



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**“Efecto de la Diabetes Materna
sobre el desarrollo y función del
páncreas de fetos y crías de rata”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

LIBORIO MORÁN ZANABRIA

**TUTORA PRINCIPAL: DRA. MARÍA CRISTINA REVILLA MONSALVE
COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJIA
DR. SERGIO AGUSTÍN ISLAS ANDRADE**

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de enero de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **MORÁN ZANABRIA LIBORIO** con número de cuenta **96130090**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA DIABETES MATERNA SOBRE EL DESARROLLO Y FUNCIÓN DEL PÁNCREAS DE FETOS Y CRÍAS DE RATA"**, realizada bajo la dirección de la: **DRA. MARÍA CRISTINA REVILLA MONSALVE**.

Presidente: DRA. MARTHA PÉREZ ARMENDARIZ
Vocal: DRA. MARTA MENJIVAR IRAHETA
Secretario: DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA
Suplente: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
Suplente: DR. SERGIO AGUSTÍN ISLAS ANDRADE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de abril de 2012

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la oportunidad de haber participado en ésta gran Institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico recibido (no. CVU: 226209) en el proyecto No. 82514 de Ciencia Básica del Fondo SEP-CONACyT para la realización de este trabajo.

A la Dra. Cristina Revilla por su apoyo y paciencia para la conclusión de este trabajo, que tanto esfuerzo, tiempo y dedicación nos costó a los dos. Gracias por tu incomparable apoyo Cristi.

Al Dr. Sergio Islas por su gran apoyo y por dejarme pertenecer a su equipo de trabajo.

A la Dra. Cristina Fernández Mejía por sus comentarios y observaciones durante los tutorales y las últimas correcciones sobre este trabajo, gracias por su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Pérez Armendariz, por su grandes aportaciones sobre el desarrollo del páncreas y la diabetes, gracias por sus observaciones y sus expectativas de este trabajo y por brindarme el tiempo necesario para la revisión minuciosa de este trabajo.

A la Dra. Marta Menjívar Iraheta, por sus comentarios sobre este experimento, sobre Pdx-1 y por brindarme su apoyo, tanto por el tiempo que dedicó a las observaciones hechas para este trabajo.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón por los comentario sobre descripción del desarrollo y las buenas opiniones sobre este trabajo.

Al M. en C. Miguel Ángel Palomino Garibay, por las observaciones hechas sobre las técnicas de inmunotinción y micrografías por su gran apoyo sobre temas moleculares del desarrollo y de diabetes materna, gracias.

Al M. en C. Francisco del Dpto. de Patología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría por su tiempo y experiencia sobre las técnicas de inmunohistoquímica, gracias por su asesoría sobre la inmunotinción de Pdx.1 que tanto tiempo me costó en obtenerlo. Gracias.

A Biól. Ana Lilia Martínez por tu gran apoyo incondicional, tu gran amistad y tu gran sentido del humor, por todas esos momento que hemos vivido en el laboratorio y en las olimpiadas, gracias por tus comentarios amiga.

Y a tod@s mis compañer@s del Laboratorio de Enfermedades Metabólicas del Centro Médico Nacional: A Minerva, Adriana, Consuelo, Alejandra, Edith, Marco, Alberto, Laura, Zaira, Salma, Ángeles y Nancy por sus opiniones y sugerencias en mis seminarios. Gracias, por su apoyo y amistad sería muy aburrido el lab. sin ustedes.

DEDICATORIA

A mis padres: Liborio y Rosario por su gran apoyo por que son parte de este resultado, sin ustedes jamás lo hubiera logrado, los Amo!

A mi hermano: Jesús por tu apoyo y ayuda cuando la necesité ahí estabas eres un ejemplo de constancia, sigue así que pronto verás tus resultados: eres un gran artista.

A mis abuelos Liborio y María: gracias por su lección de vida siempre recordaba sus pláticas, sus anécdotas cuando ya no podía... y he aquí el resultado. Somos chingones abuelos!

A ti Mamá María: Sé que podrás leer esto!!! Extraño mucho tus pláticas y tus consejos, esto es parte de esas grandes pláticas. Te amo mucho!

A toda la familia:

A la familia Morán y a la familia Sanabria, todos, todos son importantes para mí por eso en este pequeño espacio les digo gracias por su apoyo y cariño!

A ti Carmen:

Nunca creí tener alguien tan excepcional a mi lado, algo tan hermoso cerca de mí. Gracias por tu apoyo, por tus palabras de aliento cuando quería tirar la toalla, por tu paciencia, porque nunca perdiste la fe en mí, gracias por ser parte de mi vida:
Te Amo!

A mis amig@s: Marcela, Rosa, Sandra, Aimeé, Tania, Liz, Karla, Ana, Everardo, Carlos y demás compañeros con los cuales he compartido gratos momentos desde la Universidad y en el posgrado, muchos ya con familia, les deseo mucho éxito y felicidad. Esperemos sigamos compartiendo grandes momentos y reforzando nuestra gran, gran amistad!!!

*“No mires hacia atrás con ira,
ni hacia adelante con miedo,
sino a tu alrededor con fe.”*

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. ANTECEDENTES	5
1.1 Definición y situación actual de la Diabetes mellitus.....	5
1.2 Clasificación.....	6
1.3 Diabetes Gestacional.....	7
2.0 Páncreas.....	9
2.1 Páncreas exócrino.....	10
2.2 Páncreas endocrino.....	10
2.3 Desarrollo embrionario.....	12
2.3.1 Morfogénesis y Diferenciación celular.....	12
2.3.2 Maduración y crecimiento postnatal.....	16
2.4 Factores de Transcripción y diferenciación celular β	17
2.4.1 PDX-1 (Pancreatic-Duodenal Homeobox 1).....	24
2.5 Insulina.....	26
2.5.1 Síntesis.....	26
2.5.2 Secreción.....	29
2.6 GLUT2 (Facilitated Glucose Transporter member 2).....	31
3.0 Modelos Animales.....	33
3.1 Modelos de Diabetes.....	33
3.2 Diabetes inducida.....	34
3.3. Inducción química.....	34
3.3.1 Estreptozotocina (STZ).....	35
3.3.2 Mecanismo de acción.....	36
3.4 Modelos de Diabetes materna y desarrollo del páncreas.....	38
II. JUSTIFICACIÓN	39
III. HIPÓTESIS	39
IV. OBJETIVOS	39
4.1 General.....	39
4.2 Particulares.....	39
V. MÉTODO	40
5.1 Animales.....	40
5.2 Obtención de muestras (fetos y crías).....	40
5.3 Química sanguínea.....	41
5.4 Cuantificación de insulina.....	41
5.5 Método inmunohistoquímico.....	41
5.6 Análisis morfométrico e IOD (Integrated Optical Density).....	42
5.7 Análisis estadístico.....	43

VI. RESULTADOS	44
6.1 Gestación.....	44
6.2 Periodo fetal (17 y 21 días de gestación).....	46
6.3 Nacimiento crías.....	47
6.4 Periodo postnatal.....	49
6.5 Parámetros postnatales.....	52
6.5.1 Parámetros bioquímicos.....	53
6.5.2 Insulina.....	54
6.6 Malformaciones congénitas.....	55
6.7 Histología del páncreas.....	56
6.7.1 Morfometría.....	58
6.8 Análisis inmunohistoquímico.....	59
6.8.1. 17 días de gestación.....	59
6.8.2. 21 días de gestación.....	61
6.8.3. 20 días de vida postnatal.....	62
6.8.4. 28 días de vida postnatal.....	63
6.8.5. 90 días de vida postnatal.....	64
6.9 Densidad óptica Integrada (IOD).....	65
6.10 Masa celular β	67
6.11 Áreas celulares.....	68
VII DISCUSIÓN	69
VIII CONCLUSIONES	82
IX LITERATURA CITADA	83

Índice de Abreviaturas.

AR= ácido retinoico
Arx= Aristaless- related homeobox gene
ATP= Adenosina Trifosfato
bHLH= Basic Helix loop Helix
BMP's= Bone morphogenetic proteins.
CAM's= Cell adhesion molecules
d.p.c= días post-coito
d.pn.= días postnatales.
FGF's= Fibroblast growth factor's.
FGF-2= Fibroblast Growth Factor 2
g= gramos
GAD = Ácido glutámico descarboxilasa
GLUT2= glucose facilitated transporter type 2.
Hb9= Proteína de homeodominio 9
HNF's= Hepatocyte Nuclear Factor's
HNF6= Hepatocyte nuclear Factor 6
HRP= Horseradish Peroxidase
IMSS= Instituto Mexicano del Seguro Social.
IOD= Integrated Optical Density
IRS-1= Insulin receptor substrate 1
Isl-1= Insulin gene enhancer protein
LC= Lote Control
LE= Lote Experimental
MafA= Musculoaponeuortoc fibrosarcoma homologue A
mm= milímetros
MODY= Maturity Onset Diabetes of the young
MPME= Metaloproteinasas de matriz extracelular
NAD= Nicotina Adenin dinúcleotido
NeuroD1/Beta 2= Beta cell E-box transactivator 2
Ngn3= Neurogenin 3
Nkx= Homeobox Protein NK 's
Pdx.1= Pancreatic Duodenal Homeobox 1.
PGH= Hormona de crecimiento placentaria
PL= Lactógeno placentario
PP= Polipéptido pancreático.
Ptf1a= Pancreas specific transcription factor 1a.
RER= retículo endoplásmico rugoso
Shh= Sonic Hedgehog
SRP= Signal recognition particle
SS= Somatostatina
STZ= Estreptozotocina
TGF's= Transforming growth factor's
TNF- α = Tumoral necrosis factor alfa.
VIP= Péptido intestinal vaso activo.
VLDL= Very low density lipoprotein
 μ m= micrometros.

RESUMEN

Se determinó el efecto de la diabetes materna, inducida con estreptozotocina (STZ) sobre el desarrollo del páncreas de fetos de 17 y 21 días de gestación y de crías de 20, 28 y 90 días de edad. Se utilizaron 35 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 250-300g. Se aparearon con machos de fertilidad comprobada toda una noche, a la mañana siguiente la presencia del tapón vaginal y/o espermatozoides determinó a éste como el primer día de gestación. Se dividieron en dos lotes: un lote experimental (LE) compuesto de 25 ratas a las que, el 5° día de gestación, se les inyectó ip. 50 mg/kg de peso de STZ en amortiguador de acetatos a 0.1M pH 4.3. Se consideraron diabéticas aquellas que presentaron niveles de glucosa ≥ 200 mg/dl, 48 hrs. después de la inyección de STZ; y un lote control (LC), compuesto por 10 ratas, que se les inyectó ip., el 5° día de gestación, amortiguador de acetatos a 0.1M pH 4.3 de acuerdo a su peso.

Durante la gestación a las ratas se les determinaron niveles de glucosa sanguínea y peso corporal una vez por semana hasta el día del sacrificio. A los fetos de 17 y 21 días de gestación se les determinó peso, talla y se les extrajo el páncreas para el análisis histológico e inmunohistoquímico. A las crías en el periodo postnatal se les pesó y midió y se determinaron los niveles de glucosa sanguínea, una vez por semana, hasta el día de su sacrificio.

Las crías fueron sacrificadas en los tiempos postnatales de 20, 28 y 90 días, se obtuvo muestra de sangre para la determinación sérica de glucosa, colesterol, triglicéridos e insulina. Se les extirpó el páncreas y se procesó con técnicas de histología e inmunohistoquímica para determinar la presencia de Pdx.1, insulina y GLUT2, utilizando la técnica de marcaje con doble anticuerpo. Se realizó un análisis morfométrico (tamaño y área de los islotes) y un análisis IOD (integrated optical density) para cada proteína y se determinó la masa de células β . Se compararon los resultados entre el grupo control y el experimental.

Los resultados demostraron que durante la gestación las ratas del LE presentaron niveles de glucosa sanguínea >400 mg/dl y una pérdida significativa de peso en la última semana de gestación (LE vs. LC $p < 0.05$) debido al incremento en su catabolismo. El periodo de gestación se prolongó por 2 días y se presentaron reabsorciones. Los fetos y crías del LE fueron de menor tamaño y peso en comparación con los fetos y crías de ratas del LC (LE vs LC $p < 0.0001$).

El análisis histológico demostró que la hiperglucemia materna afectó el desarrollo del páncreas de fetos de 17 días, provocando un retardo de la morfogénesis y un aumento en el número de células epiteliales positivas a Pdx.1, insulina y GLUT2 en fetos de madres diabéticas, sin diferencia significativa entre lotes.

A los 21 días de gestación, se observó un atraso en la formación de las agrupaciones tipo islote evidenciado por la diferenciación de estas agrupaciones a partir del epitelio ductal, el diámetro y área de estas agrupaciones en fetos de madres diabéticas fueron significativamente menores en comparación con fetos de ratas sanas (LE vs. LC $p < 0.0001$). El análisis de IOD, también demostró una disminución significativa en la producción de Pdx.1, insulina y GLUT2 (LE vs. LC $p < 0.05$), y en la masa de células β (LE vs LC $p < 0.0001$).

Estas alteraciones, producidas *in utero*, se reflejaron también en la vida postnatal. Los niveles de glucosa sanguínea en las crías de 20, 28 y 90 días fueron significativamente mayores en las crías de madres diabéticas (LE vs. LC $p < 0.05$) que los que presentaron las crías de ratas sanas.

El estudio morfológico e inmunohistoquímico del páncreas postnatal reveló que los islotes de crías de 20 días de madres diabéticas las células endócrinas empiezan a reunirse para formar islotes maduros pero están aún asociados a los ductos y son significativamente de menor tamaño (diámetro y área LE vs. LC $p < 0.0001$) en comparación con el tamaño de los de crías de madres sanas. El análisis de la IOD demostró que ésta fue significativamente menor para insulina y GLUT2 (LE vs. LC $p < 0.05$) a diferencia, la IOD de Pdx.1 fue menor pero sin diferencia significativa.

También se observó una reducción significativa en la masa de células β (LE vs LC $p < 0.0001$).

A los 28 días, la disminución de IOD de Pdx.1 y GLUT2 e insulina continuó (LE vs LC $p < 0.05$), el tamaño de los islotes (diámetro y área) (LE vs LC $p < 0.0001$) y la masa de células β también se redujo significativamente (LE vs. LC $p < 0.0001$). En la edad adulta (90 días), la estructura del páncreas fue normal pero el tamaño de los islotes fue menor, pero sin diferencia significativa. La IOD no presentó diferencias significativas en la producción de Pdx.1 e insulina, únicamente una disminución significativa en la producción de GLUT2 (LE vs LC $p < 0.05$). La masa de células β fue significativamente menor en comparación con la de la descendencia de ratas sanas (LE vs LC $p < 0.0001$).

De los resultados obtenidos se puede concluir que la diabetes materna ocasionó un retraso *in utero* sobre la diferenciación y morfología del islote produciendo en las crías alteraciones metabólicas (pre-diabéticas) debido a la modificación de la producción de proteínas clave (Pdx.1, insulina y GLUT2) en la regulación de la homeostasis de la glucosa.

ABSTRACT

The effect of maternal diabetes induced with streptozotocin (STZ) on pancreatic development of fetuses of 17 and 21 days of gestation and offspring of 20, 28 and 90 days were determined. Thirty-five female Sprague-Dawley rats, weighting 250-300g were mated overnight, next morning the presence of vaginal plug and/or sperm determined this as the first day of gestation. Rats were allotted in two groups. The experimental Group (LE) with 25 pregnant rats that received the 5th day of gestation, an ip. injection of 50 mg/kg STZ in 0.1M acetate buffer, pH 4.3. Those with glucose levels >200 mg/dl, 48 hrs after STZ injection, were considered diabetic. The control Group (LC) included 10 pregnant rats that, on the 5th day of gestation, were injected ip. with 0.1 M acetate buffer, pH 4.3 according to their weight.

During pregnancy and until the day of sacrifice, once a week, blood glucose levels and body weight were determined. Fetuses of 17 and 21 days of gestation were weighted, and measured, the pancreas were removed and processed for histological and immunohistochemical analysis. The offspring were weighted and blood glucose levels were determined once a week until the day of sacrifice on days 20, 28 and 90 and blood samples were obtained for the determination of glucose, cholesterol, triglycerides and insulin.

Pancreas were processed for histological and immunohistochemical analysis and the presence of Pdx.1, insulina and GLUT2, using double labeling antibody technique, was determined. A morphometric analysis (size and area of the islets) and the IOD (integrated optical density) was performed for each protein and β -cell mass was determined. Results were compared between control and experimental groups.

The results showed that during pregnancy the LE rats had blood glucose levels >400 mg/dl and a significant weight loss in the last week of gestation, due to an increased catabolism (LE vs LC $p < 0.05$). The gestation period lasted 2 days more and reabsorptions were observed. Fetuses and Offspring of LE were smaller and weighted less, when compared with fetuses and offspring of the LC (LE vs LC $p < 0.0001$).

Histological analysis showed that maternal hyperglycemia affected the development of the fetal pancreas. On day 17 of gestation, in fetuses of diabetic Mothers, a delay on morphogenesis and an increase in the number of epithelial cells positive to Pdx.1, insulin and GLUT2 was detected, with no significative difference between groups.

On day 21 of gestation, a delay in the formation of the islets clusters was evidenced by the differentiation of these clusters from ductal epithelium. The diameter and area of these clusters in fetuses of diabetic Mothers were significantly smaller when compared to those of fetuses of non-diabetic rats (LE vs LC $p < 0.0001$). These the analysis of IOD also showed a significant decrease in the production of Pdx.1, insulin and GLUT2 (LE vs. LC $p < 0.05$), and in the β -cell mass (LE vs LC $p < 0.0001$).

These alterations produced *in utero*, reflected on postnatal life. Blood glucose levels in the offspring of 20, 28 and 90 days were significantly higher in offspring of diabetic mothers (LE vs LC $p < 0.05$), than those of Offspring of non-diabetic mothers.

The morphological and immunohistochemical study of postnatal pancreatic islets revealed that in those of offspring of 20 days of diabetic Mothers the endocrine pancreas cells started to form the mature islets but were still associated to the ducts and were significantly smaller in diameter and area (LE vs LC $p < 0.0001$). The IOD of insulina and GLUT2 were significantly lower (LE vs LC $p < 0.05$) in contrast, the IOD of Pdx.1 was lower, but not statistically significant. We also observed a significant reduction in β -cell mass (LE vs LC $p < 0.0001$).

At 28 days the islets were mature and the decrease in IOD of GLUT2, insulin and Pdx.1 continued (LE vs LC $p < 0.05$), the size of the islets (diameter and area) (LE vs LC $p < 0.0001$) and β -cell mass were also significantly reduced (LE vs. LC $p < 0.0001$). In adulthood (90 days), the structure of the

pancreas is normal but islets were smaller but not statistically significant. The IOD revealed no significant differences in the production of Pdx.1 and insulina, Only a significant decrease in the production of GLUT2 (LE vs LC p <0.05) was detected. The β -cell mass was significantly reduced compared with the β -cell mass of Offspring of healthy rats (LE vs LC p <0.0001). From the results, we can concluye that maternal diabetes in utero induced a delay on differentiation and islets morphogenesis in the offspring, resulting in metabolic disorders (pre-diabetes) due to changes in the production of key proteins (Pdx.1, insulin and GLUT2) in the regulation of glucose.

1.- ANTECEDENTES

1.1 Definición y situación actual de la Diabetes mellitus.

La Diabetes mellitus es una enfermedad crónica progresiva caracterizada por un nivel elevado de glucosa en sangre debido a la deficiencia relativa o absoluta de la secreción de insulina, con grados variables de resistencia a ésta. El sujeto sufre de alteraciones en casi todos los tejidos, desarrollando complicaciones serias tales como: afección cardíaca en arterias coronarias, enfermedad cardiovascular periférica, neuropatía y es fatal si no es tratada (1).

Por la acción deficiente de la insulina en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas, la diabetes produce daños tempranos en células vasculares que a largo plazo producen complicaciones microvasculares (1) como: la insuficiencia renal, una de las complicaciones más graves donde interactúan factores metabólicos, hemodinámicas, hormonales y vías de comunicación intracelular (2). La hiperglucemia se ha relacionado con cuatro trastornos principales: 1) activación de la vía de los polioles, 2) formación de productos de la glicación avanzada; 3) aumento del estrés oxidativo; y 4) activación de vías de señalización celular, incluyendo la de la proteína cinasa C (3).

Estas alteraciones producen defectos en la permeabilidad endotelial, favorecen el reclutamiento y adhesión de moléculas, aumentando la síntesis de citocinas, formación de depósitos y la proliferación de células mesangiales. Los factores hemodinámicos también tienen una participación importante: en la fase inicial de la nefropatía diabética se ha demostrado aumento en la presión de la arteriola aferente, hiperfiltración glomerular y variaciones en la presión sistémica asociadas con microalbuminuria (2, 3).

La neuropatía diabética es otra de las complicaciones que aparecen mas temprano durante el progreso de la enfermedad. Las neuropatías periféricas y autónomas progresan lento pero continuamente y se relacionan con la duración de la enfermedad y el grado de control metabólico. El síndrome más común es la polineuropatía sensitivo motora simétrica distal. Se caracteriza por dolor, ardor, disestesias, parestesias, y déficit sensitivo motor en las porciones distales de las extremidades, predominantemente de las inferiores. A largo plazo se desarrollan cambios tróficos en la piel y otras anormalidades. Los pacientes con neuropatía tienen mayor riesgo de desarrollar úlceras de los pies, amputaciones, articulaciones de Charcot, dolor, disfunción sexual e infarto agudo al miocardio (2,3).

Otra complicación severa es la retinopatía diabética en la cual la hiperglucemia induce un daño estructural y funcional en la membrana endotelial, en células endoteliales, en pericitos y en general en la retina siendo la causa principal de ceguera en población adulta (2, 3).

El número de personas con Diabetes mellitus a nivel mundial esta en aumento. La Federación Internacional de Diabetes (IDF) reportó en el 2006, 246 millones de casos y estima más de 380 millones para el 2030 (4). En nuestro país, la tendencia de este padecimiento aumenta rápidamente por la urbanización acelerada que está asociada con el aumento en el consumo de dieta alta en grasa, la disminución de la actividad física y otros factores como el estrés y la predisposición genética.

La forma mas común en nuestro país es la diabetes tipo 2, en un estudio de 1993-2006 se reportó una prevalencia de 6.7% en 1993 y de 14.4% para el 2006 observándose un incremento en la prevalencia de desórdenes metabólicos asociados a la diabetes tipo 2 entre poblaciones de 20 y 39 años sugiriendo una presencia más temprana de la enfermedad (5).

En el 2010, el número de defunciones por diabetes mellitus en México fue de 72 mil 449, representando el 14.7% del total de las muertes que se registraron en nuestro país, ubicando a este padecimiento como la principal causa de muerte; del total de las defunciones el 52.2% ocurrieron en mujeres y el 47.8% en hombres (6).

Por tratarse hasta el momento de un padecimiento incurable al gobierno le cuesta más de 2,100 millones de pesos anuales, pues los pacientes diabéticos deben recibir tratamiento durante toda su vida aunque una pequeña fracción acude regularmente a los servicios de salud y de éstos entre 25 y 40% tienen un control metabólico de la enfermedad (7).

1.2 Clasificación

La Diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por una hiperglucemia crónica asociada con daño a largo plazo, disfunción y fallo en varios órganos y está determinada genéticamente (1). Varios procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes, por lo que diagnosticar un tipo de diabetes en un individuo depende de las circunstancias presentes en el tiempo del diagnóstico, y en algunos casos no es fácil agruparlos en uno sólo existen al menos 4 grandes tipos de esta enfermedad (8):

Diabetes tipo 1:

Este tipo de diabetes es caracterizada por una destrucción autoinmune de las células β del páncreas por lo cual, el cuerpo no produce insulina o en cantidades mínimas y representa del 5 - 10% de los casos de diabetes. La destrucción inmune de las células β es producida por la presencia de auto-anticuerpos para insulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD) y tirosinas fosfatasas 1A2 y 1A2 β . En esta forma de diabetes, la tasa de destrucción celular es completamente variable, siendo rápida en algunos individuos (comúnmente niños y jóvenes) y lenta en otros (principalmente adultos). La destrucción autoinmune de las células β tiene múltiples predisposiciones genéticas y está también relacionada con factores ambientales que aún son poco conocidos(8).

Diabetes tipo 2:

Comprende a individuos que tienen una resistencia a la insulina y usualmente también una deficiencia relativa en su secreción. Representa el 90 - 95% de los casos de diabetes (1, 8). Muchos pacientes con esta forma de diabetes son obesos, causando un grado de resistencia a la insulina. La secreción de insulina es anormal en estos pacientes e insuficiente para compensar esta resistencia. El riesgo de desarrollar esta forma de diabetes se incrementa con la edad, la obesidad y el sedentarismo. Está frecuentemente asociada con una fuerte disposición genética más que la forma autoinmune y es más compleja (1, 8).

En los últimos años, la prevalencia de este padecimiento va en aumento en niños, la ocurrencia de diabetes mellitus tipo 2 en menores de 10 años es alarmante, las cifras han aumentado en nuestro país, en el Distrito Federal, el 50% de los infantes padecen sobrepeso u obesidad dos factores de riesgo que pueden desarrollar el trastorno así como antecedentes familiares(9).

Otros tipos de diabetes específicos:

Comprende una gran cantidad de defectos monogenéticos como las MODY's (Maturity Onset Diabetes of the Young) que son causadas por mutaciones heterocigas en por lo menos cinco genes que codifican factores de transcripción:

HNF4 α /HNF4A (MODY 1), HNF1 α /TCF1 (MODY 3), PDX1/IPF1 (MODY 4), HNF1 β /TCF2 (MODY 5), NEUROD1/BETA2 (MODY 6) y MODY2 que es el único subtipo no relacionado con factores de transcripción pues es causada por mutaciones en el gen de la glucocinasa de las células β (10).

La diabetes gestacional ocasiona diversas complicaciones a corto plazo (preclampsia, sepsis urinaria, polihidramnios, parto pretérmino, parto laborioso, trauma obstétrico)(11).

La descendencia de madres con diabetes gestacional tiene mayor riesgo de presentar complicaciones metabólicas asociadas como hipoglucemia, macrosomía, hiperbilirrubinemia, hipocalcemia, hipomagnesemia, malformaciones congénitas, síndrome de dificultad respiratoria, enfermedad de la membrana hialina (EMH) desproporción cefalo-pélvica, aumento de la mortalidad neonatal(11, 14). Las malformaciones congénitas son la principal causa de mortalidad y morbilidad de hijos de madres con diabetes gestacional. Las principales malformaciones asociadas son las del sistema cardiovascular, sistema nervioso central, el genitourinario y esquelético(16).

El tratamiento está siempre encaminado a la disminución de la morbimortalidad materna y perinatal que se logra con un buen control metabólico durante el embarazo, e incluso antes de éste (16).

2.0 Páncreas

El páncreas es una glándula accesoria asociada al aparato digestivo, la cual, al igual que el hígado, secreta diversas sustancias hacia la primera porción del intestino delgado para la degradación de los nutrientes y hormonas implicadas en la regulación metabólica del organismo (17). Es un órgano que se ubica en la curva del duodeno en forma de C, y está conectado a éste por la Ampula de Vater, donde el ducto pancreático se une con vesícula biliar (18). En humanos su peso es de 40 a 150 g y una longitud de 20 a 25 cm (19). Es una glándula anticrina; es decir, está compuesta de tejido glandular exócrino y endocrino. No posee cápsula fibrosa definida, sin embargo, está rodeado por una capa de tejido conectivo laxo, el cual se introduce hacia el tejido dividiéndolo en lóbulos (20) Figura 2. El abastecimiento arterial en el páncreas se origina de las arterias esplénica, hepática y mesentérica, el drenaje venoso se da por las venas esplénica y mesentérica (20). Presenta fibras nerviosas adrenérgicas y colinérgicas en los dos tipos de tejido pancreático, exócrino y endocrino (21).

El páncreas en los mamíferos consiste de tres compartimientos epiteliales principales: el sistema ductal, las células exócrinas acinares y células endocrinas. El sistema ductal se ramifica delicadamente y transporta las proenzimas digestivas producidas por el tejido exócrino acinar hacia el duodeno. Los ductos pancreáticos se caracterizan por ser lineares con células epiteliales columnares y en los grandes ductos, se presentan células globosas similares a las del intestino (17) Figura 2.

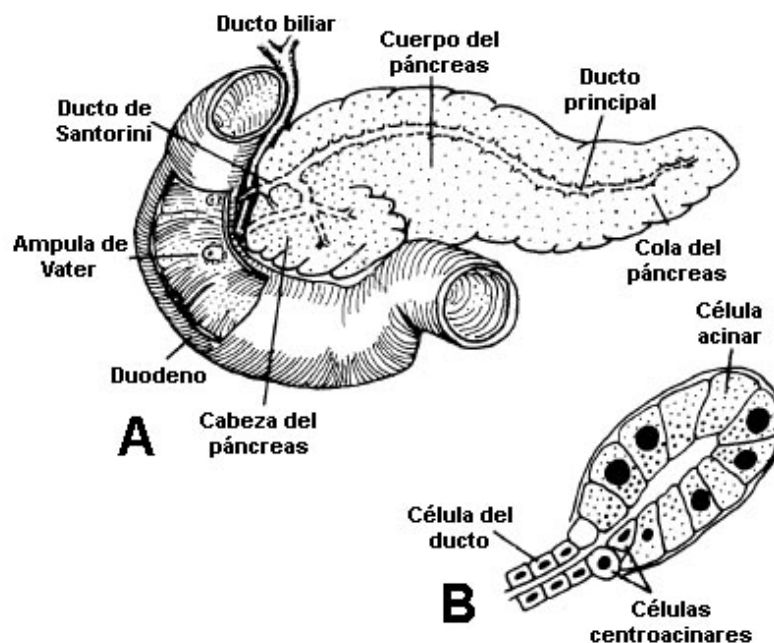


Figura 2. A) Anatomía del páncreas adulto. **B)** Histología de un acino pancreático (22).

La porción exócrina del páncreas produce enzimas digestivas y un fluido pancreático para la digestión de los alimentos; está conformado como una glándula compuesta tubuloacinar, semejante a las glándulas salivales (17). La porción endocrina consiste de tejido aislado en forma esférica disperso entre la gran masa del páncreas exócrino, fue inicialmente descrito por Langerhans en 1869. Debido a su forma y a su descubridor son llamados islotes de Langerhans (18). El número de islotes en humanos ha sido estimado entre 1,000 y 10,000 mientras que en roedores los islotes tienen una forma aproximadamente esférica, en humanos son menos regulares y varían en tamaño desde menos de 50 micras hasta más de 500 micras de diámetro (19).

2.1 Páncreas exócrino

La porción exócrina del páncreas consiste de tejido túbulo-acinar. Los acinos son redondos formados por 4 a 8 células epiteliales cúbicas o piramidales que producen enzimas digestivas incluyendo proteasas, amilasas, lipasas y nucleasas; muchas de éstas secretadas como precursores inactivos que inician su actividad después de que entran al duodeno (17). Se concentran en la parte apical de la célula acinar dentro de gránulos de secreción, presentan retículo endoplásmico rugoso y un prominente aparato de Golgi (18). Esta glándula exócrina segrega el jugo digestivo que contiene grandes cantidades de iones de sodio y bicarbonato que neutralizan el material ácido que entra al intestino delgado desde el estómago (18, 21). La secreción enzimática del páncreas exócrino está bajo un control múltiple: los impulsos neurales son transmitidos por la acetilcolina. Las señales hormonales activadas por el contenido del duodeno (péptidos, aminoácidos, ácidos grasos), provocan la liberación de colecistocinina en el intestino (18).

Otras hormonas como la secretina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), estimulan la secreción pancreática, proenzimas y agua. Al igual que de forma parácrina, el polipéptido pancreático (PP) regula la secreción enzimática (18).

2.2 Páncreas endocrino

Los islotes de Langerhans se encuentran dispersos en todo el páncreas, están compuestos de células epiteliales dispuestas en cordones, entre ellos hay una red de vasos sanguíneos y están separados de los lóbulos vecinos por una fina cápsula de fibras reticulares (23). El papel que juega, es el de mantener un nivel constante de glucosa en sangre y facilita el almacenamiento celular del material alimentario después de una ingestión, provee también la movilización de estos sustratos durante periodos de ayuno (21). Por medio de técnicas histológicas con rojo neutro se han estimado alrededor de 13,500 y 890,000 islotes en el páncreas de rata y humano respectivamente (23). Los islotes de Langerhans en el páncreas de rata miden 50-400 μm de diámetro (24). Se han identificado 5 tipos celulares dentro de los islotes de Langerhans, designados como: α , β , δ , PP y ϵ (Figura 3) cada una de las cuales segregan una hormona distinta.

Células α :

Son células acidofílicas y argirofílicas, grandes, localizadas en la periferia del islote; se encargan de sintetizar el glucagon, que por técnicas inmunocitoquímicas se ha demostrado que es almacenado y secretado por gránulos de alrededor 235 nm de diámetro; insolubles en alcohol. El porcentaje de células α en los islotes varía en los mamíferos dependiendo de la especie, pero su número es menor al de las células β (21, 23).

Células β :

Fueron las primeras células identificadas en los islotes, se localizan comúnmente en el centro del islote, son las encargadas de sintetizar la hormona pancreática más importante: la insulina. Las técnicas de inmunocitoquímica han demostrado que es almacenada y secretada por gránulos de cerca de 300 nm de diámetro, solubles en alcohol. El número de estas células es mayor que el resto de las células en los islotes, mas del 50% en humanos y en rata el porcentaje es del 67% (18, 20).

Células δ :

Células que secretan somatostatina (SS). Se distribuyen de igual manera que las células α , en la periferia del islote, pero, su número es muy reducido. En los mamíferos, se presentan dos tipos de somatostatina (SS) en el páncreas, somatostatina 14 (SS14) y somatostatina 28 (SS28) de la cual 14 amino ácidos son idénticos a la forma SS14. Esta hormona inhibe la liberación de insulina, glucagon y polipéptido pancreático (PP) de manera paracrina (20, 21).

Células F ó PP:

Son células que se encuentran al igual que las α y δ en la periferia del islote secretan el polipéptido pancreático (PP), que consiste de 36 aminoácidos. Su tamaño es similar al de las células α (20). Diversos estudios han reportado que es un potente inhibidor de la secreción exócrina pancreática y no influye en el metabolismo de carbohidratos (20, 23). Elayat y colaboradores demostraron que en el páncreas de rata se encuentran dos tipos de islotes: uno rico en células α y pocas células PP, en la región gástrica y esplénica del páncreas, mientras que en la región duodénica se encuentran islotes ricos en células PP y pobres en células α (24).

Células E ó ϵ :

Estudios realizados con microarreglos han revelado un nuevo tipo de célula endocrina dentro de los islotes de Langerhans (25). Estas células se encuentran al igual que las células α , δ y PP en la periferia del islote y secretan grelina, que regula el apetito y la hormona de crecimiento. Se sabe que este tipo de célula es muy común en el estómago (26).

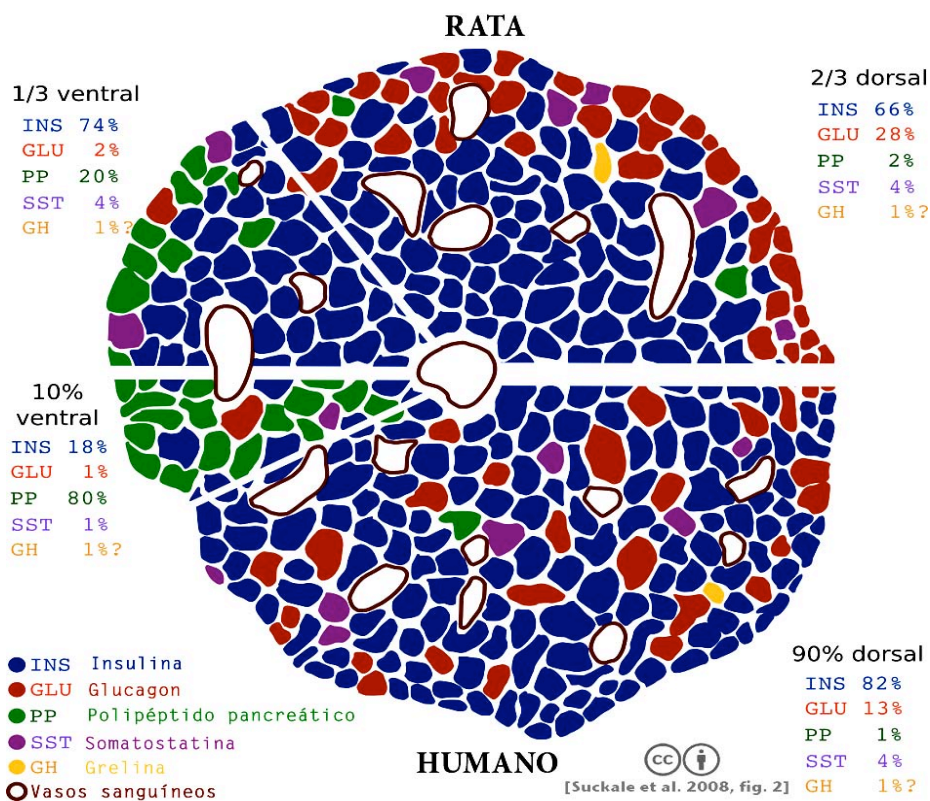


Figura 3. Diagrama comparativo entre un islote de rata y humano así como diferencias entre las regiones dorsal y ventral del órgano presentado sus proporciones celulares aproximadas. (27).

Los islotes son irrigados por un extenso laberinto de capilares. Cada islote es irrigado por medio de una a tres arteriolas, las cuales abruptamente terminan como capilares y por 1 a 6 vénulas, dependiendo del tamaño del islote (18). Los capilares en los islotes pancreáticos incluyen células endoteliales que están fenestradas para permitir la rápida toma de las hormonas; ya que es conocido que los capilares fenestrados son de 4-7 veces más permeables que los capilares no fenestrados. Los productos hormonales secretados por las células de los islotes dentro del fluido extracelular circundante pueden así atravesar la membrana basal del endotelio antes de que entren al torrente sanguíneo. La inervación de los islotes pancreáticos es dada por dos tipos de neuronas: las colinérgicas parasimpáticas y neuronas adrenérgicas simpáticas (20).

2.3 Desarrollo embrionario

En los últimos años el conocimiento sobre los mecanismos y los diversos candidatos moleculares implicados en los procesos embrionarios han aclarado la gran complejidad de la organogénesis de vertebrados. Uno muy importante, es el esclarecimiento del origen del páncreas, donde anteriormente se le adjudicaba un origen ectodérmico –derivado del sistema nervioso-.

Actualmente se ha reportado que diversas moléculas neurales (NeuroD1 y Ngn3) se expresan en células endocrinas, mientras otras, como Isl1 propias de células endocrinas se han reportado en el desarrollo neural (28).

El páncreas se deriva de la capa germinal endodérmica, al final de la gastrulación después de la transición del endodermo de una capa bidimensional a una tridimensional formándose el tubo intestinal, que está evolutivamente conservado entre los vertebrados, en los días 10.5–12 post-coito (pc) en rata (29).

El medio en el cual el páncreas se desarrolla es altamente dinámico; inicialmente los primordios pancreáticos son estructuras relativamente simples conteniendo células progenitoras, pero la complejidad se incrementa con el tiempo, debido a la aparición de numerosos tipos celulares diferenciados, la rotación del intestino y el proceso de ramificación morfogénica (30).

2.3.1 Morfogénesis y diferenciación celular

En el embrión de ratón, la primera señal visible en el desarrollo pancreático inicia alrededor del día 9 embrionario (E9) (31). Dos primordios pancreáticos emergen independientemente desde las regiones dorsal y ventral del endodermo antero-posterior (32,33). Estudios recientes, han mostrado que la formación de los rudimentos dorsal y ventral en el páncreas no son idénticos y son ligeramente asincrónicos (34, 35).

Este periodo es conocido como “transición primaria” refiriéndose al cambio en la forma de los dominios endodérmicos del intestino a un estado celular pancreático que es definido por la expresión de varios factores de transcripción inducido por señales mesodérmicas y del endotelio (34, 36).

El endodermo dorsal es adyacente a la notocorda, antes de la fusión de las dos aortas en el estado 12-20 somitas (correspondiendo e8.75 -9 en ratón) y está cercano a la aorta y al mesénquima dorsal, mientras que el endodermo pancreático ventral-lateral es adyacente al septum/tranversum (primordio del diafragma) y al mesodermo cardiogénico (37, 38, 39, 40).

Las células de los primordios tienen una morfología epitelial similar y son positivas a Pancreatic Duodenal Homeobox 1 (PDX-1) y Ptf1a (Pancreas specific transcription factor 1a) y Hbl9, factores de transcripción requeridos para el desarrollo del páncreas (28, 31, 33, 36, 37, 41) ésto es debido a la inhibición de la expresión de Sonic Hedgehog (*Shh*) en la región del intestino primitivo

destinada para el páncreas y duodeno (42) regulada por las estructuras mesodérmicas adyacentes (notocorda y aorta) durante la organogénesis (30, 34, 43).

Se ha demostrado que la notocorda permite el desarrollo del primordio dorsal por la secreción de activina β y el factor de crecimiento del fibroblasto 2 (FGF2) (39, 44, 45, 46), estas moléculas de señalización reprimen la expresión de moléculas *Shh* que actúan como un inhibidor autocrino en el desarrollo del páncreas (30, 38).

El primordio ventral del páncreas se desarrolla en estrecha proximidad con el hígado y el epitelio del ducto biliar (33) y nunca tiene contacto con la notocorda (46).

La contraparte inductiva, la realiza el mesénquima cardiogénico, que se sabe, regula el desarrollo pancreático a través de la expresión de FGF's (Factores de crecimiento del Fibroblasto) y BMP's (Proteínas morfogénicas de hueso) que regulan la expresión de *Shh* (30, 33, 38, 39, 43), evitando la diferenciación de la región del endodermo hacia un destino hepático (47).

Para este tiempo, el epitelio es de tipo estratificado consistiendo de células con una alta relación núcleo/citoplasma (33).

En ratón y rata, el epitelio pancreático se extiende considerablemente en los días posteriores, durante los cuales, el epitelio estratificado se mantiene, aunque hay un adelgazamiento gradual y las lobulaciones epiteliales se hacen pronunciadas (34). En el periodo de E12.5 los dos primordios sufren una morfogénesis ramificante desde un racimo ductal (48, 49).

Esta morfogénesis ramificante parece seguir un patrón único, desde un ángulo de ramificación y a la proximidad de otra ramificaciones, llevando a excluir la intervención de mesénquima, influyendo, sobre las interacciones epitelio-mesénquima y ocasionando una diferenciación de linajes celulares (35). Consistiendo los dos protuberancias primordiales de epitelio ductal sin diferenciar (49), la decisión entre el destino endocrino y exócrino sucede durante el periodo E11-E14 en ratón (22), parece que ocurre en las puntas en crecimiento de las ramificaciones epiteliales, una característica primordial en el desarrollo del páncreas (50).

