



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE TRIPTOFANO  
SOBRE LA FUNCIÓN Y LA MASA DE LA CÉLULA BETA  
DURANTE LA LACTANCIA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
GUSTAVO EDUARDO CANUL MEDINA

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICAS (UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES  
INSTITUTO DE QUÍMICA (UNAM)

DR. ARMANDO TOVAR PALACIO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

MÉXICO, D. F. MAYO, 2014



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto de la deficiencia de triptofano  
sobre la función y la masa de la célula beta  
durante la lactancia

Tutor

Dra. Cristina Fernández Mejía  
Unidad de Genética de la Nutrición  
Instituto Nacional de Pediatría  
Instituto de Investigación Biomédicas, UNAM

Jurado del Examen de Grado

PRESIDENTE: Dra. Marta Menjívar Iraheta  
VOCAL: Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz  
VOCAL: Dr. Samuel Canizales Quintero  
VOCAL: Dra. Diana María Escalante Alcalde  
SECRETARIO: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

## Índice

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>4</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>5</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>6</b>
<b>PÁNCREAS.....</b>	<b>6</b>
<b>SEROTONINA.....</b>	<b>13</b>
<b>Lactancia .....</b>	<b>15</b>
<b>Planteamiento del problema .....</b>	<b>16</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>16</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>17</b>
<b>Objetivos particulares .....</b>	<b>17</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>17</b>
<b>Modelo animal.....</b>	<b>17</b>
<b>Inmunohistoquímica.....</b>	<b>18</b>
<b>Cuantificación de insulina en sangre.....</b>	<b>19</b>
<b>Curvas de tolerancia a la glucosa.....</b>	<b>19</b>
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>19</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>20</b>
<b>GESTACIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>LACTANCIA .....</b>	<b>21</b>
<b>CAMBIOS QUE SE PRODUCEN EN EL PERIODO DE LACTANCIA EN RESPUESTA AL TIPO DE LACTANCIA. ....</b>	<b>22</b>
<b>CAMBIOS QUE SE PRODUCEN EN EL PERIODO DE LACTANCIA EN RESPUESTA AL TIPO DE DIETA .....</b>	<b>25</b>
<b>Peso corporal y consumo de alimento.....</b>	<b>25</b>
<b>Curva de tolerancia a la glucosa.....</b>	<b>26</b>
<b>Concentración de insulina en suero. ....</b>	<b>26</b>
<b>Peso del páncreas.....</b>	<b>27</b>
<b>Histología y morfología del islote.....</b>	<b>28</b>
<b>Discusión de Resultados .....</b>	<b>31</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>35</b>

## Abreviaturas

5-HT	5-hidroxitriptamina/serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina sérica bovina
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
E2	17 $\beta$ -estradiol
ES	Error estándar
Gck	Glucocinasa
GLUT	Transportador de glucosa
GTP	Proteína de unión a guanosina trifosfato
5HTR1d	hidroxitriptamina 1d
HTR2b	5- hidroxitriptamina 2b
Insr	Receptor de insulina
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
JAK2	Janus 2
K <sub>ATP</sub>	Canal de K <sup>+</sup> sensible a ATP
MAPK	Cinasas activada por mitógeno
NADPH	Dinucleótido de adenina nicotinamida reducida fosfato
P	Progesterona
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PIP2	Fosfatidili Inositol bisfosfato
PIP3	Fosfatidili Inositol trifosfato
PL	lactógeno placentario
PRL	Prolactina
PRLRs	Receptor de prolactina
SBF	Suero Bovino Fetal
SNC	Sistema nervioso central
STAT5	transductor de señales y activador transcripcional 5
Sur1	ATP-binding cassette sub-family C (CFTR/MRP) member 8

## **Resumen**

La masa total de las células beta es importante para mantener una producción y secreción de insulina adecuadas. Se sabe que la serotonina participa en la modulación de la masa de las células  $\beta$ . En nuestro estudio se exploró el papel de la deficiencia de triptofano en la secreción de insulina y la masa de la célula  $\beta$  en ratones C57BL6 durante la fase final de la gestación y la lactancia usando como estrategia el efecto de la restricción de su precursor, el triptofano. Los resultados indican que el consumo de una dieta deficiente en triptofano afecta la homeostasis de la glucosa, el consumo de alimento y la ganancia de peso corporal durante la etapa final de la gestación. Al término de 21 días de tratamiento después del parto, el grupo deficiencia de triptofano no mostró diferencia con su grupo control. Un hallazgo interesante en nuestro estudio fue que diferentes tipos de lactancia (intermiten *vs.* continua), presentan diferencias en la homeostasis de la glucosa y la morfometría de los islotes pancreáticos al termino de 21 días de lactancia.

## Introducción

### PÁNCREAS

El páncreas es un órgano mixto formado por dos tipos de glándulas: exocrina y endocrina. La glándula exocrina o tejido acinar, representa cerca del 98% del volumen total del páncreas y dentro de sus funciones está la de participar en la digestión de los alimentos a través de la síntesis, almacenamiento y secreción de diversas enzimas digestivas al lumen intestinal. La glándula endocrina o islotes de Langerhans, corresponde al 1-2% del volumen total del páncreas. Los islotes de Langerhans se encuentran inmersos entre el tejido acinar, y participan en el control de la homeostasis de la glucosa a través de la secreción de diversas hormonas (Figura 1) [14-16].

Los islotes de Langerhans fueron descubiertos en 1869 por Paul Langerhans. Las distintas células endocrinas que componen al islote producen y secretan diferentes hormonas: las células beta ( $\beta$ ) secretan insulina, las células alfa ( $\alpha$ ) secretan glucagón, las células delta ( $\delta$ ) secretan somatostatina, las células PP secretan polipéptido pancreático, y las células épsilon ( $\epsilon$ ) que secretan grelina. (Figura 1).

