, but it is maintained in acinar cells from approximately E13.5 throughout life, where it induces expression of amylase and elastase [7,11,15].

### HEX

The homeobox gene *Hex* controls proliferation of ventral foregut endoderm, allowing the prospective ventral pancreas endoderm to position beyond the cardiogenic mesoderm [3,9,10].

### **HlxB9**

The *Hlxb9* gene encodes the bHLH transcription activator HB9 and it is expressed during pancreatic development and in mature  $\beta$ -cells [9]. Expression of *Hlxb9* is observed along the dorsal endoderm on E8 [3,14]. *Hlxb9* is also expressed in the notochord [11]. Endodermal expression of *Hlxb9* is transient, but remains expressed in both pancreatic buds at E10.5. Notochord may help to establish *Hlxb9* expression in the dorsal endoderm along its entire length, which in turn sets a permissive state for pancreatic development. *Hlxb9* might be upstream of *Pdx1* in the dorsal pancreatic program [9,14].

### **Neurog3**

Neurog3, the gene that codes for the bHLH transcription factor Neurogenin3 (also named *Ngn3* or *Atoh5*) is transiently expressed in the mouse embryo from E9.5 to E18.5 in duct-like epithelial cells that are centrally located within the developing pancreas and initiates the differentiation program of all islet cells [11]. Its expression peaks at E15.5, a window of time that corresponds to the wave of endocrine differentiation, it is subsequently downregulated and finally declines towards birth with little or no detection in the adult pancreas [3,7,11,16,24]. Expression pattern and colocalisation of Neurog3 with PDX-1, insulin and glucagon is noted during early human pancreatic development, with significant decreases in middle and late stages, at 20-21 weeks [23]. The specification of different islet cell types and the completion of the differentiation process require the activation of transcription factors that are downstream of Neurog3. Of these regulatory factors, Beta2/NeuroD1, Pax4, Nkx2.2 and LA-1 are direct targets of Neurog3 [15,24,25]. Transcription of *Neurog3* is activated by HNF6, HNF-1 $\alpha$  and HNF-3 $\beta$  [3,11]. The Notch signaling pathway is involved in the selection of endodermal endocrine cells and acts to maintain pancreatic cells in a progenitor state [26]. Neurog3 induces expression of Notch ligands, which bind to Notch receptors and activate the Notch pathway in adjacent cells. Downstream targets of the Notch pathway (e.g. Hairy/enhancer-of-split 1, Hes1) repress Neurog3 expression, which inhibits endocrine differentiation. Therefore, cells in which the Notch signaling pathway is activated, maintain their proliferative capacity, while cells in which Notch signaling is not activated, express Neurog3, exit the cell cycle, and differentiate into endocrine cells. This mechanism is known as lateral inhibition [3,7,15].

### **Math6**

Mouse atonal homolog 6 (Math6) is a member of the atonal superfamily of bHLH transcription factors. It is expressed during pancreatic development at the time when major differentiation of the endocrine and exocrine cell

lineages occurs. *Math6* may contribute to endocrine differentiation by modulating specific aspects of *Neurog3* function. Furthermore, *Math6* is crucial for early embryogenesis [25].

### **INSM1/IA1**

The zinc-finger type transcription factor insulinoma associated 1 (IA1 or INSM1) is transiently expressed in similar cells as *Neurog3* during pancreatic development and it is directly regulated by *Ngn3*. IA1 ensures an essential stimulatory signal for proper formation of  $\beta$ - and  $\alpha$ -cells [24]. The expression pattern of the *INSM1* gene is restricted in the human fetal pancreas and embryonic tissues of the nervous system, as well as in tumors of neuroendocrine origin. In a recent study, it has been demonstrated that INSM1 is a transcriptional repressor of *NeuroD* and that the combination of INSM1, cyclinD1 and HDAC-3 greatly enhances the repressive activity of INSM1 on the *NeuroD* promoter [27].

### **Nkx2.2**

The NK homeodomain transcription factor *Nkx2.2* is expressed in the precursor epithelium slightly after *Pdx1* activation [14]. The onset of *Nkx2.2* expression in mouse endoderm is coincident with the onset of dorsal pancreatic bud evagination at E9.5. Most or all of the epithelial cells of the pancreas express *Nkx2.2* from the onset of bud formation until E12.5; thereafter, *Nkx2.2* expression becomes more restricted. From E13.5 to E18.5, *Nkx2.2* is expressed in a subset of incompletely differentiated endocrine precursor cells that co-express *Neurog3*. In the mature pancreas, *Nkx2.2* expression is limited to the differentiated endocrine cells including  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and PP- cells, but not  $\delta$ - cells [9,15,28]. *Nkx2.2* is capable of binding the insulin and *Pax4* promoters [14].