Las células positivas a glucagon aparecen tempranamente en el desarrollo del páncreas E9.5 y un pequeño grupo de células que coexpresa insulina (48), los trazos de linajes indican que estas células no son precursores de células α y β maduras por lo que las evidencias sugieren que la "transición secundaria" representa la fase principal del desarrollo de islotes (31, 51).

Durante la morfogénesis del páncreas, el epitelio pancreático inicia su crecimiento de una manera de tipo ramificante. Las células de las puntas en contacto directo con el mesénquima, mantienen un estado progenitor del epitelio, mientras que, más alejadas de éstas –contacto con el mesenquima- pierden la influencia y se diferencian (52).

Conforme progresa el desarrollo ocurre la rotación del tubo digestivo y la elongación del tallo dorsal alcanza al primordio ventral haciendo contacto uno con otro dentro del ángulo C del duodeno en desarrollo (22); esta fusión ocurre entre el E12-E13 del ratón y E37-E42 en humanos dando origen al órgano completo (35, 40, 49, 50,). Así los dos primordios producen la fusión del ducto ventral con la porción distal del ducto del primordio dorsal. Este ducto fusionado corre a toda longitud del páncreas y termina en el ducto de Wirsung (33, 53).

En los siguientes tiempos del desarrollo en la rata ocurren cambios dramáticos en la arquitectura celular del páncreas, conocido como "segunda transición" (entre los estados E13.5 y 17.5 en ratón) alrededor de los días 15-18 de gestación en rata (54). El epitelio celular pre-diferenciado permanece y se organiza dentro de estructuras ductales ramificantes y se va diferenciando como células epiteliales positivas a Pdx1 a células endocrinas productoras de hormonas y a células acinares (22, 36, 38, 53) Figura 4..

La vía de señalización Notch es una vía bien establecida en el desarrollo endocrino y neuronal, juega un papel importante sobre la decisión inicial en la diferenciación exócrina vs. endocrina

(31, 32, 49), regula principalmente la expresión de Neurogenina 3 (Ngn3) por medio de la regulación del aumentador de dispersión I (Hes1) responsable de la supresión de Ngn3 (44, 50). La formación celular acinar que ocurre a través de la morfogénesis del epitelio temprano se ha demostrado que es regulado por la señalización Notch (35, 40).

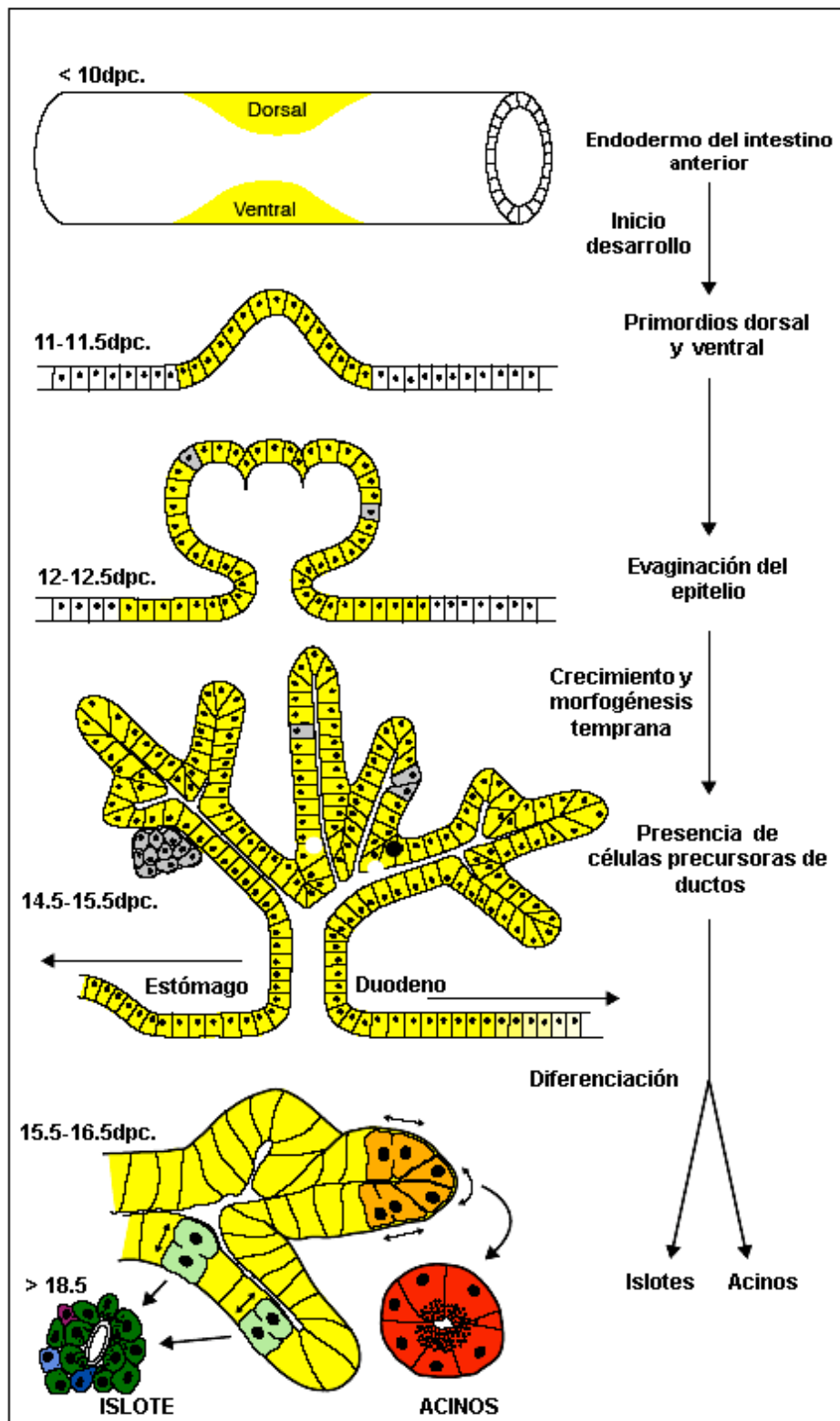


Figura 4. Esquema del desarrollo del páncreas. El desarrollo del rudimento dorsal es representado únicamente en E8.5. El sombreado amarillo indica la extensa expresión de Pdx-1 y las grises las agrupaciones endocrinas tempranas. Modificado de Kim & MacDonald 2002 (38).

Las isoformas de la familia TGF- β en mamíferos (TGF- β 1, β 2 y β 3) y Fgf10 (31) en páncreas embrionario de E12.5 que se localizan entre el epitelio ductal pueden inducir la diferenciación celular endocrino- acinar hasta el e19 (22, 37, 50,53) entre estas, la folistatina (55) y varias moléculas morfogenéticas de hueso (BMP's) e Isl1 (56, 57) producidas por las células mesenquimales inducen una fuerte diferenciación pro-endocrina a partir del epitelio ductal (50, 53, 58). El ácido retinoico (AR) también es otra molécula que induce la diferenciación endocrina y ductal (31, 35).

Conforme el desarrollo progresa (>E17.5) se incrementa la formación de nuevas células endocrinas a partir de agrupaciones que están entre los ductos y vasos sanguíneos. Estos grupos endocrinos migran formando agrupaciones celulares que envuelven múltiples procesos a partir del epitelio ductal, por lo que el desarrollo de los islotes se realiza por agregación celular (57, 59) proceso que también es conocido como isletogénesis (34, 37). Figura 5. El órgano crece y continúa su diferenciación formando agrupaciones acinares, intercaladas con células endocrinas que se organizan y dividen en pequeñas capas del epitelio formando agrupaciones aisladas (37, 40, 49, 50). La migración de las células precursoras de islotes está parcialmente controlada por metaloproteinasas de matriz extracelular (MPME) (37, 58), una gran familia de enzimas que degradan proteínas de matriz extracelular incluyendo colágenas, gelatinas, fibronectinas y lamininas (60) agrupando a células β , células α , células δ , células PP y células ϵ (34, 35, 37, 40).

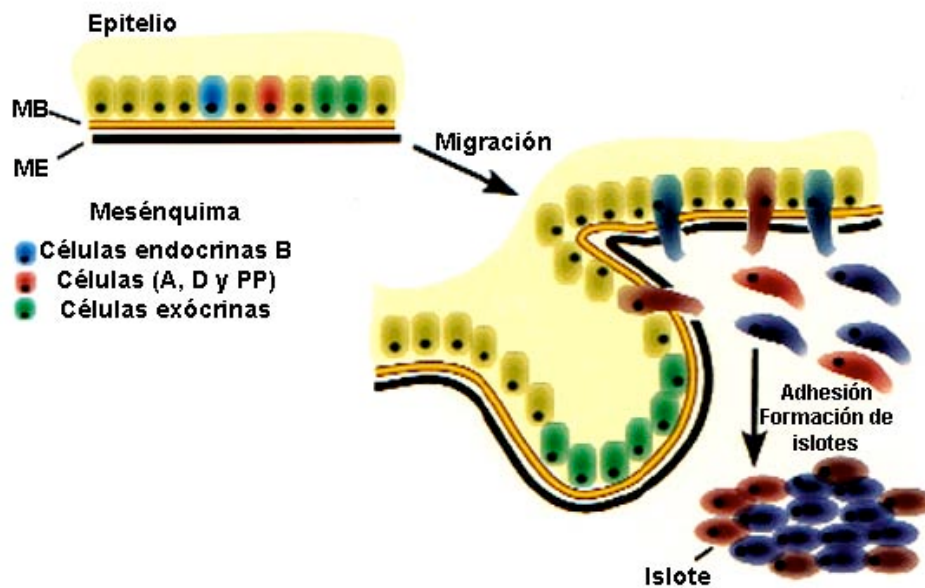


Figura 5. Esquema representando la migración de células endocrinas y la formación de islotes pancreáticos (37).

Se ha reportado que la láminina 1 juega un papel importante en el desarrollo del páncreas, interactúa con integrinas epiteliales regulando la formación de células ductales (58). Jiang y colaboradores (60), demuestran que la láminina 1 puede inducir el desarrollo de células β , sobre este mecanismo, Lammert y colaboradores (61), reportan que pueden estar involucradas señales inductoras secretadas por células endoteliales y posiblemente tienen un algún papel de diferenciación pro-célula β hacia el final de la gestación. Otros mecanismos recientemente estudiados son las interacciones célula-célula que han demostrado ser requeridas para establecer la arquitectura de los islotes (29). Las cadherinas, son moléculas de unión a membrana dependientes de calcio que regulan la adhesión célula-célula y el agrupamiento de diferentes poblaciones celulares y parecen jugar un importante papel en la migración y diferenciación de células progenitoras endocrinas (58).

Las células endocrinas expresan un número de CAM's incluyendo a los miembros de inmunoglobulinas de la superfamilia N-CAM e I-CAM, miembros de la superfamilia E-, N-, y R-cadherina como también a Ep-CAM (62). N-CAM se expresa en células α y PP, en el epitelio y mesénquima del páncreas en desarrollo y la N-cadherina está restringida a células endocrinas hacia el E11.5 en ratón (35, 37, 56). La actividad de las MPME es regulada por la señalización de TGF- β . En el trabajo de Miralles (63) se demostró que las isoformas TGF- β son importantes reguladores de metaloproteasas de matriz extracelular que controlan la habilidad de las células progenitoras endocrinas a migrar y congregarse dentro de islotes en el último periodo de gestación (35). Después de la transición secundaria, pocas células progenitoras permanecen y la expansión ocurre por crecimiento diferenciado. Las células exócrinas proliferan después de su diferenciación y las células endocrinas muestran una fuerte actividad mitótica antes del nacimiento (34).

2.3.2 Maduración y crecimiento postnatal.

Al final de la gestación en roedores, es evidente un incremento en la proliferación celular endocrina en el páncreas. El tamaño de islotes y su número se incrementan hasta días después del nacimiento. Por lo que el crecimiento de cada población celular endocrina sigue aumentando en la vida postnatal (64, 65). Los mecanismos que se han sugerido que incrementan el número celular son la diferenciación celular a partir de células precursoras ductales y por replicación de células diferenciadas (66). La neogénesis de islotes continua a través de la vida neonatal pero cesa drásticamente después del destete en la rata (48) presentándose un remodelamiento del páncreas endocrino por 2-3 semanas de edad (62).

En el estudio de Hue-Lee (64) sobre el remodelamiento de tejido pancreático en tiempo postnatal observaron una reducción en el tejido acinar a partir del día 4 los tejidos endocrino y exócrino permanecen morfológicamente estables, mientras que su población va incrementando en tamaños conforme progresa el crecimiento de las crías.

La proliferación de células β alcanza una tasa alta de replicación (aproximadamente 10% por día en ratón) hacia el final del desarrollo e inicia a descender postnatalmente. En estados postnatales el desarrollo del páncreas es seguido por un fuerte mecanismo de neogénesis. Esta proliferación es muy baja en células adultas, estudios en roedores han demostrado que existe poca capacidad proliferativa en estas células (48), se han publicado tasas de replicación para las células β en ratones adultos -12 semanas de edad- siendo variables desde 2% a 15% por día (66). La edad del animal, parece que juega un papel central en la capacidad proliferativa de las células β , pues los animales viejos presentan una importante disminución de la expansión celular, aproximadamente, 1-4% de las células β replican por día en ratas de entre 30 y 100 días de edad (40) llegando a disminuir hasta 0.1 % en ratones adultos de un año de edad (66).

La apoptosis parece jugar un papel importante en el remodelamiento de la masa endocrina en los tiempos postnatales, en roedores se presenta una onda transitoria apoptótica importante en islotes neonatales a las 2 semanas de nacimiento y el reemplazamiento de células β con nuevos islotes a partir de mecanismos de neogénesis ductal (48, 62).

El mecanismo de apoptosis en células β ocurre en tasas bajas durante la embriogénesis, pero es evidente en el periodo del destete lo que pudiera estar asociado con un remodelamiento del islote o cambios en la maduración celular β (40).

Durante la vida adulta, las células β son una población de renovación lenta, con bajos niveles de proliferación y apoptosis. Sin embargo, la masa de células β continuamente se expande sobre la vida del organismo, probablemente debido a un incremento en el peso corporal relacionado con la edad y resistencia a la insulina (40).

Varios estudios han revelado que el mecanismo primario por el cual nuevas células β se forman en la vida adulta es a través de la proliferación más que por neogénesis (40).

La masa celular β continua en crecimiento con la edad, aunque el análisis a gran detalle indica que hay hipertrofia con el envejecimiento de células β pues la actividad mitótica que ha sido estudiada *in vivo* e *in vitro*, va disminuyendo marcadamente con la edad (62). Se han reportado diversos trabajos en donde se manipula a los islotes y células β para conocer la capacidad de regeneración, la administración de diversos químicos como aloxana y STZ, intervenciones quirúrgicas parciales y trasplantes de insulomas han confirmado la capacidad regenerativa de esta población celular endocrina aunque sus tasas de proliferación y regeneración son muy bajas, el proceso existe durante toda la vida adulta del organismo (62). Los estímulos para compensar este crecimiento están directamente relacionados con la demanda de insulina que puede estar integrado por la información genética, la masa corporal, la adipocidad, la actividad física y la sensibilidad a la insulina de los tejidos (62).

2.4 Factores de Transcripción y diferenciación celular β .

Estudios sobre expresión genética en el páncreas han identificado un gran número de factores de transcripción necesarios para la producción y definición de células pancreáticas durante el desarrollo. Cuadro 1.

Los factores de transcripción controlan la habilidad de las células madre para mantener su estado indiferenciado. La inactivación de un factor de transcripción en un animal puede modificar la función de una célula del organismo completo, ejerciendo profundos cambios en la expresión de genes que no están directamente ligados con el propio regulador. Durante el inicio del desarrollo del páncreas las células progenitoras expresan Pdx1 en ambos epitelios ventral y dorsal (67). La inducción inicial es disparada por el factor de transcripción Hnf6. Otros factores como Hlb9 e Isl1 se expresan en el primordio dorsal y Hex1 en el primordio ventral que son necesarios para la expresión de Pdx1 (45, 68).

Factor nuclear del hepatocito (Hnf6)

El factor de transcripción del homeodominio HNF6/Onecut1 (Hnf6) se expresa desde e8.0, antes de la expresión de Pdx1 en la región del intestino medio-proximal, que dará lugar al divertículo pancreático (68). Hnf6 parece ser uno de los componentes importantes que sirve como puente entre genes del programa endodérmico y genes pancreático-específicos (50). Estudios en embriones que carecen de Hnf6 presentan una reducción en la expresión de Pdx1 en el E10 y se retrasa el desarrollo de los primordios dorsal y ventral, resultando en la hipoplasia pancreática (33, 45). Estudios *in vitro* de cotransfección indican que Hnf6 se une y transactiva al extremo 5' en Pdx1 (33). Hnf6 activa al gen Foxa2 y para la especificidad del páncreas inicia la activación de Pdx1 (31, 34). Está presente en progenitores positivos a Pdx1 y después restringido a células ductales y acinares en E18, posteriormente regula río abajo a Hlb9 y Hnf3 β que inician la activación de la cascada de diferenciación celular pro-endocrina(33, 35, 67) implicado particularmente en el desarrollo de células α (45).

Factor de transcripción pancreático 1a (Ptf1a)

Ptf1 es un factor de transcripción hetero-oligomérico compuesto de 3 diferentes subunidades: p75, para la translocación nuclear, y dos subunidades de unión a DNA bHLH heterodiméricas, p64 y p48 (50). El RNAm Ptf1a es detectado desde el E9.5 (la proteína E10) en los primordios (68) la cual, controla la expresión del páncreas exócrino incluyendo elastasa 1 (E1a1)(50).

Ptf1a (p48) es detectado en el epitelio progenitor pancreático que da lugar a linajes exócrinos, ductales y endócrinos (38) y después queda restringido a células acinares a partir de E14- E16 (31, 44) ya que regula la expresión genética de enzimas acinares (35, 68). En ausencia de Ptf1a, estos progenitores adoptan un destino intestinal (50). La expresión de Ptf1a es inducida en el páncreas dorsal por Pdx1, la inactivación de Ptf1a afecta selectivamente la diferenciación del tejido exócrino e indirectamente al páncreas endocrino (68). Su expresión es iniciada por la inducción selectiva de señales celulares endoteliales. La señalización de FGF10 es necesaria para sostener la expresión de Ptf1a en el primordio dorsal (.50) Después una represión dependiente de Notch de la diferenciación de células acinares asegura un crecimiento continuo del epitelio pancreático, y se ha sugerido que es regulada vía interacciones entre Ptf1a y Hes1. (69).

Neurogenina 3 (Ngn3)

El factor de transcripción bHLH Neurogenina 3 es requerido para la diferenciación endocrina (52), como se ha demostrado por la completa carencia de células endocrinas en ratones deficientes de Ngn3 (33, 69, 70). También es requerido para la completa diferenciación endocrina en intestino y en el desarrollo endocrino gástrico (34). Inicia su expresión entre los estados E8.5 y E8.75 en pocas células el primordio dorsal (50, 70) hasta el E13.5 (36), y ocurre una gran actividad de transcripción génica en el inicio del periodo denominado “transición secundaria” para el E15.5 (37, 49, 50, 52, 70), durante este periodo la expresión de Ngn3 requerida para la diferenciación endocrina permite categorizar a este gen, como un gen “pro-endocrino” (31, 33, 34, 38) su inactivación produce diabetes y no es expresada en el tejido acinar pancreático (34, 70). Las células que expresan Ngn3 durante el desarrollo del páncreas se encuentran entre el epitelio pre-ductal, se diferencian abandonando el epitelio y agrupándose cerca de éste (31, 45) inmediatamente se forman los precursores endócrinos que darán lugar a células α , β , δ , ϵ y PP (28, 37, 49, 69).

La expresión de Ngn3 está restringida a la vida embrionaria y desaparece cerca del momento de nacimiento(50, 70) después, poca o nula expresión esta presente en el adulto (50, 68).

Su primer blanco es BETA/NeuroD1 y regula la expresión de genes de las familias Pax y Nkx e Isl1, factores de transcripción implicados en la diferenciación celular endocrina (28, 33, 42, 45, 50, 68, 70), por lo que, todas las células endocrinas derivan de células positivas a neurogenina 3 (35, 52). Estudios *in vitro*, han demostrado que la Ngn3 se une y transactiva la región del extremo 5' de BETA2/NeuroD1 a elementos cis del promotor de Pax4, y regula la expresión de Pax6 (70).

La expresión de Ngn3 es reprimida por la activación de Hes1 involucrado en la señalización Notch (33, 34) y puede ser también regulada por Hnf6 expresado en el epitelio ductal y células acinares (28, 68) o sufrir una autoregulación (50).

Otro blanco importante de Ngn3 incluye a IA1 (asociador a insulina 1) una proteína de dedos de zinc que se activa por Ngn3 ó NeuroD1, IA1 parece ser importante en la activación de procesos de diferenciación endocrina. Otros blancos incluyen a Irx1, Irx2 que son expresados en el endodermo pancreático temprano y en células α (35). Otras líneas de investigación han sugerido que la determinación endocrina y por tanto la activación de Ngn3 puede estar regulada por el sistema de señalización BMP/TGF β /activina (34).

ISL1

Fue inicialmente identificado como factor de unión al promotor del gen de insulina, pertenece a la familia de proteínas del dominio LIM (34). Durante el desarrollo del páncreas, éste es sintetizado desde el E9.0 en el epitelio dorsal y en el mesenquima intestinal (68) conforme

progresa el desarrollo, la expresión de *Isl1* se presenta en células endocrinas y mesenquimales del primordio dorsal (45, 49, 56). *Isl1* es requerido para el mantenimiento de la diferenciación exócrina y endocrina del páncreas (67, 68), su ausencia causa defectos en la generación de todos los subtipos celulares endocrinos (28, 34).

BETA2/NeuroD1

NeuroD1 también conocido como BETA2 (beta cell E-Box transactivator-2) pertenece a la familia de Factores de transcripción bHLH es sintetizado en varios tipos celulares neuronales, donde juega un importante papel en los mecanismos de diferenciación celular (34, 50).

En el páncreas, NeuroD1 se expresa en todas las células endocrinas (44, 67), es un blanco inmediato de *Ngn3* por la unión y activación de la secuencia caja E del heterodímero *Ngn3-E47* (35, 50). NeuroD1 se autoregula, lo que sugiere un papel estabilizador y de proliferación del fenotipo endocrino, por lo que no es necesario para la diferenciación endocrina (34). Es sintetizado desde el E9.5 en células aisladas de epitelio pancreático y para el E14.5 es co-expresado en células *Ngn3*⁺ (49, 68), se ha sugerido que *Ngn3* y NeuroD1 activan consecutivamente a *Nkx2.2* a través de su promotor en estados celulares progenitores y endocrinos (33, 34). Después del nacimiento se sintetiza únicamente en células β y está involucrado en la formación y maduración de la masa celular β (68).

Proteínas Pax (Pax4 y Pax6)

Los genes Pax codifican reguladores clave que están involucrados en el desarrollo embrionario de muchos órganos incluyendo los ojos, riñón, glándula tiroides, sistema inmune y páncreas y juegan un papel crítico en el mantenimiento de las células tronco (71, 72). Varios miembros de la familia Pax contienen un motivo adicional de unión a DNA, un homeodominio tri-helicoidal (PAX 3, 4, 6 y 7) o un homeodominio parcial uno-helicoidal (PAX2, 5 y 8) (72). Pax6 contiene un dominio pareado y un homeodominio, es un factor de transcripción importante en el desarrollo del páncreas, cerebro, el tubo neural y los ojos (34, 69). En páncreas, Pax6 está involucrado en la diferenciación temprana de todas las células endocrinas (49, 68, 73) y también a células ductales (35) su expresión es iniciada en el E9.0 y es activada por NeuroD1 en cooperación con E47 (35, 72). La ausencia de Pax6 impide la aparición de todas las células endocrinas aunque principalmente de células α (48, 71, 73), su síntesis se limita en los islotes después del nacimiento (33, 68), donde su función es activar la transcripción de varios genes de las hormonas pancreáticas (glucagon, insulina, somatostatina) (45, 74), se han hallado sitios de unión a Pax6 en la región promotora G3 del sitio A en el gen de pro-glucagon y en sitios similares en los de insulina y somatostatina (35, 49, 67, 69).

Al igual que Pax6, el transcripto de Pax4 puede ser detectado en el páncreas del ratón en el estado inicial E9.5 por *hibridación in situ* de RNAm (67, 72, 75). El gen Pax4 en murinos está localizado en el cromosoma 6, mientras que Pax6 en el cromosoma 2 (71).

En el E11.5, Pax4 es sintetizado en células aisladas dentro del epitelio pancreático, y el máximo nivel de células positivas a Pax4 se presenta durante la transición secundaria (E13-15 ratón) donde éste puede ser co-expresado con un gran número de marcadores endocrinos incluyendo *Isl1* y *Ngn3* (33, 50, 69, 71, 74). Pax4 representa un marcador progenitor endocrino tardío en páncreas (76) su activación es regulada por *Ngn3* y *HNF1 α* (31, 34, 42). Se ha reportado que tiene un efecto represor sobre la activación de Pax6 y la expresión del gen homeobox *Arx*, glucagon, polipéptido amiloide (IAPP) e insulina (35, 77).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que la *Ngn3* es capaz de activar al promotor de Pax4 (74). El fenotipo de ratones deficientes de Pax4 ha mostrado que *Arx* y Pax4 pueden co-reprimirse uno

a otro sus promotores, el análisis del páncreas endocrino en ratones dobles homocigos *Arx/Pax4* muestran que la pérdida simultánea de ambos genes resulta en una pérdida temprana de células α y β (33, 69, 78) y si únicamente se reprime *Pax4* se estimula la diferenciación de células ϵ y un fenotipo expresador de glucagon /IAPP y con bajos niveles de *Pdx.1* no solamente en páncreas sino también en el duodeno (77).

La expresión de *Pax4* disminuye hacia el final de la gestación y no es detectado en páncreas de ratones adultos (50, 71, 76) sólo en ratas neonatales (74). Sin embargo, es controversial ya que otros reportes han demostrado que *Pax4* es expresado en el páncreas de rata adulta y en islotes humanos usando PCR- tiempo real (PCR-RT) (45, 69, 74,). Mutaciones en los genes *PAX* causan anomalías significativas durante el desarrollo en un espectro amplio de organismos desde la mosca hasta el humano (72). Los animales carentes de *Pax4* no generan células β y células δ en el páncreas mientras que ratones deficientes de *Pax6* son incapaces de formar células α (48, 49, 74, 75, 78) y si están ausentes los dos hay un fallo en el desarrollo de todas las células endocrinas (71). La actividad de *Pax4* también incrementa los niveles de la proteína *Pdx-1* aunque no se conoce el mecanismo por el que ocurre y la expresión de *Hlxb9* también es activada y aparece la síntesis de la insulina (79).

Brink et al. (80), mostraron que un fragmento que contiene aproximadamente 2kb de la región río arriba de *Pax4* es necesario y suficiente para ocasionar una expresión específica. El análisis de esta región de *Pax4* humano y de ratón ha revelado sitios de unión para los factores de transcripción *HNF4 α* , *HNF1 α* , *PDX-1* y *Neuro D1*; mutaciones en estos genes, dan por resultado una forma hereditaria de diabetes (74). También se ha demostrado que mitógenos como la activina o betacelulina inducen la expresión de *Pax4* con un incremento asociado con la replicación de células β . La sobreexpresión de *Pax4* en ratas como también en islotes de humanos induce la proliferación de células β y confiere protección contra la apoptosis inducida por citocinas (79). Estos efectos benéficos fueron producidos por un incremento en los niveles de mRNA en islotes de rata de *Bcl-xL* (un gene antiapoptótico), *c-myc* (un proto-oncogen) e *Id2* (un gen blanco de *c-myc*) (81).

En el trabajo de Collombat *et al.* (82), reportan que una sobre expresión del gen de *Pax4* en páncreas de ratón formó islotes descomunales compuestos de células β , de manera similar la expresión ectópica de este gen indujo un fenotipo de células β en progenitores pancreáticos α disminuyendo así los niveles de glucagon, esto fue producido por la reactivación del gen de *Ngn3*. El resultado de células β maduras funcionales en este experimento también fue demostrado por la capacidad de repoblar islotes pancreáticos de ratones diabéticos y normalizar los niveles de glucosa sanguíneos.

Arx (*Aristaless* -related Homeobox gene)

Es un gen Homeobox tipo-*prd* ligado a X, estrechamente relacionado con el gen *aristaless* de *Drosophila*, está implicado en el desarrollo de la parte frontal cerebral, testículos, páncreas y el sistema olfativo de ratón (83) y el desarrollo de mioblastos del músculo esquelético (84).

Es un factor de transcripción relacionado con el desarrollo del páncreas y el sistema nervioso, iniciando su expresión desde el E9.5 en ratón. Durante la organogénesis del páncreas las células que lo expresan se localizan en el epitelio proliferativo (78).

Arx es un blanco río abajo de *Ngn3* (78), una sobre-expresión de *Arx* en células progenitoras positivas a *Pdx1* son capaces de divergir de linajes β y δ , a linajes α y PP (35). La deficiencia en *Arx* produce una completa ausencia de células α en el E15.5, como también en neonatos que mueren a las 12 horas de nacidos como resultado de una hipoglucemia (69, 78) presentando además un cerebro pequeño, bulbos olfatorios reducidos y testículos alterados (78).

Pax4 y Arx tienen efectos opuestos, el primero estimula la diferenciación celular β y δ , mientras que Arx estimula la diferenciación celular α . La expresión de Pax4 es estimulada directamente por Ngn3 y Hnf1 α y es reprimida por Arx (78). Pax4 y Arx se inhiben directamente, la doble inactivación de Pax4 y Arx resulta en un desarrollo normal de células endocrinas, que producen somatostatina y cuando las crías inician la lactancia, estas células coexpresan PP (85).

Factores Nk

Factores de transcripción de la familia del homeodominio del tipo NK y puede funcionar como activador y represor transcripcional (50). Se expresan en el inicio de la organogénesis pancreática, en la expresión dorsal de Pdx1 en el E8.75. y la expresión ventral aparece en el E9.0 (49, 67). Muchas de las células epiteliales pancreáticas son positivas a Nkx2.2 hasta el E11.5, justo aquí, se observa a Nkx6.1 y Ptf1a, pero las células positivas varían en intensidad y coexpresan Pdx-1 (34, 35, 69). Se han reportado sitios de unión para Foxa2 y NeuroD, con Pdx1 la inmunoreactividad se incrementa en la diferenciación de células β (33, 34) Es posible que Pdx1 y Foxa2 activen a Nkx2.2 en las células precursoras pancreáticas y después durante la diferenciación de células β , se ha demostrado la unión al promotor de Pax4 (34) siendo un activador para la maduración y función postnatal de células β (50, 67) ya que la disminución en los niveles de Nkx2.2 también se acompaña de una disminución en la expresión de MafA, Glut2 e insulina (35, 50). Deficiencias en la expresión de Nkx2.2 repercuten en la pérdida de células β , una reducción en células α y PP (28), mientras que el número de células positivas a grelina se incrementa (86), sugiriendo un reemplazo por células ϵ en ausencia de Nkx2.2 (33, 69, 86).

También se ha demostrado que ratones deficientes de Nkx2.2 pierden la expresión de Nkx6-1 en las células endocrinas demostrando que Nkx6.1 actúa corriente abajo de Nkx2.2 en la diferenciación de células β (35, 45, 69) produciendo una diabetes severa (49). El Factor de transcripción Nkx6.1 se ha detectado inicialmente en el epitelio pancreático en E10.5. se presenta en precursores endocrinos positivos a Ngn3 y es restringido a la célula β , manteniéndose hasta la vida postnatal (45, 50, 68). Nkx6.1 es específico para las células β y es otro blanco potencial para Pdx1 (34, 49, 67). Es sintetizado en las evaginaciones de los primordios dorsal y ventral (69) y es indispensable junto con Nkx2.2, para el crecimiento pancreático embrionario, para la estabilización del fenotipo de células β restringiendo la diferenciación de células productoras de glucagon (35, 50, 68) y también está involucrado en la inducción de la programación neural (34). En páncreas, Nkx6.2 es expresado con Nkx6.1 en el epitelio pancreático desde el E10.5. Para el E15.5 este es expresado en células α y células acinares regula la expresión de amilasa y está ausente en células positivas a Ngn3 y alrededor del nacimiento su expresión desaparece (35, 68).

Maf's

MafA es un miembro de la subfamilia Maf de los factores de zipper de leucina (50). La expresión de MafA ocurre en E13.5 en las primeras células productoras de insulina y permanece hasta la vida adulta (87). Es restringido a las células β y puede estar involucrado en la especificación de este fenotipo celular por la activación de la transcripción de la insulina (34, 35, 49, 87) y la regulación de Pdx1 debido a la unión del área II del promotor de esta proteína según estudios *in vitro* e *in vivo* de una línea de células β (33, 50), también interactúa directamente con BETA2 y Hnf3 β /FoxA2 (50, 68) y regula corriente abajo a Nkx6.1 (87). MafA está involucrado en el mantenimiento de la identidad de células β y es requerido para su mantenimiento en tiempo postnatales (31, 52, 68). Otro factor importante de esta familia es MafB. Este es expresado en los estados iniciales de la diferenciación endocrina en células positivas a Ngn3 y en algunas

positivas a glucagon e insulina (34) y se ha encontrado desactivado en células positivas a insulina durante el desarrollo y en células maduras quizás juega un papel regulador de la maduración de células α y β (35, 50, 52).

Cuadro 1. Factores de Transcripción involucrados en el desarrollo del páncreas. Modificado de Seymour 2011 (88).

Factor	Tipo	Detección	Expresión/ Papel	Fenotipos mutantes
Hnf6 aka OC1	HD	9.0	Expresado en células progenitoras pancreáticas, Es restringido a células acinares y dúciles y requerido para la diferenciación endocrina	Hnf6 ^{-/-} : Primordios hipoplásticos, baja expresión de Ngn3 por tanto precursores endocrinos escasos
Hb9	HD	<8.0	Endodermo posterior y medio tanto en primordio dorsal y ventral, después restringido a células β	Hlx9 ^{-/-} : Ágenes dorsal pancreática número reducido de células β incremento de células δ .
Isl1	HD	8.5	Expresado en mesenquima dorsal y en células endocrinas, requerido para el desarrollo epitelial y endocrino, requerido para el mantenimiento y maduración de la segunda onda de diferenciación endocrina	Isl1 ^{-/-} : Ausencia de mesenquima dorsal y una diferenciación alterada de p exócrino una completa falla de diferenciación endocrina a partir de células epiteliales.
Pdx.1	HD	8.5-8.75	Expresado en progenitores pancreáticos multipotentes, requerido para el desarrollo del linaje celular β y para el mantenimiento y crecimiento de primordios pancreáticos.	Pdx1 ^{-/-} : Ágenes ventral y un arresto en el desarrollo del páncreas dorsal, intolerancia a la glucosa, incremento al mecanismo apoptótico de células β .
Ptf1a	bHLH	8.5-8.75	Expresado en células progenitoras multipotentes, promueve el destino celular ventral y mantiene el desarrollo acinar	Ptf1a ^{-/-} : Ágenes ventral promueve diferenciación intestinal arresta el desarrollo ventral y presenta una disminución en el desarrollo acinar y endocrino.
Hes1	bHLH		Mantiene los progenitores celulares pancreáticos reprime a <i>Ngn3</i> y <i>p57</i>	Hes1 ^{-/-} : Hipoplasia de primordios disgénesis acinar
Sox9	HMG box	9.0	Expresado en progenitores celulares requerido para el crecimiento de primordios y generación de progenitores Ngn3+	Sox9 ^{-/-} : Hipoplasia de primordios, hipoplasia de islotes y reducción de células progenitoras endocrinas Ngn3+
Nkx6.1	HD	9.0	Expresado en células pancreáticas multipotentes, células progenitoras endocrinas Ngn3+	Nkx6.1 ^{-/-} : Reducción de hasta un 85% de células β y además de células α
Nkx6.2	HD	<10.5	Expresado en progenitores multipotentes pancreáticos para el e15.5 únicamente se presenta n células α y acinares funcionalmente equivalente a Nkx6.1	Nkx6.2 ^{-/-} : No se presenta un fenotipo pancreático
Ngn3	bHLH	<9.5	Marcador celular progenitor endocrino que después es expresado en células de islotes, requerido para la formación de todas las células endocrinas y mantiene la función endocrina	Ngn3 ^{-/-} : Ausencia de todas las células endocrinas pancreáticas y células enteroendocrinas intestinales, dismorfogénesis acinar, hiperglucemia por una maduración celular b alterada.
NeuroD1 aka Beta2	bHLH	<9.5	Expresado en la diferenciación y maduración de células endocrinas requerido para la formación de islotes y del fenotipo celular β a respuesta a glucosa	NeuroD1 ^{-/-} : Hipoplasia y disgénesis, diferenciación endocrina alterada, hiperglucemia y RNAm de insulina reducido.
Nkx2.2	HD	<9.5	Expresado en progenitores celulares pancreáticos así como en las células α , β y PP, requerido para el desarrollo celular α y β	Nkx2.2 ^{-/-} : Pérdida de células β y reducción de células α y PP, aumento de células ϵ .
Pax4	HD	<9.5	Expresado en progenitores que son restringidos a células β y δ , dependiente de la expresión de Ngn3. Promueve la distribución del destino celular β .	Pax4 ^{-/-} : Pérdida de células β y δ , expansión de células α y ϵ .
Arx	HD	<9.5	Expresado en células α y PP dependiente de la expresión de Ngn3, promueve la diferenciación de células α y PP y reprime la diferenciación de las células β y δ .	Arx ^{-/-} ; pérdida de células α , aumento en el número de diferenciación celular β y δ .
MafA	Zipper de leucina	<13.5	Activador específico de la transcripción del gen de insulina, expresado exclusivamente en las células de insulina desde el estado 13.5 en adelante.	MafA ^{-/-} : No hay desarrollo de un fenotipo pancreático, desarrollo de intolerancia a glucosa postnatalmente
MafB	Zipper de leucina	<10.5	Expresado en células α y β para el e12.5 y restringido en células α en estados postnatales. Regula la transcripción de factores clave requeridos para la maduración de células α y β .	MafB ^{-/-} : Número reducido de células α y β a través del desarrollo del páncreas mientras que el número total no se ve afectado y la neogénesis de células *insulina esa atrasado.

Otros factores de transcripción (Sox9, Myt1, factores GATA, HB9, Sox4, Hex, Prox1 y Brain4) .

Sox9 funciona como un regulador clave de progenitores positivos a Ngn3 (50), con la señalización Notch, Sox9 parece mantener las poblaciones progenitoras de células epiteliales. Es expresado en células epiteliales en un patrón similar como vHNF1/HNF1 β y HNF6 y que tienen interacciones directas con Sox9. También se ha hallado que se co-localiza con Hes1 quizá regulando la transición de progenitores endocrinos desde un estado negativo a Ngn3/ positivo a Hes1 hacia un estado negativo a Hes1/positivo a Ngn3 que por consiguiente es cuando Hes1 se apaga (35, 36, 52). Myt1 codifica para dos factores de transcripción dedos de zinc (Myt1a y Myt1b) que interactúan potencialmente con Ngn3 (50).

Son expresados en el desarrollo del páncreas en un patrón similar a Ngn3. Myt1 parece ser un potente regulador de la diferenciación celular endocrina (31, 36).

La proteína del homeodominio Hlxb9 (Hb9), es expresada en el dominio del intestino posterior, precedida de la expresión de Pdx1 (31, 37, 52).

Conforme progresa el desarrollo es expresado en progenitores endocrinos y en islotes (31). Hb9 es importante para el desarrollo pancreático dorsal (28, 31, 35) y para la formación de todas las células β (42). Sox4 es expresado en los inicios de los primordios pancreáticos y después se enfoca hacia los islotes. Embriones mutantes mueren en el E14.5, sus explantes pancreáticos cultivados tienen una diferenciación celular endocrina reducida con una carente formación de islotes. Isl1 es una proteína del homeodominio lim y es expresada inicialmente en el epitelio pancreático, es necesario para la sobrevivencia del mesénquima dorsal (31), igual que Pbx-1 es necesario para el desarrollo de todas las células endocrinas, mientras que Isl1 en el mesénquima parece ser necesario para la producción de un factor inductivo exócrino-acinar (35).

Se ha demostrado que GATA4 y GATA6 factores de transcripción dedos de zinc son expresados durante el desarrollo del páncreas. GATA6 se ha demostrado que es importante para la especificación del páncreas. En modelos de ratones sin los dos genes se ha encontrado que se presenta una interrupción o ausencia del páncreas y Hex, una proteína del homeodominio relacionada a Hox es expresado en la región posterior del intestino pre- pancreático y en el epitelio pancreático entre el E13-E16 (35, 52).

Conforme progresa el desarrollo es expresado en progenitores endocrinos y en islotes (31). Hb9 es importante para el desarrollo pancreático dorsal (28, 31, 35) y para la formación de todas las células β (42). Sox4 es expresado en los inicios de los primordios pancreáticos y después se enfoca hacia los islotes. Embriones mutantes mueren en el E14.5, sus explantes pancreáticos cultivados tienen una diferenciación celular endocrina reducida con una carente formación de islotes. Isl1 es una proteína del homeodominio lim y es expresada inicialmente en el epitelio pancreático, es necesario para la sobrevivencia del mesénquima dorsal (31), igual que Pbx-1 es necesario para el desarrollo de todas las células endocrinas, mientras que Isl1 en el mesénquima parece ser necesario para la producción de un factor inductivo exócrino-acinar (35).

Se ha demostrado que GATA4 y GATA6 factores de transcripción dedos de zinc son expresados durante el desarrollo del páncreas. GATA6 se ha demostrado que es importante para la especificación del páncreas. En modelos de ratones sin los dos genes se ha encontrado que se presenta una interrupción o ausencia del páncreas y Hex, una proteína del homeodominio relacionada a Hox es expresado en la región posterior del intestino pre- pancreático y en el epitelio pancreático entre el E13-E16 (35, 52). Prox1 una proteína del homeodominio que señala progenitores celulares pancreáticos y hepáticos, conforme progresa el desarrollo, su expresión va siendo enfocada a células positivas a Ngn3 y células endocrinas y ductales para el E15. Prox1 parece que juega un importante papel en el desarrollo pancreático pues ratones mutantes nulos a éste mueren en el E15 con un pequeño páncreas y con la pérdida de células endocrinas en la transición secundaria, debido a la salida prematura del ciclo celular (52).

2.4.1 PDX-1 (Pancreatic-Duodenal Homeobox-1)

PDX-1 también conocido como el factor promotor de insulina 1 (Ipf-1) homeobox 1 islote-duodeno (Idx-1), factor transactivador de somatostatina 1 (Stf-1), factor río arriba de insulina 1 o factor sensible a glucosa (89). Pertenece a la familia de proteínas del homeodominio Hox que son un gran grupo de factores de transcripción que poseen la distinción de 60 aminoácidos del homeodominio que está altamente conservado desde las levaduras hasta el humano. Por su habilidad para regular la expresión génica, estas proteínas aparentemente actúan como reguladores de la actividad de varios genes durante el desarrollo. Estudios estructurales han revelado que el homeodominio consiste de un brazo N-terminal y tres α hélices, una estructura que les confiere a las proteínas la propiedad clave de unión secuencia-específica a DNA (90).