#### Páncreas:

- Exocrino y endocrino

#### Islotes de Langerhans:

- células  $\alpha$  = glucagón
- células  $\delta$  = somatostatina
- células  $\epsilon$  = grelina
- células F = polipeptidos pancreáticos
- células  $\beta$  = insulina

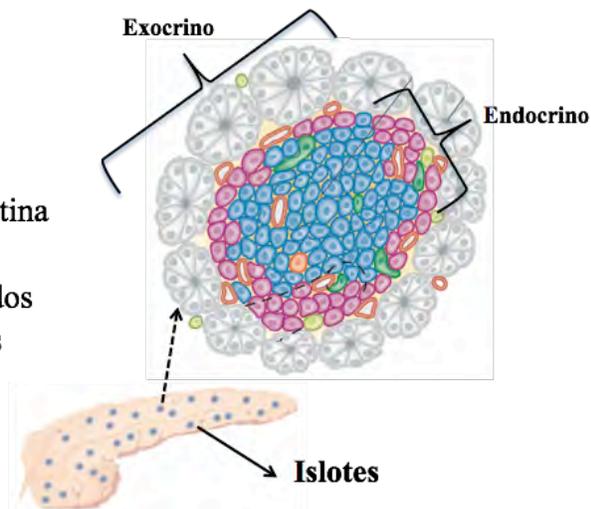


Figura 1. Estructura del páncreas conformado por glándulas exocrinas y endocrinas. Representación de los diferentes tipos celulares que conforman la parte endocrina del páncreas [11].

Las células  $\beta$  comprenden aproximadamente el 80% del volumen total del islote de Langerhans [14-16]. Durante el posprandio, la secreción de insulina por las células  $\beta$  desencadena en los tejidos como el músculo, hígado y adiposo, una serie de respuestas que permiten la captación de glucosa.

La secreción de insulina en respuesta a glucosa requiere una serie de pasos en que participan la oxidación de glucosa, cambios electro-fisiológicos, fusión de los gránulos que contiene insulina con la membrana plasmática y finalmente su secreción al medio extracelular. El proceso se inicia con el transporte de glucosa al interior de las células  $\beta$  por difusión facilitada. La incorporación de glucosa es mediada por proteínas transportadoras de glucosa (GLUT), predominando en roedores la isoforma 2 de transportador de glucosa (GLUT2) [4]. Posteriormente, la glucosa se fosforila por la enzima glucocinasa para formar glucosa-6-fosfato. La glucocinasa además de regular el flujo de la oxidación de glucosa y la secreción de insulina, se considera un sensor de los niveles de glucosa en las células  $\beta$  [5] y participa en el proceso de expansión de la masa de las células  $\beta$  [6, 7]. El aumento en los niveles de ATP por la glucólisis y el ciclo de Krebs provocan el cierre de los canales de  $K^+$  sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ). Los canales  $K_{ATP}$  son unidades de hetero-octámeros compuestos por 4 subunidades del receptor 1 sulfonilurea (SUR 1) y 4 subunidades de canales de  $K^+$  rectificadores internos Kir6.2 [8]. El cierre de los canales  $K_{ATP}$  ocasiona despolarización de la membrana plasmática, activación de los canales de calcio dependientes de voltaje y la entrada de  $Ca^{+2}$  del espacio extracelular. La movilización de las reservas de  $Ca^{+2}$  del retículo endoplasmático también participa en el aumento en los niveles en el citoplasma. El aumento de  $Ca^{+2}$  en el citoplasma es la señal que desencadena la secreción de insulina al permitir la fusión de los gránulos que la contiene con la membrana plasmática y la liberación de insulina a la circulación (Figura 2)[10].