### **Nkx6.1 and Nkx6.2**

The NK homeodomain factor *Nkx6.1* is specific for  $\beta$ -cells in the adult pancreas. *Nkx6.1* gene is activated by *Nkx2.2* and PDX-1. It is expressed as the dorsal and ventral buds evaginate and it is required downstream of endocrine cell selection [3,14]. *Nkx6.1* acts as a potent repressor of gene transcription. In the pancreas, the gene is initially broadly expressed in the developing mouse bud at E10.5, but becomes restricted exclusively to the  $\beta$ -cells at the time of birth (E18.5). In the developing human pancreas, *Nkx6.1* is also restricted to  $\beta$ -cells [23]. *Nkx6.1* has a positive feedback mechanism for the expression of the *Nkx6.1* gene [29] and it can stimulate  $\beta$ -cell replication [30]. *Nkx6.2* is also expressed in the developing pancreas and is restricted to the differentiating  $\alpha$ -cells that do not express *Nkx6.1* [14].

### **MIST1**

MIST1 is a bHLH transcription factor strongly expressed in pancreas. MIST1 can heterodimerize with E2A factors and bind typical E boxes. MIST1 is confined to exocrine cells, and absent in ducts. At E12.5, *Mist1* expression is observed only in the peripheral epithelial regions most likely destined to develop as exocrine cells. *Mist1* is a key regulator of acinar cell function and stability [3,14].

### **BETA2/NeuroD1**

The bHLH transcription factor BETA2/NeuroD1 is expressed in all endocrine cells, but only after they have undergone differentiation and cell cycle arrest [14]. NeuroD1 plays an important role both in the maintenance of islet cell differentiation and survival, and in the process of islet morphogenesis [31]. *NeuroD1* expression is detected at E9.5. On E14.5, its expression appears within and in proximity to ductal epithelium, and by E17.5, it is restricted to islets. Expression of *NeuroD1* is activated by *Neurog3* [3]. NeuroD1 is predominantly restricted to  $\beta$ -cells in the adult pancreas, where it is a key regulator of *insulin*, *Iapp* and *Nkx2.2* gene transcription and it represses somatostatin gene expression [32].

### **ISL-1**

ISL-1 is a homeodomain factor member of the LIM-domain containing protein family. ISL-1 is required for the formation of the mesenchyme of the dorsal pancreatic bud pancreatic at E9.0 in the mouse embryo and is not expressed in the ventral mesenchyme. It is also required for the differentiation of the dorsal pancreatic epithelium to endocrine cells. *Isl1* is expressed in all the hormone-producing cells of pancreatic islets [3,14,15].

### **Pax4**

The paired-box homeoprotein Pax4 is expressed in both ventral and dorsal buds by E9.5 and, at birth, its expression is restricted to  $\beta$ -cells. The main role of Pax4 is to regulate the differentiation of  $\beta$ - and  $\delta$ -cells [3]. Interaction of HNF-4 $\alpha$ , HNF-1 $\alpha$ , PDX-1 and NeuroD1 with the *Pax4* regulatory region is required for *Pax4* transcription and may play a role in controlling tissue specific regulation of *Pax4*. In addition, Pax4 has been shown to act as a repressor of glucagon gene expression and it can inhibit the insulin promoter in the absence of Pax6. The *Pax4* gene promoter contains binding sites for Pax4 itself, suggesting that Pax4 inhibits its own expression [19]. Pax4 acts as a repressor of the expression of various islet genes, including those encoding glucagon, *Arx*, islet amyloid polypeptide (*Iapp*), insulin and ghrelin [33].

### **Pax6**

Pax6 is a paired-box homeoprotein important for islet cell development. It is expressed on E9.0 in both dorsal and ventral pancreatic buds. On E15.5, its expression expands to all pancreatic endocrine cells. In newborn animals, Pax6 is detected in all cells of the islets of Langerhans. Pax6 is involved in the early stage of islet morphogenesis and its expression is activated by NeuroD1 [3,34]. Pax6 is essential for the expression of *insulin* and *Glut-2*, and it has been proposed to regulate *Pdx1* expression as Pax6-binding sites have been detected in the *Pdx1* promoter [19].