El gen humano de Pdx-1 consiste de 2 exones y una región espaciadora de cerca de 5kb en humanos en el cromosoma 13. Su homólogo en el ratón, llamado Ipf-1 ha sido mapeado en el extremo distal del cromosoma 5 del ratón. El gen de Pdx-1 en la rata ha sido localizado en el cromosoma 12 y es una proteína nuclear que consiste de 284 aminoácidos (90).

Pdx-1 es el primero en identificarse en la especificación del páncreas y es expresado en todas las células epiteliales en el desarrollo del páncreas (69). Se expresa en el E8.5 en regiones del endodermo ventral y dorsal (34, 35, 36, 52), como también en ducto biliar, estómago distal, glándulas de Brunner y epitelio del duódono (28, 42, 68).

En el E13.5, unas pocas células con altos niveles de expresión se observan en el epitelio central y son más prominentes en el E14.5, éstas constituyen las células formadoras de células β . (37, 49, 69). Para E16.5 la expresión de Pdx-1 disminuye en linajes exócrinos y ductales (34, 49) y en E19 éste es restringido a las células β , cerca del 20% de células δ y en algunas células PP (50, 68, 91) Figura 6.

En ratones y humanos deficientes de Pdx-1 se presenta un crecimiento alterado del primordio pancreático en etapas tempranas del desarrollo, ocasionando una agénesis completa en el nacimiento (35, 47, 52). Mutaciones heterocígas de Pdx-1 ocasiona el desorden metabólico denominado MODY4 (49, 69).

Pdx-1 es necesario para el mantenimiento y proliferación de células β postnatales, altos niveles de expresión de Pdx-1 están restringidos en estas células (33, 50, 68, 91). La acción de Pdx-1 involucra un papel como factor de diferenciación/proliferación (32, 90) durante la embriogénesis y como un regulador transcripcional de proteínas necesarias en el control homeostático de glucosa (35, 89, 91). Se ha reportado que Pdx-1 controla directamente la expresión del gen de insulina, GLUT2, amilina, Pax4, sinaptotagmina 1 y su propia expresión (92); también forma complejos con Pbx1 regulando la expansión de líneas celulares acinares, ductales y endocrinas durante el desarrollo, con Pbx1 regula la expresión de somatostatina, elastasa 1 (90) y con Prep1 únicamente Pbx1 silencia la expresión de glucagon en células no α .(34, 50).

Otra combinación, la formación de un complejo trimérico que incluye Pdx-1, Pbx1 y Mrg1 es necesario para la formación del linaje acinar (34, 50, 89, 90).

El homeodominio de Pdx-1 que contiene la señal de localización celular (NLS), no únicamente regula la unión a DNA, si no que también actúa como un dominio de interacción proteína-proteína para otros factores de transcripción como tcf3 (e47), NeuroD1 y hmg-i(y). La señal de localización celular es necesaria para su transporte dentro del núcleo. Esta señal consiste de 6 aminoácidos (RRMKWKK) que son necesarios para la translocación nuclear de Pdx-1 (90).

La expresión del gen de Pdx-1 de la rata es regulado por 3 regiones cortas muy conservadas en los genes de Pdx-1 de humanos y ratón denominados PH1, PH2, y PH3 o áreas I, II y III. El área conservada PH1/area I muestra una alta actividad transcripcional preferencial en células β y no β , se han reportado factores de transcripción endodérmicos como HNF-3 β /Foxa2 y Hnf1 α ,

NeuroD1/ BETA2 (89, 91, 92) en estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que se autoregula controlando su propia expresión (91).

El dominio de transactivador de Pdx-1 está contenido dentro de la región amino-terminal, (aminoácidos 1-79) (89). Otros factores que han sido reportados regulan la expresión de Pdx-1 son SP1/3, Pax3, USF172, Maf (91).

Aproximadamente el 90% de las células β y el 15% de las células δ expresan Pdx-1 (33, 49). En los islotes de Langerhans, Pdx-1 regula la expresión de insulina, somatostatina, amilina, glucocinasa y GLUT2 (28, 31, 42, 52, 89) como también genes acinares (31).

La expresión del gen de la insulina está controlada por la actividad del promotor vía factores de transcripción en la región amplificadora (enhancer), localizada entre los nucleótidos -340 y -91. Pdx-1 al igual que HNF-1 se unen a los elementos A (A1-A3) que son reguladores críticos de la expresión del gen de la insulina (34). La transactivación del gen de insulina es mediada por la secuencia amino-terminal de Pdx-1, especialmente por las 3 secuencias altamente conservadas, los aminoácidos espaciadores 13-22, 32-38 y 60-73 (89). Pdx-1 se une a la región A3/4 del promotor de la insulina 1 (90) y activa la transcripción del gen de la insulina por cooperación con la proteína bHLH E47/pan1; ésta a su vez, se une al sitio adyacente E2. Aunque la evidencia apoya el principio de que Pdx-1 promueve la expresión del gen de insulina, también ha sido demostrado que altos niveles de Pdx-1 ectópico tienen un efecto inhibitor de la expresión del gen de insulina en humano. Esta represión puede ocurrir por una interacción proteína-proteína (89). La amilina también presenta regiones de unión a Pdx-1, en el sitio AT-2 (89).

Waeber et al. (93), ha propuesto que la acción de Pdx-1 en el promotor de GLUT2 es mediada vía interacción con un motivo TAAT (5'-TAATA-ATAACA-3'), que es una secuencia muy conservada en varias especies. El control transcripcional de GLUT2 es regulado por dos proteínas de unión a DNA islote específicas, GTIIa y Pdx-1.

Bonny et al. (94), demostraron que la disminución de la expresión de RNAm de GLUT2 correlaciona con una disminución de la actividad de unión a DNA de GTIIa, mientras que la unión de Pdx-1 está incrementada. Ellos proponen que la disminución en la actividad de GTIIa puede representar un paso inicial en el desarrollo de la disfunción de la célula β (89). La enzima glucocinasa juega un papel primario en la secreción de insulina sensible a glucosa.

La región promotora del gen de la glucocinasa humana abarca múltiples elementos *cis*, incluyendo dos motivos *cis* muy importantes, la estructura palindroma hPal-1 el elemento tipo A motivo *cis* hUPE-3. Pdx-1 se une al motivo hUPE-3 que activa la transcripción de la glucocinasa (89). Las áreas I y II del promotor están destinadas a la expresión endocrina, mientras que el área III le confiere la especificidad celular β .

Estos estudios indican que Pdx1 juega un papel crucial en el crecimiento pancreático y en la diferenciación de ambos linajes celulares endocrinos y exócrinos (50). Otros factores que recientemente han sido estudiados sobre la regulación de Pdx.1 son Foxa2, Hnf α , Hnf β y MafA (33, 34). Figura 6.

La insulina y la glucosa han demostrado que regulan el nivel de Pdx-1, como su translocación nuclear vía la fosfatidilinositol 3-cinasa (vía dependiente PI3K). La exposición de células β a concentraciones elevadas de glucosa (30mmol/l vs 3mmol/l) dispara la transcripción del gen de la preproinsulina y la translocación al nucleoplasma de Pdx-1. (89). El tejido endotelial también puede jugar un papel importante sobre la expresión de este factor de transcripción, al igual que el mesénquima, durante la organogénesis pancreática, por medio de la expresión de Fgf10 en el epitelio en desarrollo (34).

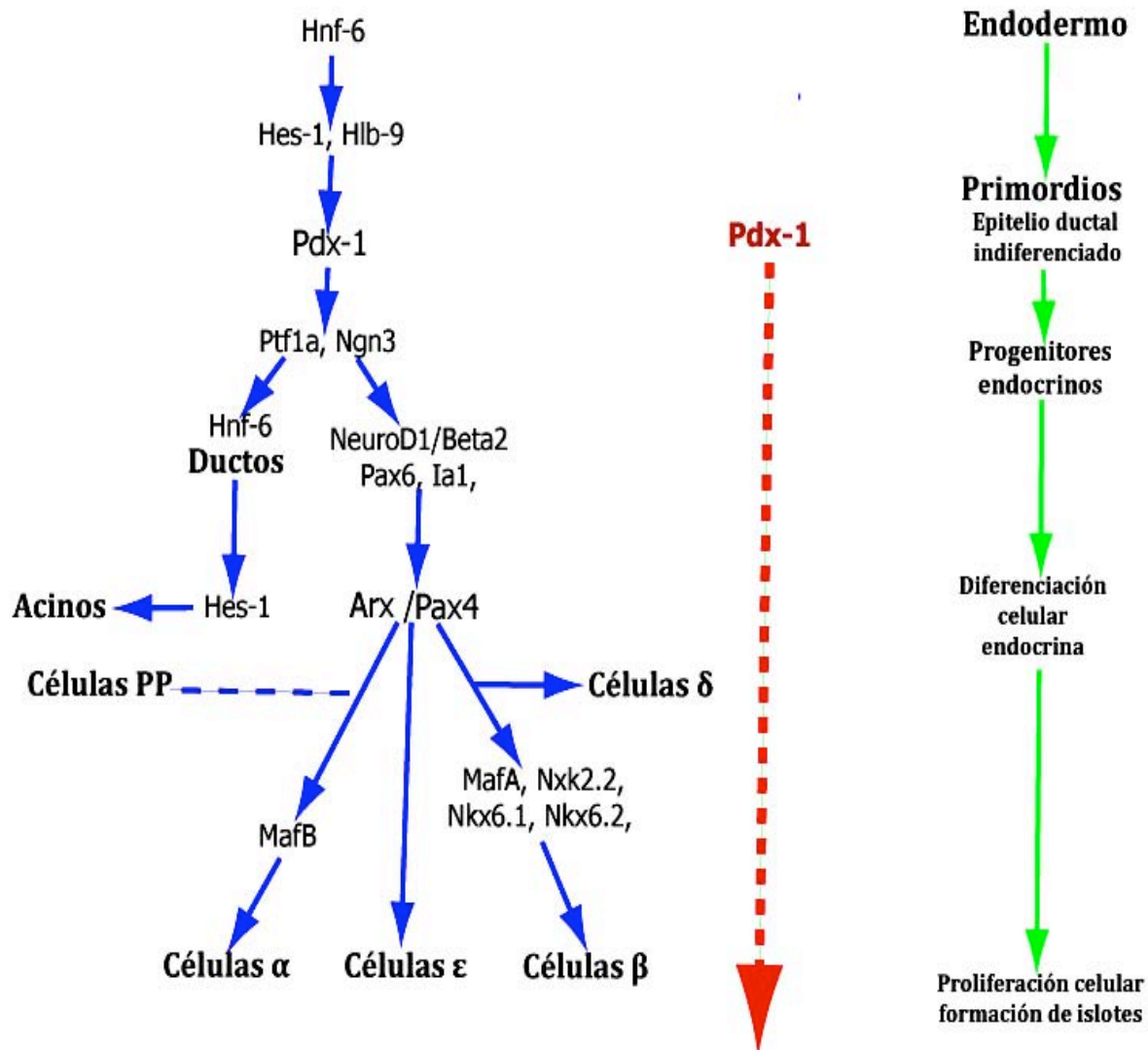


Figura 6. Esquema de los principales factores de transcripción involucrados en la diferenciación celular pancreática (extremo izquierdo). La flecha punteada representa la función permanente de Pdx-1. Eventos morfológicos son representados a nivel general por el esquema del extremo derecho (flechas claras).

2.5 Insulina

La insulina es una molécula filogenéticamente antigua en el reino animal y diversas teorías apoyan su origen en el sistema nervioso de organismos multicelulares (95). En mamíferos, es producida y secretada únicamente por las células β del páncreas; es el agente anabólico más potente que promueve la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas, inhibiendo su degradación y liberación al torrente sanguíneo (96).

Es una proteína pequeña de un peso molecular de 58.0 kDa, compuesta de 51 aminoácidos formada por dos diferentes cadenas peptídicas, cadena A y B unidas por dos puentes disulfuro. La cadena A consiste de 21 aminoácidos y la cadena B consiste de 30 (21).

2.5.1 Síntesis

El gen que codifica la insulina, en humanos, se encuentra en una sola copia en el brazo corto del cromosoma 11 (96) y tiene una longitud de 1355 pares de bases; mientras que en la rata y ratón se presentan dos copias del gen no alélicas. En rata, los dos genes se localizan en el cromosoma 1 y en ratón en el cromosoma 6 (gen I) y en cromosoma 7 (gen II) (97).

El gen de la insulina consiste de tres exones que están separados por dos intrones. El primer exón, codifica al péptido señal en el extremo-N de la preproinsulina, el segundo codifica para la cadena B y parte del péptido C y el tercero codifica la parte complementaria del péptido C y la cadena A. Figura 7.

Los intrones son variables en secuencia, nucleótidos y longitud pero su posición se encuentra altamente conservada (98). En ratón y rata, el gen I carece del intrón 2 esto ha sugerido que el gen I se originó por retro posición de una copia del RNAm parcialmente procesado del gen II (97) por lo tanto , se ha sugerido que el gen *Ins1* es un gen relativamente joven y presumiblemente un retrogen con funciones evolutivamente nuevas en las vías metabólicas de la glucosa (97).

La transcripción produce un RNAm de 466 pb, y su traducción origina a la preproinsulina, un polipéptido de 12 kDa (98) que es rápidamente descargado dentro del espacio cistérnico del retículo endoplásmico rugoso.

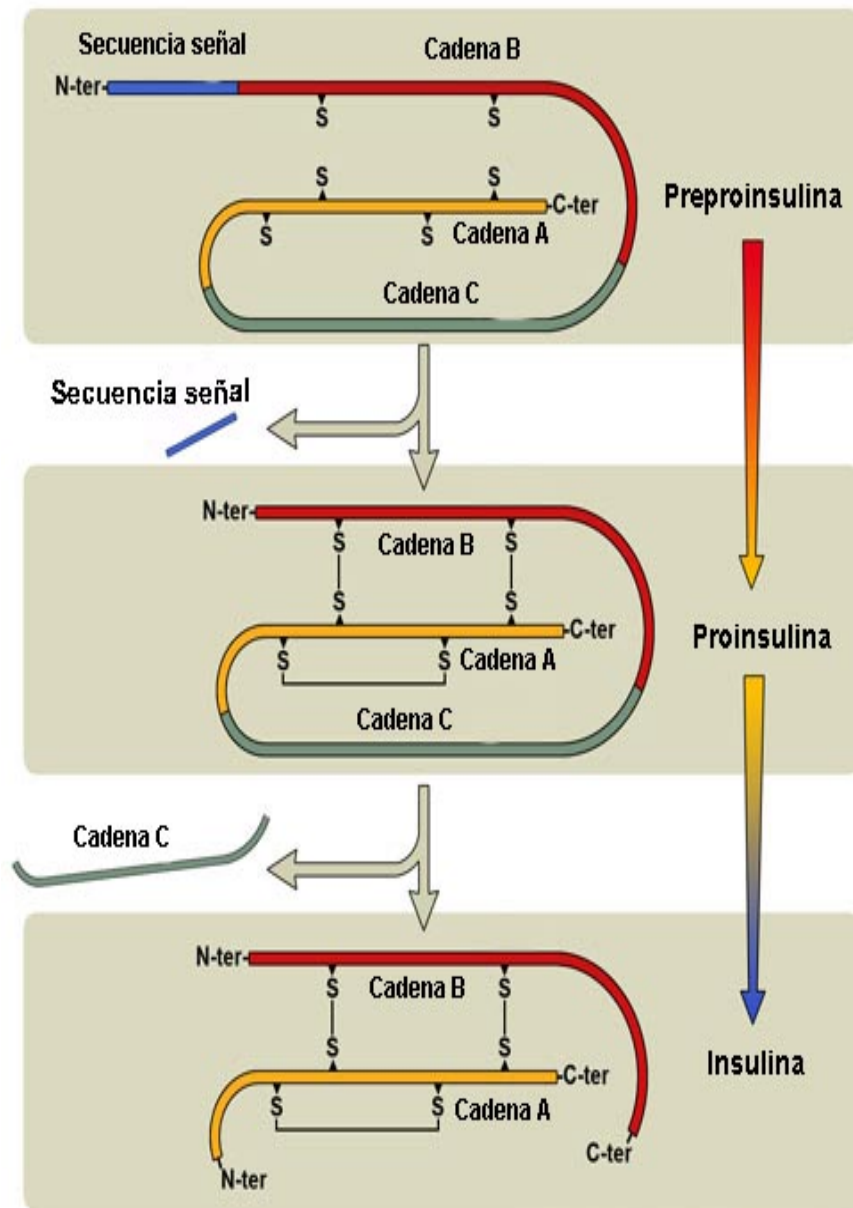


Figura 7. Esquema representando la biosíntesis de la insulina (99).

Conforme la elongación continua la secuencia señal emergente de pre-proinsulina se une a la partícula de reconocimiento de señal (SRP), un complejo ribonucleo-proteico y la traducción es detenida momentáneamente.

La unión de la secuencia señal SRP se acopla a su receptor que es una proteína integral de membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER) siendo el complejo RNAm preproinsulina/ribosoma en el RER el mayor sitio de síntesis de proinsulina en la célula β (98). Como SRP se une a su receptor, el péptido señal naciente de la nueva preproinsulina formada se disocia de SRP y es transferido a otra proteína de membrana integral del RER llamado receptor de secuencia señal (SSR). SSR es parte de un poro de translocación que facilita el transporte del polipéptido de preproinsulina recién formado de la membrana del RER hacia el lumen, marcando la entrada de la recién formada preproinsulina dentro de la vía secretora de la célula β (98). El extremo carboxílico de la molécula de preproinsulina completa la translocación cruzando el RER, resultado de una molécula de proinsulina naciente en el lumen del RER, algunas enzimas proteolíticas cortan inmediatamente esta molécula para producir la proinsulina, removiendo el péptido señal.

Una vez en el lumen la molécula de proinsulina sufre un plegamiento apropiado en que la unión de enlaces disulfuro de la cadena A y los dos de la cadena A/B están correctamente alineados. El proceso de plegamiento es catalizado probablemente por chaperonas moleculares como BiP y enlaces disulfuro, catalizada por la actividad de la disulfuro isomerasa que se encuentra en el lumen del RER (98). La función del péptido C es el alinear los puentes disulfuro que unen a las dos cadenas para que la molécula esté correctamente plegada para su liberación (100). Después, la proinsulina es transportada por microvesículas hacia el aparato de Golgi, donde es empaquetada en vesículas que contiene una bomba de protones dependientes de ATP (98, 100).

La conversión de proinsulina a insulina es iniciada en el complejo de Golgi y continua su maduración en los gránulos secretores a través de la acción secuencial de dos endopéptidasas (pro-hormonas convertasas 2 y 3) y carboxil peptidasa H, juntas; estas enzimas actúan para remover la cadena del péptido C, produciendo así, la insulina y su co-secreción con el péptido C separado (98). La Biosíntesis de la proinsulina está controlada por ciertos nutrientes, neurotransmisores y hormonas a nivel traduccional, pero de éstos la glucosa es el más relevante.

La concentración umbral de glucosa requerido para estimular la secreción de insulina es de 4-6mM (72-108 mg/dl), pero se requiere para estimular la biosíntesis de proinsulina únicamente de 2-4mM (36-72mg/dl) (98). La proinsulina recién formada eventualmente se acumula en regiones cubiertas de clatrina de la red de Golgi trans, que son los sitios de biosíntesis de gránulos secretores (101). La maduración de los gránulos secretores implica la conversión de proinsulina, la acidificación progresiva intragranular, la pérdida de regiones de envolturas de clatrina y la formación de cristales hexámicos de insulina (101). La acidificación promueve la correcta formación granular (pH 5.0-5.5) para el propio procesamiento de insulina y la formación óptima de los cristales de insulina (98).

La insulina tiene una baja solubilidad, de esta manera se coprecipita con iones zinc para auto asociarse como hexámeros formando microcristales dentro de los gránulos secretores (96).

Además los gránulos secretores de insulina contienen otros ~50 polipéptidos algunos de los cuales tienen funciones biológicas como el polipéptido amiloide pancreático (amilina) y cromogranina A (100, 101). Los gránulos también almacenan un número de compuestos de bajo peso molecular como ATP, GABA, serotonina y glutamato y altas concentraciones de iones metálicos como Zn^{2+} y Ca^{2+} (101). En roedores, cada célula β contiene alrededor de 10,000-13,000 gránulos secretores siendo de un tamaño de 350nm, estudios estructurales han demostrado que ~600 gránulos están acoplados con la membrana plasmática y unos alejados ~1500 están situados $\leq 0.2 \mu m$ de la superficie celular. (100, 101).

2.5.2 Secreción

Las células β liberan la insulina por el proceso de exocitosis, la glucosa y los aminoácidos juegan un papel importante. La secreción de insulina es activada de segundos a minutos después de una elevación en los niveles de glucosa, la traducción del RNAm de preproinsulina es activada en pocos minutos, y la transcripción del gen es activada después de una hora (102).

En la célula β , la entrada de la glucosa se lleva a cabo por los transportadores de glucosa tipo 2 (GLUT2) en roedores y en humanos, se da por GLUT1 (100).

Para ser metabolizada en la vía glucolítica, la molécula de glucosa es fosforilada por la glucocinasa, para ser metabolizada y producir ATP. El incremento en la tasa de ATP:ADP provoca el cierre de canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) en la membrana celular, previniendo que los iones potasio crucen la membrana celular (96, 100). Los canales de K_{ATP} actúan como sensores metabólicos, ellos se cierran en respuesta a cambios en concentraciones de nucleótidos (ATP/ADP) que resultan del metabolismo de la glucosa (103).

La resultante elevación de iones de potasio en el interior de la célula ocasiona la despolarización de la membrana celular (100, 101). El potencial de reposo de las células β es mantenido principalmente por la actividad de los canales de K_{ATP} (103). Cuando la glucosa es escasa o está ausente en el medio extracelular, el potencial de reposo de las células β aisladas es de alrededor de -70 a -80 mV. Sin embargo, en concentraciones basales de glucosa esta puede oscilar alrededor de -60 mV (103). El cierre de los canales de K_{ATP} inicia una lenta despolarización del potencial de membrana, que cuando alcanza los -40 mV, incrementa la probabilidad de la apertura de canales dependientes de voltaje de Na^+ y de Ca^{2+} tipo T, el incremento de la entrada de Na^+ y Ca^{2+} causan el incremento de la despolarización. Alrededor de -20 mV, una rápida apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje incrementan la $[Ca^{2+}]$ y por consiguiente la exocitosis de insulina (103) Figura 8.

La secreción de insulina en respuesta a cambios en las concentraciones de glucosa extracelular es bifásica, cuando la concentración de glucosa extracelular se incrementa (>180 mg/dl), se observa un brusco incremento en la secreción de insulina en pocos minutos y es conocido como la primera fase. Cuando estas concentraciones de glucosa se mantienen, se presenta un segundo incremento o fase, que aunque es más baja en intensidad que la primera, ésta se mantiene hasta que se alcanza la normoglucemia (103). La primera fase puede ser explicada por el cierre de los canales de K_{ATP} y la activación o disparo de las vías de señalización de la despolarización que ocasiona la exocitosis de grupos de pequeños gránulos, dependiente de las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares (104) Figura 8.

La segunda fase es más compleja (103, 104) la liberación de insulina permanece dependiente a ATP aunque los gránulos que son utilizados en la liberación se mantienen más lejos de la membrana siendo parte de gránulos de reserva y se ha encontrado que en esta fase los mecanismos de acoplamiento a la membrana son independientes de proteínas SNARE, como la syntaxina 1A, por lo que las dos fases no sólo se diferencian espacialmente sino también de manera mecánica durante la secreción de insulina (105).

Los canales de Ca^{2+} tipo L son considerados los más importantes para la entrada de Ca^{2+} que controlan la secreción de insulina en las células β , los canales de Ca^{2+} están localizados cerca de los gránulos de insulina que es una de las propiedades de la fase secundaria de la secreción de insulina que refleja la liberación secuencial de distintos grupos de gránulos que están asociados con diferentes subtipos de canales de Ca^{2+} tipo L y se han descubierto que los canales de K sensibles a voltaje (K_v) también están involucrados (101, 103). La membrana de los gránulos se fusiona con la membrana celular, liberando el contenido de los gránulos; se ha demostrado que el número de gránulos exocíticos se incrementa por la estimulación con glucosa (105).

La maquinaria involucrada en el anclaje y fusión de los gránulos secretores se compone de Syntaxina 1A /HPC-1 , SNARE-t, SNAP-25 y VAMP2, estas proteínas son las principales activadoras de la liberación de insulina en la primera fase (104).

El movimiento de los gránulos hacia la membrana plasmática ocurre a lo largo de la red de microtúbulos debido a una densa red de actina debajo de la membrana plasmática (101). Se han propuesto varios mecanismos exocíticos sobre la liberación de insulina en las células β uno de ellos es la fusión completa del gránulo con la membrana celular y toma lugar cuando los gránulos y los canales de Ca^{2+} están situados en estrecha proximidad uno del otro así que la maquinaria exocítica está expuesta a altas concentraciones de Ca^{2+} que ocurre muy cerca de la boca interna del canal de Ca^{2+} . (101).

Otro mecanismo propuesto es el conocido como Kiss and run (besa y corre) donde un gránulo anclado a la membrana produce una fusión parcial de su membrana con la membrana celular en un tiempo rápido y se ha propuesto que también es dependiente de las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares (101).

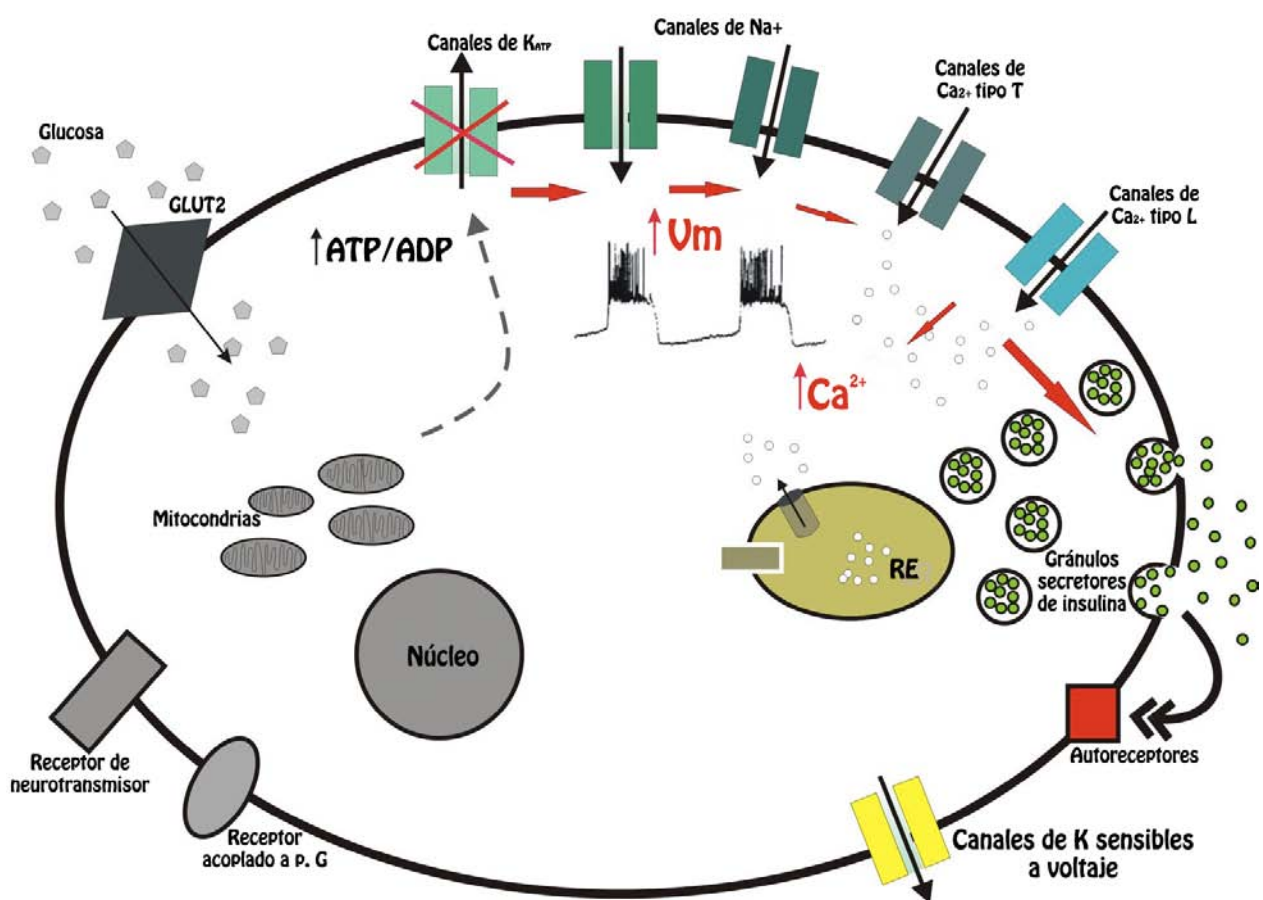


Figura 8. Principales mecanismos involucrados en la secreción de insulina. Modificado de Hiriart *et al*, 2008 (103).

En roedores, cada gránulo secretor contiene comúnmente anillos electro-densos de insulina-zinc. Un simple gránulo de insulina contiene $\sim 1.6 \text{ amol}$ (10^{-18} mol) de insulina (8 picogramos) ó 10^6 moléculas de insulina. (101). La reincorporación de la membrana de los gránulos es parcialmente reabsorbida por la célula (membrana plasmática) y es reciclada por el aparato de Golgi para su re- uso. Para el final del proceso, se produce un reservorio de gránulos acumulados sobre la superficie de la membrana plasmática (100, 105).

2.6 GLUT2 (Facilitated Glucose Transporter member 2).

Las proteínas GLUT (familia génica SLC2A) transportan glucosa pero con diferente cinética y eficiencia. Cada isoforma tiene una distribución tejido-específica aunque pueden ser expresadas en el mismo tejido y en diferentes tiempos, siendo reguladas diferencialmente (106). Estas diferencias revelan que cada isoforma del transportador juega un papel específico en la toma de glucosa en varios tejidos para el mantenimiento de los niveles de glucosa en el organismo (106). Comprenden cerca de 14 miembros que pueden ser divididos dentro de 3 subfamilias de acuerdo a similitudes en sus secuencias genéticas compartiendo un alto grado de homología proteica siendo esencial para el reconocimiento de la glucosa extracelular (107). Son proteínas de entre 450 - 617 aminoácidos aproximadamente (106), que se pliegan dentro de 12 α -hélices combinadas atravesando la membrana celular para formar un poro o canal central a través del cual el sustrato cruza la bicapa lipídica membranaral con los extremos amino y carboxílico hacia la parte intracelular (108). Figura 9.

El transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2) tiene una baja afinidad a la glucosa ($K_m = \approx 30\text{mM}$ comparado con la K_m de 1-10mM de otras isoformas) galactosa ($K_m = \approx 92\text{mM}$), manosa ($K_m = \approx 125\text{mM}$) fructosa ($K_m = \approx 76\text{mM}$) y tiene una alta afinidad a la glucosamina ($K_m = \approx 0.8\text{mM}$) (106). Se presenta en células β pancreáticas, hígado, cerebro, riñón e intestino delgado -membrana basolateral- (107). En estos tejidos, la toma de glucosa no es dependiente en el número y actividad de los transportadores de glucosa sino en la concentración de glucosa sanguínea, por lo tanto la actividad del transportador no puede ser saturada con concentraciones fisiológicas de glucosa sanguínea (108). GLUT2 además de reconocer a la glucosamina como un sustrato (109) puede reconocer también a 2-desoxi-D-glucosa (2DG) (108).

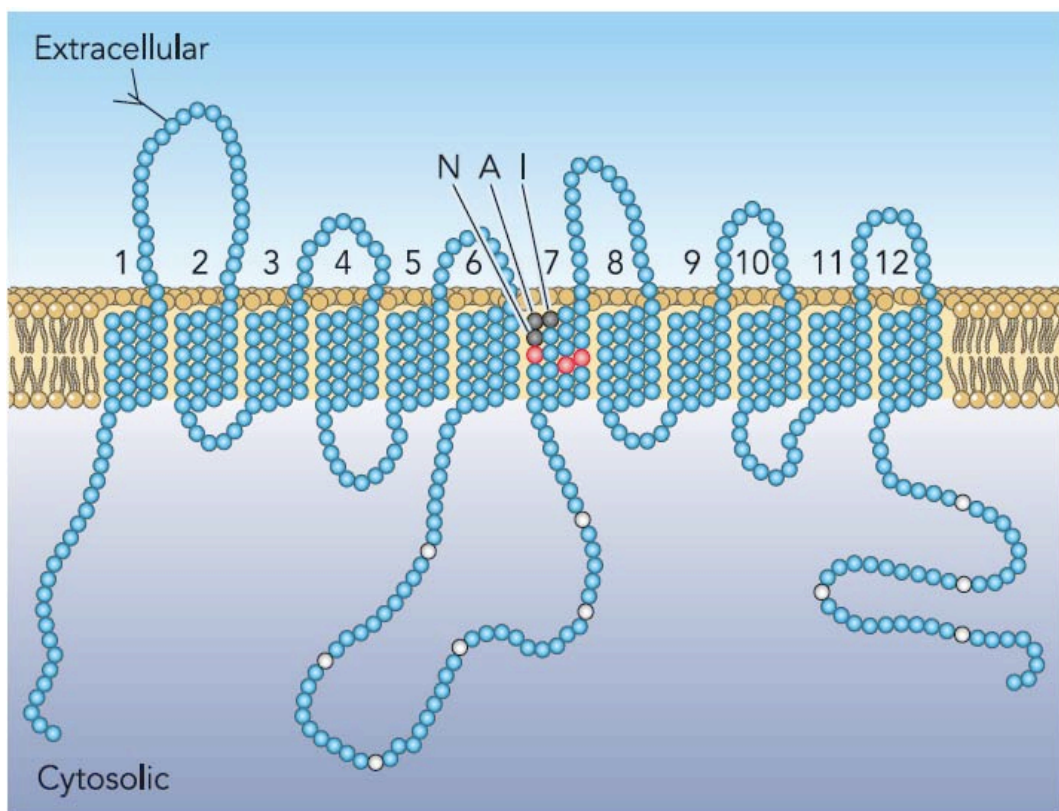


Figura 9. Modelo estructural de un transportador de glucosa (GLUT).
Modificado de Manolescu 2007 (108).

Estudios genéticos en GLUT1, en particular en la secuencia de reconocimiento en la hélice 7 indican que el motivo QLS sería un sitio involucrado en la región de reconocimiento y afinidad al sustrato, GLUT1, 3 y 4 que transportan glucosa pero no fructosa tienen la secuencia QLS en la hélice 7, mientras GLUT2 y 5 los cuales transportan además fructosa, tienen HVA ó MGG respectivamente careciendo de esta secuencia (108). La secuencia de aminoácidos de esta proteína presenta una identidad del 81% entre el humano, el ratón y la rata (106).

El papel de GLUT2 en el sistema de monitoreo y secreción de insulina está completamente identificado en varios tejidos. Experimentos en ratones deficientes de GLUT2 han reportado el desarrollo de diabetes presentando un crecimiento postnatal anormal de los islotes y se caracterizan por hiperglucemia, hipoinsulinemia, hiperglucagonemia y glucosuria y mueren a las 3 semanas de vida (107). Se ha encontrado que los 338 pb proximales del promotor de GLUT2 contiene elementos cis destinados para los factores islote específicos que actúan en *trans* requeridos para la expresión de GLUT2 (106). En hepatocitos, el gen de GLUT2 es regulado por el factor nuclear de hepatocito 1 (HNF1) y HNF3 en su región del promotor -132/-87 en humanos (106).

En el estudio de Waeber et al, (93) se demostró que el factor de transcripción PDX-1 regula la activación de la expresión de gen de GLUT2, ellos demuestran que este factor se une a una secuencia TAAT del promotor de GLUT2 en humanos y murinos. Otros factores relacionados en la regulación transcripcional de GLUT2 son el receptor activador proliferador de peroxisoma δ (PPAR- δ) y receptor X retinoide α (106) y también su expresión es regulada por la glucosa *in vivo* e *in vitro* (110).

3. Modelos Animales

Para realizar investigación biomédica los modelos animales resultan de gran utilidad. Las observaciones en éstos pueden extrapolarse al hombre después de un análisis riguroso (111). Para el estudio de la diabetes mellitus existen diversos modelos animales que pueden ser utilizados de acuerdo a los requerimientos de la investigación.

3.1 Modelos de Diabetes

Existen una gran diversidad de modelos animales para el estudio de la diabetes y son utilizados dependiendo del objetivo del experimento, tres cuartas partes de los reportes en animales han sido realizados en ratas (60%), y ratón (10%), seguido por la oveja (12%), cerdos (8%), cobayos (4%), y monos (2%); esto se debe a que el ratón y la rata están altamente relacionados con los humanos por genes, vías bioquímicas, órganos y fisiología similares (112). Existen dos grandes grupos de modelos animales de diabetes: Los modelos genéticos que son producidos por la selección de una mutación espontánea o por ingeniería genética (113) Cuadro 2; y los modelos inducidos que son producidos experimentalmente por cirugía, infección viral, administración de hormonas o de agentes químicos (114). Son muchos los ejemplos de modelos genéticos, entre éstos, los más utilizados son el ratón db/db, ratón ob/ob, ratón kkk, ratón NZO, rata diabética Zucker; los modelos de Diabetes tipo 1 incluyen al ratón NOD y la rata diabética BB (113, 114). También se utilizan animales en los cuales, determinados genes o proteínas son eliminados o están ausentes (knockouts) ó son sobrepresados (114, 115).

Cuadro 2. Características de algunos modelos animales de diabetes espontánea.

NOMBRE	CONSTITUCIÓN	INSULINA PLASMÁTICA	TIPO DE DIABETES	CETOSIS	EFFECTO EN CÉLULAS β .
Rata BB (Biobreder)	Delgada	Muy baja	Tipo 1	+++++	Insulinitis. Necrosis de las células β .
Ratón NOD (diabético no obeso)	Delgada	Baja	Tipo 1	+++	Destrucción autoinmune por las células T.
Ratón Chino (<i>Cricetulus griseus</i>)	Delgada	Normal a Baja	Tipo 1	+	Degranulación, bajo número de células β , con cetosis: necrosis
Hámster Sudáfrica <i>Mysomys albicaudatus</i>	Delgada	¿?	Tipo 1	++	Hiperplasia e infiltración de glucógeno, con cetosis: necrosis
Ratón C57BL/6J ob/ob	Muy obeso	Inicia alta después normal.	Tipo 2	-----	Inicio: degranulación; después hiperplasia y regeneración.
Ratón C57BL/ Ksj db/db	Muy obeso	Inicio: alta, después baja	Tipo 2	Ocasional	Inicio: degranulación, después necrosis de células β .
Ratón amarillo	Obeso	Alta	Tipo 2	-----	Hipertrofia e Hiperplasia
Ratón Obeso de Nueva Zelanda (NZO)	Obeso	Alta	Tipo 2	-----	Inicio: Aumento de la insulina pancreática.
Ratón KK	Obeso	Alta	Tipo 2	-----	Hipertrofia e hiperplasia.
Ratón amarillo - KK	Obesidad moderada	Alta	Tipo 2	-----	Hipertrofia e Hiperplasia.
Rata Obesa de la cepa Zucker (fa/fa Zucker)	Obesa	Alta	Tipo 2	-----	Inicio: Alargamiento de islotes, después baja insulina, bajo número de células β .
Rata de Arena (<i>Psammomys obesus</i>)	Obesa	Alta	Tipo 2	Ocasional	Alargamiento de los islotes, degranulación de las células β ; depósitos de glucógeno, con cetosis: necrosis
Simio negro (<i>Macaca nigra</i>)	Delgado	Normal	¿?	----	Amiloides.

3.2 Diabetes inducida.

Los primeros intentos de inducir la diabetes experimental se realizaron en perros a través de la pancreatectomía parcial; y fue con este modelo que F. G. Banting y C. Best, en 1921, descubrieron la insulina. Este procedimiento también fue el primero que se utilizó para causar diabetes en ratas gestantes (114). El efecto de inducción de diabetes por pancreatectomía es dependiente del grado de identificación y la habilidad para preservar segmentos adecuados del órgano. En especies animales como perros, cerdos, y primates no humanos el páncreas es un órgano discreto y aislado; que en el caso de roedores como la rata, el páncreas es un órgano muy difuso, y la disección total del páncreas es muy difícil de realizar (113, 114).

Los virus representan otro mecanismo de inducción de diabetes, están asociados con el desarrollo de la diabetes tipo 1 en humanos y animales, pueden destruir directamente las células β por efecto citolítico propio de los virus o bien actuar indirectamente por una respuesta autoinmune iniciada y aumentada por el virus (113). Entre los principales virus se encuentran: Coxsackie B, virus bovino, virus Kilham de la rata, citomegalovirus, Epstein-Barr y Varicela Zoster (114).

Los modelos de Diabetes vírica presentan diversas dificultades experimentales, por la susceptibilidad genética frente a la infección y la resistencia de las células β a las lesiones virales por lo que son poco utilizados (114).

3.3 Inducción Química

La inducción de diabetes experimental en la rata utilizando agentes químicos que destruyen selectivamente a las células β del páncreas es un método conveniente y simple de usar (111, 113, 114). En el Cuadro 3 se muestran los diferentes agentes químicos inductores de diabetes. Los más utilizados son la aloxana y la estreptozotocina (STZ) estos dos compuestos químicos son citotóxicos para células β y aunque su citotoxicidad es realizada por diferentes vías (116), sus mecanismos de acción selectivo a las células β son idénticos causando un síndrome tipo diabetes 1 y producen una destrucción celular característica de muerte celular necrótica. La toxicidad en la célula β y la diabetogenicidad resultado del efecto de la aloxana es debido al ciclo redox y a la generación de especies reactiva de oxígeno (ROS) tóxicos (117).

Cuadro 3. Agentes químicos inductores de diabetes.

Agentes con efectos citotóxicos irreversibles en la célula β	Agentes con efectos citotóxicos reversibles en la célula β
Difenilthiocarbazona	2-deoxiglucosa
Estreptozotocina	Ácido dehidroascórbico
Hidroxiquinolona	Aloxana
Oxine-9	Fluorida
Vacor	Iodoacetato
	Malonato
	Mannoheptulosa.
	L- asparginasa
	6- aminocotinamida
	Cianida
	Azida
	Ciproheptamina

3.3.1 Estreptozotocina (STZ)

La estreptozotocina (2-desoxi-2-(3-(metil-3nitrosourideo)-D-glucopiranososa) es un antibiótico sintetizado por el hongo *Streptomyces achromogenes* y es usado para inducir diabetes mellitus en modelos animales (114, 116). Además de sus propiedades antibióticas y diabetogénicas, la STZ ha presentado propiedades alquilantes y genotóxicas en una variedad de ensayos, tales como: mutagénesis microbiana, síntesis de DNA no previstas, micronúcleos, aberraciones cromosómicas (CAs) e intercambio de cromátidas hermanas (SCEs) (118).