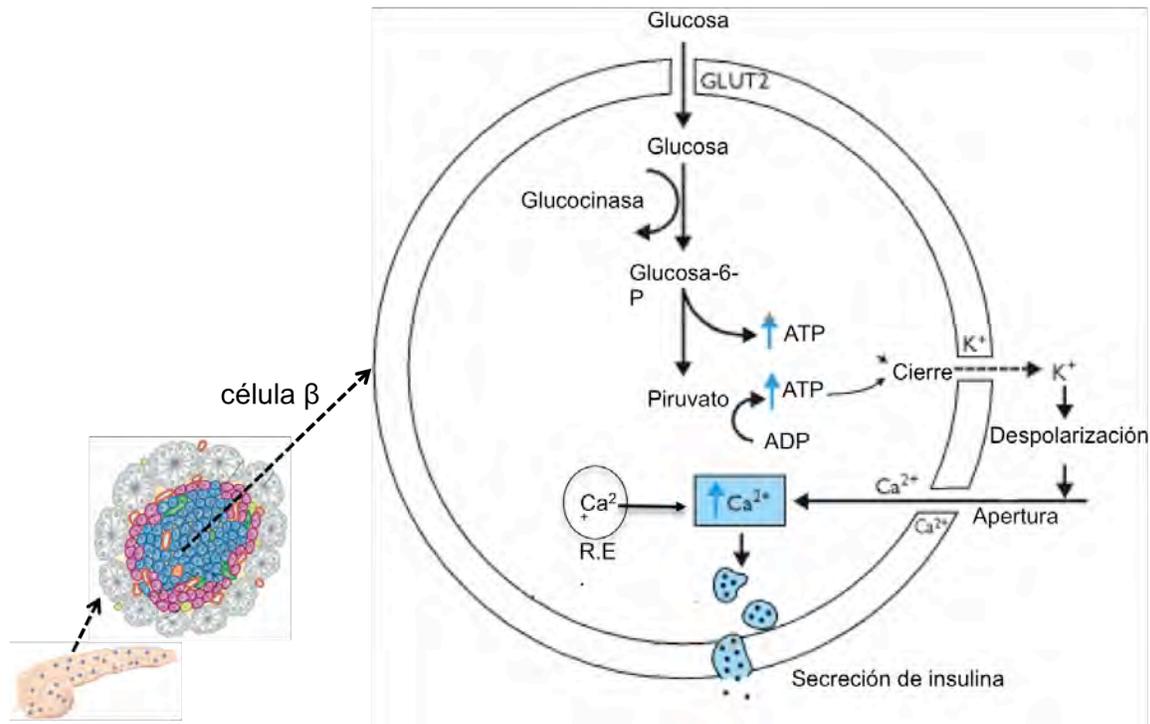


Figura 2. Modelo de secreción de insulina estimulada por glucosa en las células  $\beta$ . La entrada de glucosa en la célula ocasiona aumento del ATP, cierre de los canales de  $K^+$ , despolarización de la membrana plasmática y entrada de  $Ca^{+2}$  del medio externo. El retículo endoplasmático también participa en el aumento de  $Ca^{+2}$ . Esto incrementa los niveles de  $Ca^{+2}$  en el citoplasma, fusión de los gránulos que contienen insulina con la membrana plasmática y la secreción de ésta a la circulación [4-10].

La secreción de insulina por las células  $\beta$  está modulada tanto por controles hormonales y neuronales vía activación de receptores membranales [17]. En dicho control, la proteína de unión a guanosina trifosfato (GTP) interviene al regular la actividad de la adenilato ciclasa, fosfolipasa C, canales iónicos y diferentes eventos que permitan incrementar los niveles de  $Ca^{+2}$  del citoplasma[18]. Además, estudios recientes también proponen la participación de la vía cGMP/PKG en las señales involucradas en la función de la células  $\beta$  y la secreción de insulina[19-22].

Además de una función adecuada de las células beta, la masa total de células beta también es importante para mantener una producción y secreción de insulina adecuadas. Está dada por el número y tamaño de células, y se incrementa progresivamente durante los periodos fetal y neonatal, alcanzando una meseta durante la adultez y decayendo gradualmente con la edad [23].

En los islotes pancreáticos y las células  $\beta$ , un aspecto importante a considerar es su masa. La disminución parcial o total de la masa de células  $\beta$  es el común denominador en la aparición de los diferentes tipos de diabetes. La masa de los islotes pancreáticos se regula por un estricto balance entre la replicación celular, hipertrofia y neogénesis; y la muerte celular, atrofia y autofagia[16]. Los aspectos relacionados con la proliferación, supervivencia y destrucción de la célula  $\beta$  pancreática han sido y siguen siendo objeto de estudio en busca de estrategias terapéuticas para tratar la diabetes.

La masa de los islotes pancreáticos no permanece constante a lo largo de la vida y puede adaptarse ante diferentes demandas metabólicas y cambios fisiológicos. Estudios en roedores adultos reportan la capacidad de las células  $\beta$  de adaptarse ante incrementos en la demanda de insulina, mediante aumento en su masa y la secreción de esta hormona[22]. Este proceso ocurre en la gestación, obesidad y pancreatectomía. Estos cambios adaptativos en la masa de los islotes también son controlados por ajustes en la muerte, proliferación y tamaño celular; y alteración en estos mecanismos participan en la aparición de diabetes [14, 24, 25].

## GESTACIÓN

La gestación es uno de los estímulos fisiológicos más fuertes para la expansión de la masa de las células  $\beta$  (Figura 3). Durante este periodo, se presentan una serie de cambios cuyo objetivo es permitir el crecimiento óptimo del feto. Parte de los cambios que acontecen son las modificaciones en los niveles de hormonas: aumento de progesterona, estrógenos, lactógeno placentario y prolactina, cuya variación con respecto al tiempo se esquematiza en la figura 4.

Además de los cambios hormonales, existen también cambios en las necesidades energéticas del feto que provocan en la madre resistencia a la insulina en tejidos periféricos[26, 27]. En la tabla 5 se presentan algunas moléculas y sus efectos en las células  $\beta$  y la acción de la insulina durante la gestación[1, 2].