### **Arx**

The transcription factor aristaless-related homeobox (*Arx*) is expressed in pancreatic progenitor cells beginning at E9.5 [15]. During early stages of endocrine development, a mutual transcriptional inhibition occurs between *Arx* and *Pax4* to allocate the different endocrine cell fates. In early islet cell specification, endocrine progenitor cells exhibit a potential to adopt a  $\beta/\delta$  or an  $\alpha$ -cell fate. The alternative destinies require the activities of *Pax4* and *Arx*, respectively. *Arx* is also necessary to promote endocrine progenitors towards the PP cell lineage [35].

### **MafA**

The basic leucine-zipper (bZIP) transcription factor MafA (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A) is an important regulator of  $\beta$ -cell function and a marker of mature  $\beta$ -cells. It controls glucose-regulated transcription of the *insulin* gene [15]. During pancreatic development, *MafA* is expressed in early  $\beta$ -cells during the secondary transition of pancreas development, on E14 [3]. *FoxA2*, *Nkx2.2* and *PDX-1* regulate *MafA* expression [36].

## **Genetic alterations on pancreatic development transcription factors and diabetes**

Modifications on gene sequence from several transcription factors that coordinate pancreas development lead to dysfunction of  $\beta$ -cells and are associated with the onset of some forms of diabetes, which results from insulin resistance and defects in insulin secretion.

Maturity onset diabetes of the young (MODY) is a form of autosomal dominant monogenic type 2 diabetes characterized by early onset of hyperglycemia (before age 25 years) and deficient glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) with slightly or non-impairment of insulin action [1,19]. The prevalence of MODY diabetes is approximately 5-10% of type 2 diabetes

[3]. Genetic studies in humans have identified heterozygous mutations linked to MODY in six genes, referred to as MODY genes. Five of them correspond to transcription factors related to pancreatic development and proper function of  $\beta$ -cells: HNF-1 $\alpha$  (MODY3), which is the most prevalent form of MODY and 193 different mutations have been reported, HNF-4 $\alpha$  (MODY1), HNF-1 $\beta$  (MODY5), PDX-1 (MODY4) and Beta2/NeuroD (MODY6). The remaining MODY form (MODY2) is related to mutations in the glucokinase gene [1,37]. Mutations in the MODY genes cause  $\beta$ -cell dysfunction and diabetes through haploinsufficiency or, rarely, through dominant-negative mechanisms [38] and the phenotype clearly vary with the gene that is mutated [39]. Many novel mutations found in the MODY genes are constantly being reported in different population groups [19]. Approximately 10–20% of families fitting MODY criteria do not have a mutation in any of the six known genes. Genome wide studies have not revealed any locus in these families and they are referred to as MODYX families [40].

Sequence variation in MODY-related genes may contribute to the polygenic background and development of type 2 diabetes (T2D) [41]. Previous association studies in several populations have suggested that missense single nucleotide polymorphisms (SNPs) within these genes should be associated with a common form of T2D. A recent study of the six MODY genes identified several variants that may be associated with type 2 diabetes, particularly rs757210 in TCF2 (HNF-1 $\beta$ ), which has been replicated in >15,000 samples and achieved strong overall statistical significance. There are also nominal associations for variants in PDX-1 with T2D. However, several studies suggest that variants in the MODY3 gene (TCF1/HNF-1A) do not appear to influence risk of T2D [38]. Dysfunctional heterozygous mutations in the *BETA2/NeuroD1* gene are also associated with glucose intolerance and T2D in certain populations [19,41,42]. In addition, P2 promoter region variants of the *HNF4A* gene are associated with susceptibility to T2D. A recent study suggests that the HNF4A3 isoform moderate the HNF4A diabetic phenotype [21].

Alterations in gene sequences of the transcription factors PTF1A, PDX-1 and HNF-1 $\beta$  can contribute to the development of neonatal diabetes. In addition, two diabetes subtypes with extra pancreatic features that are frequently under diagnosed at present, the renal cysts and diabetes syndrome, result from mutations or deletions of the transcription factor gene *Hnf1 $\beta$*  [37]. Furthermore, mutations or genetic polymorphisms in genes encoding for other transcription factors critical in the developing pancreas and  $\beta$ -cell function, such as Pax4, Pax6, Nkx2.2, Nkx6.1, ISL-1 and Neurog3 have been associated to the development of type 2 diabetes in some populations [19,42–46].