El rango de la dosis no es muy claro como en el caso de la aloxana. La dosis intravenosa frecuentemente usada en ratas adultas para inducir diabetes está entre 40 y 60 mg/Kg, pero han sido también utilizadas dosis altas (119). La acción de la STZ en las células β está acompañada por alteraciones en las concentraciones de insulina y glucosa sanguíneas tiene una vida media de 5 minutos y es eliminada de la circulación en un lapso de 4 a 6 horas (116), presentándose hipoglucemia con altos niveles de insulina en la sangre. Finalmente, la hiperglucemia se desarrolla y los niveles de insulina sanguíneos disminuyen (116). La STZ altera la oxidación de la glucosa y disminuye la biosíntesis y secreción de la insulina (116, 117, 119).

ESTRUCTURA QUÍMICA

La estructura química de la STZ es $C_8H_{15}N_3O_7$; está formada por isómeros α y β con respecto a la glucosa (118), Figura 10. Es inestable a temperatura ambiente, por lo que hay que mantenerla congelada y se descompone rápidamente en solución acuosa a un pH neutro y su estabilidad óptima se consigue a pH 4 (114, 116, 120).

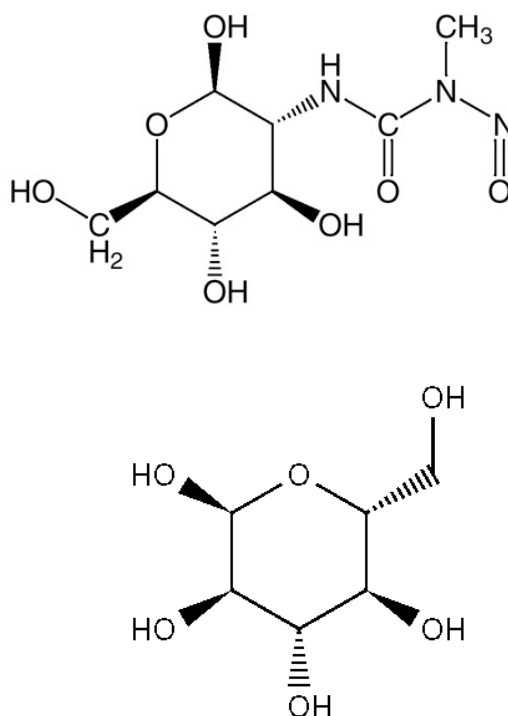


Figura 10. Estructura química de la STZ (arriba) y glucosa (abajo).

3.3.2 Mecanismo de acción

La STZ es tomada por la célula β vía transportador de glucosa GLUT2, el mecanismo citotóxico ha sido aclarado recientemente por varios estudios (121).

Inicialmente, la biosíntesis de insulina, la secreción de insulina inducida por glucosa y el metabolismo (oxidación de glucosa y consumo de oxígeno) se ven afectados. La STZ no tiene un efecto directo inmediato ni inhibitor sobre el transporte de glucosa o sobre la fosforilación de la glucocinasa (117).

Sin embargo, en estados posteriores, deficiencias en la expresión génica y producción proteica ocasionan un deterioro del transporte y metabolismo de la glucosa (117), aún así, antes de los efectos negativos sobre el DNA mitocondrial y alquilación proteica y glucosilación es evidente el agotamiento de NAD^+ intracelular produciendo una disfunción enzimática mitocondrial y daño al genoma mitocondrial (117).

La STZ es dependiente de la actividad alquilante a DNA de su porción metilnitrosuera, especialmente en la posición O^6 de la guanina. La transferencia de este grupo metilo desde la STZ a la molécula de DNA le causa daño, que es definido por una cadena de eventos. La acción intracelular de la STZ ocasiona cambios en el DNA de las células β resultando la fragmentación de esta molécula (117, 118). Una hipótesis alternativa propone que el efecto diabetogénico no es por su habilidad alquilante sino por su potencial como donador de óxido nítrico (ON). Al ser metabolizada en la célula, la STZ sirve como donador de ON el cual se ha propuesto que lleva a cabo la necrosis celular y daño al DNA (118, 119, 120) ésto es debido a que contienen un grupo nitroso y puede liberar ON. Sin embargo el agente alquilante metil metanosulfonato es el compuesto más tóxico en el metabolismo de la STZ (117).

En diversos experimentos, se ha demostrado que el ON no es la única molécula responsable del efecto citotóxico de la STZ, también genera especies de oxígeno reactivo, que contribuyen a la fragmentación del DNA y otros cambios que dañan a las células β (122). La formación de aniones superóxidos resulta por la acción de la STZ en la mitocondria e incrementa la actividad de la xantina oxidasa, pues se ha demostrado que la STZ inhibe el ciclo de Krebs y substancialmente disminuye el consumo de oxígeno de la mitocondria (123). Estos efectos limitan la producción de ATP mitocondrial y causan una disminución de esta molécula en las células β , la restricción en la generación de ATP mitocondrial está parcialmente mediada por ON (118, 120, 123). La xantina oxidasa cataliza la reacción y se forman los aniones superóxidos (122, 123). Como resultado de la generación del anión superóxido se forma el peróxido de hidrógeno y radicales de hidróxilo (123) pero se ha demostrado que se genera cantidades mínimas de ROS, durante el metabolismo de la hipoxantinas acelerando el proceso de destrucción de la célula β pero los ROS no parecen jugar un papel importante como la alquilación (117). En el intento para reparar el daño al DNA, la polimerasa poli(ADP-ribosa) (PARP) es sobre estimulada. Ésta disminuye el NAD^+ intracelular y por consiguiente el ATP almacenado; la escasez de almacenamiento energético celular ocasiona una necrosis celular (124). La STZ también metila proteínas, la metilación al DNA es a la larga la responsable de la muerte de la célula β , aunque es probable que la metilación de proteínas contribuya a los defectos funcionales de las células β después de la exposición a la STZ (117, 121, 124). La poli ADP-ribosilación es una reacción enzimática dependiente de NAD^+ resultando una modificación covalente de proteínasceptoras con unidades repetidas de residuos de ADP-ribosa (125). La estructura es un biopolímero, originalmente la Poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP)-1 se encuentra dentro del núcleo y se ha demostrado que es activada por la ruptura de cadenas de DNA (126). PARP-1 juega un importante papel en lesiones celulares después de un golpe, trauma, reperfusión isquémica del corazón, bazo, músculo y retina, artritis y citotoxicidad de células β / diabetes mellitus por lo que se ha propuesto una hipótesis de suicidio celular en las acciones de PARP-1 que regula la muerte celular (127).

El incremento en la longitud y complejidad de los polímeros PARP ocasionan un incremento en la muerte celular en neuronas, polímeros complejos >60 unidades de ADP-ribosa indujeron >80% de muerte celular. La muerte celular dependiente de PARP-1 es en parte independiente de caspasas sugiriendo que la muerte no es por apoptosis (125, 127). Uno de los inhibidores de la poli ADP ribosilación es la 3-amino enzamida, potente inhibidor de la poli (ADP-ribosa); y el otro es la nicotinamida que es también una “limpiadora” de radicales libres y ejerce una protección para la STZ, pero es dependiente de ATP (123).

Se puede concluir en general que el efecto citotóxico de la STZ sobre las células β es la inducción del mecanismo de muerte celular por necrosis pues presenta diversas características que presenta una célula necrótica como es el fallo bioenergético y una rápida pérdida de la membrana celular que son causadas por eventos moleculares bien definidos como el incremento en la producción mitocondrial de ROS, la toma de calcio mediada por canales, activación de proteasas no apoptóticas y una destrucción enzimática de cofactores requeridos para la producción de ATP (128). Figura 11.

La activación de la poli-ADP ribosilación polimerasa por medio de la alquilación al DNA es de gran importancia para la diabetogenicidad de la STZ (117, 121), además de la generación de radicales libres; el calcio puede también jugar un papel importante en el efecto de la STZ, pues se ha observado que los antagonistas de canales de calcio no protegen a las células β del daño de la STZ, como en el caso de la aloxana (116, 117, 118, 120, 122, 123).

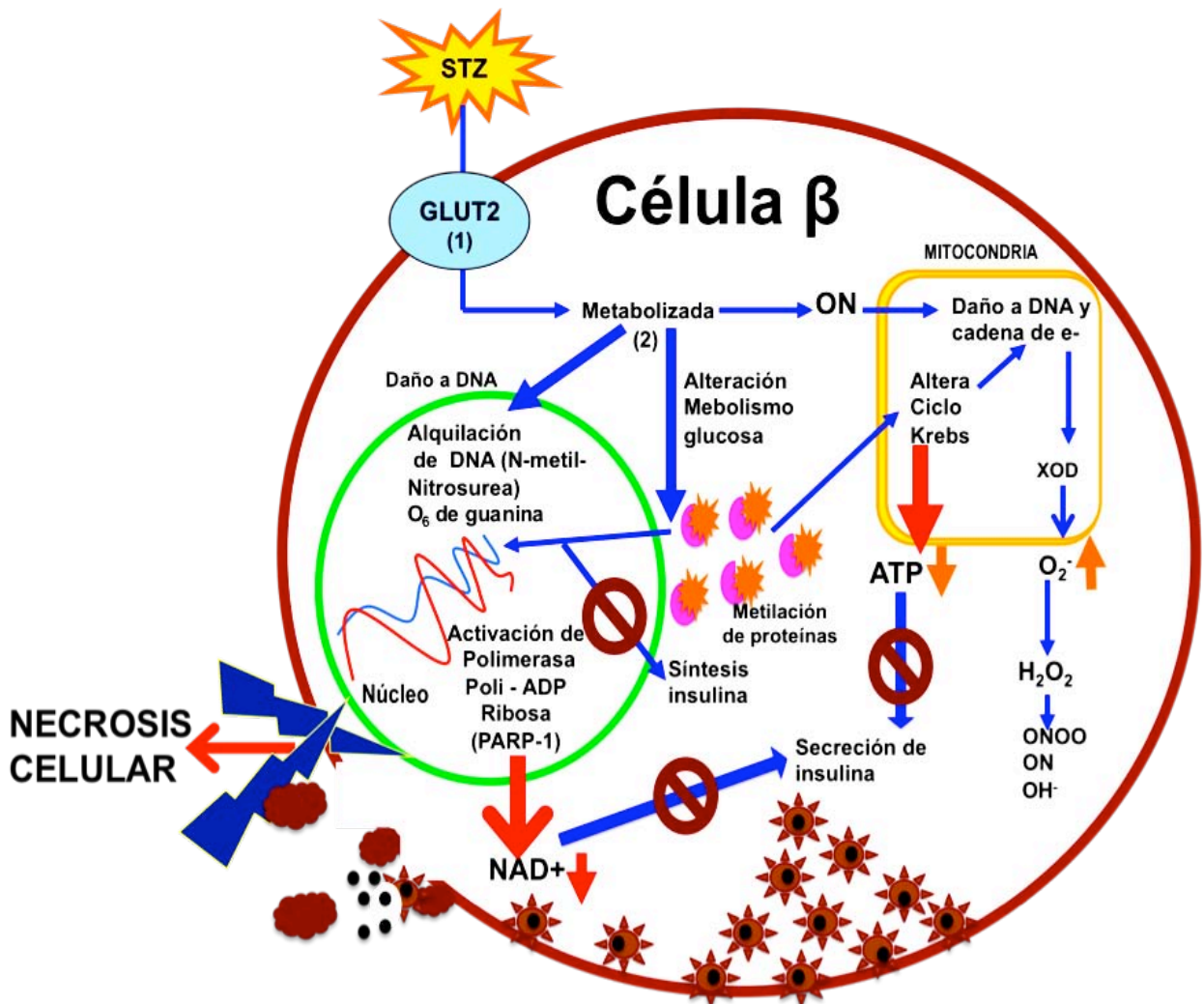


Figura 11. Esquema del mecanismo de acción de la STZ en la célula β.

3.4. Modelos de Diabetes Materna y Desarrollo del páncreas

La diabetes materna descontrolada provoca un medio intrauterino anormal que induce alteraciones en el crecimiento y desarrollo de los fetos.

Experimentos realizados en roedores con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) han demostrado la presencia de malformaciones congénitas y reabsorciones; retardo y aumento en el crecimiento de los productos, y un periodo de gestación mas largo de lo normal (129, 130, 131).

Una gran variedad de anormalidades afectan a los productos de madres diabéticas; entre las más comunes están: defectos cráneo-encefálicos, holoprosencefalia, defectos cardiacos, síndrome de regresión caudal, agénesis renal, defectos gastrointestinales y la presencia de una sola arteria umbilical, entre otros (132, 133, 134).

Las placentas presentan anormalidades estructurales como: degeneración cística del espongiotrofoblasto, aumento en el volumen de la capa laberíntica e hipervascularización, así como la presencia de células gigantes del trofoblasto en etapas que ya no deberían presentarse (129, 135).

Se ha reportado que las crías de ratas diabéticas presentan alteraciones en el metabolismo después del nacimiento hasta la vida adulta debido a las adaptaciones funcionales durante el desarrollo fetal ocasionadas por la hiperglucemia materna; según varios autores estas alteraciones en el metabolismo pueden ser un factor de riesgo para padecer, diabetes tipo 2 (136), obesidad, intolerancia a la glucosa; incluso se podrían sumar para ocasionar el síndrome metabólico (137, 138). El mecanismo que ocasionan todas estas alteraciones en el desarrollo de fetos de madres diabéticas aún no se conoce, sin embargo, parece ser multifactorial (138).

Estudios en gestaciones diabéticas de roedores han sugerido varios mecanismos del páncreas en desarrollo a la respuesta de la diabetes inducida (139).

En ratas diabéticas, se ha reportado que las porciones endocrinas del páncreas fetal en el último día de la gestación son grandes, indicando una hiperactividad funcional, aunque presentan una disminución de la granulación en las células β , lo que se debe a un agotamiento de la propia función endocrina (139, 140, 141).

Eriksson en 1980 (130), reportó que en fetos de 20 días se presenta una alteración sobre las células β del páncreas en fetos de ratas diabéticas, y observó también que las reservas de glucagon y somatostatina, se mantienen en un rango normal.

Un medio intrauterino anormal, puede deberse a una deficiencia proteica en la alimentación o a una mala transferencia de nutrientes maternos; como la diabetes materna, que ocasiona diferentes alteraciones dependiendo de la cantidad de glucosa que llega al feto (138).

Una elevación moderada ($\pm 20\%$) en las concentraciones de glucosa materna y por ende en las concentraciones de glucosa fetal inducen un incremento en el número y actividad biosintética de las células β fetales. La secreción de insulina debido a las concentraciones de glucosa fetal *in vivo* e *in vitro*, se incrementa en ratas con diabetes moderada (142).

La hiperglucemia severa en ratas gestantes da por resultado una hiperglucemia e hipoinsulinemia en los fetos así como un retraso en el crecimiento fetal, el peso pancreático disminuye pero el porcentaje de tejido endocrino está incrementado (142).

Con microscopia electrónica se ha observado que las células β son sobre estimuladas y muestran una degranulación: un fenómeno de agotamiento celular β , que es, probablemente el causante de la disminución en las concentraciones de insulina pancreática y plasmática.

Las células β de fetos con hiperglucemia severa son incapaces de secretar insulina *in vivo* e *in vitro*, indicando que el páncreas es insensible a la glucosa (142).

II. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es actualmente una epidemia que ha afecta tanto a países industrializados como a los que están en vías de desarrollo.

Estudios epidemiológicos en humanos y modelos animales han demostrado que un crecimiento intrauterino anormal está relacionado con un incremento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y metabólicas. Un gran número de tejidos, órganos y sistemas son programados *in utero* con consecuencias adversas sobre su función fisiológica en la vida adulta.

El conocimiento del efecto de las condiciones hiperglucémicas *in utero* sobre el desarrollo fetal y la reorganización del páncreas endocrino en periodos postnatales es controversial. Durante el desarrollo del páncreas endocrino, a partir de un grupo de células precursoras que inician progresivamente una diferenciación controlada por una red jerárquica de factores de transcripción se determina la masa celular β y después del nacimiento, por el reclutamiento de las tasas de replicación celular y apoptosis. Cualquier disturbio sitio-específico en el medio como ocurre en un ambiente hiperglucémico, puede perturbar el balance de factores controladores, contribuyendo así a un fallo de la masa celular β y producir diabetes.

Es posible, que ciertas alteraciones producidas en diferentes ventanas de tiempo perturben el desarrollo y maduración del páncreas endocrino en diferentes formas ya que su desarrollo sigue un preciso cronograma de regulación.

En la rata, el periodo de lactancia constituye una fase importante en la ontogenia pancreática una ventana crítica, que resulta en varios cambios adaptativos en sus islotes, en particular, sobre la síntesis de proteínas reguladoras de la función de las células β como: Pdx-1 y su efecto sobre la producción de insulina y GLUT2.

III. HIPÓTESIS

El microambiente uterino en el que se desarrollan los fetos de ratas diabéticas provocará alteraciones en la producción de Pdx-1, proteína clave de diferenciación y maduración de las células β , lo que repercutirá en su funcionamiento, alterando la síntesis de insulina y presencia de GLUT2; dando por resultado individuos que desarrollarán hiperglucemia en la edad adulta.

IV. OBJETIVOS:

4.1 General:

- Determinar los cambios estructurales en el páncreas y la expresión de los genes de Pdx-1 y GLUT2 en páncreas de fetos y crías de madres con diabetes inducida con estreptozotocina (STZ) los días 17 y 21 de gestación; 20, 28 y 90 días de nacidas y correlacionarlo con la producción de insulina.

4.2 Particulares:

- Correlacionar el retraso en la diferenciación del páncreas de fetos de ratas diabéticas a los 17 y 21 días de gestación con la secreción de insulina, y la expresión de los genes de Pdx-1 y GLUT2.
- Correlacionar la secreción de insulina y presencia de Pdx-1 y GLUT2 con la remodelación y mantenimiento de la masa celular β de crías de madres diabéticas a los 20, 28 y 90 días de nacidas y compararla con crías de ratas sanas.

V. MÉTODO

5.1 Animales.

Se utilizaron 35 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley con peso de 250-300g. que permanecieron en condiciones controladas de bioterio con una temperatura de 22-25°C, con un periodo de luz-oscuridad de 12/12 hrs. con acceso a alimento y agua *ad libitum*; se aparearon con machos de fertilidad comprobada toda una noche, al día siguiente, la presencia de tapón vaginal y/o espermatozoides determinó a éste como el primer día de la gestación.

Lote Control

Al quinto día de gestación, a 10 ratas gestantes se les inyectó vía intraperitoneal (ip.) una dosis de 0.2 -0.3 ml de amortiguador de acetatos (CH_3COONa) a 0.1M a pH 4.3 de acuerdo a su peso.

Lote Experimental

Se utilizaron 25 ratas gestantes que al quinto día de gestación se les inyectó vía ip. una dosis única de 50mg/kg de estreptozotocina (STZ) en amortiguador acetatos (CH_3COONa) a 0.1M a pH 4.3. A las 48 hrs. se les determinó niveles de glucosa sanguínea (obtenida de la vena caudal) a todas las ratas y las que presentaron concentraciones de glucosa basal $\geq 200\text{mg/dl}$ fueron consideradas diabéticas.

Todas las ratas se colocaron en jaulas individuales y se formaron los siguientes grupos que representaron el Lote Control (LC):

1. **Grupo 1**= 2 ratas gestantes no diabéticas sacrificadas a los 17 días de gestación.
2. **Grupo 2**= 2 ratas gestantes no diabéticas sacrificadas a los 21 días de gestación.
3. **Grupo 3**= 2 ratas no diabéticas cuyas crías fueron sacrificadas a los 20 días de nacidas
4. **Grupo 4**= 2 ratas no diabéticas cuyas crías fueron sacrificadas a los 28 días de nacidas.
5. **Grupo 5**= 2 ratas no diabéticas cuyas crías fueron sacrificadas a los 90 días de nacidas.

Y los grupos diabéticos que representaron el Lote Experimental (LE):

1. **Grupo 1DM**= 5 ratas gestantes diabéticas que se sacrificaron a los 17 días de gestación.
2. **Grupo 2DM**= 5 ratas gestantes diabéticas que se sacrificaron a los 21 días de gestación.
3. **Grupo 3DM**= 5 ratas diabéticas cuyas crías fueron sacrificadas a los 20 días de nacidas
4. **Grupo 4DM**= 5 ratas diabéticas cuyas crías fueron sacrificadas a los 28 días de nacidas.
5. **Grupo 5DM**= 5 ratas diabéticas cuyas crías fueron sacrificadas a los 90 días de nacidas.

5.2 Obtención de muestras (fetos y crías)

Durante la gestación a todas las ratas, se les determinó peso, glucosa sanguínea con un glucómetro Accu-Chek® Active de Roche. Para el día de sacrificio a las ratas gestantes de los grupos 1 y 2 de los dos lotes se les extrajo el útero para la determinación del número de fetos viables y el número de reabsorciones por camada.

Los fetos se pesaron y midieron y se registró la presencia de malformaciones macroscópicas. Se les extrajo el páncreas que se pesó y fijó en formol amortiguado al 10%.

De manera similar, a todas las crías de los grupos 3, 4 y 5 de los dos lotes al nacimiento, se registró la presencia de malformaciones macroscópicas y número de muertes postnatales.

A las crías que sobrevivieron se les determinó peso y longitud una vez por semana, así como niveles de glucosa sanguínea hasta el día de su sacrificio.

Al sacrificio se les determinó glucosa sanguínea y se obtuvo la sangre total, la cual, se separó el suero por centrifugación y se congeló a -70°C para la posterior determinación de glucosa, triglicéridos, colesterol e insulina. Se obtuvo el páncreas el cual se pesó y fijó en formol amortiguado al 10%.

Todos los páncreas fueron incluidos en Paraplast® (Sigma) para la obtención de cortes histológicos de $5\ \mu\text{m}$, para la realización de técnicas de histología Hematoxilina/Eosina (H/E) e inmunohistoquímicas. De cada páncreas se obtuvo un total de 30 cortes seriados que después fueron escogidos al azar para realizar las diferentes técnicas.

5.3 Química Sanguínea

La sangre obtenida fue centrifugada a 3500 r.p.m. por 10 minutos (en una centrífuga marca Beckman® GS-15R), se separó el suero y se congeló a -70°C para análisis posterior de glucosa sérica, triglicéridos, VLDL (Proteínas de muy baja densidad) y colesterol.

Las determinaciones de estos componentes bioquímicos séricos se realizaron por medio de un analizador Automático de Química Clínica marca Beckman Couter® (Synchron CX4 Pro).

Glucosa:

Reacción en la que la glucosa de la muestra reacciona con el oxígeno en presencia de glucosa oxidasa.

Triglicéridos:

Separación de los triglicéridos de los acarreadores lipo-proteicos, los triglicéridos son hidrolizados por una lipasa y se retiran los residuos de ácido ascórbico con ascorbato oxidasa.

Colesterol:

El colesterol se disocia de los acarreadores de lipoproteínas. Los ésteres de colesterol se hidrolizan a colesterol libre que se oxida con colesterol oxidasa. La reacción final produce color a través de la cual se calcula la cantidad de colesterol presente.

5.4 Cuantificación de insulina

La cuantificación de insulina se realizó por medio del Kit de Radioinmunoanálisis para la cuantificación multiespecie de insulina (desarrollado por el Dr. Eulises Díaz Díaz). Es un radioinmunoanálisis en fase líquida con precipitación por segundo anticuerpo en presencia de polientilenglicol y fue determinada por medio de un contador de rayos gamma.

5.5 Método Inmunohistoquímico

Se utilizaron cortes histológicos de $5\ \mu\text{m}$, se montaron en portaobjetos tratados con Poli-L-Lisina (Sigma®). Todos los cortes obtenidos fueron almacenados a temperatura ambiente en un lugar fresco, seco y sin exposición a luz.

Para todas las técnicas se realizó la inmunodetección por medio del Sistema Envision de Dako® (K1392) por la acción de un polímero multiespecie acoplado a peroxidasa HRP (Dako®) y se

reveló por el método de Diaminobenzidina (DAB⁺) Dako® y se contrastaron con Hematoxilina de Harris.

Para la localización de Pdx1 las laminillas se incubaron a temperatura ambiente 1 hora con anticuerpo Anti-Pdx1 de conejo (Abcam®) en una dilución 1:750.

Para la localización de insulina las laminillas se incubaron a temperatura ambiente 1 hora con el Anticuerpo Anti-insulina de ratón (NeoMarkers®) en una dilución 1:300.

Para la detección de GLUT2 las laminillas se incubaron a temperatura ambiente 1 hora con anticuerpo anti-GLUT2 de conejo (Millipore®) en una dilución 1:300.

En cada técnica se probó la especificidad del anticuerpo omitiendo en cada laminilla un corte y fue incubado únicamente con sol. de PBS (control negativo).

5.6 Análisis Morfométrico y de IOD (Integrated Optical Density).

Se utilizaron 16 cortes de páncreas teñidos con la técnica de H/E de fetos y crías. Se tomaron micrografías por medio de un microscopio de luz Nikon E400® con objetivos de 20 y 40x (adaptado a una cámara digital Olympus®). Posteriormente las micrografías fueron utilizadas para un análisis morfométrico donde se determinó el diámetro principal y el área de los islotes en crías de madres sanas y diabéticas mediante el software Image Proplus® ver. 6.15 para Windows®.

Asumiendo que los islotes tiene una forma elíptica., se determinó el diámetro principal por medio de la siguiente fórmula:

$$D = 2\sqrt{A*B}$$

Donde *A*, representa el radio ecuatorial y *B* el radio polar de cada islote, Figura 12 A. De manera similar, se determinó el área total del islote por medio de la selección del tamaño total de la estructura endocrina de la imagen, Figura 12 B.

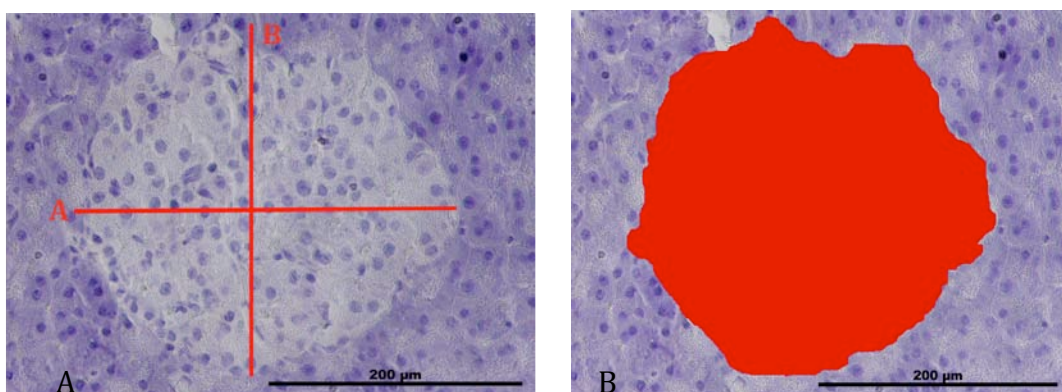


Figura 12. A) Método de obtención del tamaño del islote. B) Método de obtención del área del islote.

Para el análisis de densidad óptica se utilizaron 10 cortes de cada páncreas que fueron procesados con las técnicas de inmunohistoquímica para cada proteína (Pdx-1, insulina, Glut2).

El análisis de Densidad óptica determina la cantidad de materia en una superficie por medio de la cantidad de luz que se trasmite (la que pasa a través de éste). Para el análisis de densidad en las muestras se utilizó el comando de medición Integrated Optical Density (IOD) el cual reporta el promedio de intensidad/densidad de cada objeto por el área de éste, proporcionando una estimación semicuantitativa de la expresión molecular. Figura 13 A y B.

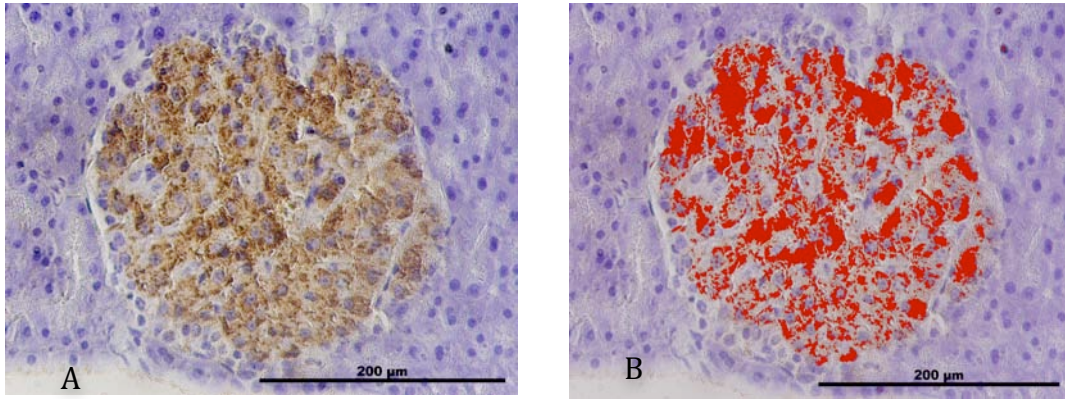


Figura 13. A y B) Método de selección de Densidad óptica e IOD de las técnicas inmunohistoquímicas para Pdx.1, insulina y GLUT2.

El porcentaje del área pancreática ocupado por las células β (inmunohistoquímicas para insulina) fue calculada y la masa celular se obtuvo multiplicando el área porcentual de las células β por el peso del páncreas correspondiente.

5.7 Análisis Estadístico.

Los valores de todos los parámetros estudiados se expresaron como la media \pm error estándar (E.E). Se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía utilizando el programa de estadística Minitab® ver. 15 para Windows® así como una post-prueba de Tukey para la comparación específica de los grupos. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de $p \leq 0.05$.

Sobre los datos obtenidos para IOD se utilizó la prueba no paramétrica Matt-Whitney para la comparación entre grupos y se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de $p \leq 0.05$.

VI. RESULTADOS

6.1 Gestación

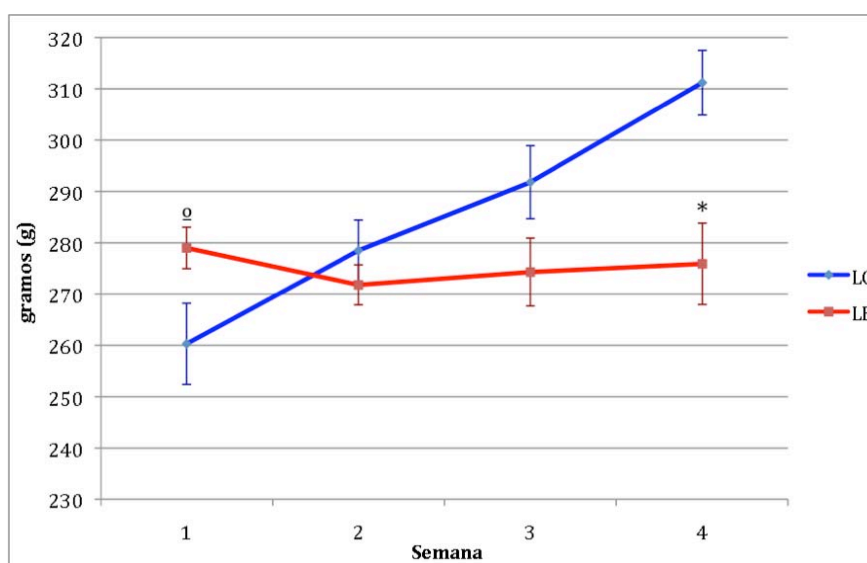
Una característica importante fue la duración de la gestación, en ratas diabéticas (LE), el periodo de gestación osciló entre los 23-24 días postcoito en comparación con el periodo de tiempo que presentaron las ratas sanas (LC) de 22 días postcoito.

Peso.

Al inicio de la gestación el peso promedio de las ratas del Lote Control (LC) fue de 260.3 ± 7.91 g y del Lote Experimental (LE) fue de 279.0 ± 4.04 g siendo mayor el de las ratas del Lote Experimental (LE). Después de la administración de STZ, las ratas del LE perdieron peso, pero a partir de la tercera semana las ratas mantuvieron su peso corporal hasta la cuarta semana Tabla 1. Las ratas del LC durante toda la gestación tuvieron una ganancia progresiva de peso hasta la cuarta semana, siendo estadísticamente significativa con respecto a la que presentaron las ratas del LE para este tiempo Gráfica 1.

Tabla 1. Peso materno durante la gestación.
Datos = media \pm E. E. LC vs LE $^{\circ}$ p=0.55, * p<0.05, ANOVA.

Semana	Peso (g)	
	LC n= 10	LE n= 35
1	260.3 ± 7.91	$279.0 \pm 4.04^{\circ}$
2	278.5 ± 5.94	271.8 ± 3.90
3	291.8 ± 7.11	274.3 ± 6.62
4	311.2 ± 6.29	$275.9 \pm 7.93^*$



Gráfica 1. Peso materno durante la gestación. Datos = media \pm E.E.
LC vs LE $^{\circ}$ p= 0.055, *p<0.05, ANOVA.

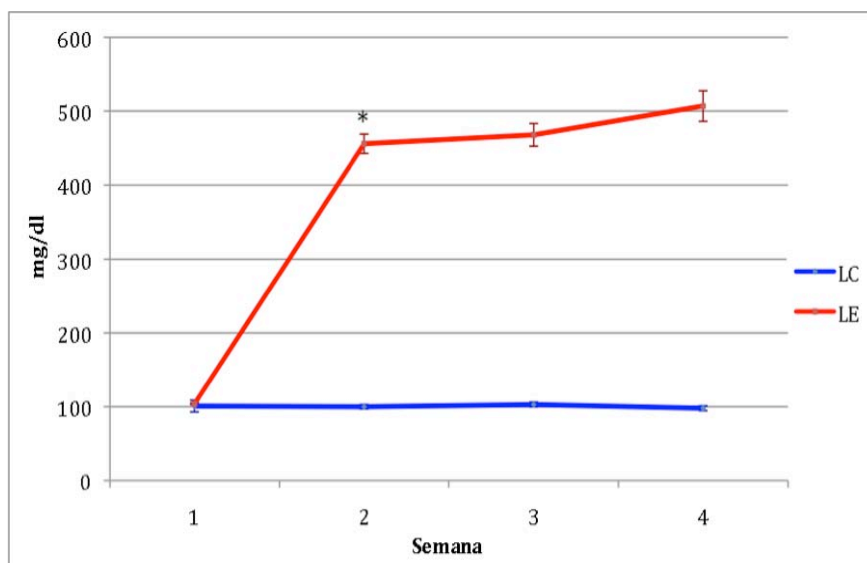
Glucosa sanguínea

Los niveles de glucosa sanguínea al inicio la gestación fueron de 105 ± 2.9 mg/dl en el LC y de 104 ± 1.26 mg/dl en ratas del LE, después de la administración de STZ, en la segunda semana, los niveles de glucosa en las ratas del LE aumentaron hasta 456 ± 13 mg/dl alcanzando niveles de 507 ± 20.8 mg/dl hacia el final de la gestación, Tabla 2.

A diferencia de las ratas del LE, las ratas del LC presentaron niveles de glucosa sanguínea menores a 108 mg/dl durante toda la gestación. Gráfica 2.

Tabla 2. Niveles de glucosa durante la gestación.
Datos = media \pm E. E. LC vs LE * $p < 0.0001$, ANOVA.

Semana	Niveles de glucosa (mg/dl)	
	LC n=10	LE n=35
1	105 ± 2.90	104 ± 1.26
2	100 ± 2.95	$456 \pm 13.0^*$
3	103 ± 3.21	$468 \pm 15.3^*$
4	98 ± 3.21	$507 \pm 20.8^*$



Gráfica 2. Niveles de glucosa sanguínea durante la gestación.
Datos = media \pm E.E. LC vs LE *A partir de esta semana $p < 0.0001$, ANOVA.

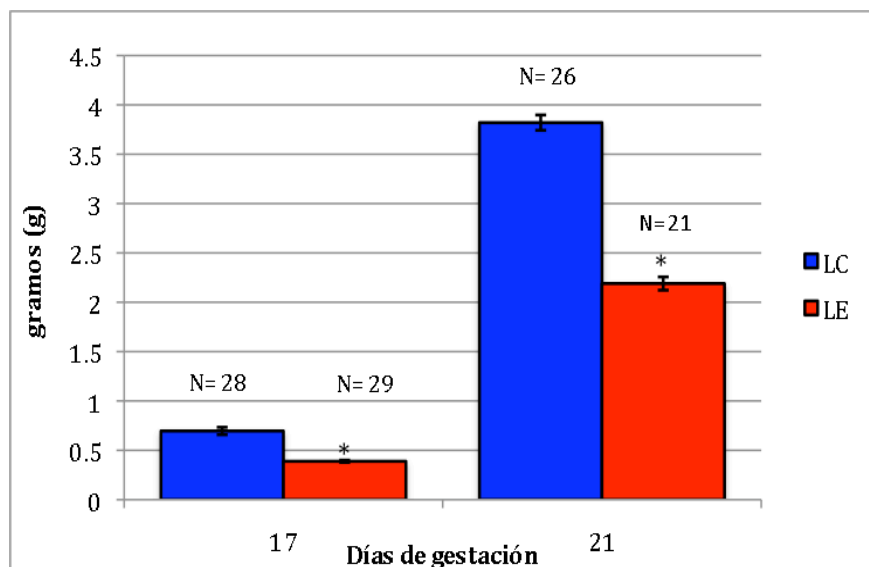
Al día del sacrificio se observó en ratas diabéticas gestantes (LE), presencia de reabsorciones en los dos cuernos uterinos, la mayoría de estas ratas presentaron menor número de fetos (media= 7) por la presencia de estas reabsorciones y durante el periodo de gestación, 18 ratas diabéticas reabsorbieron por completo todos sus fetos.

A diferencia de las ratas sanas gestantes (LC) que no presentaron ninguna reabsorción durante el periodo de gestación hasta el día de su sacrificio.

6.2 Periodo fetal.

Peso

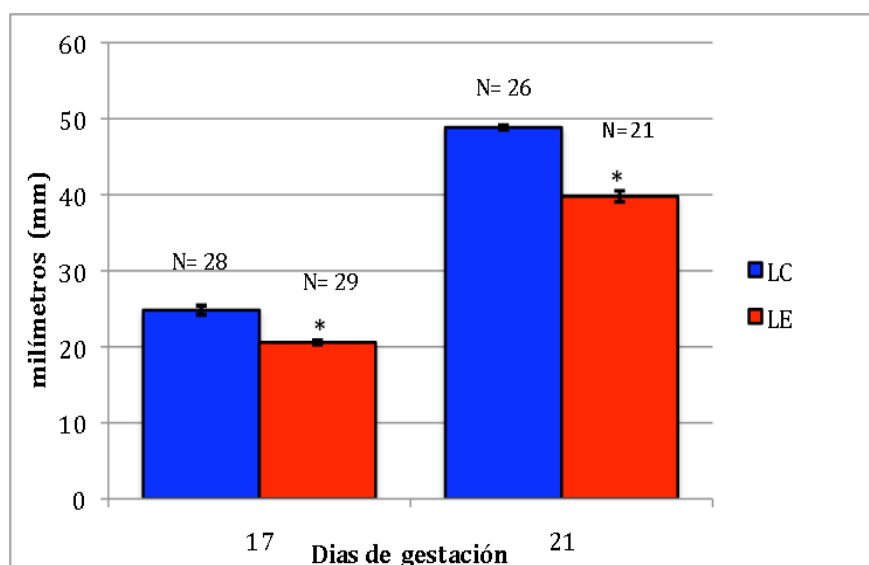
Los fetos de 17 y 21 días de gestación del LC pesaron $0.6958 \pm .0375$ g y 3.82 ± 0.0776 g respectivamente, teniendo mayor peso que los fetos de madres diabéticas que pesaron $0.3890 \pm .0110$ g y 2.19 ± 0.0670 g respectivamente. Con diferencia estadísticamente significativa para los dos tiempos estudiados. Gráfica 3.



Gráfica 3. Peso fetal de 17 y 21 días de gestación. Datos = Media ± E.E. LC vs LE * $p < 0.0001$, ANOVA.

Talla

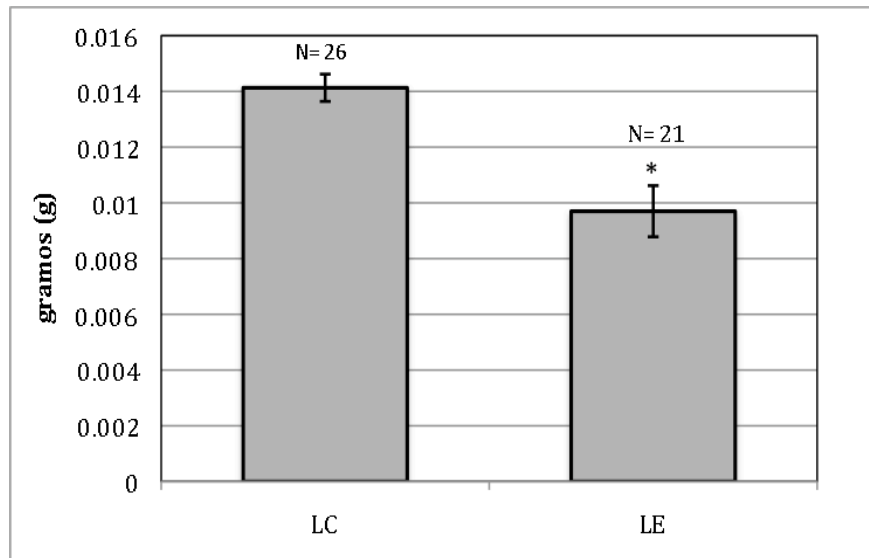
De manera similar, el tamaño de los fetos de 17 y 21 días de gestación fue mayor en ratas sanas siendo de 24.82 ± 0.602 mm y de 48.85 ± 0.264 mm respectivamente a comparación de fetos de ratas diabéticas que fue de 20.57 ± 0.300 mm y de 39.79 ± 0.731 , diferencia estadísticamente significativa para los dos tiempos, Gráfica 4.



Gráfica 4. Talla fetal de 17 y 21 días de gestación. Datos = Media ± E.E. LC vs LE * $p < 0.0001$, ANOVA.

Peso páncreas 21 días

El peso del páncreas de fetos de 21 días de gestación fue de 0.01413 ± 0.0049 g en fetos de crías de madres sanas (LC), mientras que los fetos de madres diabéticas (LE) el peso del páncreas fue menor y estadísticamente significativo en comparación con el LC, siendo de $0.0097 \pm .00091$ g. Gráfica 5.