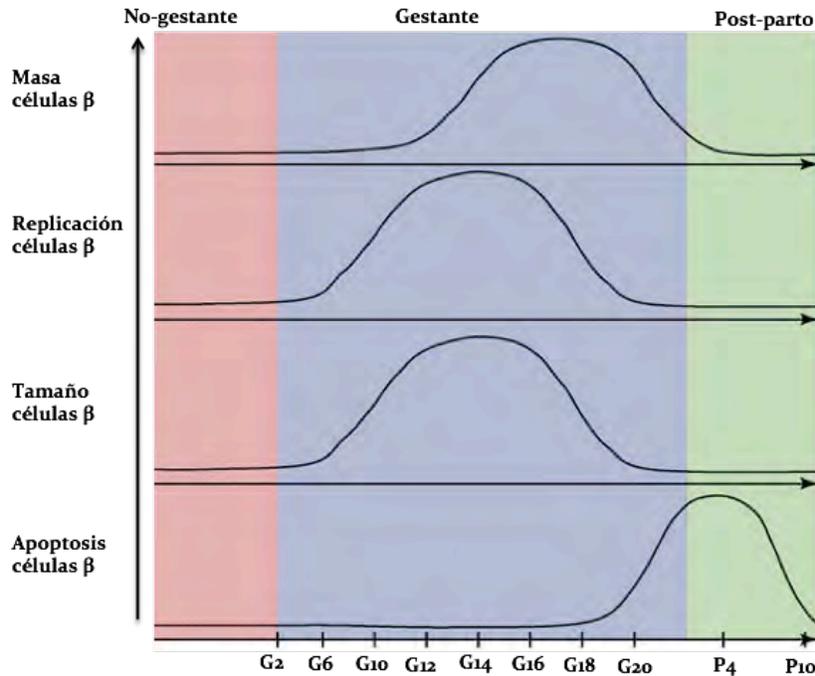


Figura 3. Cambio en la masa de las células  $\beta$  durante la gestación y el post-parto. Durante la gestación existe un aumento en la replicación y el tamaño de las células  $\beta$  que alcanzan su punto máximo al día 14 de gestación en roedores (G14). Al final de la gestación y durante la lactancia aumenta la apoptosis de las células  $\beta$  lo que contribuye a la disminución en la masa de las células  $\beta$  [12].

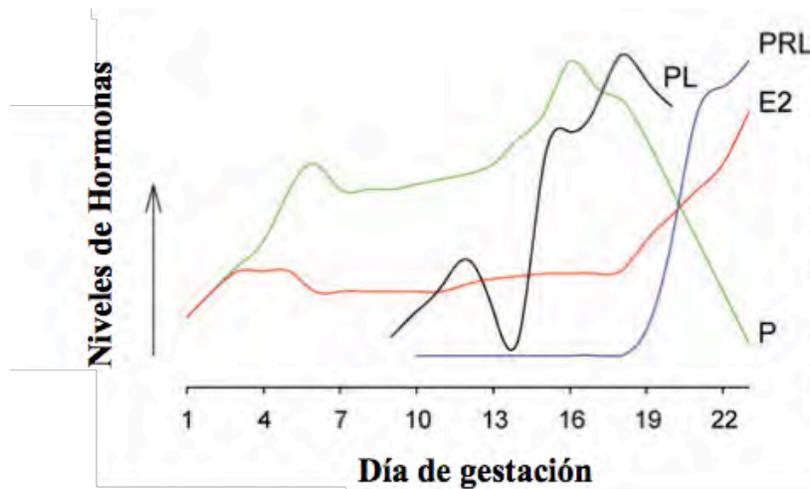


Figura 4. Esquema de los cambios hormonales durante la gestación en roedores. En los primeros días de gestación hay un incremento de  $17\beta$ -estradiol (E2) y progesterona (P). A la mitad de la gestación aumenta el lactógeno placentario (PL). Durante los días finales de la gestación se incrementa prolactina (PRL), hay un segundo incremento de E2 y PL; y disminuye P. [13].

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

Tabla 5. Efectos de las algunas moléculas que modifican sus niveles durante la gestación [1-3].

La resistencia a la insulina en la madre es un evento que acontece de manera normal durante la gestación para permitir la homeostasis energética entre la madre y el feto[26, 27]. Como respuesta a esta necesidad, en los islotes pancreáticos se efectúan mecanismo adaptativos que permiten incrementar la secreción de insulina y compensar la resistencia a la insulina[28-32]. Estos mecanismos adaptativos incluyen el aumento en la secreción de insulina estimulada por glucosa y el aumento en la masa de los islotes pancreáticos (Figura 6)[29].

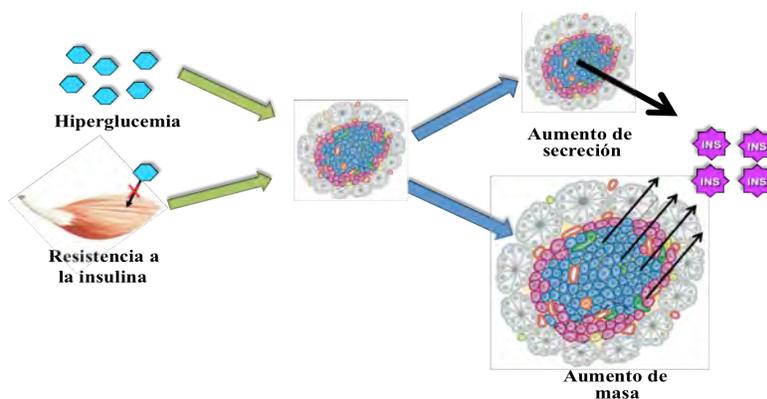


Figura 6. Mecanismo de compensación de la célula  $\beta$  durante la gestación. La resistencia a la insulina y la hiperglucemia desencadenan aumento en la secreción de insulina estimulada por glucosa y el aumento en la masa de los islotes pancreáticos.

Gran parte de estos cambios adaptativos en los islotes se producen por elevación de prolactina y lactógeno placentario, los cuales se saben que son reguladores de la masa de las células  $\beta$  durante la gestación [28, 33-35]. La función de las hormonas lactogénicas se produce a través de unión al receptor de prolactina (PRLRs), lo que permite la activación de la vía de la cinasa Janus 2 / transductor de señales y activador transcripcional 5 (JAK2/STAT5)[36, 37]; también se sabe que activan la vía RAS - FAS de proteínas cinasas activada por mitógeno (MAPK) y la vía fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K)[33]. Sin embargo, este aumento en las hormonas lactogénicas no puede explicar completamente las modificaciones que se produce en el islote durante la gestación. Los niveles de lactógeno placentario y prolactina aumentan hacia el final de la gestación, y durante la lactancia permanecen aumentados los niveles de prolactina. No obstante, la proliferación y la masa de las células  $\beta$  alcanzan su pico máximo a la mitad de la gestación y regresan a los niveles normales (previo a la gestación) durante la lactancia [33, 34, 38, 39]. En el 2010, un grupo de investigadores en San Francisco[40] elucidaron el posible mecanismo mediante el cual las hormonas lactogénicas desencadenan el aumento en la masa de las células  $\beta$  durante la gestación.