## Pancreatic development programming and diabetes

The genetically predetermined growth and development of an individual can be influenced by environmental factors [47]. Programming occurs because the tissues and systems of the body go through critical, often brief, periods of growth and development during fetal life and infancy. Failure of development during these periods as a result of suboptimal environmental influences changes permanently the structure and function of the body, leading to imbalances in adulthood [48,49]. The fetal origins hypothesis proposes that the fetus adapts to a limited supply of nutrients, and in doing so it permanently programs organ structures and associated functions altering its physiology and metabolism, which could increase the risk of disease in later life [48,50].

Animal models and human epidemiologic studies illustrate that adverse genetic and environmental factors during pregnancy and early postnatal life contribute to the development of glucose intolerance, insulin resistance and type 2 diabetes in adulthood. Nevertheless, the underlying molecular mechanisms have been poorly defined [49,51].

For the supply of nutrients, the fetus depends on the nutritional status of the mother and on the capacity of the placenta to transport these nutrients to the fetus. Any imbalance can result in fetal growth restriction or fetal overgrowth. Intrauterine growth retardation (IUGR) is mainly due to a reduced uteroplacental circulation, maternal undernutrition or malnutrition. It has been demonstrated that the number of insulin-producing  $\beta$ -cells and the total amount of endocrine tissue are reduced in the pancreas of human growth retarded fetuses [47,52].

The animal models most commonly used to evaluate environmental effects during either gestation or early postnatal life and their role in inducing diabetes are either caloric or protein restriction, glucocorticoid administration and induction of uteroplacental insufficiency in the pregnant rodent [52]. In the offspring, these insults cause an altered glucose metabolism and decreased  $\beta$ -cell mass, proliferation, islet number and size, insulin content, insulin response to glucose and amino acids and islet vascularization, which predisposes them to glucose intolerance and diabetes in later life [5,6,49,53,54].

The adverse effect of IUGR on glucose homeostasis may be mediated through programming of the fetal endocrine pancreas due to modifications in fetal gene expression resulting from an altered intrauterine milieu [52]. When IUGR is caused by total caloric restriction in rats, the reduction in  $\beta$ -cell mass is a result of reduced  $\beta$ -cell differentiation, with decreased expression of *Pdx1*, *Pax6*, *Nkx6.1*, and *Neurog3*. These changes are associated with increased levels of glucocorticoids, which can independently reduce fetal

b-cell mass when exogenously administered to the mother [15,51,55]. It has also been reported a reduced expression of PDX-1 in the rat protein restriction model [56]. Studies in IUGR rats demonstrate that an abnormal intrauterine environment later in gestation can also induce epigenetic modifications of key genes regulating  $\beta$ -cell development, such as PDX-1 permanent expression silencing [57].

## Conclusion

Nowadays, it is clear that diabetes mellitus is a complex heterogeneous disease resulting from multiple factors and non individual breakthrough could help reversing or ceasing the worldwide diabetes epidemic. Perspective of the current knowledge should be directed to joint the vast advances in several different areas, including genetic inheritance and susceptibility, clinical investigation, animal models, cell culture, environmental factors, fetal programming and population genetics. This enormous task implicates a global effort that could potentially results in the development of new technologies for risk prediction, prognostic of the associated complications, new and safer drugs, development of specific therapies for the offspring of diabetic individuals, expansion of educational programs, nutritional therapy and individualized care of the diabetic patient.

## References

1. American Diabetes Association 2007, *Diabetes Care*, 30, S42.
2. Hattersley, A.T., and Pearson, E.R. 2006, *Endocrinology*, 147, 2657.
3. Habener, J.F., Kemp, D.M., and Thomas, M.K. 2005, *Endocrinology*, 146, 1025.
4. Servitja, J.M., and Ferrer, J. 2004, *Diabetologia*, 47, 597.
5. Delghingaro-Augusto, V., Ferreira, F., Bordin, S., Corezola do Amaral, M.E., Toyama, M.H., Boschero, A.C., and Magalhães Carneiro, E. 2004, *Journal of Nutrition*, 134, 321.
6. Chamson-Reig, A., Thyssen, S.M., Arany, E., and Hill, D.J. 2006, *Journal of Endocrinology*, 191, 83.
7. Cano, D.A., Hebrok, M., and Zenker, M. 2007, *Gastroenterology*, 132, 745.
8. Slack, J.M.W. 1995, *Development*, 121, 1569.
9. Kume, S. 2005, *Development, Growth and Differentiation*, 47, 367.
10. Spagnoli, F.M. 2007, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2378.
11. Murtaugh, L.C. 2007, 134, 427.
12. Desvergne, B., Michalik, L., and Wahli, W. 2006, *Physiological Reviews*, 86, 465.
13. Piper, K., Brickwood, S., Turnpenny, L.W., Cameron L.T., Ball S.G., Wilson D.L., and Hanley N.A. 2004, *Journal of Endocrinology*, 181, 11.
14. Jensen, J. 2004, *Developmental Dynamics*, 229, 176.
15. Ackermann, A.M., and Gannon, M. 2007, *Journal of Molecular Endocrinology*, 38, 193.