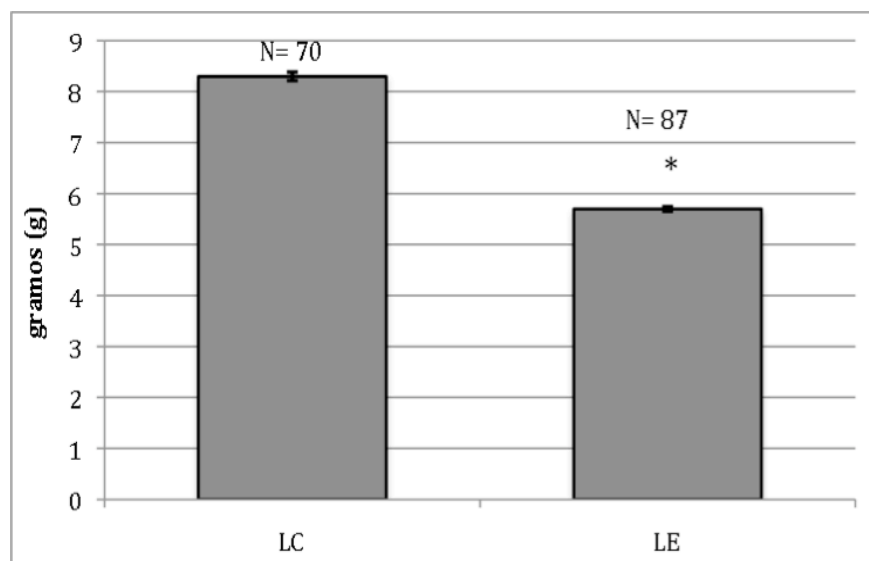


Gráfica 5. Peso del páncreas de fetos de 21 días de gestación. Datos = Media \pm E.E. LC vs LE * $p < 0.0001$, ANOVA.

6.3 Nacimiento de las crías.

Peso

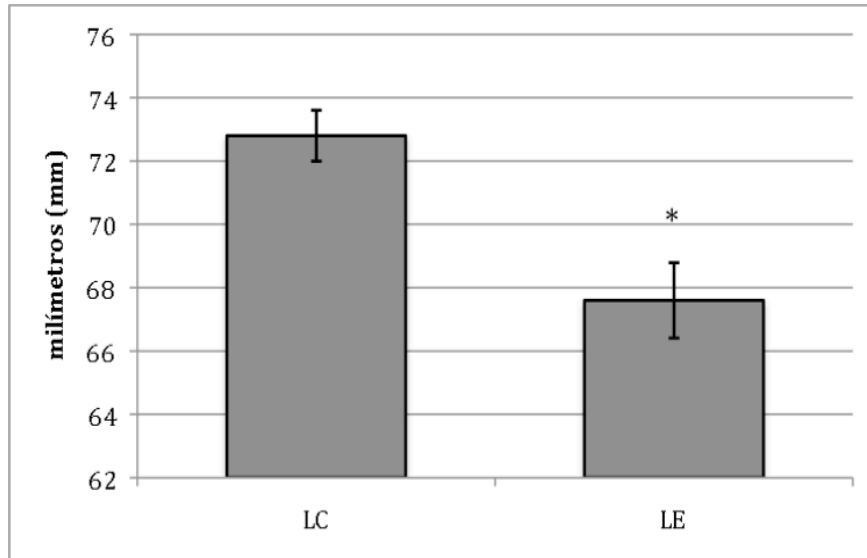
El peso de las crías al nacer de ratas del LC fue de 8.3 ± 0.086 g mientras que las crías del LE el peso fue menor comparado con las del LC, siendo de 5.7 ± 0.044 g y estadísticamente significativo. Gráfica 6.



Gráfica 6. Peso de crías en el nacimiento. Datos = Media \pm E.E. LC vs LE * $p < 0.0001$, ANOVA.

Talla

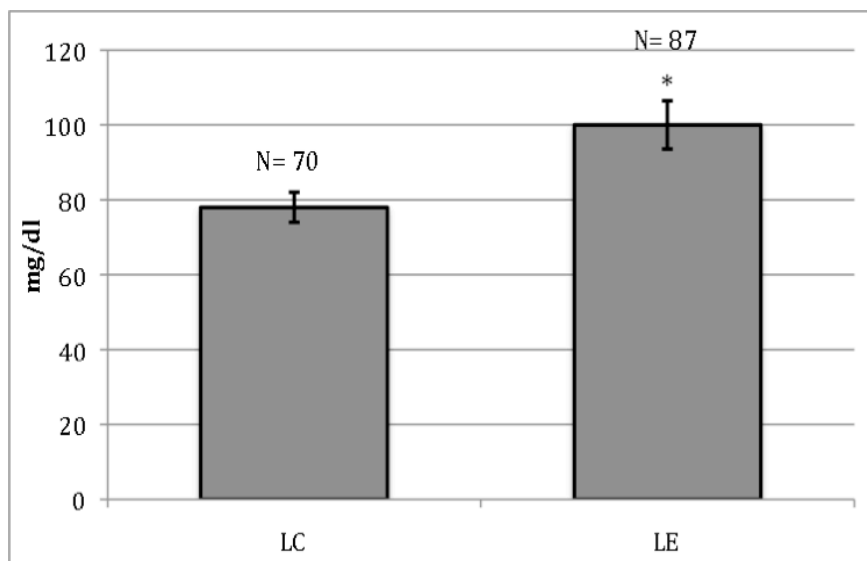
La talla de crías de ratas del LC fue de 72.8 ± 0.803 mm siendo más grandes que las crías del LE que midieron 67.6 ± 1.19 mm, siendo estadísticamente significativa la comparación entre los grupos. Gráfica 7.



Gráfica 7. Talla de crías en el nacimiento. Datos = Media \pm E.E.
LC vs LE * $p < 0.0001$, ANOVA.

Glucosa sanguínea

Los niveles de glucosa sanguínea el día del nacimiento fue de 78 ± 4.04 mg/dl en crías del LC, mientras que las crías del LE presentaron niveles mayores que fueron de 100 ± 6.43 mg/dl. Gráfica 8, siendo estadísticamente significativa entre los dos lotes.



Gráfica 8. Niveles de glucosa sanguínea en recién nacidos. Datos = Media \pm E.E.
LC vs LE * $p < 0.05$, ANOVA.

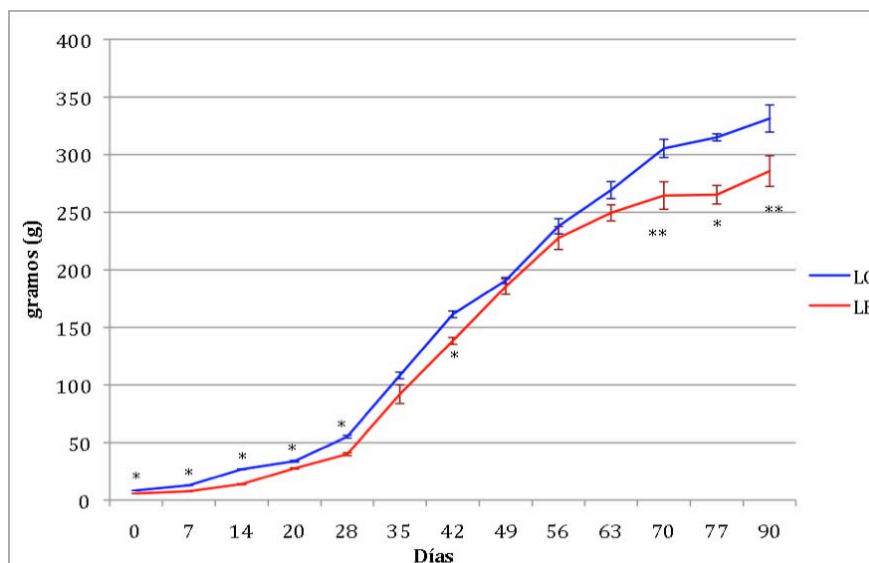
6.4 Periodo postnatal.

Peso.

El peso de las crías durante el experimento presentó una ganancia progresiva. Las crías de ratas del LC presentaron un peso inicial de 8.25 ± 0.085 g y a los 90 días de edad alcanzaron un peso de 331.20 ± 11.7 g. A diferencia de estas, las crías de ratas del LE presentaron un peso inicial de 5.65 ± 0.044 g alcanzando un peso de 285.7 ± 13.3 g a los 90 días de edad, siendo menos pesadas al final del experimento, Tabla 3. Aunque en el inicio y final del experimento los resultados fueron estadísticamente significativos días 0, 7, 2, 14, 28, 70, 77 y 90; entre los días 35 y 63 la ganancia de peso fue similar aunque sin mucha diferencia siendo éste periodo donde ocurre rápidamente un aumento de peso. Gráfica 9.

Tabla 3. Peso corporal de la descendencia de ratas del LC y LE desde el día de nacimiento hasta el día 90. **<math>p < 0.05</math>, * <math>p < 0.0001</math>, ^{NS} = No significativo. Análisis ANOVA.

Días	N (LC)	LC media \pm E.E. (g)	N (LE)	LE media \pm E.E. (g)
0	72	8.25 ± 0.085	105	$5.65 \pm 0.044^*$
7	72	12.70 ± 0.146	61	$7.62 \pm 0.182^*$
14	72	26.76 ± 0.268	61	$13.79 \pm 0.471^*$
20	50	33.79 ± 0.719	42	$27.56 \pm 0.544^*$
28	24	55.18 ± 1.22	20	$39.94 \pm 1.23^*$
35	24	108.33 ± 2.86	20	92.00 ± 8.08^{NS}
42	24	161.42 ± 2.88	20	$138.43 \pm 2.96^*$
49	24	190.78 ± 2.68	20	185.50 ± 6.69^{NS}
56	24	237.97 ± 6.55	20	227.67 ± 9.92^{NS}
63	24	269.18 ± 7.38	20	249.45 ± 6.98^{NS}
70	24	305.33 ± 7.91	20	$264.48 \pm 11.9^{**}$
77	24	314.86 ± 3.07	20	$265.21 \pm 8.02^*$
90	24	331.20 ± 11.7	20	$285.7 \pm 13.3^{**}$



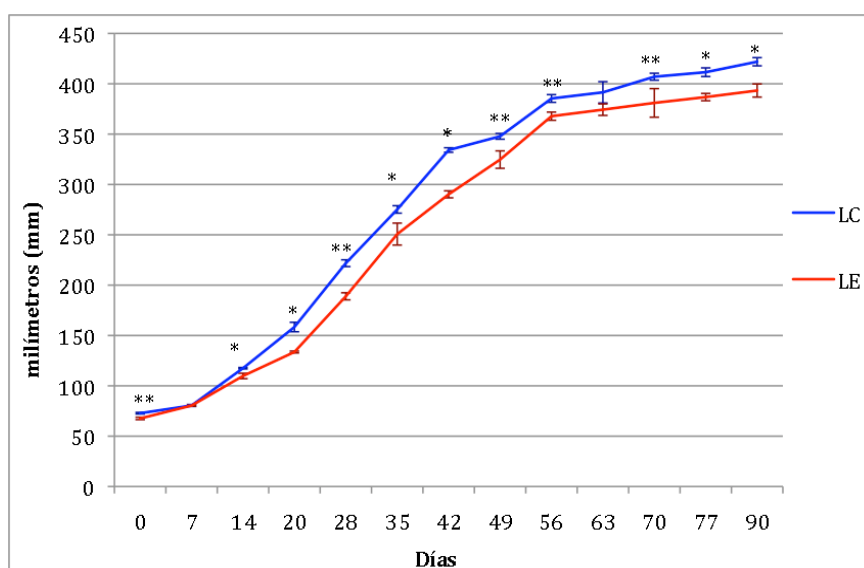
Gráfica 9. Peso corporal de la descendencia desde la semana del nacimiento hasta la 12. Datos = Media \pm E.E. LC vs LE. **<math>p < 0.05</math>, * <math>p < 0.0001</math>, ANOVA.

Talla

De manera similar el tamaño de las crías durante todo el periodo del experimento aumentó progresivamente, las crías de ratas del LC presentaron una talla inicial (día 0) de 72.8 ± 0.803 mm y a los 90 días de edad alcanzaron una talla de 421.90 ± 4.07 mm. A diferencia de éstas, la talla de las crías de ratas del LE fue de 67.6 ± 1.19 mm en el día 0 alcanzando un tamaño de 393.3 ± 6.5 mm a los 90 días de edad, siendo pequeñas al final del experimento, Tabla 4. A diferencia del peso el tamaño de las crías fue estadísticamente significativo en casi todo el periodo experimental a excepción de los días 7 y 63; siendo más pequeñas que las crías de madres del LC. Gráfica 10.

Tabla 4. Talla de la descendencia de ratas del LC y LE desde su nacimiento hasta el día 90. ** $p < 0.05$, * $p < 0.0001$, Análisis ANOVA.

Días	N (LC)	LC media \pm E.E. (mm)	N (LE)	LE media \pm E.E. (mm)
0	72	72.8 ± 0.803	105	$67.6 \pm 1.19^{**}$
7	72	80.5 ± 0.97	61	80.4 ± 0.62^{NS}
14	72	117.5 ± 0.710	61	$109.8 \pm 2.67^*$
20	50	158.4 ± 4.70	42	$133.6 \pm 0.95^*$
28	24	221.8 ± 3.36	20	$188.9 \pm 3.51^{**}$
35	24	275.2 ± 3.7	20	$250.7 \pm 10.9^*$
42	24	334.15 ± 2.24	20	$290.2 \pm 3.48^*$
49	24	347.8 ± 2.84	20	$324.7 \pm 8.65^{**}$
56	24	385.4 ± 3.84	20	$367.8 \pm 4.05^{**}$
63	24	391.5 ± 10.6	20	374.3 ± 5.7^{NS}
70	24	407.0 ± 3.47	20	$381.0 \pm 14.2^{**}$
77	24	411.5 ± 4.29	20	$386.8 \pm 3.63^*$
90	24	421.9 ± 4.07	20	$393.3 \pm 6.52^*$



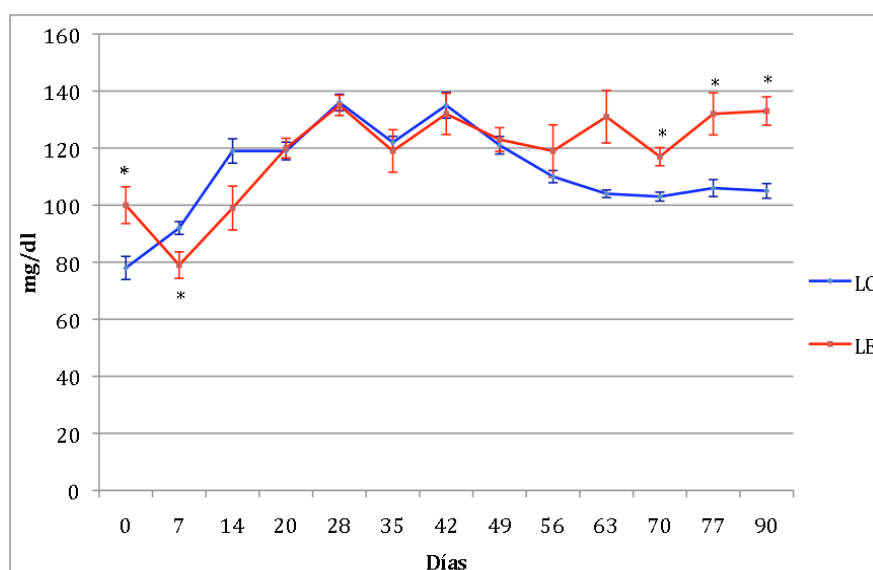
Gráfica 10. Talla de la descendencia desde el día del nacimiento hasta el día 90. Datos = Media \pm E.E. LC vs LE ** $p < 0.05$ * $p < 0.0001$, ANOVA.

Niveles de glucosa sanguínea

Las crías de ratas del LC presentaron niveles de glucosa sanguínea de 78 ± 4.04 mg/dl al nacer (día 0) y a los 90 días de edad presentaron niveles de 105 ± 2.58 mg/dl; en cambio, las crías de ratas del LE presentaron niveles significativos de glucosa sanguínea de 100 ± 6.43 mg/dl al nacer (día 0) y de 133 ± 4.98 mg/dl a los 90 días de edad. A partir de los 20 días las crías de los 2 lotes elevaron sus niveles de glucosa hasta llegar a los 140 mg/dl en el día 42 de edad Tabla 5. En el día 56 los niveles de glucosa descendieron a menos de 110 mg/dl en crías de ratas del LC mientras que las crías del LE presentaron niveles mayores a 110 mg/dl durante el mismo tiempo, siendo estadísticamente significativa a los días 70, 77 y 90. Gráfica 11.

Tabla 5. Niveles de glucosa sanguínea de la descendencia de ratas del LC y LE Desde su nacimiento hasta 90 días. **<p 0.05, * p<0.0001, Análisis ANOVA.

Días	N (LC)	LC media \pm E.E. (mg/dl)	N (LE)	LE media \pm E.E. (mg/dl)
0	72	78 ± 4.04	105	$100 \pm 6.43^*$
7	72	92 ± 2.24	61	$79 \pm 4.64^*$
14	72	119 ± 4.26	61	99 ± 7.69
20	50	119 ± 3.09	42	120 ± 3.45
28	24	136 ± 2.91	20	135 ± 3.56
35	24	122 ± 2.14	20	119 ± 7.46
42	24	135 ± 4.50	20	132 ± 7.22
49	24	121 ± 3.09	20	123 ± 4.16
56	24	110 ± 2.13	20	119 ± 9.18
63	24	104 ± 1.32	20	131 ± 9.19
70	24	103 ± 1.56	20	$117 \pm 3.18^*$
77	24	106 ± 2.98	20	$132 \pm 7.37^*$
90	24	105 ± 2.58	20	$133 \pm 4.98^*$

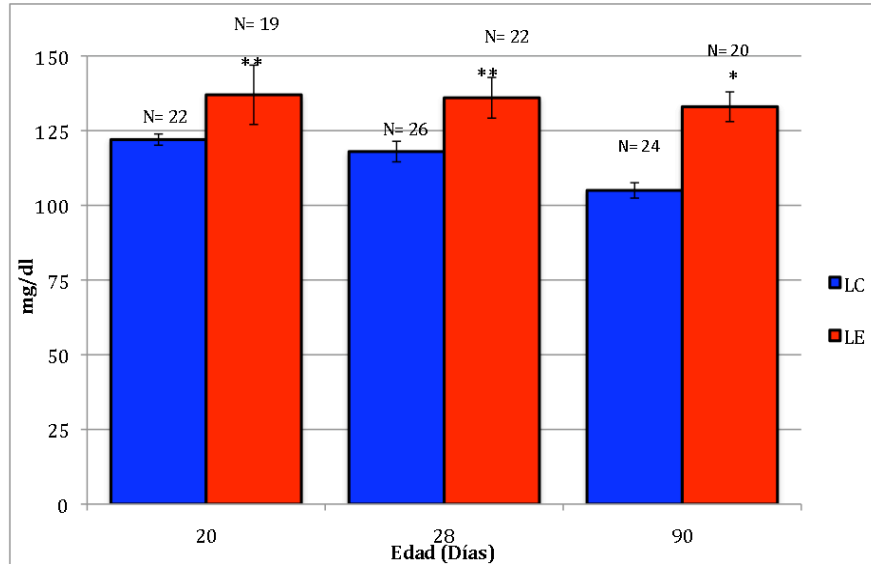


Gráfica 11. Niveles de glucosa sanguínea en la descendencia, desde día 0 hasta el día 90. Datos = Media \pm E.E. LC vs LE *p<0.0001, ANOVA.

6.5 Parámetros postnatales.

Glucosa Sanguínea

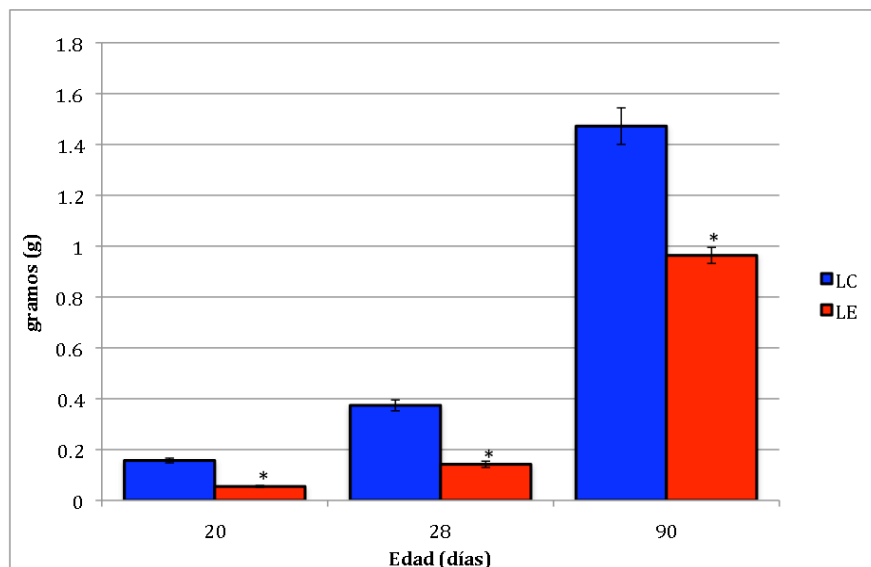
Los niveles de glucosa sanguínea en crías de madres del LC fueron de 122 ± 1.87 mg/dl a los 20 días, de 118 ± 3.45 mg/dl a los 28 días y de 105 ± 2.58 mg/dl a los 90 días. Los niveles de glucosa sanguínea en crías de madres del LE fueron mayores a los de crías del LC, siendo de 137 ± 9.93 mg/dl a los 20 días, 137 ± 6.80 mg/dl a los 28 días y 133 ± 4.98 mg/dl a los 90 días de nacidas, presentando una diferencia significativa entre los grupos. Gráfica 12.



Gráfica 12. Niveles de glucosa sanguínea en crías de 20, 28 y 90 días de edad.
Datos = Media \pm E.E. LC vs LE ** $p < 0.05$, * $p < 0.0001$, ANOVA.

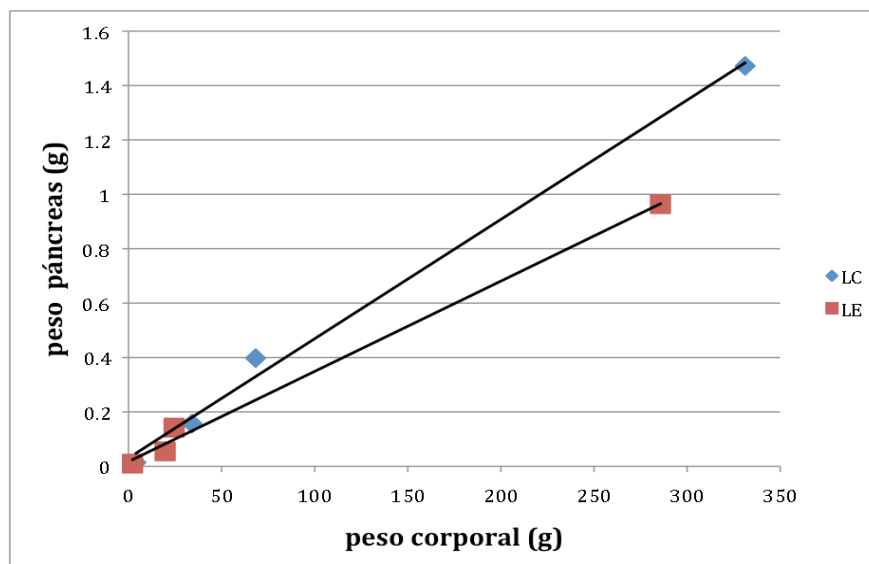
Peso páncreas

El peso de páncreas en crías de ratas del LC fue de 0.1571 ± 0.009 g a los 20 días, de 0.3739 ± 0.022 g a los 28 días y de 1.472 ± 0.0718 g a los 90 días de nacidas, a diferencia de las crías del LE que su peso fue menor y estadísticamente significativo en los tres tiempos siendo de $0.0548 \pm .0037$ g a los 20 días, 0.1421 ± 0.0124 g a los 28 días y 0.9637 ± 0.0317 . Gráfica 13.



Gráfica 13. Peso del páncreas en crías de 20, 28 y 90 días de edad.
Datos = Media \pm E.E. LC vs LE * $p < 0.0001$, ANOVA.

El peso del páncreas y el peso total de los animales presentaron una correlación significativamente fuerte entre los dos lotes (R= 0.998 p<0.002), demostrando que el peso total de los animales y el peso del páncreas en los tiempos estudiados fue menor en ratas de madres diabéticas en el tiempo fetal de 21 días de gestación hasta la vida postnatal (20, 28 y 90 días). Gráfica 14.



Gráfica 14. Correlación entre el peso del páncreas y el peso total de los animales del LC y LE. (LC, Coeficiente de correlación de Pearson, R= 0.998 p<0.002 vs LE, R= 0.998 p<0.002)

6.5.1 Parámetros Bioquímicos

Glucosa Sérica, Colesterol, Triglicéridos y VLDL (Very low density lipoprotein)

El análisis sérico demostró que los niveles de glucosa sérica aumentaron el día 20 siendo de 226 ± 10.9 mg/dl, que después disminuyeron a 160 ± 5.88 mg/dl a los 28 días después del destete y disminuyendo aún más a los 90 días siendo de 105 ± 4.35 mg/dl en crías del LC; mientras que las crías de madres diabéticas (LE) fueron de 238 ± 18.5 mg/dl a los 20 días, disminuyendo a los 28 días por 160 ± 5.88 mg/dl y disminuyeron a los 90 días siendo de 146 ± 6.14 mg/dl.

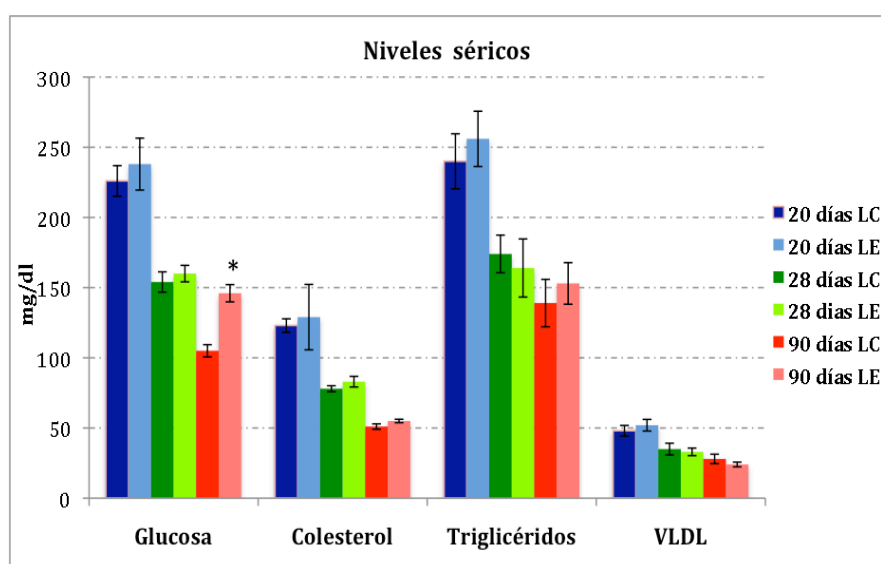
Los niveles de colesterol fueron mayores en crías de 20 días de nacidas siendo de 123 ± 4.81 mg/dl, disminuyendo a los 28 días a 78 ± 2.10 mg/dl y a 51 ± 1.91 mg/dl a los 90 días, en crías de madres del LC. Los niveles de colesterol en crías del LE también fueron altos en crías de 20 días siendo de 129 ± 23.3 mg/dl, disminuyendo a 83 ± 3.81 mg/dl a los 28 días y a 55 ± 1.26 mg/dl a los 90 días de nacidas.

De manera similar, los niveles de triglicéridos fueron altos en crías de 20 días de edad siendo de 240 ± 19.6 mg/dl, disminuyendo a 174 ± 13.4 mg/dl a 28 días y a 139 ± 16.9 mg/dl a los 90 días en crías del LC, y los niveles en crías del LE fueron mayores a los 20 días siendo de 256 ± 19.7 mg/dl, que disminuyeron a 164 ± 20.7 mg/dl a 28 días y a 153 ± 14.8 mg/dl a los 90 días, siendo mayores a los que presentaron las crías de madres sanas.

Los niveles de proteínas de muy baja densidad (VLDL) en crías del LC fueron de 48 ± 3.83 mg/dl en crías de 20 días, de 35 ± 4.15 mg/dl a los 28 días y de 28 ± 3.37 mg/dl para 90 días niveles menores de los que presentaron las crías de madres diabéticas que fueron de 52 ± 4.15 mg/dl en 20 días, 33 ± 2.69 mg/dl para 28 días y de 24 ± 1.67 mg/dl para 90 días. Tabla 6, Gráfica 15.

Tabla 6. Niveles séricos de Glucosa, colesterol, triglicéridos y VLDL.

Tiempo/ Lotes	Glucosa mg/dl	Colesterol mg/dl	Triglicéridos mg/dl	VLDL mg/dl
20 días LC (N=22)	226 ± 10.9	123 ± 4.81	240 ± 19.6	48 ± 3.83
LE (N=19)	238 ± 18.5	129 ± 23.3	256 ± 19.7	52 ± 4.15
28 días LC (N=26)	154 ± 7.24	78 ± 2.10	174 ± 13.4	35 ± 4.15
LE (N=22)	160 ± 5.88	83 ± 3.81	164 ± 20.7	33 ± 2.69
90 días LC (N=24)	105 ± 4.35	51 ± 1.91	139 ± 16.9	28 ± 3.37
LE (N=20)	146 ± 6.14*	55 ± 1.26	153 ± 14.8	24 ± 1.67



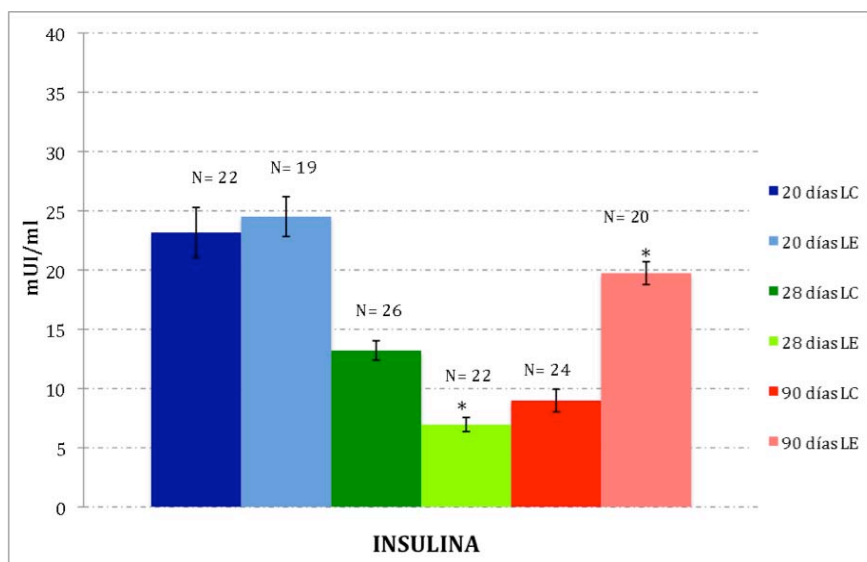
Gráfica 15. Análisis sérico de crías de ratas sanas y diabéticas.

Datos = Media ± E.E. LC vs LE * $p < 0.0001$, ANOVA.

6.5.2 Insulina

Los niveles de insulina que presentaron las crías del LC a los 20 días fueron de 23.17 ± 2.11 μ UI/ml, las de 28 días fueron de 13.21 ± 0.815 μ UI/ml y las de 90 días presentaron niveles de 8.99 ± 0.949 μ UI/ml, mientras que las crías de madres diabéticas presentaron mayores niveles que el LC a los 20 y 90 días siendo de 24.51 ± 1.68 y 19.74 ± 2.97 μ UI/ml, respectivamente.

Los niveles de insulina a 28 días fueron menores en crías de ratas diabéticas, presentando niveles de 6.96 ± 0.585 μ UI/ml en comparación con los que presentaron las crías de madres sanas. Gráfica 16.



Gráfica 16. Niveles de insulina sérica en crías de ratas sanas y diabéticas.
 Datos = Media ± E.E. LC vs LE * $p < 0.0001$, ANOVA.

6.6 Malformaciones congénitas

Sobre la presencia de malformaciones congénitas en este trabajo, obtuvimos una cría de madre diabética del LE con microftalmia (presentando ojos y parpados pequeños) que en animales de crías de ratas sanas. Figura 14.



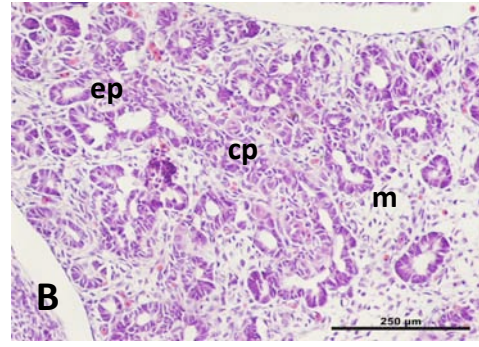
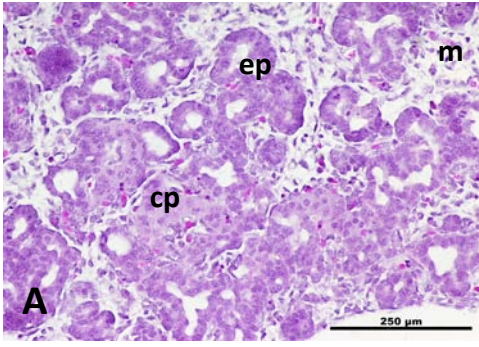
Figura 14. Crías de rata de madre diabética, la imagen de arriba muestra una cría con microftalmia (izquierda) que el resto de las ratas de la misma camada(derecha).

6.7 Histología del páncreas

Cuadro 4: Comparación Histológica entre los grupos LC y LE del desarrollo del páncreas de rata.

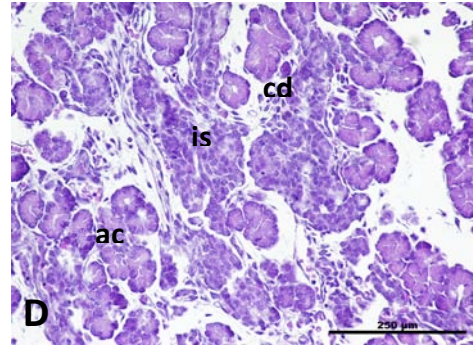
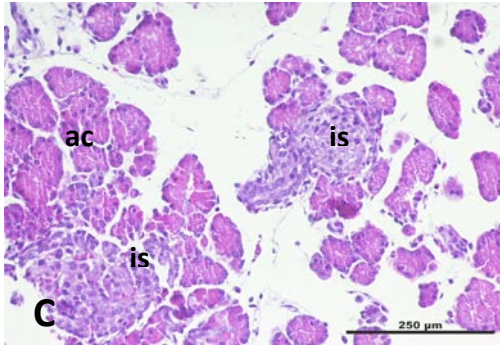
Día de estudio	LOTE CONTROL	LOTE EXPERIMENTAL
17 días p.c.	Páncreas fetal completamente fusionado presentando diferenciación celular a partir de células pre-ductales. En este tiempo se observan células epiteliales ductales y mesénquima, varios vasos sanguíneos esparcidos entre la gran masa de células mesenquimatosas y en algunas áreas, agrupaciones de células pro endocrinas, inicio formación de ductos.	Páncreas fetal completamente fusionado, diferenciación celular a partir de células pre-ductales. Células epiteliales entre la gran masa de mesénquima, con varios vasos sanguíneos; asociaciones y cordones de células pre-ductales pequeñas en comparación con los de LC, al igual que pequeñas agrupaciones de células pro-endocrinas estrechamente asociadas a puntas del epitelio ductal.
21 días p.c.	Diferenciación celular y tisular evidente presencia de los principales tejidos: células ductales, células acinares y células endocrinas. Células acinares con gránulos de zimógenos, entre estas, se aprecian líneas de células ductales y a poca distancia varias agrupaciones tipo islotes de diversos tamaños. Las agrupaciones tipo islote, están en estrecha relación con vasos sanguíneos y capilares, dependiendo del tamaño de la agrupación, comúnmente de formas variadas principalmente alargadas.	Diferenciación celular y tisular evidente presencia de los principales tejidos: células ductales, células acinares y células endocrinas. Células acinares con presencia de gránulos de zimógenos, líneas celulares ductales entre la gran masa acinar, en las células ductales se aprecian diversas células endocrinas asociadas y se observaron pocas agrupaciones tipo islote a diferencia de los páncreas de crías de madres sanas (LC). Posible evidencia de atraso en el mecanismo de isloteogénesis.
20 días p.n.	Tejidos pancreáticos bien diferenciado, los islotes presentan una gran diversidad de tamaños y arreglos. Se observó en particular, una gran actividad proliferativa en tejido endocrino. Entre le tejido exócrino se observó su estructura típica lóbulo-acinar.	Tejido pancreáticos bien diferenciados. Los islotes presentaron su estructura típica y están en estrecha relación uno con otro y comúnmente a una distancia estrecha al epitelio ductal como en el día 21 de gestación aunque la maduración tisular es evidente entre los tres tejidos. Tejido exócrino de forma lóbulo-acinar.
28 días p.n.	Morfología normal observandose un arreglo mas discreto de los islotes y los ductos. La relación de endotelio entre los islotes es mas discreto, pocos capilares se ven compactados entre la gran masa endocrina circular. Los ductos son de epitelio uniforme esparcidos entre el tejido acinar.	Morfología del páncreas normal presentando sus tres tipos de tejidos característicos al igual que en crías del LC , pocos capilares se ven compactados entre la gran masa endocrina circular. Los ductos son de epitelio uniforme esparcidos entre el tejido acinar. Se observaron islotes de menor tamaño en comparación el LC.
90 días p.n.	Morfología del páncreas normal presentando sus tres tipos de tejidos característicos aunque se observó un arreglo mas discreto de los islotes y los ductos, pocos capilares se ven compactados entre la gran masa endocrina circular. Los ductos son de epitelio uniforme esparcidos entre el tejido lóbulo-acinar.	Morfología del páncreas normal presentando sus tres tipos de tejidos característicos al igual que en crías del LC , pocos capilares se ven compactados entre la gran masa endocrina circular. Los ductos son de epitelio uniforme esparcidos entre el tejido lóbulo-acinar. Islotes frecuentemente de menor tamaño en comparación con el LC.

LC

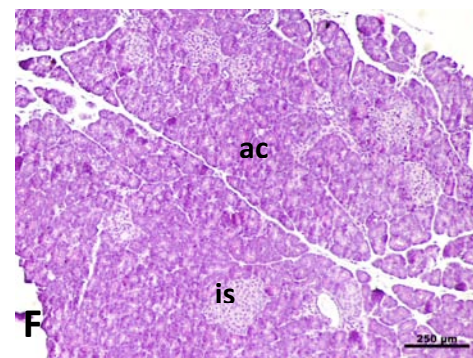
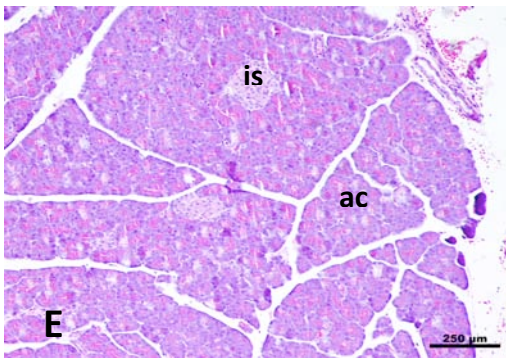


LE

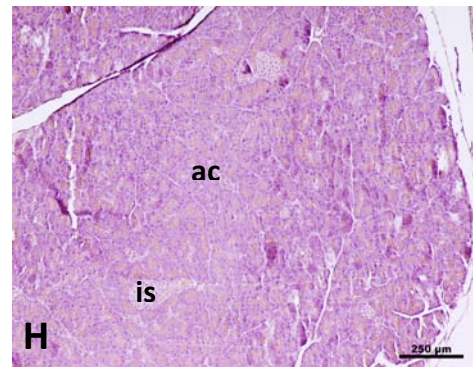
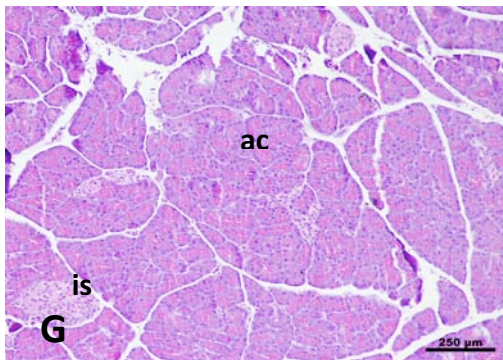
17dpc



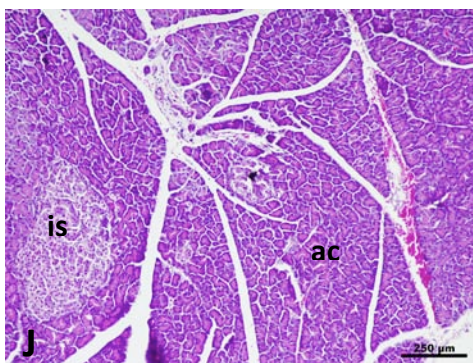
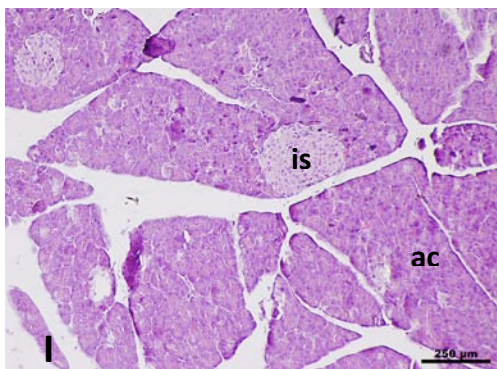
21dpc



20dpn



28dpn



90dpn

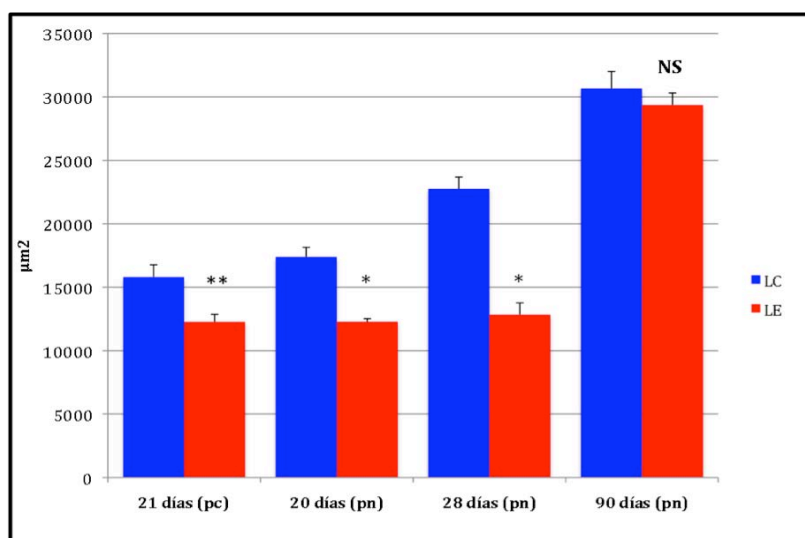
6.7.1 Morfometría

De los resultados obtenidos del análisis de morfometría de páncreas de fetos y crías de rata se obtuvo que el tamaño de los islotes de páncreas de fetos de 21 días de gestación del LC fueron de $154.63 \pm 4.01 \mu\text{m}$ mientras que el de los fetos de ratas diabéticas fue de $125.46 \pm 3.17 \mu\text{m}$, el tamaño reducido de los islotes en las crías del LE se mantuvo después del nacimiento como pudimos observar en el análisis de los islotes de 20 días de nacidas. Las crías del LC presentaron un tamaño promedio de $179.31 \pm 5.25 \mu\text{m}$ mientras que las crías de ratas diabéticas fue de $120.85 \pm 1.3 \mu\text{m}$, al igual que a los 28 días donde las ratas sanas tuvieron en promedio un tamaño de islote de $183.25 \pm 4.27 \mu\text{m}$, y la descendencia de madres diabéticas un promedio de $125.15 \pm 2.16 \mu\text{m}$. Para el último día de estudio el de 90 días las crías de madres sanas presentaron en promedio un tamaño de $223.77 \pm 6.73 \mu\text{m}$ y las de madres diabéticas un tamaño promedio de $186.9 \pm 4.73 \mu\text{m}$. Estos resultados también se correlacionan con el área total promedio de los islotes analizados. Tabla 7.