Un grupo de investigadores dirigidos por el Dr. German, encontraron que durante la primera mitad de la gestación, justo cuando la masa de las células  $\beta$  ha alcanzado su pico máximo, la señal lactogénica incrementa la expresión de la enzima limitante para la síntesis de serotonina: hidroxilasa de triptofano 1 (Tph1). Ellos encontraron que la serotonina dirige el aumento en la replicación de las células  $\beta$  durante la gestación para incrementar la masa de las células  $\beta$ . La inhibición de la síntesis de serotonina por restricción dietaria de triptofano o inhibición de la Tph1, no permiten la expansión de la masa de las células  $\beta$  e induce intolerancia a la glucosa durante la gestación sin afectar la sensibilidad de la insulina. En las células  $\beta$  de las ratonas gestantes, la expresión del receptor de serotonina, 5- hidroxitriptamina 2b (HTR2b), se correlaciona con el periodo de incremento de la replicación y masa de las células  $\beta$ . La pérdida del receptor *Htr2b* no permite la expansión de la masa de las células  $\beta$ . Además, la inhibición de la actividad de *Htr2b* por agentes farmacológicos durante la gestación también induce intolerancia a la glucosa, disminución de la proliferación y de la masa de las células  $\beta$ [40].

Basados en los resultados antes mencionados, se propone que la señal lactogénica durante la gestación induce la expresión de las enzimas de síntesis 5-hidroxitriptamina, mejor conocido como serotonina (5-HT) mediante la vía de JAK2/STAT5, lo que provoca aumento en los

niveles intracelulares de serotonina. Posteriormente, la serotonina se secreta para actuar de manera autocrina y paracrina sobre las células  $\beta$ . Durante la primera mitad de la gestación, la serotonina se une al receptor HTR2b, el cual se encuentra sobreexpresado, lo que permite el aumento de la proliferación y la masa de las células  $\beta$ . En el periodo final de la gestación y las primeras semanas de la lactancia, disminuye la expresión del receptor HTR2b y aumenta la expresión del receptor 5-hidroxitriptamina 1d (5HTR1d), lo cual coincide con el inicio en la reducción de la proliferación y la masa de las células  $\beta$  hasta los niveles previos a la gestación. (Figura 7)[40, 41].

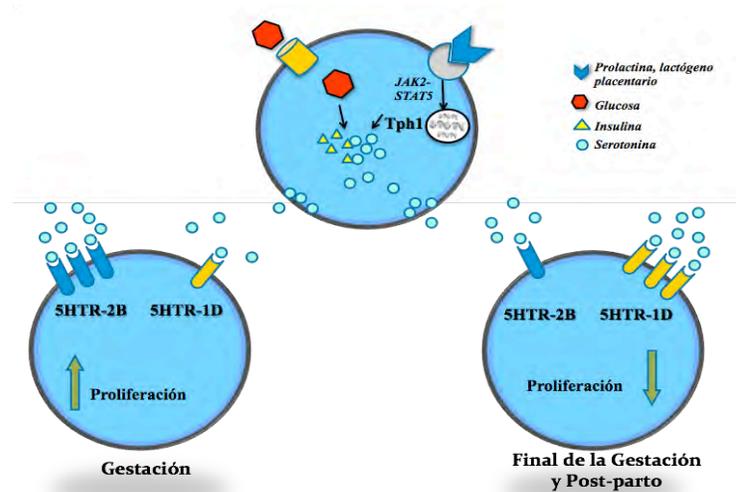


Figura 7. Mecanismo propuesto mediante el cual las hormonas lactogénicas, a través de la serotonina y de manera autocrina y paracrina, controlan la proliferación de las células  $\beta$ .

## SEROTONINA

La serotonina, es una hormona con diversas funciones en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos. Para su síntesis es necesario el aminoácido esencial L-triptofano que es hidroxilado a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) por la hidroxilasa de triptofano. Finalmente, el 5-HTP es descarboxilado por la descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos para formar 5-HT (Figura 8)[42].

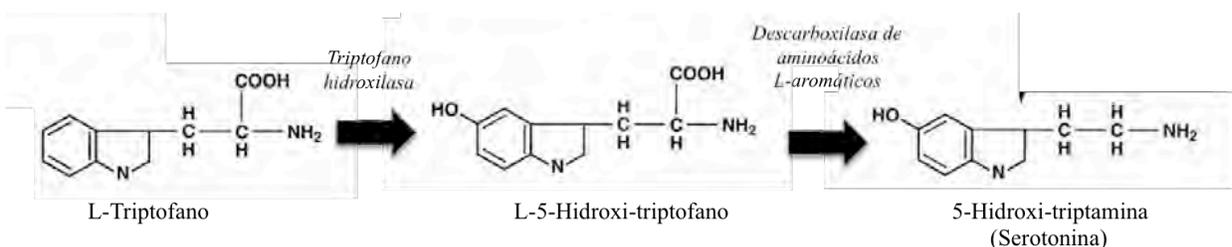


Figura 8. Conversión de triptofano a serotonina.