16. Attali, M., Stetsyuk, V., Basmaciogullari, A., Aiello, V., Zanta-Boussif, M.A., Duvillie, B., and Scharfmann, R. 2007, *Diabetes*, 56, 1248.
17. Bocian-Sobkowska, J., Zabel, M., Wozniak, W., Surdyk-Zasada J. 1999, *Histochemistry and Cell Biology*, 112, 147.
18. Lerch, M.M., Zenker, M., Turi, S., and Mayerle, J. 2006, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 35, 219.
19. Cerf, M.E. 2006, *European Journal of Endocrinology*, 155, 671.
20. Wang, H., Gauthier, B.R., Hagenfeldt-Johansson, K.A., Iezzi, M., and Wollheim, C.B. 2002, *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 17564.
21. Harries, L.W., Locke, J.M., Shields, B., Hanley, N.A., Piper Hanley K., Steele, A., Njolstad, P.R., Ellard, S., and Hattersley, A.T. 2008, *Diabetes*, 57, 1745.
22. Rowley, C.W., Staloch, L.J., Divine, J.K., McCaul, S.P., and Simon, T.C. 2006, *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290, G446.
23. Lyttle, B.M., Li, J., Krishnamurthy M., Fellows, F., Wheeler, M.B., Goodyer, C.G., and Wang, R. 2008, *Diabetologia*, 51, 1180.
24. Mellitzer, G., Bonnè, S., Luco, R.F., Van De Casteele, M., Lenne-Samuel, N., Collombat, P., Mansouri, A., Lee, J., Lan, M., Pipeleers, D., Nielsen, F.C., Ferrer, J., Gradwohl, G., and Heimberg, H. 2006, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 25, 1344.
25. Lynn, F.C., Sanchez, L., Gomis, R., German, M.S., and Gasa, R. 2008, *PLoS ONE*, 3, e2430.
26. Hald, J., Hjorth, P., German, M.S., Madsen, O.D., Serup, P., and Jensen, J. 2003, *Developmental Biology*, 260, 426.
27. Liu, W.D., Wang, H.W., Muguira, M., Breslin, M.B., and Lan, M.S. 2006, *The Biochemical Journal*, 397, 169.
28. Watada, H., Scheel, D.W., Leung, J., and German, M.S. 2003, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 17130.
29. Iype, T., Taylor, D.G., Ziesmann, S.M., Garmey, J.C., Watada, H., and Mirmira, R.G. 2004, *Molecular Endocrinology*, 18, 1363.
30. Schisler, J.C., Fugger, P.T., Babu, D.A., Hohmeier, H.E., Tessem, J.S., Lu, D., Becker, T.C., Naziruddin, B., Levy, M., Mirmira, R.G., and Newgard, C.B. 2008, *Molecular and Cellular Biology*, 28, 3465.
31. Huang, H.P., Chu, K., Nemoz-Gaillard, F., Elberg, D., and Tsai, M.J. 2002, *Molecular Endocrinology*, 16, 541.
32. Itkin-Ansari, P., Marcora, E., Geron, I., Tyrberg, B., Demeterco, C., Hao, E., Padilla, C., Ratineau, C., Lelter, A., Lee, J.E., and Levine, F. 2005, *Developmental Dynamics*, 233, 946.
33. Wang, Q., Elghazi, L., Martin, S., Martins, I., Srinivasan, R.S., Geng, X., Sleeman, M., Collombat, P., Houghton, J., and Sosa-Pineda, B. 2008, *Developmental Dynamics*, 237, 51.
34. Marsich, E., Vetere, A., Di Piazza, M., Tell, G., and Paoletti, S. 2003, *The Biochemical Journal*, 376, 707.