Tabla 7. Tamaños y áreas del páncreas endocrino en los tiempos analizados.
Datos expresados como la media \pm E. Estd. Análisis ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$

Día estudio	Diámetros (μm)		Áreas (μm^2)	
	LC	LE	LC	LE
21 días (postcoito)	154.63 ± 4.01	$125.54 \pm 3.32^{**}$	15798 ± 977	$12264 \pm 596^{**}$
20 días (postnatal)	179.31 ± 5.25	$120.85 \pm 1.3^*$	17385 ± 763	$12277 \pm 250^*$
28 días (postnatal)	183.25 ± 4.27	$125.15 \pm 2.16^*$	22758 ± 926	$12842 \pm 923^*$
90 días (postnatal)	223.77 ± 6.73	$186.9 \pm 4.73^{**}$	30670 ± 1332	$29363 \pm 944^{\text{NS}}$

De manera similar, el área de los islotes de páncreas de fetos y crías de madres diabéticas fue menor en comparación con los fetos y crías de madres sanas. Presentándose una diferencia estadísticamente significativa en los tiempos de 21 días de gestación, de 20 días de nacidas y 28 días de nacidas. El área del tejido endocrino de 90 días entre los dos lotes no presentó una diferencia estadísticamente significativa. Gráfica 17.



Gráfica 17. Área del tejido endocrino pancreático en tiempos fetales y postnatales.
Datos expresados como la media \pm E. Estd. Análisis ANOVA * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$.

Un análisis de distribución de frecuencias de los tamaños de los islotes en los cuatro tiempos estudiados reveló que las frecuencias obtenidas en los grupos de madres diabéticas fueron mayores para los tamaños reducidos de los islotes así vemos que a los 21 días de gestación los tamaños más comunes en LC fueron entre 120 y 230 μm , mientras que en el LE los tamaños más frecuentes oscilaron entre los 90 y 160 μm . Figura 16 A. Para el tiempo de 20 días de nacidas el tamaño en el LC osciló entre las 120 y 230 μm y para el LE entre las 90 y 150 μm . Figura 16 B.

A los 28 días de nacimiento las frecuencias en el tamaño del islote en el LC fueron entre 90 a 200 μm , mientras que en el LE fueron de 90 a 140 μm . Figura 16 C. Para el tiempo de 90 días el análisis de las frecuencias fue más amplio para los dos grupos siendo entre las 100 y 300 μm las distribuciones más comunes para los islotes del grupo control, y de una manera similar en amplitud los islotes del grupo experimental las distribuciones fueron de 100 a 280 μm . Figura 16 D.

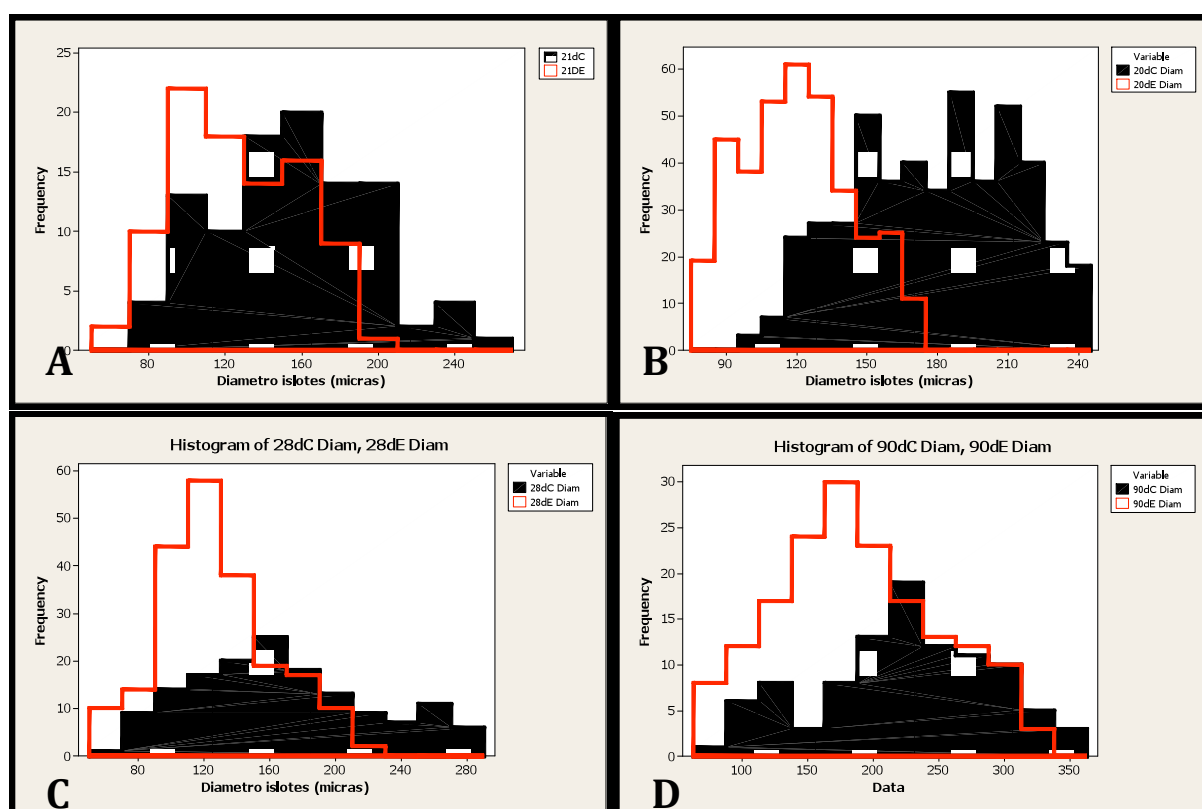


Figura 16. Gráficas representando la distribución de frecuencias en los tamaños de islotes. La zona sombreada representa a las frecuencias del LC y las zona delineada con rojo representa las frecuencias del LE. A) 21 días de gestación, B) 20 días postnatales, C) 28 días postnatales y D) 90 días postnatales.

6.8 Análisis inmunohistoquímico

6.8.1. 17 días de gestación

Las células positivas a Pdx-1 son representadas por el epitelio pre-ductal, entre éstas, se encuentran células con una mayor positividad en el núcleo aunque el citoplasma presentó un menor marcaje. Las células con un núcleo positivo a Pdx-1 varían en el tamaño de éste intercalándose entre toda la cadena de células del epitelio pre-ductal del páncreas fetal. En fetos de madres sanas (LC) el epitelio pre-ductal positivo a Pdx-1 se presentó formando

diversos ductos con una gran variedad de tamaños. Las agrupaciones epiteliales pre-ductales con menor tamaño y en estrecha relación fueron más positivas a Pdx-1. En algunos cortes, en donde se observa el intestino, sus células epiteliales también presentaron una inmunopositividad a Pdx-1. Figura 20 A y B. Entre este epitelio ductal positivo a Pdx-1, se pudo observar pequeñas agrupaciones de células pro-endocrinas, con una alta inmunopositividad a Pdx-1 en sus núcleos y en menor cantidad en su citoplasma asociadas a unas 3 o 4 puntas del epitelio pre-ductal. Se presentan escasas células negativas a Pdx-1 entre éstas y diferenciándose del epitelio mesenquimatoso que rodea al epitelio pre-ductal. En fetos de madres diabéticas (LE) las células de epitelio pre-ductal de fetos presentaron una fuerte positividad a Pdx-1 en todo el epitelio. Pero a diferencia las agrupaciones de células pro-endocrinas presentaron una menor inmunopositividad, comúnmente sólo el citoplasma fue positivo y pocas células presentaron una positividad mayor en sus núcleos. Figura 20B. Entre estas células pre-ductales se observaron escasas células positivas a insulina en todo el citoplasma, y en algunas partes siendo más inmunopositivas a esta proteína. Entre el epitelio pre-ductal de fetos de madres sanas como diabéticas esta observación fue similar Figura 17 C y D, aunque se observó una mayor inmunopositividad a insulina en páncreas fetales de madres diabéticas. Figura 20D. Sobre la inmunodetección de GLUT2 en este tiempo, escasas células fueron positivas entre la masa de células pro-endocrinas en los dos grupos tanto en páncreas fetal de madres sanas (LC) como en páncreas de fetos de madres diabéticas (LE), aunque levemente mayor en este último lote Figura 17 E y F.

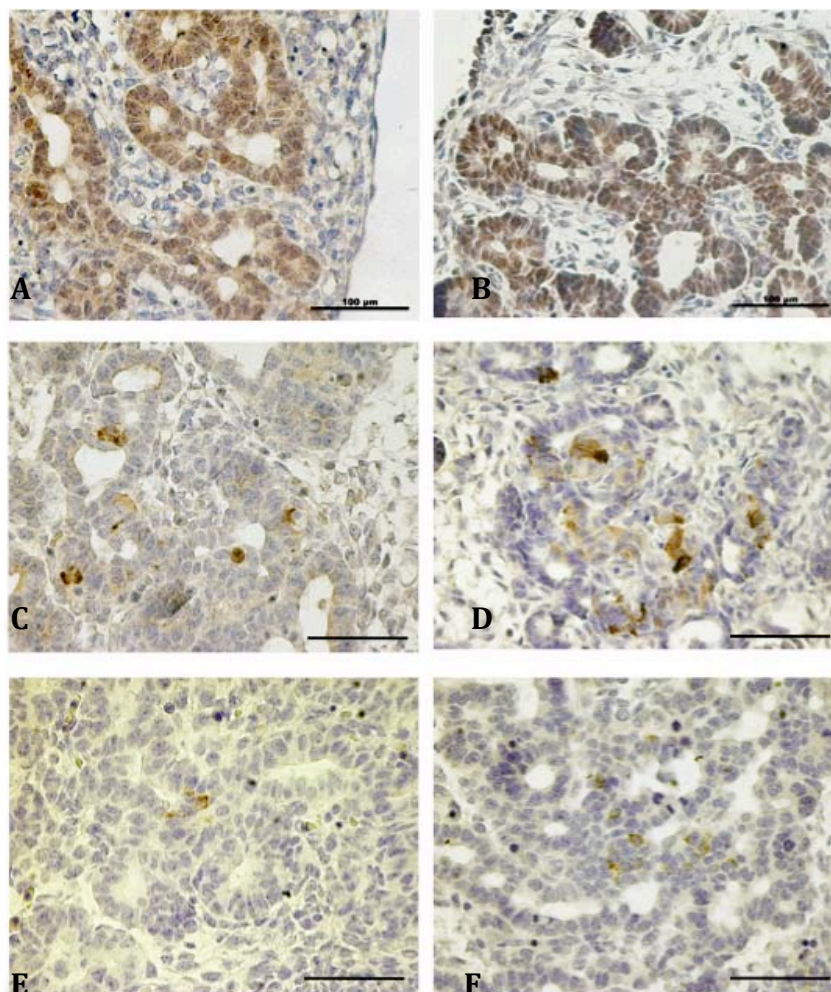


Figura 17. Composición de micrografías de inmunohistoquímicas para las proteínas estudiadas. **A)** Pdx.1 LC, **B)** Pdx.1 LE, **C)** Insulina LC, **D)** Insulina LE, **E)** GLUT2 LC, **F)** GLUT2 LE. 40X.

6.8.2. 21 días de gestación

Las técnicas de inmunohistoquímica revelaron que la mayoría de las células pancreáticas siguen siendo positivas a Pdx-1, incluyendo células acinares y ductales; aunque las células con una mayor positividad en sus núcleos fueron las células endocrinas de las agrupaciones tipo islote. En estas agrupaciones no todas las células fueron positivas a Pdx-1, en la mayoría del tejido se presentan células con núcleos positivos a Pdx-1 dispersos entre la masa endocrina, entre estas una gran cantidad de células con citoplasma positivo a Pdx-1 siendo éstas mas abundantes entre las células endocrinas. Entre las agrupaciones tipo islote se pueden observar diversos tamaños de núcleos celulares positivos a Pdx-1. Figura 18 A. En la mayoría de las agrupaciones la periferia fue negativa a Pdx-1 la mayor parte positiva se concentra en el centro de la agrupación representando células β además de la gran positividad a insulina y GLUT2. Figura 18 C y E.

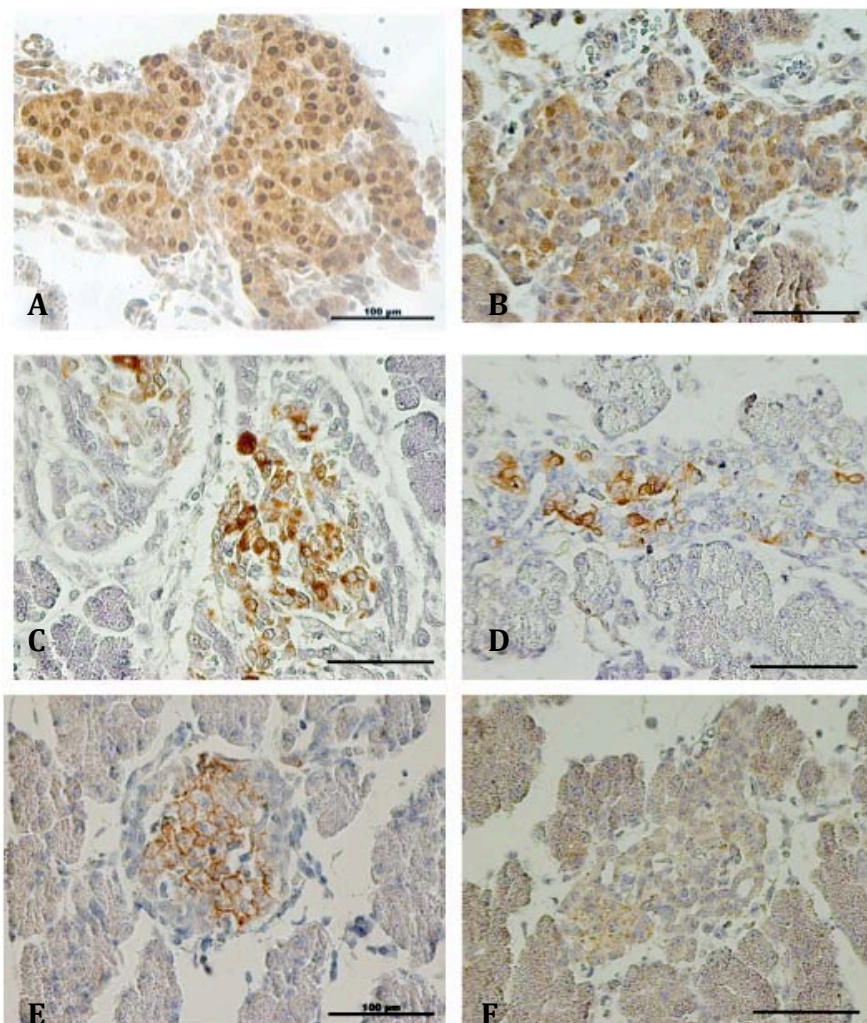


Figura 18. Composición de micrografías de inmunohistoquímicas para las proteínas estudiadas.

A) Pdx.1 LC, B) Pdx.1 LE, C) Insulina LC, D) Insulina LE, E) GLUT2 LC, F) GLUT2 LE. 40X.

B)

En los páncreas de fetos de madres diabéticas, la diferenciación de agrupaciones tipo islote es escasa y de menor tamaño. La reacción inmunopositiva a Pdx-1 fue menor que en páncreas de fetos de madres sanas, en todas las pequeñas agrupaciones tipo islotes, aunque el tejido acinar también fue inmunopositivo a esta proteína Figura 18 B. Pocas células de las agrupaciones tipo islote fueron positivas a Pdx-1, insulina (Figura 18 D) y GLUT2 (Figura 18 E) en comparación con páncreas de fetos de madres sanas que la detección

inmunohistoquímica fue mínima para las tres proteínas y en algunos casos esta inmunopositividad fue clara en células endocrinas en diferenciación comúnmente localizadas entre el epitelio ductal pancreático y en menor número en agrupaciones tipo islote. Las células epiteliales ductales que se presentaron en estrecha relación a estas agrupaciones fueron positivas a Pdx-1.

6.8.3. 20 días de vida postnatal

Las técnicas de inmunohistoquímica realizadas demostraron que las células β se encuentran en el centro de islote donde se observó una mayor inmunopositividad a insulina y GLUT2. A diferencia de insulina y GLUT2, la inmunohistoquímica para Pdx-1 se observó en células acinares y epiteliales aunque como en el tiempo anterior, el islote presentó una mayor inmunopositividad a Pdx-1 en los núcleos Figura 19 A y B. Se observó una mayor positividad en los islotes tanto en citoplasma como en el núcleo celular, siendo mas evidente en el núcleo que el resto de los tejidos acinares y ductales. En las células positivas a Pdx-1 en el ducto sólo se observan los núcleos de células epiteliales y presentaron un arreglo uniforme en toda la tira ductal.

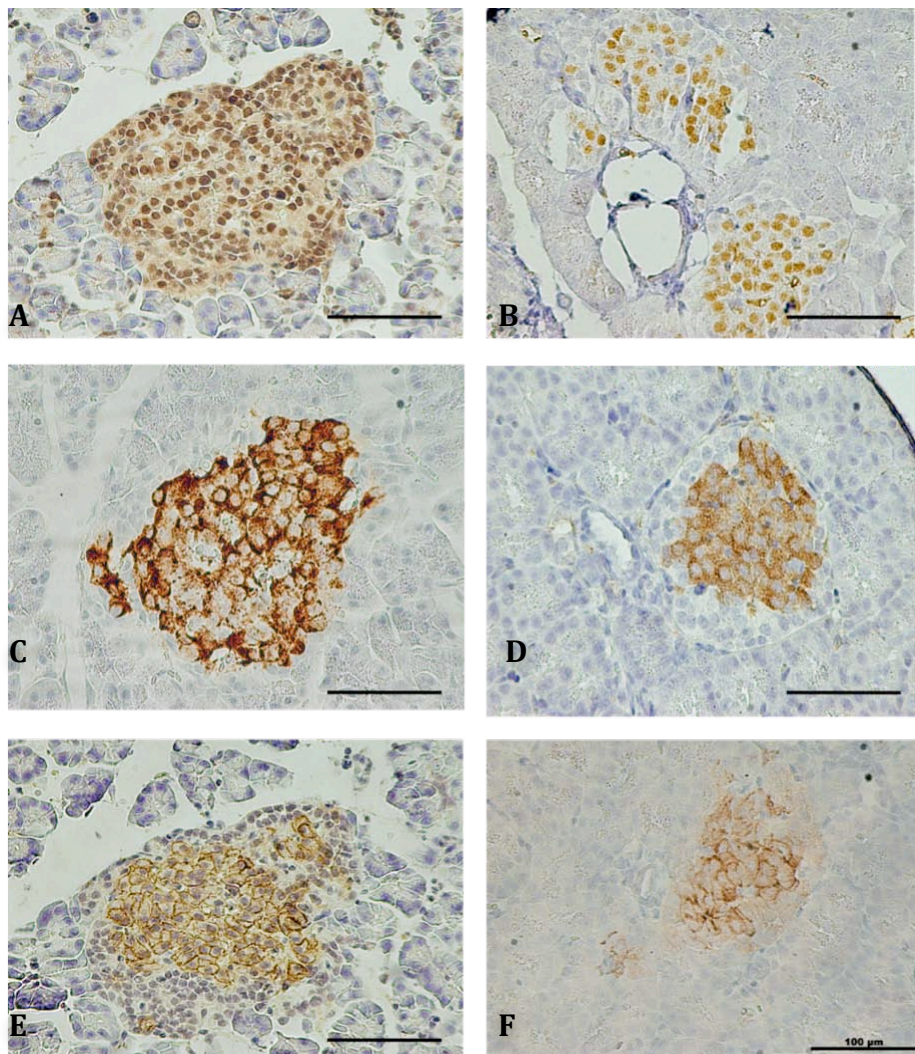


Figura 19. Composición de micrografías de inmunohistoquímicas para las proteínas estudiadas. A) Pdx.1 LC, B) Pdx.1 LE, C) Insulina LC, D) Insulina LE, E) GLUT2 LC, F) GLUT2 LE. 40X.

Los páncreas de crías de madres diabéticas presentaron una reacción similar para Pdx-1, insulina y GLUT2 con la que presentaron las crías de ratas sanas, la diferencia mas evidente fue que observamos que las regiones de la periferia y masas endocrinas negativas a Pdx-1 que rodeaban los islotes son de mayor tamaño y aunque la reacción ocurrió en la parte central del islote, se observó una menor cantidad de células positivas para las tres proteínas. Figura 19 B,D y F.

6.8.4. 28 días de vida postnatal

Para este tiempo la técnica de inmunohistoquímica para Pdx.1 presentó una similaridad con el tiempo de 20 días de nacidos. Los ductos son de epitelio uniforme y siguen siendo positivos a Pdx-1 aunque la reacción fue menor que en células endocrinas. De manera similar se presenta una inmunopositividad esparcida entre todo el tejido acinar algunos núcleos de células acinares son positivos a Pdx-1 pero la reacción fue también menor en comparación que las células endocrinas y una gran diferencia es que sólo se observa en el núcleo y no en el citoplasma. Figura 20 A. Pocas células del islote fueron negativas a Pdx-1 y la reacción no discriminó zonas del islote se observa una reacción uniforme en todo el islote. Es también evidente que los núcleos positivos a Pdx-1 fueron de diversos tamaños, pudiendo diferenciar los tipos celulares endocrinos.

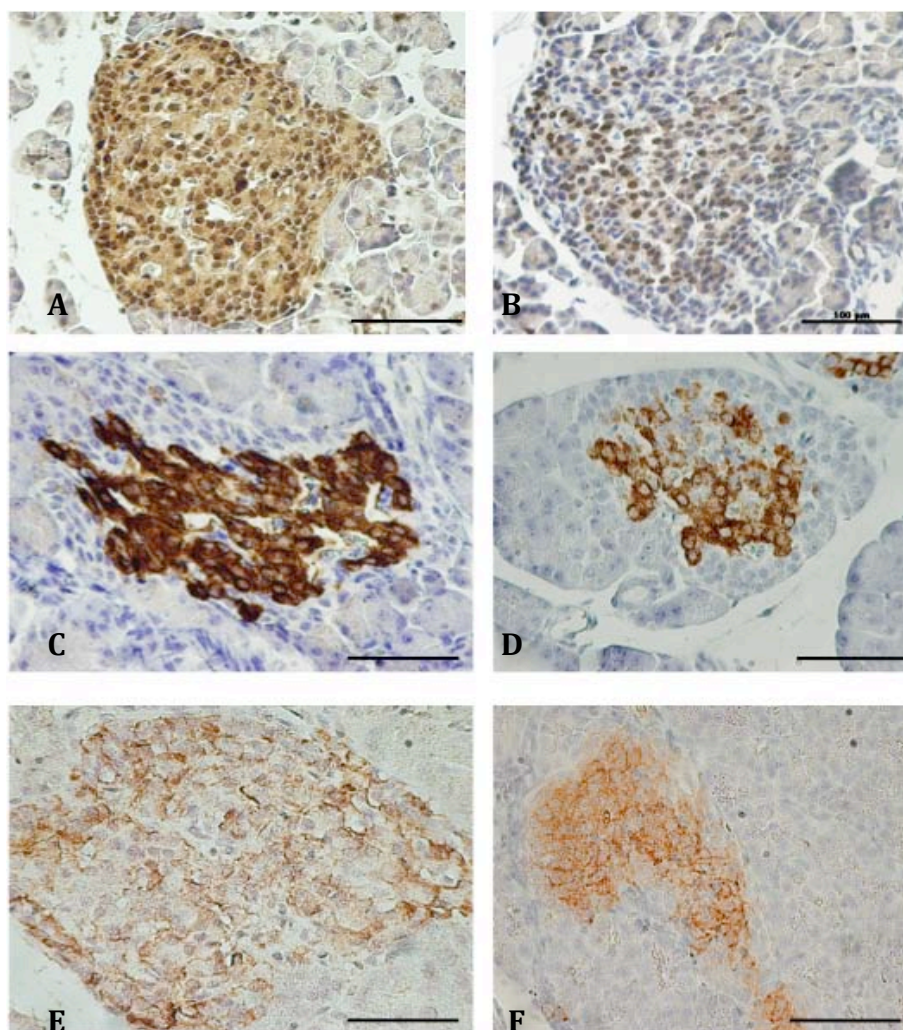


Figura 20. Composición de micrografías de inmunohistoquímicas para las proteínas estudiadas. **A)** Pdx.1 LC, **B)** Pdx.1 LE, **C)** Insulina LC, **D)** Insulina LE, **E)** GLUT2 LC, **F)** GLUT2 LE. 40X.

A diferencia del arreglo de Pdx-1 en el islote GLUT2 e insulina únicamente se presentaron en células de la región central del islote, células muy escasas fueron observadas en la región periférica del islote negativo para la reacción inmunohistoquímica de las tres proteínas. Figura 20 B y C. Por el contrario, las regiones negativas a insulina y GLUT2 que representan la periferia del islote en páncreas del LE, fueron más amplias en páncreas de madres diabéticas y con una inmunotinción más ligera. Figura 20 D y F.

6.8.5. 90 días

En este tiempo, se observó que las células con núcleos positivos a Pdx.1 y con una positividad menor en el citoplasma representan la mismas regiones en el islote que fue inmunopositivo a insulina y a GLUT2 Figura 21 (C-F), para este tiempo los islotes son de una forma esférica discreta entre todo el tejido acinar, que en algunas regiones presentaron positividad a Pdx.1 en algunos núcleos de células acinares.

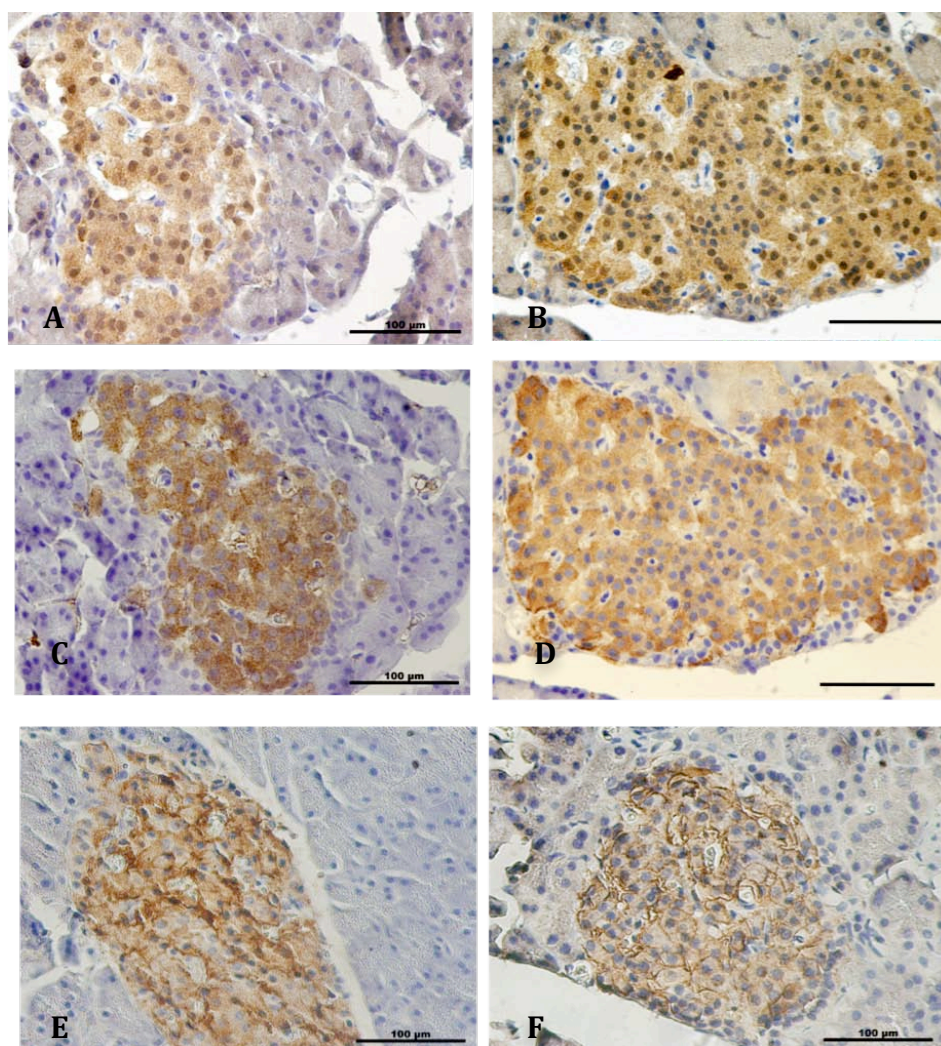


Figura 21. Composición de micrografías de inmunohistoquímicas para las proteínas estudiadas.

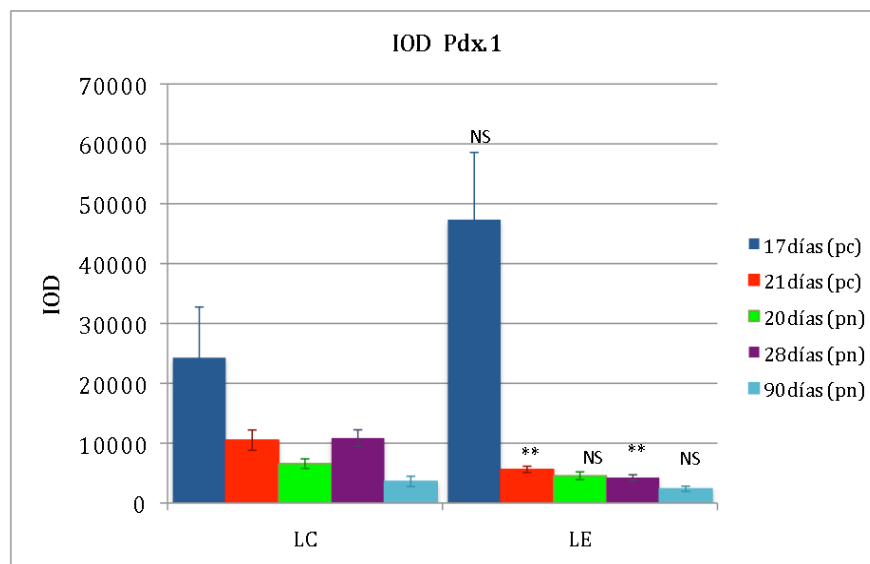
A) Pdx.1 LC, B) Pdx.1 LE, C) Insulina LC, D) Insulina LE, E) GLUT2 LC, F) GLUT2 LE. 40X.

En cuanto a la intensidad de la reacción de la propia técnica de inmunohistoquímicas para las tres proteínas no representó a simple vista una diferenciación en la intensidad para Pdx.1 e insulina, sólo se observó en la mayoría de los islotes de páncreas de madres diabéticas una menor inmunopositividad a GLUT2 (Figura 21 F).

6.9 Densidad Óptica Integrada (IOD)

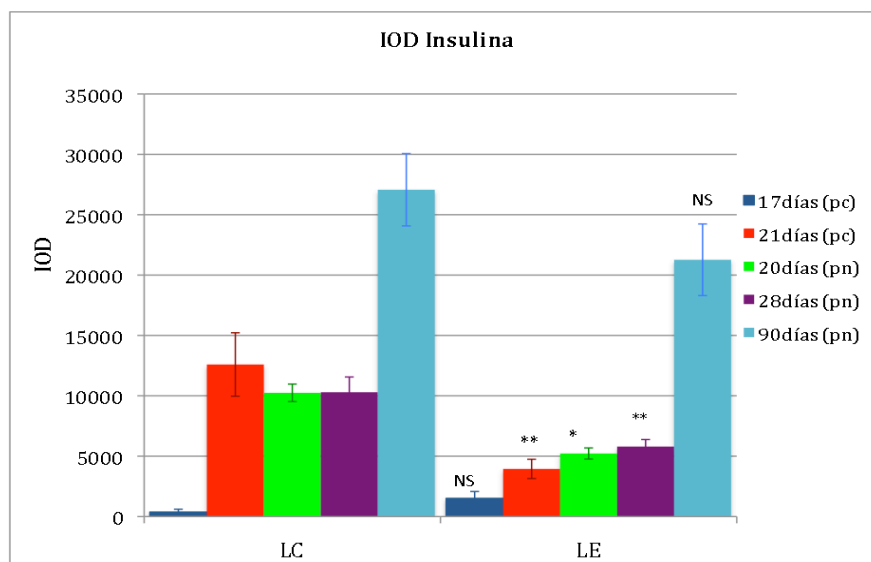
Los valores obtenidos de la IOD para Pdx.1 fueron mayores en los dos lotes para el día 17 de gestación, siendo de 24289 ± 8451 para Pdx.1 en el LC y de 47338 ± 11231 en el LE (sin diferencia significativa). A diferencia, al día 21 de gestación, el análisis de IOD para Pdx.1 fue mayor en el LC, siendo de 10510 ± 1694 en comparación con la que se obtuvo en el LE al mismo tiempo de 5620 ± 533 con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En tiempo postnatales se observó una disminución a los 20 días de vida postnatal en crías de madres del LE (IOD= 4557 ± 656) en comparación con crías de madres del LC (IOD= 6596 ± 797), sin diferencia significativa. Para el día 28 de vida postnatal, esta reducción continuó en crías del LE siendo de 4265 ± 463 en comparación con la que presentaron crías del LC con valores de 10862 ± 1370 con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Para el tiempo de 90 días de vida postnatal se observó una ligera reducción de la IOD en islotes de crías de madres diabéticas (LE) siendo de 2384 ± 437 en comparación con las que presentaron las crías de madres sanas (LC) que con valores obtenidos de 3618 ± 863 sin diferencias significativas entre las dos. Gráfica 18.



Gráfica 18. Densidad óptica integrada (IOD) de Pdx.1 en todos los tiempos de estudio. Datos expresados como la media \pm e.st. Análisis de Mann-Whitney, ** $p < 0.05$.

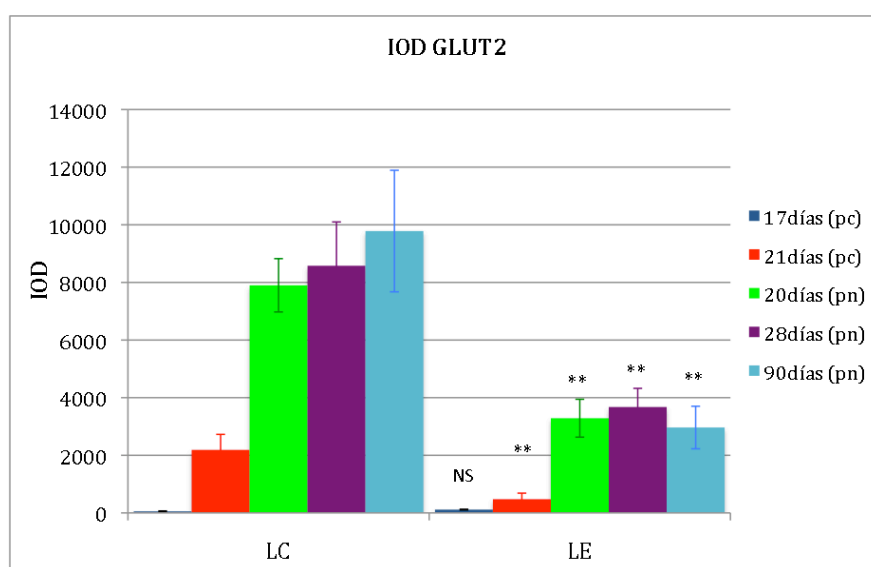
La IOD de insulina para el día 17 de gestación en fetos de madres diabéticas (LE) fue mayor en comparación con los valores obtenidos en fetos de madres sanas (LC) siendo de 374 ± 230 en LC y de 1508 ± 566 para el LE sin diferencia significativa. A diferencia, en el día 21 de gestación, los valores de IOD fueron mayores en fetos del LC (12592 ± 2627) y estadísticamente significativos con los que presentaron los fetos de madres de LE (3945 ± 802 , $p < 0.05$). En el tiempo postnatal, esta reducción continuó en las densidades ópticas integradas de los días 20 y 28 en crías de madres del LE siendo de 5222 ± 460 y de 5795 ± 584 respectivamente, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con los obtenidos en el LC que fueron de 10247 ± 724 y de 10295 ± 1264 , respectivamente. Para el día 90 de vida postnatal las crías de madres del LE presentaron una IOD menor que la que obtuvimos de las crías del LC, siendo de 23759 ± 3803 y de 32237 ± 3750 sin diferencia significativa. Gráfica 19.



Gráfica 19. Densidad óptica integrada (IOD) de insulina en todos los tiempos de estudio. Datos expresados como la media \pm e.std. Análisis de Mann-Whitney, **p<0.05.

De manera similar que la IOD obtenida en el tiempo fetal de 17 días de gestación para Pdx.1 e insulina, la IOD para GLUT2 fue ligeramente mayor en fetos del LE siendo de 115.1 ± 13.3 en comparación con la obtenida en fetos de madres de LC que fue de 54.4 ± 14.2 sin diferencia significativa. Para el tiempo de 21 días de gestación esta situación cambió y fue similar con las IOD's obtenidas de las dos proteínas anteriores, los fetos de madres del LE tuvieron una reducida IOD para GLUT2 (476 ± 210) y estadísticamente significativamente con la que presentaron los fetos de madres del LC (2187 ± 539).

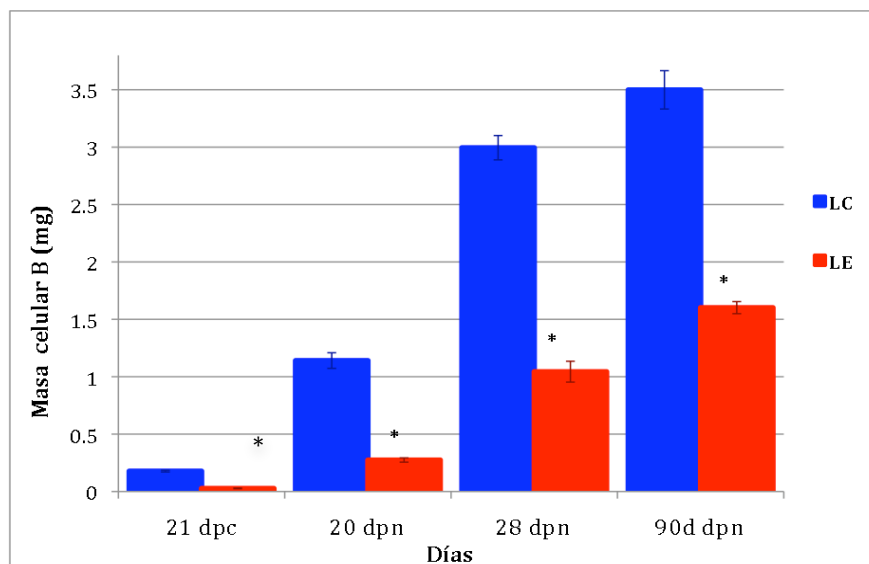
En el periodo postnatal, esta reducción continuó en las crías de madres diabéticas (LE) en los días 20 y 28 postnatales fue de 3287 ± 657 y de 2915 ± 712 respectivamente y estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con las obtenidas en crías de madres sanas (LC) siendo de 7899 ± 925 y 8578 ± 1521 , respectivamente. En la vida adulta, a los 90 días esta reducción persistió en crías de madres diabéticas (LE) sobre la IOD de GLUT2 siendo de 2964 ± 738 y estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto a la obtenida en crías de madres sanas (LC) que fue de 9782 ± 2109 . Gráfica 20.



Gráfica 20. Densidad óptica integrada (IOD) de GLUT2 en todos los tiempos de estudio. Datos expresados como la media \pm e.std. Análisis de Mann-Whitney, **p<0.05

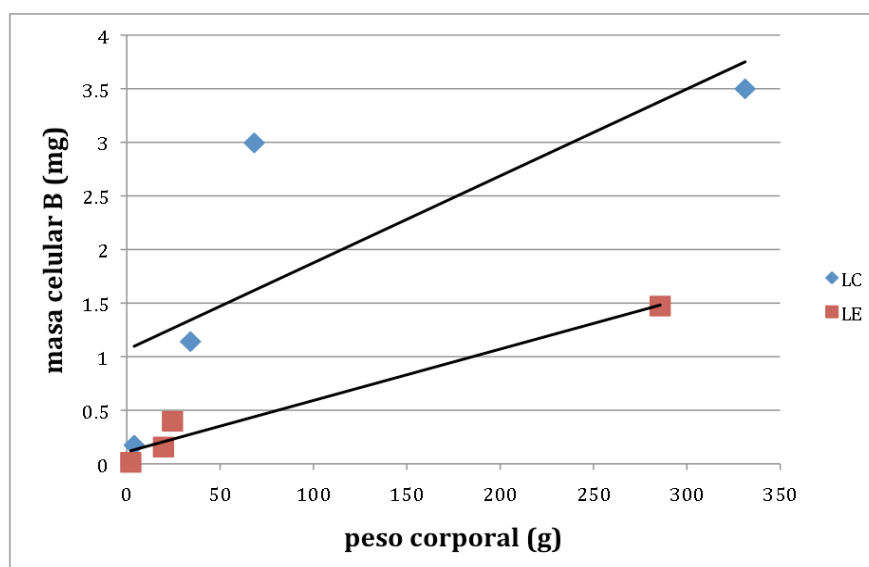
6.10 Masa celular β

La masa celular β fue menor en todos los tiempo en crías del LE siendo de 0.0272 ± 0.00257 a los 21 días de gestación, en crías de 20 días fue de 0.2743 ± 0.0185 , de 1.0439 ± 0.0908 en 28 días y de 1.602 ± 0.0526 en 90 días comparadas con las masas celulares β de fetos y crías del LC que fueron de 0.1776 ± 0.00771 a los 21 días de gestación, de 1.1408 ± 0.068 a los 20 días, de 2.995 ± 0.106 a los 28 días y de 3.499 ± 0.167 a los 90 días, aumentando progresivamente conforme incrementa el tamaño y la edad en las crías. Gráfica 21.



Gráfica 21. Masa celular β en fetos y crías en los tiempos estudiados. Mediana \pm Error Estándar. * <0.0001 Análisis ANOVA.