La 5HT ejerce su función en las células a través de una larga familia de receptores acoplados a proteínas G y a la apertura de canales iónicos [43]. En el sistema nervioso central (SNC), las funciones de la serotonina son variadas. Están relacionadas con la acción del sistema serotoninérgico en donde regula, por ejemplo, la temperatura, apetito, ciclo del sueño, emesis, la conducta sexual y la nocicepción. Alteraciones en el sistema serotoninérgico en el SNC, tienen implicaciones en la patogénesis de diversos trastornos psiquiátricos y neurológicos como depresión y manías[42, 44]. Además de su acción como neurotransmisor en el SNC, actualmente se tiene interés en la participación de la serotonina en la regulación de diversas funciones en diversos tejidos periféricos.

La serotonina está presente en muchos tejidos, además del cerebro: pulmón, riñón, plaquetas, tracto gastrointestinal, hueso y páncreas, entre otros[42]. La serotonina participa en la agregación plaquetaria mediada por el receptor 5-HT<sub>2</sub> localizado en la superficie de las plaquetas [45-47]. En la glándula mamaria participa en la regulación de su desarrollo[48-50]. En hueso, la serotonina parece estar involucrada en el mantenimiento de su metabolismo y la regulación de su masa[51-53]. En el intestino, está implicada en la motilidad y secreción[54-56]. En el hígado, probablemente participe en su regeneración[57, 58]. La serotonina también tiene efectos en la morfología de diversas células: efectos de constricción en vasos sanguíneos[59], induce cambios en el músculo esquelético[60], plaquetas[61], células endoteliales[62] y fibroblastos[63]. Además de su función en cambios morfológicos, la serotonina también participa en la proliferación celular en diversos tejidos; por ejemplo, en células de músculo liso de las arterias pulmonares[64].

En el páncreas, la presencia de serotonina en las células  $\beta$  se conocía desde varias décadas atrás, pero su función era totalmente desconocida[65]. Actualmente se sabe que la serotonina participa en la modulación de la proliferación y de la masa de las células  $\beta$ [40, 41]. Durante la gestación diversos cambios metabólicos acontecen, incluyendo resistencia a la insulina. Para sobrellevar esta resistencia a la insulina, el páncreas incrementa el tamaño y el número de células  $\beta$  para aumentar la cantidad de insulina[29]. Si este mecanismo no se lleva a cabo, existe una alteración en la homeostasis de la glucosa y la aparición de diabetes mellitus gestacional[14]. Estos nuevos conocimientos en los mecanismos de modulación de la masa de las células  $\beta$  por parte de la serotonina, son importantes e importante a considerar en el uso de medicamentos y recomendaciones dietéticas durante la gestación.

## Lactancia

Durante la lactancia, en la madre se llevan a cabo una serie de cambios metabólicos y hormonales que favorecen su adaptación a los cambios en las necesidades energéticas durante este periodo.

Además, también se revierten todos los cambios fisiológicos y estructurales realizados en ciertos órganos durante la gestación. Uno de los órganos que atraviesa por diversos cambios estructurales y funcionales después del parto es el páncreas

Después del parto, todos los cambios realizados en los islotes durante la gestación son revertidos, permitiéndoles recuperar las características previas a la gestación. Se especula que son hormonas las que también participan en dichos cambios en los islotes [66-69]. Los cambios en la masa de los islotes y en la secreción de insulina en respuesta a glucosa ocurren paulatinamente en los primeros días de iniciada la lactancia [70-72]. Parte de estos cambios en los islotes después del parto podrían estar dados por disminución en la expresión del receptor de serotonina HTR2b y aumento en el receptor 5HTR1d, lo que permitiría la disminución en la proliferación y la masa de los islotes [40, 73]. También se considera la participación de los glucocorticoides en las modificaciones de los islotes después del parto [39, 40]. Diversos estudios reportan los efectos de los glucocorticoides sobre la función de los islotes pancreáticos y células  $\beta$  [74-77], incluyendo modificación en la proliferación y apoptosis [66]; y la secreción de insulina durante la lactancia [78-82]. Sin embargo, hasta la fecha se desconocen los detalles de los mecanismos de involución de los islotes y los cambios en la secreción de insulina durante la lactancia.

## **Planteamiento del problema**

Durante la gestación los requerimientos de energía del feto provocan cambios en el metabolismo materno que permiten la expansión de la masa de las células  $\beta$  y aumentos en la secreción de insulina. Parte de estos cambios adaptativos se produce por elevación de las hormonas lactogénicas. Sin embargo, este aumento no explica completamente las modificaciones que se producen en el islote durante la gestación. Estudios recientes han encontrado que coincidente con la expansión de la masa de los islotes en la gestación, se produce aumento en la expresión de genes que participan en la síntesis de serotonina y la acción de ésta. Se ha encontrado que durante la primera mitad de la gestación, existe un aumento en la expresión de la Th1, que incrementa en la síntesis de serotonina. Ésta por acción autocrina y paracrina, se une al receptor HTR2b aumentando la proliferación y la masa de las células  $\beta$ . Cuando disminuye la síntesis de serotonina por restricción en la dieta de triptofano o se interfiere con su acción con los receptores, se afecta la expansión de las células  $\beta$ . En el periodo final de la gestación, se produce una disminución en la expresión del receptor HTR2b y se aumenta la expresión del receptor 5HTR1d. Se ha propuesto que los cambios en la expresión de estos receptores son los responsables de la disminución de la proliferación y la masa de las células  $\beta$  en las etapas finales de la gestación y la lactancia. De manera similar a los estudios durante la primera mitad de la gestación, en este proyecto proponemos estudiar cuál es la participación de la serotonina durante la fase final de la gestación y la lactancia usando como estrategia el efecto de la restricción de su precursor, el triptofano. Los resultados que se obtengan en este proyecto ayudarán a la comprensión de los mecanismos que participan en la regulación de la masa de las células  $\beta$  y la secreción de la insulina, factores de importancia crítica en el desarrollo de diabetes. Entender estos mecanismos brindará nuevas claves para el desarrollo estrategias terapéuticas para el mejoramiento de la respuesta de las células  $\beta$  durante la diabetes.