35. Collombat, P., Hecksher-Sorensen, J., Krull, J., Berger, J., Riedel, D., Herrera, P.L., Scrup, P., and Mansouri, A. 2007, *The Journal of Clinical Investigation*, 117, 961.
36. Raum, J.C., Gerrish, K., Artner, L., Henderson, E., Guis, M., Sussel, L., Schisler, J., Newgard, C.B., and Stein, R. 2006, *Molecular and Cellular Biology*, 26, 5735.
37. Murphy, R., Ellard, S., and Hattersley, A.T. 2008, *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*, 4, 200.
38. Winckler, W., Weedon, M.N., Graham, R.R., McCarroll, S.A., Purcell, S., Almgren, P., Tuomi, T., Gaudet, D., Bengtsson Boström, K., Walker, M., Hitman, G., Hattersley, A.T., McCarthy, M.L., Ardlie, K.G., Hirschhorn, J.N., Daly, M.J., Frayling, T.M., Groop, L., and Altshuler, D. 2007, *Diabetes*, 56, 685.
39. Frayling, T.M., Evans, J.C., Bulman, M.P., Pearson, E., Allen, I., Owen, K., Bingham, C., Hancock, M., Shepherd, M., Ellard, S., and Hattersley, A.T. 2001, *Diabetes*, 50, S94.
40. Mitchell, S.M.S., and Frayling T.M. 2002, *Molecular Genetics and Metabolism*, 77, 35.
41. Liu L., Weiping, J., Zheng, T., Li, M., Lu, H., and Xiang, K. 2006, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 290, 199.
42. Jackson, A.E., Cassell, P.G., North, B.V., Vijayaraghavan, S., Gelding, S.V., Ramachandran, A., Snehathya, C., and Hitman, G.A. 2004, *Diabetes*, 53, 2122.
43. Zhao, L., Guo, M., Matsuoka, T., Hagman, D.K., Parazzoli, S.D., Poirout, V., and Stein, R. 2005, *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 11887.
44. Yokoi, N., Masao, K., Horikawa, Y., Takeda, J., Sonke, T., Furuta, H., Nanjo, K., Mori, H., Kasuga, M., Hara, K., Kadowaki, T., Tanizawa Y., Yoshitomo, O., Iwami, Y., Ohgawara, H., Yamada, Y., Yutaka, S., Yano, H., Cox, N.J., and Seino, S. 2006, *Diabetes*, 55, 2379.
45. Tokuyama, Y., Matsui, K., Ishizuka, T., Egashira, T., and Kanatsuka, A. 2006, *Metabolism Clinical and Experimental*, 55, 213.
46. Barat-Houari, M., Clément, K., Vatin, V., Dina, C., Geneviève, B., Vasseur, F., Guy-Grand, B., and Froguel, P. 2002, *Diabetes*, 51, 1640.
47. Holmansk, K., Acerts, L., and Van Assche, F.A. 2003, *The Journal of Physiology*, 547, 11.
48. Roseboom, T.J., van der Meulen, J.H.P., Ravelli, A.C.J., Omond, C., Barker, D.J.P., and Bleker, O.P. 2001, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 185, 93.
49. Vuguin, P.M. 2007, *Hormone Research*, 68, 113.
50. Lau, C., and Rogers, J.M. 2004, *Birth Defects Research*, 72, 300.
51. Bréant, B., Gesina, E., and Blondeau, B. 2006, *Hormone Research*, 65, 98.
52. Simmons, R. 2005, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 16, 390.
53. Zambrano, E., Bautista, C.J., Déas, M., Martínez-Samayoa, P.M., González-Zamorano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F., and Nathanielsz, P.W. 2006, *The Journal of Physiology*, 571, 221.
54. Petrik, J., Reusens, B., Arany, E., Remacle, C., Coelho, C., Hoet, J.J., and Hill, D.J. 1999, *Endocrinology*, 140, 4861.

55. Dumortier, O., Blondeau, B., Duvillie, B., Reusens, B., Bréant, B., and Remacle, C. 2007, *Diabetologia*, 50, 2495.
56. Arantes, V.C., Teixeira, V.P.A., Reis, M.A.B., Latorraca, M.Q., Leite, A.R., Carneiro, E.M., Yamada, A.T., and Boschero, A.C. 2002, *The Journal of Nutrition*, 132, 3030.
57. Simmons, R.A. 2007, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 8, 95.