La masa celular β y el peso total de los animales presentaron una correlación mas fuerte en los tiempos del LE (21 dpc, 20 dpn, 28 dpn y 90 dpn, $R=0.984$ $p<0.05$) en comparación con la que se presentó entre los mismos tiempos en animales del LC ($R=0.781$) Gráfica 21.



Gráfica 22. Correlación entre la masa celular β y el peso total de los animales del LC y LE. (Coeficiente de correlación de Pearson, LC, $R=0.781$ vs LE, $R=0.984$).

6.11 Áreas celulares

En la tabla 8, se reporta el porcentaje de las áreas positivas a insulina, el número total de núcleos Pdx.1⁺ y el promedio de estos en los islotes para cada tiempo analizado. Los resultados demuestran que las áreas positivas fueron mayores en los grupos del LC que en el LE, de manera similar el número de núcleos Pdx.1⁺ y el promedio de núcleos Pdx.1⁺ por islote fueron mayores en los tiempos del lote control.

Tabla 8. Área total de islotes, área positiva a insulina, número total de núcleos Pdx.1⁺ y número de núcleos Pdx.1⁺/por islote en páncreas de fetos y crías de madres sanas (LC) y diabéticas (LE)* p<0.001, **p<0.05.

Análisis ANOVA (Media ± E. Std) NS= no significativo

Tiempo	Área Total islote (µm ²)	Área Insulina (%)	N Total de Núcleos Pdx-1 ⁺	Núcleos Pdx-1 ⁺ /Islote	
21 días	LC	15798 ± 977	76.93%	11843	134 ± 25
	LE	12264 ± 596**	22.86%	7547	51 ± 6*
20 días	LC	17385 ± 763	41.82%	5361	62 ± 12
	LE	12277 ± 250*	40.72%	5614	49 ± 4 ^{NS}
28 días	LC	22758 ± 926	58.77%	6360	72 ± 12
	LE	12842 ± 923**	57.21%	6288	35 ± 7 ^{NS}
90 días	LC	30670 ± 1332	78.50%	9785	81 ± 16
	LE	29363 ± 944 ^{NS}	56.61%	8920	60 ± 12 ^{NS}

VII. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de los mamíferos se establece un grado de autonomía durante la vida fetal en preparación para la vida después de del nacimiento. En esta etapa cuando se desarrollan mecanismos homeostáticos necesarios para garantizar esa existencia, pasando a través de periodos críticos que se ven influenciados por aspectos del medio intrauterino como la nutrición y el metabolismo (143).

El embarazo está caracterizado por una serie de cambios metabólicos que promueve la acumulación de tejido adiposo en periodos tempranos, seguido por una resistencia a la insulina y una lipólisis facilitada al final de la gestación. En mujeres sanas el embarazo se caracteriza por una disminución de alrededor de 50% en la disposición de glucosa regulada por insulina y por un incremento de 200-250% en la secreción de insulina para el mantenimiento de la normoglucemia en la madre (12).

En la diabetes gestacional el metabolismo se altera por una disminución en la sensibilidad a insulina producida por una disfunción endotelial que se asocia con diversos mecanismos moleculares en respuesta a la hiperglucemia (144). El producto presenta modificaciones en el patrón genético de crecimiento y mantiene la homeostasis a costa de una serie de ajustes metabólicos que comprometen la capacidad de adaptación al medio extrauterino, incrementando los riesgos de una morbimortalidad (145).

Actualmente, no existe un modelo animal que reproduzca exactamente las condiciones de la diabetes gestacional humana. Sin embargo, varios modelos pueden proporcionar una aproximación para estudiar la patogénesis de esta enfermedad. Entre estos, la inducción quirúrgica, hormonal y química (STZ) son los más utilizados, ya que provoca una alteración en el medio intrauterino semejante al de la diabetes gestacional humana (146).

La acción inicial de la STZ para inducir hiperglucemia, es la destrucción de las células β ocasionando una disminución en la secreción de insulina, produciendo hipoglucemia temprana (<48 hrs. después de la inducción) que puede tener como resultado un efecto letal sobre los animales. Los animales que sobreviven pasan a un estado de hiperglucemia a largo plazo, permitiendo la aparición de las complicaciones características de la diabetes.

En este estudio, durante la primera semana de gestación, antes de la administración de la STZ, las ratas (LE) presentaron niveles de glucosa normales, 48 hrs. después de la inducción, los niveles de glucosa en ratas del LE aumentaron a valores superiores a 400 mg/dl como demuestran los valores de la segunda, tercera y media semana de gestación llegando alcanzar valores superiores a los 500 mg/dl en la última semana, confirmando la hiperglucemia permanente en los animales tratados con STZ. De manera similar, el peso registrado durante la gestación evidenció la condición metabólica alterada que se indujo a las ratas del LE. Aunque al inicio de la gestación las ratas del LE tenían mayor peso que las del LC (279 ± 4.04 g vs 260.3 ± 7.91 g) se observó una pérdida de peso en la segunda semana manteniéndose hasta el final de la gestación, a diferencia de las ratas del LC que a partir de la segunda semana empezaron a tener una ganancia progresiva de peso hasta el final de la gestación.

En la gestación, la hiperglucemia afecta directamente la ganancia de peso, en esta condición se presentan dos fases metabólicas: una anabólica y otra catabólica, durante las dos primeras semanas en roedores ocurre la fase anabólica donde el aumento de tejido fetal y de

tejidos anexos son insignificantes y la madre produce una reserva proteica (147) aumentando su ingesta alimentaria para el aumento y crecimiento del contenido uterino. Entre la mitad de la tercera y la última semana ocurre un rápido crecimiento fetal y las reservas son utilizadas (fase catabólica); por tanto, los tejidos de reserva aumentan como es el caso del tejido adiposo, el cual permite mantener una reserva metabólica endógena abundante para situaciones de restricción alimentaria (147) o para ser utilizada después durante el periodo de lactancia cuando la demanda energética es muy alta debido a la producción de leche (148).

En una gestación diabética existe un alto gasto energético el cual usualmente ocasiona un estado compensatorio de hiperfagia debido a la deficiencia o ausencia de insulina que ocasiona una disminución en la acumulación de nutrientes como consecuencia del consumo de nutrientes y una excesiva movilización de metabolitos endógenos en condiciones de ayuno, produciendo elevadas concentraciones de ácidos grasos, hiperglucemia e hiperaminoacidemia (149).

Yamada y colaboradores, (149) demostraron que la diabetes inducida con STZ en ratas Wistar gestantes ocasiona un alto gasto energético, en comparación con ratas gestantes no diabéticas y diabéticas no gestantes. Ellos encontraron que la diabetes inducida con STZ ocasiona una reducción en el peso del útero, y de fetos y concluyen que en el estado hiperglucémico puede estar involucrado en un bloqueo del proceso de la eficiencia alimentaria y en el depósito de grasas, ocasionando una pérdida de peso y energía en las ratas gestantes diabéticas.

Los niveles hiperglucémicos están relacionados con el gasto energético, debido al alto catabolismo proteico (147) acompañado de una hiperglucagonemia que como consecuencia aumenta el gasto energético por el disparo de la gluconeogénesis durante la gestación (150), por lo que podemos deducir que las ratas gestantes diabéticas presentaron un estado catabólico permanente propio de la enfermedad reflejado por la poca ganancia de peso y también por el mantenimiento de los altos niveles de glucosa durante la gestación en estos animales (Gráfica 1 y 2).

El propio estado gestacional en un animal implica un alto gasto energético que aumenta en la condición hiperglucémica, el estado metabólico y nutricional se ve afectado severamente llegando a producir la muerte del animal y/o de los productos.

En este trabajo tuvimos además de una mayor mortandad materna durante la gestación, una gran cantidad de reabsorciones, lo que se correlaciona con el gasto que implica la gestación. Se sabe que las reabsorciones son equivalente a abortos y son una forma de supervivencia que presentan los animales múltiparos que es necesaria para mantener la vida de la madre, que en este trabajo también se asoció de manera indirecta, con el peso de las ratas durante la gestación.

En los tiempos fetales estudiados (17 y 21 días de gestación) nosotros obtuvimos menor número de fetos en ratas diabéticas. Las madres diabéticas, además de su menor número de fetos y presentar una mayor frecuencia de reabsorciones, presentaron fetos más pequeños reflejando un retardo en el crecimiento fetal. (Gráficas 3 y 4). Los fetos de 17 días de madres diabéticas pesaron 0.3890 ± 0.0110 g y midieron 20.57 ± 0.300 mm siendo más pequeños que los de madres sanas que pesaron 0.6958 ± 0.0375 g y midieron 24.82 ± 0.602 mm, está alteración la encontramos también a los 21 días de gestación y continuó al nacimiento, donde las crías de madres diabéticas fueron más pequeñas (con un peso de 5.7 ± 0.044 g y una talla de 67.6 ± 1.19 mm) que la de madres sanas (peso 8.3 ± 0.086 g y talla de 72.8 ± 0.803 mm) (Gráficas 6 y 7).

A pesar de la abundancia de nutrientes, los fetos de madres severamente diabéticas presentaron un crecimiento retardado (142), y aunque presentaron un periodo de gestación más largo del que presentaron las ratas sanas, no pudieron compensar esta falta de crecimiento aún manteniendo por más tiempo a sus crías en el medio intrauterino. Los mecanismos por los cuales una diabetes materna puede ocasionar, retardo o restricción del crecimiento fetal son pocos conocidos, diversas investigaciones apuntan que es multifactorial (151).

Un crecimiento fetal normal es resultado de una interacción equilibrada entre diferentes factores, el abastecimiento de nutrientes, pues los fetos dependen directamente del estado nutricional de la madre y de la capacidad de la placenta para transportar estos nutrientes hacia los fetos (142), la placenta juega un importante papel en el desarrollo fetal en toda la gestación (152) pues regula el transporte de nutrientes entre la madre y el feto, elimina los productos de desecho fetal a la corriente sanguínea materna y regula los suministros metabólicos mediante la producción de hormonas (1).

Durante el primer mes de vida, las ratas están expuestas a cambios críticos que inician en el nacimiento, seguido por el periodo de lactancia y finalmente por el periodo de destete, varios estudios demuestran que el primer mes de vida es un periodo crítico para el desarrollo óptimo de las crías, el periodo de destete representa un desafío metabólico pues las ratas cambian de una dieta constante de leche rica en grasas, a una dieta omnívora, alta en carbohidratos (153), por lo que cualquier estímulo o estrés que ocurra en este periodo produce cambios estructurales, fisiológicos y metabólicos permanentes que predisponen a los individuos a desórdenes en su vida adulta (154).

Durante el periodo de lactancia, nuestros resultados demostraron que existen todavía alteraciones en el crecimiento de las crías de madres diabéticas evidenciado por el bajo peso y tamaño, durante las primeras 4 semanas (Tablas 3 y 4). Además de tener una gran incidencia de reabsorciones durante la gestación, también tuvimos un alto número de muertes postnatales en las camadas de madres diabéticas, más de 40 crías murieron durante el experimento. Las madres diabéticas, no almacenan grandes cantidades de reservas energéticas (particularmente en forma de grasa) y al no tener una cantidad necesaria de grasa para la producción suficiente de leche en el periodo de lactancia, muchas crías mueren por no tener nutrientes necesarios para su supervivencia. Las crías que sobreviven durante la primera semana, son las que mayor cantidad de nutrientes ingieren y por consecuencia las que más energía consumen. A diferencia de las camadas de madres diabéticas, en las camadas de madres sanas todas las crías sobrevivieron y tuvieron una ganancia progresiva del peso y en consecuencia el tamaño incrementó durante el primer mes de vida, (Gráfica 9 y 10). En crías de madres diabéticas se demostró que aún en los periodos de lactancia (20 días edad) y de destete (28 días de edad), su desarrollo postnatal se vió afectado como lo demuestra el bajo peso y la talla que presentaron (Gráficas 9, 10) con diferencia estadísticamente significativa (Peso LC vs LE $p < 0.0001$, talla LC vs LE $P < 0.05$).

Los niveles de glucosa sanguínea durante la lactancia demostraron también una alteración, las ratas del LC tuvieron niveles desde los 78 a los 136 mg/dl siendo más elevados en la 4 semana. (20-28 días). Conforme empezaron a crecer, a partir del día 56 los niveles empezaron a disminuir hasta llegar a niveles normales entre los días 63-90. En crías de madres diabéticas, los niveles más bajos fueron durante la primera semana (0-7 días) y alcanzando niveles de 135

en la semana 4 (20-28 días) y permaneciendo similares hasta la última semana del estudio (semana 12) o 90 días (Gráfica 11).

En los días 20, 28 y 90 días de edad los niveles estuvieron aumentados en crías del LE > 130 mg/dl y fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en comparación con los niveles de las crías del LC que fueron menores a <123 mg/dl Gráfica 12.

El análisis sérico demostró que los niveles de glucosa e insulina fueron elevados a los 20 días de edad en los dos lotes, los niveles de insulina fueron de 23.17 mUI/ml en crías de madres sanas y de 24.51 mUI/ml en crías de madres diabéticas, siendo los niveles más altos en todo el estudio. Los niveles de colesterol, triglicéridos y VLDL también presentaron niveles altos en este mismo día en los dos lotes. Los niveles séricos de glucosa disminuyeron al día 28 a 154 mg/dl en LC y de 160 mg/dl en LE, la insulina disminuyó drásticamente en crías de madres diabéticas a 6.96 mUI/ml y los de crías de ratas sanas a 13.21 mUI/ml ($p < 0.005$), los niveles de colesterol, triglicéridos y VLDL también descendieron, aunque el colesterol fue mayor en crías de madres diabéticas. Esta disminución continuó a los 90 días de edad en ratas sanas, los niveles de glucosa descendieron a 105 mg/dl, y en crías de madres diabéticas fueron de 146 mg/dl, los niveles de insulina también fueron altos en estas crías siendo de 19.74 mUI/ml, y estadísticamente significativos ($p < 0.05$) a los que observamos en crías de ratas sanas, que fueron de 8.99 mUI/ml. Los niveles de colesterol, triglicéridos fueron mayores en crías de madres diabéticas sin diferencia significativa (Gráfica 15).

Estos resultados demuestran que el primer mes de vida (20 y 28 días de edad), representa un periodo crítico para el desarrollo metabólico de la rata, donde los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos aumentan por la dieta a la que están expuestas alta en grasa (leche). Posteriormente se observa una disminución de estos niveles después del destete (28 días) y a la edad adulta (90 días) los niveles de estos parámetros bioquímicos disminuyen a valores normales. Estos resultados se pueden relacionar con los hallazgos obtenidos en el primer mes de vida de ratas sanas Wistar, reportados por Aguayo-Macuzzato y colaboradores (153), quienes reportan niveles de glucosa sanguínea que se elevan constantemente durante las primeras 3 semanas, alcanzando niveles plasmáticos de 223 mg/dl el día 20.

La diabetes materna además de aumentar la morbilidad y mortalidad en los productos, altera el desarrollo de varios órganos como: el corazón, tejido adiposo y muscular, riñones, pulmones, hígado e intestino (155).

Pocos estudios analizan el efecto de la diabetes materna sobre el desarrollo del páncreas fetal, desde su morfogénesis hasta su crecimiento y maduración y aún en la vida postnatal. Los que se han publicado resaltan solamente los efectos al final de la gestación (últimos 2 días en rata) y reportan sus efectos solamente en el tejido endocrino y en particular sobre la secreción de insulina por las células β .

En este estudio inmunohistoquímico donde utilizamos marcadores de diferenciación (Pdx.1) y específicos para célula β (insulina y GLUT2) nosotros encontramos resultados contrastantes entre el desarrollo y el periodo postnatal.

Durante la transición secundaria en el $\sim E16$ de gestación de la rata, el epitelio poco diferenciado sufre una sorprendente transformación en donde ocurre una onda masiva de diferenciación celular desde un epitelio de asignación hacia la diferenciación de los tres principales linajes celulares (156).

Zhou y cols. (157) en su trabajo, analizaron el desarrollo del páncreas de ratón utilizando marcadores moleculares y con líneas genéticas, encontraron que los dominios de las puntas distales del epitelio en desarrollo, (que coexpresan Pdx.1, Ptf1a, c-Myc, Carbopeptidasa A1) son progenitores multipotentes capaces de generar células acinares, el tronco o base de este epitelio localizado comúnmente debajo de las puntas demuestran que consiste principalmente de una población celular progenitora bipotencial: endocrino-ductal. Sus datos indican que los precursores endocrinos residen exclusivamente dentro de los troncos de las ramificaciones epiteliales pancreáticas. aunque es posible que un pequeño número pueda persistir hasta el final del desarrollo y durante la vida postnatal y adulta.

Conforme progresa la organogénesis, la citodiferenciación y proliferación de los linajes celulares es muy marcada. Las células acinares y ductales empiezan a diferenciarse a partir de este epitelio primitivo. Los precursores de células endocrinas se van alejando posteriormente del cordón epitelial o ducto primitivo durante la transición secundaria (156). Al diferenciarse y dejar el epitelio formando agrupaciones endocrinas a menudo se quedan en proximidad a éste, incluso a veces aparecen asociados con uno u otros ductos progenitores. Los islotes se forman por un proceso de separación/fisión en que agrupaciones celulares rodean la masa celular β , los islotes que se forman migran y adquieren su forma ovoide, una característica obtenida después del nacimiento (156).

En nuestro trabajo sobre el análisis histológico e inmunohistoquímico en el día 17 de gestación encontramos esta diferenciación celular a partir de un epitelio pre-ductal donde se forman los tres tipos de tejido, el epitelio sufre una expansión extensa, que es rodeado por una gran cantidad de mesénquima, lo que se observa en los páncreas fetales de LC y LE (Figura 15 A-B) presencia de vasos sanguíneos distribuidos entre la gran masa de células mesenquimatosas y en algunas áreas se observaron agrupaciones de células epiteliales pro-endocrinas, en el páncreas de fetos de LC.

En fetos del LE observamos una relación muy estrecha de estas agrupaciones pro-endocrinas con el epitelio pre-ductal y en algunos fetos de madres diabéticas no fueron observadas. Nuestros resultados concuerdan con la literatura, ya que encontramos que el epitelio pre-ductal (primitivo) es positivo a Pdx.1 en toda el área del páncreas en desarrollo, rodeado por el mesénquima (negativa a Pdx.1) (Figura 17 A y B), los resultados obtenidos por el método de Densidad óptica integrada (IOD) revelaron que el epitelio pre-ductal, en fetos de madres diabéticas presentó un aumento en el número de células epiteliales positivas a insulina y GLUT2 (Gráficas 19 y 20), debido al aumento en la IOD de Pdx.1 en fetos de madres diabéticas (Gráfica 18), sin diferencia significativa entre los dos lotes. Las células positivas a insulina y GLUT2 se localizaron entre la gran masa de tejido pre-ductal, como células aisladas entre este epitelio o en agrupaciones dentro del mismo epitelio. Las agrupaciones pro-endocrinas fueron menos positivas a estas dos proteínas, siendo más evidentes en fetos de madres sanas.

Es difícil evaluar qué es lo que ocurre en este tipo celular indiferenciado y la hiperglucemia materna, sabemos que el principal sustrato de energía del feto es la glucosa (152). No se conocen los mecanismos que están involucrados en la producción de esta respuesta, recordemos que en este tiempo no existe aún una diferenciación clara para definir una célula β *per se*.

Durante el desarrollo una gran masa de epitelio aparentemente indiferenciado (negativo a hormonas) es inmunoreactivo a GLUT2 en la ontología del páncreas, antes de la formación del primordio pancreático. Se ha sugerido que esta población de células epiteliales es determinante para la diferenciación de células β (positivas a GLUT2) que se presentan alrededor de los días 15-18 pc. en el desarrollo del páncreas de rata, también conocida como la segunda transición del desarrollo (158).

A los 21 días, un día antes del nacimiento, se observó una gran proliferación celular y crecimiento tisular (Figura 15 C), en los páncreas de fetos de madres diabéticas (LE) nosotros encontramos una disminución en la proliferación de agrupaciones tipo islote, en algunos casos apenas se iniciaba una diferenciación tisular a partir de progenitores ductales (Figura 15 D). Las agrupaciones tipo islote que observamos fueron de menor tamaño que las que observamos en páncreas de fetos de madres controles (Tabla 7) siendo estadísticamente significativos esta diferencia (LC vs LE $p < 0.0001$). Los diámetros de las agrupaciones en fetos de madres sanas oscilaron entre los 120-220 μm , mientras que en páncreas de fetos de madres diabéticas oscilaron entre los 90-160 μm (Figura 16 A). Entre los dos grupos se observaron varias células acinares y ductales positivas a Pdx.1.

Con el análisis de la IOD, encontramos una drástica disminución en los fetos de madres diabéticas, casi del doble para Pdx.1 (Gráfica 18) o del triple como fue para insulina y GLUT2 (Gráfica 19 y 20) a los que presentaron los fetos de madres sanas. Estos resultados demuestran que la diabetes materna afectó directamente la diferenciación y proliferación de células β (Figura 18).

En el estudio de Calvo y cols. (159) realizado en fetos de 21 días de gestación encontraron que los islotes fueron completamente funcionales e independientes del tejido acinar. Aunque a veces estuvieron asociados con ductos pancreáticos. En fetos de ratas diabéticas el citoplasma de células β fue escaso y comúnmente microvacuolado, la inmunotinción de insulina estuvo marcadamente disminuida y el número de células no positivas a insulina se incrementó. Los fetos de madres a las que se les administró 1 UI/ml de insulina presentaron un mayor inmunopositividad a insulina en sus islotes. El estudio morfométrico reveló que existe una hiperplasia del tejido insular en fetos de madres diabéticas comparadas con el LC. La hiperplasia de las células β en fetos de madres diabéticas observaron que está relacionada con el estado glucémico de los fetos el cual es derivado de la madre.

A diferencia del estudio de Calvo y cols. nosotros no encontramos una hiperplasia de las células β , pero sí una drástica disminución de síntesis de insulina en páncreas de fetos del LE, confirmando con otros trabajos que en la diabetes experimental, el páncreas fetal está bajo estrés durante su desarrollo, aunque se han obtenido diferentes resultados dependiendo de la edad gestacional estudiada y la dosis de STZ utilizada (142, 160, 161).

Durante la vida postnatal, ocurren modificaciones estructurales y funcionales en el páncreas, las células endocrinas comienzan a reunirse para formar islotes maduros (153). En los tiempos postnatales nosotros observamos a 20 días de edad, una gran actividad proliferativa en el tejido endocrino y el tejido exócrino presentó su estructura típica lóbulo-acinar. (Figura 15 E). Se observaron estas características en páncreas del LE (Figura 15 F); aunque los islotes estuvieron comúnmente asociados a los ductos (Figura 19). El estudio morfométrico reveló que los islotes de crías del LE fueron de menor tamaño en comparación con los islotes de páncreas del LC (Tabla 7) y con diferencias estadísticamente significativas (LC vs LE $p < 0.0001$).

Los tamaños de estos islotes oscilaron entre los 120-230 μm y en crías de madres diabéticas fueron entre los 90- 150 μm . La IOD representó valores muy reducidos con diferencia significativa para la insulina y GLUT2 (LC vs LE $p < 0.05$) en crías de madres diabéticas (Gráficas 19 y 20) y sin diferencias significativas con los valores de IOD de Pdx.1 entre los dos lotes (Gráfica 18).

En el tiempo de 28 días, el análisis morfométrico reveló un menor tamaño de los islotes en crías de ratas diabéticas, las distribuciones de los tamaños de los islotes fueron de 90-200 μm en el LC y de 90-140 μm en LE. El análisis de IOD reveló que hubo una mayor presencia de las tres proteínas en crías de madres sanas con respecto a los islotes de crías de madres diabéticas (Gráficas 17, 18 y 19) presentando una diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$.

Estudios previos han mostrado que las células β pancreáticas sufren una activa proliferación y apoptosis durante el primer mes de vida, Scaglia y cols (162) reportaron en ratas Sprague-Dawley que la masa celular β se incrementó en el periodo postnatal desde los 2 días hasta los 31 días de nacidas, pero el crecimiento no fue lineal. La masa celular β permaneció estable desde 2 a 20 días de edad; es hasta los días 24 y 31 donde hubo un incremento significativo. El porcentaje de células β apoptóticas fue alto cuando fue comparado con ratas adultas. Sus datos demuestran que el páncreas endocrino, durante el periodo neonatal, está sujeto a un remodelamiento de la población celular β y que la apoptosis juega un importante papel en la maduración de la masa celular β definitiva.

Un estudio más reciente documentó también la reorganización de islotes pancreáticos durante el periodo postnatal. Encontraron que la masa celular β y el tamaño de sus agregados se incrementó durante el primer mes de vida y esta expansión continuó hasta la vida adulta. Observando un aumento en las células β en el día 20 y en los niveles de insulina. La masa celular β incrementó desde el día 6 al día 20 en cabeza, cuerpo y cola y permaneció estable hasta el día 28 y continuó incrementándose hasta la vida adulta. El día 20 coincide con una transición de dieta alta en proteínas y grasa durante la lactancia a una dieta alta en carbohidratos después del destete, los niveles de insulina obtenidos entre los días 20 y 28 sugieren que ocurre una transición funcional entre estos tiempos (153).

Nuestros resultados, obtenidos por el análisis sérico y de radioinmunoensayo para insulina demuestran la existencia de esta transición metabólica entre 20 y 28 días en crías de rata debido al cambio de dieta en este periodo, las crías sufrieron una remodelación del páncreas endocrino evidenciado por el aumento de tamaño (diámetro y áreas de islotes) a partir de los 20 días, aunque esta estructuración fue menor en crías de madres diabéticas acompañado de la baja expresión de proteínas clave en la diferenciación y funcionalidad de células β , como Pdx.1, insulina y GLUT2.

Para el tiempo de 90 días de edad el análisis morfométrico, evidenció un aumento en el tamaño de los islotes que fue mayor en crías de madres sanas. La distribución de tamaños de los islotes fue mas amplia, en el LC entre las 180 y 300 μm y de 100 a 280 μm en el LE (Figura 16D). Los resultados de IOD demostraron una disminución en las crías de madres diabéticas, siendo drástica y significativamente menor para GLUT2 (Gráfica 20), aunque la disminución en Pdx.1 e insulina no fue significativa (Gráficas 18 y 19).

Estos resultados, son similares con los obtenidos en el trabajo de Han y cols. (163) donde encontraron que el contenido proteico de islotes, DNA y de insulina no mostraron cambios significativos en crías de 15 semanas de edad.

A pesar de que nosotros obtuvimos una IOD y un tamaño similar del islote entre los animales de 90 días de edad, nosotros observamos claramente un aumento en los niveles de insulina en crías de madres diabéticas ($19.74 \pm 2.97 \mu\text{UI/ml}$), suponiendo una secreción alterada de la hormona.

La masa celular β es dinámica, se incrementa y disminuye de acuerdo a la función para mantener los niveles de glucosa dentro de un rango fisiológico normal. La masa celular β se puede incrementar por replicación, hipertrofia de las células o por formación de nuevas células (neogénesis) de islotes por diferenciación de precursores a partir de células ductales. (65, 143, 162, 164).

Al analizar las áreas de los islotes en crías sanas, encontramos que entre el día 21 de gestación y a los 20 días de edad el tamaño del islote aumentó ligeramente (Gráfica 17), en estos periodos de reorganización y maduración no ocurre un cambio drástico en el tamaño del islote hasta día 28 de edad y aumenta progresivamente hasta los 90 días de edad.

Estos resultados concuerdan con reportes anteriores sobre el tamaño del islote al nacimiento y la lactancia donde se reporta que no existe un aumento en el tamaño de tejido endocrino sino hasta el periodo del destete y entre 3-4 meses de edad relacionándose con el crecimiento de los animales en la vida adulta (65, 163, 164), y como lo demostramos con el análisis de correlación entre el peso del páncreas y el peso corporal total entre los dos lotes, que cada uno presentó un índice de correlación considerable ($R=0.998$).

Cerca del 80% de la masa del islote presente en el nacimiento es generada por la proliferación y diferenciación de progenitores endocrinos, y el 20% restante de la multiplicación de células en el islote (159, 165, 166), sugiriendo que este periodo puede representar una ventana crítica en la determinación de la fisiología pancreática adulta (153).

Nuestros resultados morfométricos del páncreas endocrino relacionado con el bajo peso pancreático que presentaron las crías de LE en los 4 tiempos estudiados (21 días de gestación, 20, 28 y 90 días postnatales) demuestran que existe una alteración durante el desarrollo, sobre la diferenciación y proliferación de células β con consecuencias en la vida postnatal.

Se ha reportado que la descendencia de madres severamente diabéticas la masa endocrina excede valores normales, y este exceso en la masa endocrina es debido a un alto número de pequeños islotes de Langerhans, sugiriendo un incremento en la neogénesis de células β más que una replicación. Después del nacimiento la masa del islote disminuye sugiriendo una restauración de su capacidad secretora. En la edad adulta, el tamaño del páncreas endocrino es mayor y la masa celular β también se incrementa (142).

La masa del islote es mayor relacionada con una hiperplasia y degranulación de las células β sugiriendo una sobre estimulación (160). Un agotamiento temprano de su capacidad secretora es la causa de un contenido bajo de insulina hacia el final de la gestación. *In vivo* e *in vitro*, la estimulación de células β da por resultado un aumento en la secreción de insulina, sugiriendo una resistencia a insulina en la descendencia de estas ratas (142). Cuando son adultos, esta descendencia presenta una masa celular β reducida e hiperglucemia basal, una tolerancia a la glucosa alterada y resistencia a la insulina (161).

Otros autores reportan que cuando las madres tuvieron una diabetes severa, el peso fetal, el tamaño del islote y la masa celular β estuvo disminuida y se observó una atrofia del tracto intestinal fetal (143).

En nuestro estudio, las pequeñas áreas de los islotes en crías del día 21 de gestación y 20 días de vida postnatal no presentaron diferencias de tamaño sino hasta los 28 días de vida postnatal aumentando conforme crecieron los animales aumentando más del doble el área a los 90 días de vida postnatal siendo más del doble de la observada en crías de madres diabéticas a los 28 días. Estos resultados se relacionan con los obtenidos de la masa celular β que disminuyó en páncreas y fetos de crías de ratas diabéticas en comparación con la obtenida en crías de madres sanas (Gráfica 21) y con la fuerte correlación obtenida entre la masa celular β y el peso total de los animales (Gráfica 22) siendo más ajustada a los datos de madres de ratas diabéticas ($R=0.984$).

Nuestros resultados sugieren, que la diabetes materna altera la reorganización y maduración del páncreas en el periodo postnatal, perturbando la diferenciación y proliferación celular influyendo así en su habilidad de respuesta a la actividad metabólica (161, 163). Así, la disminución del tejido pancreático al nacimiento en ratas del LE indica que nuestro estudio se realizó un modelo de diabetes materna severa.

Aún presentando una disminución drástica en la masa celular β durante el último día de gestación observamos un aumento en la masa celular en los tiempos postnatales (20 y 28 días) y aunque no fue tan evidente como en crías de madres sanas, estos mecanismos de proliferación y remodelamiento, compensaron en las crías una respuesta para el mantenimiento de la homeostasis de glucosa similar al de las crías de madres sanas; como se demuestra con la fuerte correlación que obtuvimos entre la masa celular β y el peso total de los animales en crías de madres diabéticas ($R=0.984$).

Parece ser que la neogénesis y replicación celular juegan un importante papel para el mantenimiento de la regulación metabólica en estos animales.

La neogénesis es un mecanismo celular importante el cual, a partir de células ductales se diferencian células endocrinas en tiempos postnatales y que es mantenida hasta la vida adulta (168). Se ha reportado en ratas de madres diabéticas con una masa endocrina pequeña, después de la lactancia, el tamaño del islote fue totalmente normalizado, mostrando que el páncreas endocrino tiene una plasticidad considerable y es capaz de adaptarse a cambios ambientales durante su desarrollo, pero únicamente cuando la deficiencia está restringida a la vida fetal (160, 168).

Otros estudios han reportado que en animales diabéticos se presentan células endocrinas dispersas dentro del epitelio de los ductos. Se ha encontrado que este segundo arreglo de células endocrinas asociadas al sistema ductal ha sido referido como primordios, que consisten de pequeñas agrupaciones de células endocrinas predominantemente asociadas a conductos intralobulares e intercalados. Estas agrupaciones celulares formadas por <20-25 células compuestas de células secretoras de insulina, células secretoras de glucagón y células secretoras de somatostatina que rodean a las secretoras de insulina y continúan a lo largo de la línea ductal (165).

Los resultados obtenidos en este estudio por medio de inmunohistoquímicas para Pdx.1 revelaron que en los dos lotes las células ductales y células acinares siguen expresando esta proteína en tiempos postnatales y en la edad adulta. Este nivel de expresión de Pdx.1 en células acinares es requerido para la formación y diferenciación de estas células además forma un complejo trímerico con Pbx1 y Mers2 que controlan la actividad transcripcional del gen de

la elastasa1 específico de acinos (156), aunque no en la misma densidad que lo presentan las células endocrinas del islote. La disminución de la IOD obtenida para Pdx.1 en todos los tiempos analizados desde el día 21 de gestación hasta 28 días de vida postnatal, se podría explicar por cambios que ocurren en la diferenciación celular β durante la transición secundaria que disminuyen la proliferación de estas células aún en periodos postnatales. El mecanismo que puede estar involucrado es desconocido, pero ciertas investigaciones podrían darnos una idea, sobre lo que ocurre.

Como sabemos la expresión y por tanto la transcripción de Pdx-1 es regulada por varios factores, entre éstos, la glucosa parece ser que juega un papel importante. Si tenemos en cuenta, que durante el desarrollo en fetos de madres diabéticas, el ambiente es hiperglucémico la regulación de Pdx.1 es activa.

Los bajos niveles de Pdx-1, reportados en modelos animales con restricción alimentaria durante los periodos fetales y de lactancia, han mostrado que el número de células de islote positivas a Pdx.1 es menor que en crías sanas y Pdx-1 es detectado en células ductales, ocasionando alteraciones en el tamaño del islote y su función. La reintroducción de una dieta normal, inmediatamente después del nacimiento normaliza la expresión de la proteína Pdx-1 y restaura la masa celular β y la capacidad de secreción de los islotes (169).

Un modelo de restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) causado por insuficiencia uteroplacentaria en ratas, podría explicar las alteraciones en periodos postnatales (170). En el nacimiento se observaron que los niveles del RNAm de Pdx.1 están reducidos más del 50% y la masa celular β es normal y cuando son adultas tienen una marcada reducción de su masa celular β y la expresión de Pdx1 está casi nula. Quienes determinan que en la vida postnatal, el estado de IUGR induce deacetilación de las Histonas H3 y H4, la pérdida de la acetilación es acompañada por la pérdida de unión del factor de transcripción clave, USF1, aumentando la metilación en promotores y regiones del DNA en crías con IUGR. A los seis meses de edad se incrementó la metilación de DNA en islotes y se observó una significativa reducción de la abundancia de histonas H3 y H4 acetiladas y la deacetilación prosiguió con la edad. Demostrando que un medio intrauterino alterado disminuye la transcripción de Pdx.1 mediante una cascada de modificaciones epigenéticas culminando en el silenciamiento de Pdx.1. Estos estudios son los primeros en caracterizar el código de histonas en Pdx.1 *in vivo* en islotes primarios y la conexión progresiva de modificaciones epigenéticas en genes clave para el desarrollo de la diabetes (170).

Por lo que no podemos descartar algún mecanismo similar al que obtuvieron en el trabajo de Park y Arantes sobre la disminución en los niveles de Pdx.1 durante el periodo postnatal podemos nosotros suponer que otros mecanismos existentes sobre la regulación de Pdx.1 podrían estar manteniendo su función en este trabajo, a diferencia los resultados obtenidos en el trabajo de Park: una nula expresión de Pdx.1 en ratas adultas.

Posiblemente otro mecanismo que pudiera estar involucrado en el medio intrauterino hiperglucémico como sería el inducido por un estrés oxidativo y en consecuencia una glucotoxicidad y lipotoxicidad.

Los islotes son de los pocos tejidos dotados con la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SUD1, SUD2) catalasa, y glutatióna peroxidasa (GPx). Varios estudios sugieren que la lipotoxicidad y glucotoxicidad están interrelacionadas en alterar la habilidad de unión de Pdx.1 al promotor del gen de insulina (171).

En condiciones de hiperglucemia gradualmente se altera la función celular β . El estrés oxidativo está relacionado con la disminución en la expresión del gen de insulina y se ha demostrado que la actividad de Pdx-1 se ve reducida. La prolongada exposición y concentraciones excesivas de ácidos grasos también inducen una disminución en la actividad de unión a DNA de Pdx-1 y la expresión celular de MafA. Las células β son más vulnerables al estrés oxidativo debido a la baja expresión de enzimas antioxidantes (172).

Otro reporte sobre la alteración en la expresión de Pdx.1 en la vida postnatal sugiere diversas consecuencias en la proliferación de células β como un incremento en la apoptosis de células β vía disminución en la regulación de genes antiapoptóticos (Bcl y Bcl-2) resultando una pérdida de masa celular y funcional, pérdida de la actividad de genes clave para Pdx-1 cuyos productos están involucrados en la transcripción y secreción de insulina estimulada por glucosa (GLUT2, glucocinasa, MafA, Nkx6.1, insulina) y pérdida en la formación de nuevas células (regeneración) (173).

En la diabetes materna, el páncreas en desarrollo se expone a diversos mecanismos que son consecuencia del propio metabolismo alterado induciendo alteraciones permanentes en el propio desarrollo del feto, como lo demostramos por la alta incidencia de reabsorciones y la presencia de una malformación congénita y la muerte de las crías. Por lo que un mecanismo o mecanismos durante el periodo embrionario podrían estar relacionados con una disminución en la expresión de Pdx.1 en islotes de fetos y crías de madres diabéticas.

Diversos mecanismos estarían induciendo las alteraciones que nosotros observamos durante el periodo postnatal, observando una disminución en la expresión y función de Pdx-1 en islotes de crías de madres diabéticas, induciendo una alteración en la síntesis de insulina y GLUT2, como lo demostramos en nuestros resultados sobre la disminución de estas proteínas en los tiempos postnatales analizados.

El papel de Pdx-1 en la función del islote en el adulto no está completamente definida. En un estudio en ratones con un alelo inactivado (Pdx-1^{+/-}) reportaron que existe una respuesta alterada a la glucosa a las 8 semanas, una disminución en la secreción de insulina, el contenido pancreático de glucagon se incrementó en 29 % mientras el contenido de amilina se redujo en 32% (174). La evaluación inmunohistoquímica del páncreas de 16-18 semanas de ratones Pdx-1^{+/-} reveló una morfología normal y una relación normal de células α , β y δ , sin embargo la expresión de GLUT2 se redujo de manera drástica comparada con los islotes silvestres. Los resultados de este trabajo indican que Pdx-1 es requerido para la función normal del islote y que una modesta reducción en Pdx-1 altera la sensibilidad a glucosa y la secreción de insulina (174).

La expresión de Pdx-1 y GLUT2 se redujo por cerca de 68 y 55% respectivamente comparado con el tipo silvestre, mientras la expresión de GK estuvo sin cambio relativo sugiriendo que los genes regulados por Pdx-1 tienen una sensibilidad diferencial en el nivel de actividad de Pdx-1, lo que indica que la menor reducción relativa en Pdx-1, aunque no causa diabetes, puede incrementar su susceptibilidad y representaría un riesgo significativo para padecer diabetes tipo 2 (174).

Los resultados de este reporte se relacionan con los que obtuvimos en las crías de madres diabéticas a los 90 días de edad. Los niveles reducidos de IOD de GLUT2 nos demuestran que la regulación de GLUT2 por Pdx.1 es más sensible al papel regulador de Pdx.1 en su promotor, que esta proteína en el promotor de la insulina. Basados en estos hallazgos, nosotros podemos deducir que diferentes activadores y reguladores transcripcionales podrían estar jugando un papel compensatorio en este periodo de tiempo, recordemos que, el promotor del gen de la

insulina presenta diferentes regiones de unión a una gran diversidad de activadores y aumentadores y no sería raro que estén implicados en el mantenimiento de la producción de insulina en las células β , como el caso de MafA y NeuroD1.

MafA es un activador transcripcional exclusivo de las células β , presente a partir de la transición secundaria en el desarrollo del páncreas, capaz de inducir la expresión del RNAm del gen de insulina 2. MafA, Pdx.1 y NeuroD1 (176) actúan juntos para activar la transcripción endógena de genes clave tales como insulina, GLUT2 y PC2 (prohormona convertasa 2) indicando que MafA es un regulador de la transcripción de insulina y GLUT2 en células β (175). En embriones de pollo, MafA induce la activación del gen de insulina, la coexpresión de Ngn3 y MafA forman estructuras tipo islote con células productoras de insulina en el centro y productoras de glucagon en la periferia. La coelectroporación de MafA y MafB no se presenta un aumento en la producción de células de insulina más que MafA por sí sólo (176).

Durante el desarrollo del páncreas una vía de señalización puede servir para dos cosas distintas dependiendo del tiempo, y la dosis de señal (40).

Por tanto no sería raro que en la propia regulación de la síntesis de insulina en periodos postnatales y en la edad adulta, diferentes factores de transcripción estén regulando o compensando el papel de otros factores que han sido alterados por un medio anormal durante el desarrollo, como sería el caso de la diabetes materna. Es necesaria la comprensión sobre la regulación precisa espacio-temporal y específica-celular de complejos transcripcionales activadores-represores que actúan en diferentes regiones reguladoras en el gen de Pdx.1 (156) y para determinar si la forma de 31 kDa es idéntica a las proteínas observadas en otras células de mamíferos y si esta forma proteolítica tiene un papel en la función celular β .

Mientras la glucosa materna es libremente transferida hacia el feto, la insulina materna no cruza la placenta. El páncreas en desarrollo responde a la carga de glucosa produciendo insulina para ejercer sus efectos hipoglucémicos (177). Así la glucosa regula la transcripción y traducción de preproinsulina y estabiliza el RNAm de preproinsulina (169).

La hipoinsulinemia fetal ha sido involucrada en el retardo del crecimiento fetal. La insulina es conocida como ser un factor importante de crecimiento y la IGF-I e IGF-II también tiene papeles de crecimiento fetal y se ven disminuidos en modelos con retardo en el crecimiento (168, 178). En células β adultas, se demostró que la insulina tiene potentes efectos antiapoptóticos (179) estimulando la actividad de unión DNA/Pdx-1, sugiriendo que la translocación de Pdx-1 es un evento clave en la señalización antiapoptótica de la insulina, reforzando un mecanismo autocrino en la propia célula β .

Estos resultados se pueden correlacionar con los resultados obtenidos en fetos de 21 días y crías recién nacidas, el retardo en el crecimiento (bajo peso y talla) en crías de madres diabéticas podría estar involucrado la disminución de la síntesis de insulina en los islotes de estos páncreas alterando el crecimiento fetal-pancreático (Gráfica 14) y los efectos hipoglucémicos en estos. Otros combustibles, incluyendo ácido grasos libres, cuerpos cetónicos y aminoácidos, también contribuyen a la hipersecreción de la insulina fetal (161, 177).