## **Hipótesis**

Si el metabolismo y la vía de señalización del triptofano, a través de la serotonina, participan durante la lactancia en la reducción de la proliferación y la masa de las células  $\beta$ , estos eventos permitirán a los islotes regresar a las condiciones previas a la gestación al finalizar éste periodo.

## **Objetivos**

Determinar cuál es el papel de la deficiencia de triptofano en la secreción de insulina y la masa de la célula  $\beta$  durante la lactancia.

### **Objetivos particulares**

Analizar los cambios que produce la deficiencia de triptofano durante la lactancia sobre:

- 1.- La masa de las células  $\beta$ .
- 2.- La concentración de insulina en suero.
- 3.- La homeostasis de glucosa.

### **Metodología**

#### Modelo animal.

Ratonas de la cepa C57BL/6 fueron apareados, colocando en cada caja de bioterio dos ratonas y un ratón macho. Los animales se monitorearon hasta la aparición del tapón vaginal. A partir del día de aparición del tapón vaginal (G0), las ratonas recibieron una dieta con los requerimientos necesarios (2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Diet). A partir del día 14 de gestación, las ratonas se separaron en dos grupos y se cambió el tipo de dieta. El grupo control que recibió una dieta con los requerimientos necesarios de vitaminas y nutrimento (Baker aminoacid diet, 44181); el grupo experimental que recibió una dieta deficiente de triptofano (Baker aminoacid diet w/0.04%, 1812281), dietas que se mantuvieron durante todo el periodo de lactancia. Después del parto, las ratonas se separaron en tres grupos: un grupo sometido a lactancia continua bajo una dieta conteniendo los requerimientos necesarios de nutrimentos y vitaminas (Baker aminoacid diet, 44181), que se denomina grupo control de lactancia continua o normal. Dos grupos que se sometieron a un proceso de lactancia consistente en estimular el proceso de lactancia en la madre, colocándoles las crías al menos 4 horas al día, que se denomina lactancia pausada. Uno de estos grupos recibió la dieta conteniendo los requerimientos necesarios de nutrimentos y vitaminas

(Baker aminoacid diet, 44181) y el otro grupo se le sometió a lactancia pausada bajo una dieta deficiente de triptófano (Baker aminoacid diet w/0.04%, 1812281).

Durante el periodo de experimentación se realizó en las madres mediciones de peso corporal, consumo de alimento y curvas de tolerancia a la glucosa, así como el análisis de las concentraciones en sangre de glucosa e insulina. Al término de los 21 días de lactancia, las madres se sacrificaron previa anestesia con Sevofluorane y se extrajo el páncreas que se procesó para efectuar los estudios de inmunohistoquímica. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con el Reglamento para el Cuidado y Manejo de los Animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

### Inmunohistoquímica

Se realizó de acuerdo con el protocolo previamente reportado por nuestro laboratorio [64] en el que se fijaron los páncreas en paraformaldehído al 4%, se deshidrataron y embebieron en parafina. Se realizaron cortes de 0.5  $\mu\text{m}$  y se fijaron en laminillas. Posteriormente los corte se desparafinaron, rehidrataron y permeabilizaron con 0.3% Triton X-100 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) y se bloquearon con suero bovino al 3% (Microlab, Aguascalientes, México). La tinción inmunohistoquímica de fluorescencia se realizó incubando a 4°C por toda la noche con anticuerpos para: Insulina (1:150, Sigma) y Glucagon (1:4500, Sigma). Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a FITC (1:200, Jackson) y Cy3 (1:800, Jackson). Los núcleos se tiñeron con DAPI durante 1 min. Finalmente, se lavaron las laminillas con PBS1x por 5 min tres veces y se cubrieron con cubreobjetos montados con medio para montaje fluorescente (Dako). Las imágenes se obtuvieron con un sistema de microscopía de campo amplio Axioskop 2 plus (Zeiss, Thornwood, NY) acoplado a una lámpara de fluorescencia de mercurio (FluoArc) con una cámara AxioCamRm.

El análisis morfométrico se realizó en 4 laminillas de cada ratón, en un total de 4 ratones por grupo. Las laminillas se analizaron utilizando un microscopio Olympus 1X70 (Tokyo, Japón) acoplado a una lámpara de halógeno y se adquirieron las imágenes de todos los islotes observados en el corte con una cámara Hammamatsu (Hammamatsu City, Japan) utilizando los mismos parámetros de configuración para todas las laminillas. Se cuantificaron las áreas de los islotes y las células positivas a insulina (células beta) así como el área total del corte, usando el

software Image J 1.40 (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

#### Cuantificación de insulina en sangre.

Se colectaron muestras de sangre de ratón en tubos de polipropileno con 5  $\mu$ l de heparina y 5  $\mu$ l de inhibidor de proteasas Complete® (Roche). Los tubos se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min a 4°C. El plasma se separó y se almacenó a -20° C. Las concentraciones de insulina se midieron por ELISA, usando un kit ALPCO (ALPCO Diagnosis), de acuerdo al protocolo de 25  $\mu$ l proporcionado por el proveedor. La absorbancia se midió usando un lector de placas de ELISA Labsystems Multiskan MS (Labsystems). Todas las mediciones se hicieron por duplicado.