En las células β , GLUT2 parece ser un abastecedor sin restricciones del metabolismo de glucosa mientras que la glucocinasa es el paso de tasa limitante para el flujo glucolítico. Por lo que GLUT2 puede definirse como un eficiente estimulante de la transcripción de genes sensibles a glucosa además de ser un receptor a glucosa (180).

En roedores con diabetes con STZ se incrementa la expresión de GLUT2 en el intestino e hígado y se ha encontrado una reducción en su expresión en el páncreas y en hígado de animales con restricción nutricional (108, 180). La inactivación de GLUT2 en ratones provoca una severa glucosuria y a diferencia de los humanos es letal después del destete (180).

Pocos trabajos reportan la función de GLUT2 y su presencia durante el desarrollo del páncreas, escasos experimentos sobre la funcionalidad de estos transportadores durante la vida fetal, se ha demostrado que su expresión y la de canales iónicos está disminuida en páncreas fetal, por lo que los sistemas de transducción que operan y estimulan la secreción en la célula β en el estado de desarrollo son desconocidos y se ha propuesto que las vías de señalización en páncreas fetal puede ser por medio de una vía independiente a la permeabilidad de K^+ (165).

A diferencia de lo reportado en la literatura nosotros encontramos células positivas a GLUT2 desde el día 17 de gestación en fetos tanto en madres sanas como diabéticas, aunque fue mayor la inmunopositividad en el páncreas del LE, desconocemos cuál es el mecanismo real que ocasione ésto en células pre-ductales. Conforme progresó el desarrollo nosotros encontramos células positivas a GLUT2 en agrupaciones tipo islote en fetos de 21 días, aunque una marcada reducción se observó en fetos de madres diabéticas. Suponiendo que para este tiempo las células β cuentan con la maquinaria necesaria para la secreción de insulina y con los datos obtenidos con la IOD de Pdx.1 podemos deducir que el ambiente hiperglucémico alteró la proliferación y diferenciación de estas células en este tiempo, ocasionando una disminución de estas células para los tiempos postnatales y una marcada reducción en crías de 90 días de madres diabéticas lo que nos permite considerar que prosiguió este daño.

Aunque los niveles de insulina no se vieron afectados por la reducción de GLUT2 en islotes de 90 días de edad, nosotros creemos que no es dependiente de la cantidad de transportadores de glucosa, ésto podría deberse a la K_m de este transportador es decir, a la capacidad de transporte de glucosa que puede alcanzar; como se ha demostrado en ratas nulas de GLUT2 en quienes la secreción de insulina fue rescatada por la expresión del 20% del nivel normal de GLUT2 en islotes de rata (174).

Los estudios en animales, también han mostrado que el tiempo y la naturaleza exacta del daño durante la gestación son determinantes importantes del patrón de crecimiento intrauterino y de consecuencias específicas fisiológicas. Juntos, los experimentos en animales y los datos epidemiológicos en humanos muestran que un rango global de tejidos individuales, órganos y sistemas completos pueden ser programados *in utero* con consecuencias adversas para su función fisiológica en la vida adulta. (181).

El desarrollo y crecimiento fetal dependen primeramente del abastecimiento de nutrientes y oxígeno. Se han utilizado técnicas para reducir la disponibilidad fetal de macronutrientes, éstos incluyen restricción calórica, deprivación isocalórica proteica, restricción placentaria, y reducciones en el flujo sanguíneo umbilical e uterino. Todos estos procedimientos alteran el crecimiento fetal y originan anomalías en la función cardiovascular, metabólica y endocrina antes y después del nacimiento (181, 182).

Modificaciones epigenéticas son inducidas por factores ambientales y afectan la estructura y función del DNA más que a su secuencia (160). Por lo que un ambiente hiperglucémico con alto estrés oxidativo como en la rata gestante diabética potencialmente juega un papel en la programación fetal y la transmisión de una tendencia diabetogénica a la siguiente generación a través de alteraciones permanentes en DNA y daño tisular en los fetos en desarrollo, en particular en el tejido endocrino del páncreas (143, 160, 184).

VIII. CONCLUSIONES

La diabetes materna ocasiona múltiples efectos sobre el mantenimiento y desarrollo de los productos durante la gestación y después del nacimiento. La madre durante la gestación presenta un aumento en su estado catabólico evidenciado por la pérdida de peso y los altos niveles de glucosa ocasionando un incremento en la presencia de reabsorciones y un periodo de gestación prolongado.

La hiperglucemia materna afecta el desarrollo del páncreas fetal produciendo un retardo en su morfogénesis alterando la producción de Pdx.1, insulina y GLUT2 en el epitelio pre-ductal a los 17 días de gestación.

-Induce una disminución en la producción de Pdx.1, insulina y GLUT2 en agrupaciones tipo islote a los 21 días de gestación disminuyendo la masa celular β formando islotes de menor tamaño.

-Estas alteraciones producidas *in utero* se reflejan a los 20 días de edad, las crías de madres diabéticas presentan una disminución en la producción de Pdx.1, de insulina y GLUT2 en las células β , siendo menor el tamaño del islote y la masa celular β .

-A los 28 días esta disminución continuó sobre la producción de Pdx.1 y GLUT2 e insulina y en la edad adulta (90 días), no se presentó diferencia en la producción de Pdx.1 aunque sí una disminución en la producción de insulina y una disminución drástica de GLUT2 y en la masa celular β .

Por lo que podemos concluir que la diabetes materna ocasiona alteraciones *in utero* que afectan la diferenciación del islote durante el desarrollo fetal, produciendo en las crías alteraciones metabólicas (pre-diabéticas) como consecuencia de la producción alterada de proteínas clave (Pdx.1, insulina y GLUT2) en la homeostasis de la glucosa. A pesar de presentar una reducción en la masa celular β las crías de madres diabéticas compensan esta pérdida en función con mecanismos de remodelación y proliferación celular durante la vida postnatal.

IX. LITERATURA CITADA.

1. Islas Andrade S. A, Revilla Monsalve María Cristina. Diabetes Mellitus. 3ª ed. México, McGraw-Hill Interamericana, 2005: 500 pp.
2. Sheetz M.J. King L. George. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. JAMA, 2002. Vol. 27(20): 2579-2588.
3. Rosas Guzmán Juan, Vázquez Chaves Cuauthémoc. Complicaciones microvasculares en la Diabetes mellitus tipo 2. Revista de Endocrinología y Nutrición, 2004. Vol. 12 (2) Supl. 1: S31- S44.
4. International Diabetes Federation: <http://www.eatlas.idf.org/media>
5. Villalpando Salvador, Shamah-Levy Teresa, Rojas Rosalba, Aguilar-Salinas A. Carlos. Trends for type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors in Mexico from 1993-2006. 2010. Salud pública de México. Vol. 52 suplemento 1. S72-S79.
6. Mensaje del Dr. José Ángel Córdoba Villalobos durante la ceremonia de inauguración del XXIII Congreso Nacional de Diabetes, Boca del Río, Veracruz, México. 17 de Marzo del 2011.
7. Kumate Jesús. Diagnóstico oportuno Prediabético, II Congreso Internacional de Especialidades Médicas. Bol. de Prensa No. 460. IMSS. Sábado 6 de Septiembre del 2003.
8. American Diabetes Association. 2008. Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. Diabetes Care, Vol. 31, Suppl 1: S55 - S60.
9. Boletín UNAM-DGCS-718. En aumento la Diabetes tipo II en niños. 15 de Noviembre del 2008. Ciudad Universitaria, México D.F.
10. Setji I. Tracy, Brown J. Ana and Feinglos N. Mark. Gestational Diabetes Mellitus. Clinical Diabetes, 2005. Vol. 23(1): 17-24.
11. Buchanan A. Thomas, Xiang Anny, Kjos L. Siri and Watanabe Richard. 2007. What is Gestational Diabetes? Diabetes Care, Vol. 30 Suppl 2: S105- S109.
12. Barbour A. Linda, McCurdy E.. Carrie, Hernandez L. Teri, Kirwan P. John, Catalano M. Patrick and Friedman E. Jacob. 2007. Cellular Mechanisms for insulin resistance in Normal Pregnancy and Gestational Diabetes. Diabetes Care, Vol. 30, suppl 2: S112-S119.
13. Ferrara Assiamira, 2007. Increasing prevalence of gestational Diabetes mellitus. A public Health perspective. Diabetes Care, Vol. 30 (Suppl. 2): S141-S146.
14. García García Carlos. 2008. Diabetes mellitus gestacional. Med Int Mex. Vol. 24(2): 148-156.
15. Journal Mex Periodistas de México: <http://journalmex.wordpress.com/2008/10/25/diabetes-gestacional-eleva-riesgo-de-enfermedades-cronicas/>
16. Dabelea Dana, Snell- Bergeon K. Janet, Hartsfield L. Cynthia, Bischoff J. Kimberly, Hamman F. Richard and McDuffie S. Robert. 2005. Increasing Prevalence of Gestational Diabetes mellitus (GDM) over time and by Birth Cohort. Diabetes Care, Vol. 28: 579- 584.

17. Torres-García Ma. P., Sosa Rodríguez T. Aparato Digestivo. In Atlas de Histología de Vertebrados, Estrada Flores E. Uribe Aránzabal M.C. Eds. 2002. Coordinación de Servicios Editoriales, Fac. de Ciencias. UNAM. pág: 76-78.
18. Hadley E. Mac. Endocrinology. Fourth Edition. 1996. Prentice Hall. Inc. USA pag: 231-254.
19. Clark A. Morphology of the pancreas in normal and Diabetic states. Chapter 5. *In* International Textbook of Diabetes. DeFronzo A. Ralph, Ferrannini Ele, Keen Harry, Zimmet Paul (eds). Third Edition. 2004. Volume one. Jhon Wiley & Sons. Ltd. NJ, USA.
20. Norris O. David. Vertebrate Endocrinology. Third Edition 1997. Academic Press Inc. USA. pag: 506-535.
21. Norman W. Anthony. Hormones. Second Edition. 1997. Academic Press. USA. pag: 193-226.
22. Slack J.M.N. Developmental Biology of the Pancreas. *Development*, 1995. Vol 121:1569-1580.
23. Rivas Manzano Patricia. Sistema Endocrino. *In* Atlas de Histología de Vertebrados, Estrada Flores E., Uribe Aranzábal M.C. Eds. 2002. Coordinación de Servicios Editoriales, Fac. de Ciencias, UNAM. pág. 176-177.
24. Elayat Ahmed, El-Naggar M. Mostafa and Tahir Mohamed. An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J. Anat.* 1995. Vol. 186: 629-637.
25. Wierup N. Yang S., McEvelly R.J. Mulder H., and Sundler F. Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in the Developing rats islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2004.Vol. 52(3): 301-310.
26. Kojima Masayasu, Hosoda Hiroshi, Date Yukari, Nakazato Masamitsu, Matsuo Hisayuki and Kangawa Kenji. Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptid from stomach. *Nature*. 1999. Vol. 402: 656- 660.
27. Suckale Jakob and Solimena Michele. 2008. Pancreas islets in metabolic signaling – focus on the β -cell
Frontiers in Bioscience, Vol. 13: 7156-7171.
28. Wilson E. Maria, Scheel David and German S. Michael. 2003. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mechanisms of Development*, Vol. 120: 65-80.
29. Wells J., Melton D. Vertebrate Endoderm Development. *Annual Review Cell Developmental Biology*. 1999. Vol. 15: 393-410.
30. Hebrok M. Hedgehog signaling in pancreas development. *Mechanisms of Development*, 2003. Vol. 120:45-57.
31. Murtaugh L. Charles. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. 2007. *Development*, Vol. 134: 427-438.
32. Edlund Helena. *Developmental Biology of the Pancreas*. *Diabetes*, 2001. Vol. 50: 55-59.
33. Servitja J.M. and Ferrer J. 2004. Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia*, Vol. 47: 597-613.

34. Jensen Jan. 2004. Gene regulatory factors in pancreatic development. *Developmental Dynamics*, Vol. 229: 176-200.
35. Gittes K. George. *Developmental Biology of pancreas: A comprehensive review*. *Developmental Biology*. 2009. Vol. 326: 4-35.
36. Gu Guoqiang, Wells M. James, Dombkowski David, Preffer Fred, Aronow Bruce and Melton Douglas. 2004. Global expression analysis of gene regulatory pathways during endocrine pancreatic development. *Development*, Vol. 131: 165-179.
37. Kim K. Seung and Hebrok Matthias. , 2001. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes & Development* Vol. 15: 111-127.
38. Kim K. Seung and Mc Donald J.R. 2002. Signaling and Transcriptional control of Pancreatic Organogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*. Vol. 12: 540-547.
39. Duncan S.A. The pancreas and its heartless beginnings. *Nature Genetics*, 2001. Vol. 27: 355-356.
40. Ackerman M., Amanda and Ganhon Maureen. 2007. Molecular regulation of pancreatic β -cell mass development, maintenance and expansion. *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol. 38: 193-206.
41. Zhou Qiao, Law C. Anica, Rajagopal Jayaraj, Anderson J. William, Gray A. Paul and Melton A. Douglas. 2007. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Developmental Cell*, Vol. 13: 103-114.
42. Grappin-Bottom Anne, Majithia R. Amit and Melton A. Douglas. 2001. Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expresión of pancreatic regulatory genes. *Genes & Development*, Vol. 15: 444-454.
43. Rawdon B. Benjamin. Early Development of the gut: New light and old hypothesis. *Cell Biology International*, 2001. Vol. 25(1): 9-15.
44. Edlund Helena. 1999. Pancreas: How to get there from gut? *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 11:663-668.
45. Schwitzgebel M. Valerie. 2001. Programming of the pancreas. *Molecular and cellular Endocrinology*, Vol. 185: 99-108.
46. Cleaver Ondine and Krieg A. Paul. Notochord Patterning of the Endoderm. *Developmental Biology*, 2001. Vol. 234: 1-12.
47. McLin A. Valerie and Zorn M. Aaron. 2003. Organogenesis: Making Pancreas from liver. *Current Biology*, Vol. 13: R96-R98.
48. Hill J David and Duvillie Bertrand 2000. Pancreatic Development and adult diabetes. *Pediatric Research*, Vol. 48(3):269-274.
49. Habener F. Joel, Kemp M. Daniel and Thomas K. Melissa. Transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology*, 2005. Vol. 146(3): 1025-1034.
50. Oliver-Krasinski M. Jennifer and Stoffers A. Doris. On the Origin of the B cell. 2008. *Genes & Development*, Vol. 22: 1998-2021.

51. Herrera Pedro Luis. 2000. Adult insulin and glucagon producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development*. Vol. 127: 2317-2322.
52. Puri Sapna, Hebrok Matthias. Cellular Plasticity within the Pancreas – Lessons learned from development. *Developmental Cell*. 2010. Vol. 18: 342- 356.
53. Böck Peter, Abdel - Moneim Mohammed and Egerbacher Monika. Development of Pancreas. *Microscopy Research and Technique*, 1997. Vol. 37: 374 - 383.
54. Madsen Dragsbaek Ole, Jensen Jan, Blume Niels, Petersen V. Helle, Lund Kare, Karlsen Christina, Andersen G. Frank, Jensen B. Per, Larsson Larse-Inge and Serup Palle. 1996. Pancreatic development and maturation of islet β cell. Studies of pluripotent islets cultures. *Eur. J. Biochem*, Vol. 242:435-445.
55. Miralles F., Czernichov P., Scharfman R. Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development*, 1998. Vol. 125: 1017-1024.
56. Larsson I.L. On the Development of the islets of Langerhans. *Micros. Research Tech.* 1998. Vol. 43: 284-291.
57. Percival Anja C., Slack M.W. Jonathan. Analysis of pancreatic Development using a cell lineage label. *Experimental Cell Research*, 1999. Vol. 247: 123-132.
58. Scharfmann R. 2000. Control of early development of the pancreas in rodents and humans: implications of signals from the mesenchyme. *Diabetologia*, . Vol. 43: 1083 - 1092.
59. Soria B., Skoudy A., Martín F. 2001. From stem cells to beta cells: New strategies in the cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia*, . Vol. 44: 407-415.
60. Jiang Fang-Xu, Cram S. David, DeAizpurua J. Henry and Harrison C. Leonard. 1999. Laminin 1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic B-cells. *Diabetes*, . Vol. 48: 722- 730.
61. Lammert E., Cleaver O., Melton D. Role of endothelial cells in Early pancreas and liver development. *Mechanisms of Development*, 2003. Vol. 120: 50-64.
62. Serup Palle and Nelsen Hoiriis Jens. Development and Life Cycle of the β cell. Chapter 4. *In International Textbook of Diabetes*. DeFronzo A. Ralph, Ferrannini Ele, Keen Harry, Zimmet Paul (eds). Third Edition. 2004. Volume one. Jhon Wiley & Sons. Ltd. NJ, USA.
63. Miralles F., Czernichov P., Scharfman R. Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development*, 1998. Vol. 125: 1017-1024.
64. Hue-Lee Cheng Kaung. Growth Dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. 1994. *Developmental Dynamics*, Vol. 200: 163-175.
65. Bonner-Weir S. 2000. Perspective: Postnatal pancreatic β -cell growth. *Endocrinology*. Vol. 138(4): 1736-1741.
66. Brennand Kristen, Huangfu Danwei and Melton Doug. 2007. All β cells contributes equally to islet growth and maintenance. *Plos Biology*, Vol. 5(7): e163.
67. Edlund Helena. 1998. Transcribing Pancreas. *Diabetes*, 47: 1817-1823.

68. Bonal Claire and Herrera L. Pedro. 2008. Genes controlling pancreas ontogeny. *The International Journal of Developmental Biology*, Vol. 52: 823-835.
69. Jørgensen Mette Christine, Ahnfelt-Rønne Jonas, Hald Jacob, Madsen D. Ole, Serup Palle and Hecksher-Sørensen Jacob. 2007. An Illustrated review of early pancreas development in the Mouse. *Endocrine Reviews*. Vol. 28: 685-705.
70. Gradwohl Gérard, Dierich Andrée, LeMeur Marianne and Guillemot François. 2000. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *PNAS*, Vol. 97(4): 1607-1611.
71. Dohrmann Cord, Gruss Meter and Lemaire Lydia. 2000. Pax Genes and the differentiate endocrine cells hormones products in the pancreas. *Mechanisms of Development*. 92:47-54.
72. Lang Deborah, Powell K. Sara, Plummer S. Rebecca, Young P. Kacey and Ruggeri A. Bruce. 2007. PAX genes: Roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 73: 1-14.
73. St-Onge Luc, Sosa-Pineda Beatriz, Chodhury Kamal, Mansouri Ahmed and Gruss Peter. 1997. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing α -cell in mouse pancreas. *Nature*, Vol. 386: 403-406.
74. Sosa-Pineda Beatriz. 2004. Pax4 gene is a essential regulator of the development pancreatic β cell. *Molecules and Cells*, 18(3): 289-294.
75. Sosa Pineda Beatriz, Chowdhury Kamal, Torres Miguel, Oliver Guillermo and Gruss Peter. 1997. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing β cells in the mammalian pancreas. *Nature*, Vol. 386: 399-402.
76. Smith B. Stuart, EE C. Hooi, Connors R. Jennifer and German S. Michael. 1999. Paired-homeodomain transcription factor PAX4 acts a transcriptional repressor in early pancreatic Development. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 19 (12): 8272-8280.
77. Wang Qian, Elghazi Lynda, Martin Sophie, Martins Isabelle, Srinivasan Satish R., Geng Xin, Sleeman Mark, Collombat Patrick, Houghton Janet and Sosa-Pineda Beatriz. 2008. Ghrelin is a novel target of Pax4 in endocrine progenitors of pancreas and duodenum. *Developmental Dynamics*, Vol. 237: 51-61.
78. Collombat Patrick, Mansouri Ahmed, Heckser-Sørensen, Serup Palle, Krull Jens, Gradwohl Gerard and Gruss Peter. 2003. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes and Development*, Vol. 17: 2591-2603.
79. Liew Chee Gee, Shah N. Nadia, Briston J. Sarah, Shepherd M. Ruth, Khoo Peen Cheen, Dunne J. Mark, Moore D. Harry, Cosgrove E. Karen and Andrews W. Peter. PAX4 Enhances beta-cell differentiation of human embryonic stem cells. 2008. *PLoS One*, Vol. 3(3): e1783.
80. Brink Cristopher, Chowdhury Kamal y Gruss Peter. 2001. Pax4 regulatory elements mediates beta cells especific expression in the pancreas. *Mechanisms of Development*, Vol. 100: 37-43.
81. Brun Thierry and Gauthier R. Benoit, 2008. A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet β -cell expansion and survival in health and disease. *Journal of Molecular Endocrinology*. 40: 37-45.

82. Collombat Patrick, Xu Xiaobo, Ravassard Philippe, Sosa-Pineda Beatriz, Dussaud Sébastien, Billestrup Nils, Madsen D. Ole, Serup Palle, Heimberg Harry and Mansouri Ahmed. 2009. The Ectopic Expression of *Pax4* in the mouse pancreas converts progenitor cells into α and subsequently β cells. *Cell*, Vol. 138: 449-462.
83. Yoshihara Sei-Ichi, Omichi Kayo, Yanazawa Masako, Kitamura Kunio and Yoshihara Yoshihiro. 2005. *Arx* homeobox gene is essential for development of mouse olfactory system. *Development*, Vol. 132: 751-762.
84. Biressi S, Messina G, Collombat P, Tagliafico E, Monteverde S, Benedetti L, Cusella de Angelis MG, Mnasouri A, Ferrari S, Tajbakhsh S, Broccoli V y Cossu G. 2008. The homeobox gene *Arx* is a novel positive regulator of embryonic myogenesis. *Cell Death and Differentiation*, Vol. 15: 94-104.
85. Collombat Patrick, Hecksher-Sørensen Jacob, Broccoli Vania, Krull Jens, Ponte Ilaria, Mundiger Tabea, Smith Julian, Gruss Peter, Serup Palle and Mansouri Ahmed. 2005. The simultaneous loss of *Arx* and *Pax4* genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the α - and β - cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development*, Vol. 132: 2969-2980.
86. Prado, C. L., Pugh-Bernard, A. E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B. and Sussel, L. 2004. Ghrelin cells replace insulin-producing β cells in two mouse models of pancreas development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 101, 4679-4684.
87. Matsuoka Taka-aki, Artner Isabella, Henderson Eva, Means Anna, Sander Maike and Stein Roland. 2004. The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *PNAS*, Vol. 101(9): 2930-2933.
88. Seymour A. Philip and Sander Maike. 2011. Historical Perspective: Beginnings of the β -Cell. Current perspectives in the β -Cell development. *Diabetes*, Vol. 60:364-376.
89. Hui Hongxiang and Perfetti Ricardo. 2002. The Pancreatic duodenum Homeobox 1 (*PDX-1*) regulated of pancreas development during of embryogenesis and the cellular function of the islet on adults. *European Journal of Endocrinology*, 146:129-141.
90. Liberzon Arthur, Ridner Gabriela and Walter D. Michael. 2004. Role of intrinsic DNA binding specificity in defining target genes of the mammalian transcription factor *PDX1*. *Nucleic Acids Researchs*, Vol. 32(1): 54-64.
91. Melloul Danielle. 2004. Transcription factors in the islets development and Physiology: Role of *Pdx-1* in beta cell function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Vol. 1014: 28-37.
92. Keller M. David, McWeeney Shannon, Arsenlis Athanasios, Drouin Jacques, Wright V.E. Christopher, Wang Haiyan, Wolheim B. Claes, White Peter, Kaestner H. Klaus and Goodman H. Richard. 2007. Characterization of pancreatic transcription Factor *Pdx-1* binding sites using promoter microarray and serial analysis of chromatin occupancy. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282(4): 32084-32092.
93. Waeber Gerard, Thompson Nancy, Nicod Pascal and Bonny Christophe. 1996. Transcriptional Activation of the *GLUT2* gene by the *IPF-1/STF-1/IDX-1* Homeobox Factor. *Molecular Endocrinology*. Vol. 10: 1327-1334.
94. Bonny C, Thompson N, Nicod P, Waeber G. 1995. Pancreatic-specific expression of the glucose transporter type 2 gene: identification of cis-elements and islet-specific transacting factors. *Molecular Endocrinology*, 9: 1413-1426.

95. Ebberink R.H.M, Smith A.B. and Van Minnen J. 1989. The insulin Family: Evolution of structure and function in vertebrates and invertebrates. *Biol. Bull.* Vol: 177: 176-182.
96. Joshi R. Shashank, Parikh M. Rakesh and Das A.K. 2007. Insulin –History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology. Supplement of JAPI, Vol. 55:19-27.
97. Shiao Men-Shin, Liao Ben-Yang, Long Manyuan and Yu Hon-Tsen. 2008. Adaptive Evolution of the Insulin Two-Gene System in Mouse. *Genetics*, Vol. 178: 1683-1691.
98. Clark A. Morphology of the pancreas in normal and Diabetic states. Chapter 5. *In International Textbook of Diabetes.* DeFronzo A. Ralph, Ferrannini Ele, Keen Harry, Zimmet Paul (eds). Third Edition. 2004. Volume one. Jhon Wiley & Sons. Ltd. NJ, USA.
99. Beta Cell Biology Consortium Artículo1:<http://www.betacell.org/content/articles/print.php?aid=1>
100. Saltiel R. Alan. 1996. Diverse signalling pathways in the cellular actions of insulin. *Endocrinol. Metab.* . Vol. 33: E375-E385.
101. Eliasson Lena, Abdulkader Fernando, Braun Matthias, Galvanovskis Juris, Hoppa B. Michael and Rorsman Patrik. 2008. Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *The Journal Physiology*. Vol. 586 (14): 3313-3324.
102. Rutter A. Guy, Tavaré M. Jeremy and Palmer D. Gail. 2000. Regulation of Mammalian gene expression by glucose. *News Physiol. Sci.* Vol. 15: 149-154.
103. Hiriart Marcia and Aguilar-Bryan Lydia. 2008. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic β cell. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* Vol. 295: E1298-E1306.
104. Ohara-Imaizumi Mica, Fujiwara Tomonori, Nakamichi Yoro, Okamura Tadashi, Akimoto Yoshihiro, Kawai Junko, Matsushima Satsuki, Kawakami Hayato, Watanabe Takashi, Akagawa Kimio and Nagamatsu Shinya. 2007. Imaging analysis reveals mechanistic differences between first- and second-phase insulin exocytosis. *The Journal Cell Biology*. Vol. 177(4): 695-705.
105. Hinke A. Simon, Hellemans Karine and Schuit Frans. Plasticity of the B cell insulin secretory competence: preparing the pancreatic B cell for the next meal. *Journal of Physiology*, 2004.Vol. 558 (2): 369-380.
106. Zhao Feng-QI and Keating F. Aileen. 2007. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *Current Genomics*, Vol. 8: 113-128.
107. Scheepers Andrea, Joost Hans-Georg and Schürmann Annette. 2004. The Glucose transporter familias SGLT1 and GLUT: Molecular Basis of normal and aberrant function. *Journal and Parental and Enteral Nutrition*. Vol. 28(5): 364-372.
108. Manolescu R. Andrei, Witkowska Kate, Kinnaird Adam, Cessford Tara and Cheeseman Chris. 2007. Facilitated Hexose transporters: New perspectives on form and function. *Physiology*, Vol. 22: 234-240.
109. Uldry Marc, Ibberson Mark, Hosokawa Masaya and Thorens Bernard. 2002. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Letter*, Vol. 524: 199-203.

110. Waeber Gerard, Thompson Nancy, Haefliger Jacques-Antoine, and Nicod Pascal. 1994. Characterization of the murine High Km glucose transporter GLUT2 gene and its transcriptional Regulation by glucose in a Differentiated insulin-secreting cell-line. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 269 (43): 26912-26919.
111. Hugues Hernandorena Beatriz, Rodríguez González Julio César y Rodríguez García Julio César. Animales de Laboratorio en la Endocrinología: Biomodelos de la Diabetes mellitus tipo 1. Rev. Cubana Endocrinol. 2001. Vol. 12(3): 168-177.
112. Vuguin M. Patricia. 2006. Animal Models for small gestational age and fetal programming of adult disease. Hormone Research, Vol. 68: 113-123.
113. Hugues Hernandorena Beatriz, Rodríguez González Julio César, Rodríguez García Julio César y Marrero R. Ma. Teresa. Animales de Experimentación como modelos de la Diabetes tipo 2. Rev. Cubana Endocrinol. 2002. Vol. 13(2): 160-168.
114. Batell L. Mary, Yuen G. Violet, Verma Subodh, and McNeill H. John. Other models of Type I Diabetes. In Experimental models in Diabetes. Eds. McNeill J. Ed. 1999. CRC Press. USA. Pag: 219 – 229
115. JAX® Research Models for Diabetes & Obesity Research at jaxmice.jax.org/models/diabetes_obesity
116. Rodriguez B., Poucheret P., Battel M.L. Mc. and Neill J. Streptozotocin - Induced diabetes Induction mechanism (s) and dose dependency. In experimental Model in Diabetes; Mc Neill J. Ed. 1999. CRC Press. USA. pag 3-17.
117. Lenzen S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin –induced diabetes. 2008. Diabetologia, Vol. 51: 216-226.
118. Bolzán Alejandro, and Bianchi S. Martha. Genotoxicity of Streptozotocin. Mutation Research, 2002. Vol. 512: 121-134.
119. Kalter Harold. Reproductive Toxicology in animals with induced and spontaneous Diabetes. Reproductive Toxicology, 1996. Vol. 10(6): 417-438.
120. McIntosh H.S. Christopher, Pederson R.A. No insulin Dependent Animal Model of Diabetes mellitus. In: Experimental Models of Diabetes. Eds. John H. McNeill, 1999. CRC Press LLC, Flor. USA. Pag: 338-398.
121. Elsner M., Guldbakke B., Tiedge M., Munday R. and Lenzen S. 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. Diabetologia, Vol. 43: 1528-1533.
122. Takasu N. Komiya I., Asawa T., Nagasawa Y., Yamada T. Streptozotocin and Alloxan - Induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. Diabetes, 1991. Vol. 40: 1141-1145.
123. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol. Res. 2001. Vol. 50: 536-546.
124. Burns Nicole and Gold Barry. 2007. The effect of 3-methyladenine DNA glycosylase-mediates DNA repair on the induction of toxicity and diabetes by the β -cell toxicant streptozotocin. Toxicological Sciences, Vol. 95(2): 391-400.

125. Beneke Sascha and Bürkie Alexander. 2007. Poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian ageing. *Nucleic Acids Research*, Vol. 35(22):7456-7465.
126. Miwa Masanao and Masutani Mitsuko. 2007. PolyADP-ribosylation and cancer. *Cancer Science*, Vol. 98(10): 1528-1535.
127. Andrabi A. Shaida, Kim No Soo, Yu Seong-Woon, Wang Hongmin, Koh W. David, Sasaki Masayuki, Klaus A. Judith, Otsuka Takashi, Zhang Zhizheng, Koehler C. Raymond, Hurn D. Patricia, Poirier G. Guy, Dawson L. Valina and Dawson M. Ted. 2006. Poly(ADP-ribose) PAR polymer is a death signal. *PNAS*, Vol. 103(48): 18308-18313.
128. Zong Wei-Xing and Thompson B. Craig. 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes & Development*, Vol. 20: 1-15.
129. Polanco Ponce A. Cecilia, Revilla Monsalve M. Cristina, Palomino Garibay Miguel Angel, Islas Andrade Sergio. 2005. Efecto de la Diabetes materna sobre el desarrollo fetal de humanos y ratas. *Ginecol. Obstet. Mex.* Vol. 73: 544-552.
130. Eriksson J. Ulf Andersson Arne, Efendic Suad, Elde Robert and Hellerström Claes. 1980. Diabetes in pregnancy: effects on the foetal and newborn rat with particular regard to body weight, serum insulin concentrations and pancreatic contents of insulin, glucagon and somatostatin. *Acta Endocrinologica*, . Vol. 94: 354-364.
131. Uriu-Hare Y. Janet, Stern S. Judith, Reaven M. Gerald, and Keen L. Carl. The effect to Maternal Diabetes on trace elements status and fetal Development in the rat. *Diabetes*, 1985. Vol. 34: 1031-1040.
132. Reece E. A. and Eriksson U.J. The pathogenesis of diabetes associated congenital malformations. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 1996. Vol. 23(1): 29-45.
133. García J. Heladia, Rodas López María del Carmen. Morbilidad en el recién nacido con fetopatía diabética. *Rev. Med, IMSS.* 2002. Vol. 40(1): 5-10.
134. Eriksson J. Ulf, Karlsson Mats-Göte and Styruud Johan. Mechanisms of congenital malformations in diabetes pregnancy. *Biol. Neonate*, 1987. Vol. 51: 113-118.
135. Loredó Nuñez Elidia. Efecto de la Diabetes Materna sobre la estructura de la placenta de 20 días de desarrollo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F. 2003. 72 pp.
136. Aerts L and Van Assche F.A. 2003. Intrauterine Transmission of disease. *Placenta* vol. 24: 905-911.
137. García-Carrapato Manuel. The offspring of gestational diabetes. *J. Perinat. Med.* 2003. Vol. 31(5): 5-11.
138. Fowden A.L., Forhead A.J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction*, 2004. Vol. 127: 515-526.
139. Kim J.N., Runge W., Wells L.J., Lazarow A. 1960. Pancreatic islets in blood sugar in prenatal and postnatal offspring from diabetic rats: beta granulation and glycogen infiltration. *Anat. Rec.* Vol. 238: 239-259.

140. Pitkin R.M., Van Orden D.E. Fetal effects of maternal streptozotocin-diabetes. *Endocrinology*, 1974. Vol. 94(5): 1247-1253.
141. Giavini E., Broccia M.L., Prati M., Roversi G.D. and Vismaria C. Effects of streptozotocin- induced Diabetes on Fetal Development of the rat. *Teratology*, 1986. Vol. 34: 81-88.
142. Holemans K., Aerts L. and Van Assche F.A. 2003. Life consequences of abnormal fetal pancreatic development. Symposium Report. *J. Physiol.* Vol. 547 (1): 11-20.
143. Hoet J.J. and Hanson M.A. 1999. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *Journal of Physiology*. Vol. 514(3): 617-627.
144. Paradisi GianCarlo, Biaggi Arabella, Ferrazani Sergio, De Carolis Sara and Caruso Alessandro. 2002. Abnormal carbohydrate metabolism during pregnancy. Association with endothelial dysfunction. *Diabetes Care*, Vol. 25: 560-564.
145. García J. Heladia y Rodas López María del Carmen. 2002. Morbilidad en el recién nacido con fetopatía diabética. *Rev. Med. IMSS*, Vol. 40(1):5-10.
146. Hellerström C, Swenne I. and Eriksson U.J. Is their animal model of gestational diabetes? *Diabetes*, 1985. Vol. 34 (suppl 2): 28-31.
147. Naismith D.J. and Morgan B.L.G. The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat. *British Journal of Nutrition*, 1976. Vol. 36: 563-566.
148. Herrera Emilio. 1978. Metabolismo intermediario durante el embarazo. *Investigación y Ciencia*, No. 19. 14-25.
149. Yamada Ruth, Griggio Mauro A. and Luz Jaqueline. Energy balance of pregnant diabetic rats. *British Journal of Nutrition*, 2002. Vol. 87: 509-515.
150. Butte F. Nancy, Hopkinson M. Judy, Mehta Nitesh, Moon K. Jon, and O'Brian Smith E. Adjustments of energy expenditure and substrate utilization during late pregnancy and lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999. Vol. 69: 299-307.
151. Schrezenmeir Jürgen and Jagla Alexandra. 2000. Milk and Diabetes. *J. of the American Collage of Nutrition*, Vol. 19(2): 176S-190S.
152. Nathanielsz W. Peter and Padmanabhan Vasantha. 2006. Developmental origin of health and disease. *J. Physiol.* Vol. 572(1): 3-4.
153. Aguayo-Mazzucato Cristina, Sánchez Soto Carmen, Godinez Puig Victoria, Gutierrez Ospina Gabriel y Hiriart Marcia. 2006. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in postnatal critical window. *Plos One*, issue 1: e35.
154. Seshiah V., Balaji V., and Balaji S. Madhuri. 2008. Scope for Prevention of Diabetes –“Focus intrauterine milieu Interieur”-. *JAPI*, Vol. 56: 109-113.
155. Jawerbaum Alicia and White Verónica. 2010. Animals Models in Diabetes and Pregnancy. *Endocrine Reviews*. Vol. 31: 680-701.
156. Cheng Fong Pan and Wright Chris. 2011. Pancreas organogenesis: From bud a plexus to gland. *Developmental Dynamics*, Vol. 240: 530- 565.

157. Zhou Qiao, Law C. Anica, Rajagopal Jayaraj, Anderson J. William, Gray A. Paul and Melton A. Douglas. 2007. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Developmental Cell*, Vol. 13: 103-114.
158. Sander Maiké and German S. Michael. The B-Cell transcription factors and development of the pancreas. *J. Mol. Med.* 1997. Vol. 75: 327-340.
159. Calvo Rosa María, Forcen Rosa, Obregón María Jesús, Escobar del Rey Francisco, Morreale de Escobar Gabriela and Regadera Javier. 1998. Immunohistochemical and morphometric studies of the fetal pancreas in diabetic pregnant rats. Effects of insulin administration. *The Anatomical Record*, Vol. 251: 173-180.
160. Fetita Lila-Sabrina, Sobngwi Eugène, Serradas Patricia, Calvo Fabien, Gautier Jean-François. REVIEW: Consequences of fetal exposure to maternal Diabetes in Offspring, 2006. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 91(10):3716-3724.
161. Aerts L. and Van Assche F.A. 2006. Animal Evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 38 : 894-903.
162. Scaglia L. Cahill C.J. Finegood D.T. and Bonner –Weir Susan. 1997. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology*, Vol. 138(4): 1736-1741.
163. Han J. Hu, Long YS, Epstein PN, Liu YQ. Rat maternal diabetes impairs pancreatic β -cell function in the Offspring. 2007. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* Vol. 293: E228-E236.
164. Inuwa M.I. and Mardi A.S. 2005. Correlation between volum fraction and volume-weighted mean volume and between total number and total mass of islets in post-weaning and young Wistar rats. *J. Anat.* Vol. 206: 185-192.
165. Bertelli Eugenio and Bendeyan Moise. 2005. Association between endocrine pancreas and ductal system. More than an epiphenomenon of endocrine differentiation and Development? *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Vol. 53(9): 1071-1086.
166. Serup Palle and Nelsen Hoiriis Jens. Development and Life Cycle of the B cell. Chapter 4. *In International Textbook of Diabetes.* DeFronzo A. Ralph, Ferrannini Ele, Keen Harry, Zimmet Paul (eds). Third Edition. 2004. Volume one. Jhon Wiley & Sons. Ltd. NJ, USA.
167. Jetton L. Thomas, Everill Brian, Lausier James, Roskens Violet, Habibovic Aida, Larock Kyla, Goking Alexander, Peshavaria Mina and Leahy L. Jack. 2008. Enhanced β -cell mass without increased proliferation following chronic mild glucose infusion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* Vol. 294: E679 – E687.
168. Dumortier O., Blondeau B., Duvillié B., Reusens., Bréant B. and Remacle C. 2007. Different mechanisms operating during different critical time windows reduce rat fetal beta cell mass due to maternal low-protein or low-energy diet. *Diabetologia*, Vol. 50: 2495-2503.
169. Arantes C. Vanessa, Teixeira P. A. Vicente, Reis A. B. Marise, Latorraca Q. Márcia, Leite R. Adriana, Carneiro N. Everardo, Yamada T. Áureo and Boschero C. Antonio. 2002. Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. *Journal of Nutrition.* Vol. 132: 3030-3035.

170. Park H. Jun, Stoffers A. Doris, Nicholls D. Robert and Simmone A. Rebecca. 2008. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 118(6): 2316-2324.
171. Robertson R. Paul and Harmon S. Jamie. 2007. Pancreatic islet β -cell and oxidative stress: The importance of glutathione peroxidase. *FEBS Letters*. Vol. 58: 3743-3748.
172. Kaneto Hideaki Kaneto Hideaki, Miyatsuka Takeshi, Kawamori Dan, Yamamoto Klaoru, Kato Ken, Shiraiwa Toshihko, Katakami Naoto, Yamasaki Yoshimitsu, Matsuhisa Munehide and Matsuoka Taka-Aki. 2008. Pdx.1 and MafA play role crucial of the differentiation of β -cell maintenance and function. *Endocrine Journal*, Vol. 55(2): 235-252.
173. Babu A. Daniella, Deering G. Tye and Mirmira G. Raghavendra. 2007. A feat of metabolic proportions: Pdx1 orchestrates islet development and function in the maintenance of glucose homeostasis. *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 92: 43-55.
174. Brissova Marcela, Shiota Masakazu, Nicholson E. Wendell, Gannon Maureen, Knobell M. Susan, Piston W. David, Wright V.E. Christopher and Powers C. Alvin. 2002. Reduction in pancreatic transcription Factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277 (13): 11225-11232.
175. Matsuoka Taka-aki, Kaneto Hideaki, Stein Roland, Myatsuka Takeshi, Kawamori Dam, Henderson Eva, Kojima Itaru, Matsuhisa Munehide, Masatsugu Hori and Yamasaki Yoshimitsu. 2007. MafA regulates expression of genes important to islet β -cell function. *Molecular Endocrinology*. Vol. 21(11): 2764- 2774.
176. Artner Isabella, Hang Yan, Guo Min, Gu Guoquiang, Stein Roland. 2008. MafA is dedicated activator of the insulin gene *in vivo*. *Journal of Endocrinology*. Vol. 198: 271-279.
177. Oken Emily and Gillman W. Matthew. 2003. Fetal origins of Obesity. *Obesity Research*, Vol. 11(4): 496-503.
178. Takenaka Yukiko and Toyoda Nagayasu. The effect of alpha1-blocking vasolidator on fetal growth and uteroplacental blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, 1995. Vol. 56(13): 1127-1134.
179. Jhonson D. James, Bernal-Mizrachi Ernesto, Alejandro U. Emilyn, Han Zhiqiang, Kalynyak B. Tatyana, Li Hong, Beith L. Jennifer, Gross Julia, Warnock L. Garth, Townsend R. Reid, Permutt M. Alan and Polonsky S. Kenneth. 2006. Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome. *PNAS*, Vol. 103(51): 19575-19580.
180. Leturque Armelle, Brot-Laroche Edith and Le-Gall Maude. 2009. GLUT2 Mutations, translocation and receptor function in diet sugar managing. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* Vol. 296: E985-E992.
181. Fowden L. Abigail, Giussani A. Dio and Forhead J. Alison. 2006. Intrauterine programming of Physiological Systems: Causes and Consequences. *Physiology* Vol. 21: 29-37.
182. Srinivasan Malathi, Laychock G. Suzanne, Hill J. David and Patel S. Mulchand. 2003. Neonatal nutrition: Metabolic programming of pancreatic islets and obesity. *Ex. Biol. Med.* Vol. 228: 15-23.
183. Ling Charlotte and Leif Groop. 2009. Epigenetics: A molecular link between environmental factors and Type 2 Diabetes. Vol. 58: 2718-2725.

184. Green S Alice, Rozance J. Paul and Limesand W. Sean. 2010. Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. *Journal of Endocrinology*, Vol. 205: 211-224.