#### Curvas de tolerancia a la glucosa.

Para la curva de tolerancia a la glucosa, los ratones se sometieron a un ayuno de 16 h antes de la prueba. A cada ratón se le inyectó glucosa (2g/kg peso corporal) por vía intraperitoneal, y la sangre se colectó antes de la inyección de glucosa, así como a los minutos 15, 30, 60, 90 y 120 después de la inyección. La glucosa en sangre fue cuantificada con un glucómetro (Precision QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories Company).

#### Análisis estadístico

Los datos representan la media  $\pm$  ES. n es el número de muestras o sujetos evaluados. El análisis estadístico se realizó utilizando del software GraphPad Prism (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Los datos se analizaron por medio de una prueba de t de Student o un ANOVA de dos vías. Los valores de  $p$  menores a 0.05 son considerados como estadísticamente significativos.

## Resultados

### GESTACIÓN

A partir del día 14 de gestación, los ratones se separaron en dos grupos: un grupo que recibió una dieta conteniendo los requerimientos necesarios de nutrimentos y vitaminas (Baker aminoacid diet, 44181) en tanto que el otro se mantuvo bajo una dieta conteniendo deficiencia de triptofano (Baker aminoacid diet w/0.04%, 1812281).

### Cambios que produce el cambio de dieta sobre el peso corporal y el consumo de alimento en el periodo final de la gestación.

El incremento en el peso corporal entre el día 14 de gestación y hasta el día 18 de gestación (día del parto) con las diferentes dietas, mostró un aumento final de 24.3% en el grupo alimentado con la dieta control y de 4.1 % en el grupo alimentado con la dieta deficiente de triptofano ( $p < 0.05$ ) (Figura 9).

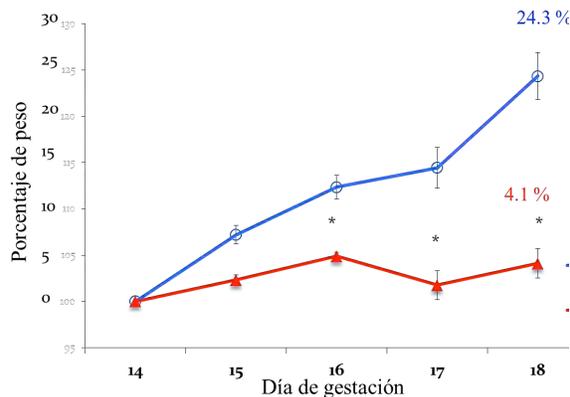


Figura 9. Porcentaje de peso ganado durante el cambio de dieta en ratones control (triángulo rojo) y deficiente en triptofano (círculo azul) entre los 14 y 18 días de gestación. Los datos representan la media  $\pm$  ES. n=13 ratones por grupo. \* $p < 0.05$  comparado con el control.

En la relación con el consumo de alimento/peso corporal, el grupo alimentado con la dieta deficiente en triptofano presentó un menor consumo de alimento que el grupo control al día 15 y 16 de gestación ( $p < 0.05$ ) (Figura 10).

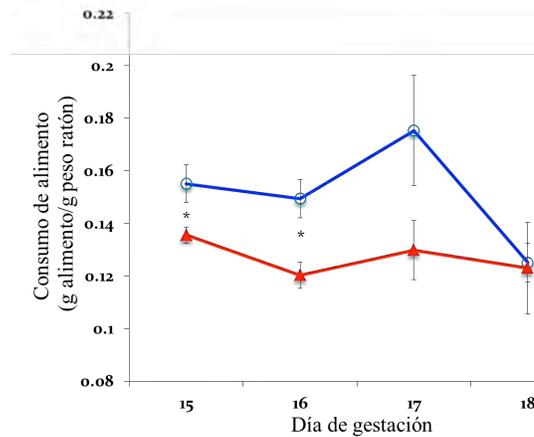


Figura 10. Relación de consumo de alimento con respecto al peso del animal en ratones control (círculo azul) y deficiente en triptofano (triángulo rojo) durante el cambio de dieta entre los días 14 y 18 días de gestación. Los datos representan la media  $\pm$  ES.  $n=12-16$  ratones por grupo.  $*p<0.05$  comparado con el control.

### Curva de tolerancia a la glucosa al día 17 de gestación.

Con el fin de dilucidar cómo afecta la dieta deficiente de triptofano la homeostasis de la glucosa durante el periodo final de la gestación, efectuamos el análisis de pruebas de tolerancia a la glucosa. Nuestros resultados muestran una disminución en las concentraciones de glucosa a los 15 min posteriores a la inyección de glucosa en los ratones alimentados con la dieta deficiente en triptofano ( $P \leq 0.05$ ) (Figura 11).

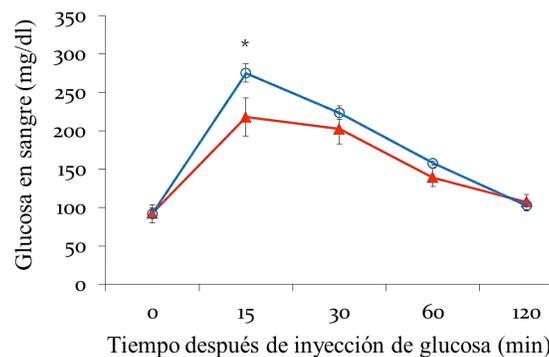


Figura 11. Curva de tolerancia a la glucosa al final de la lactancia en ratones control (círculo azul) y deficiente en triptofano (triángulos rojo);  $n = 7$  animales por grupo.  $*P \leq 0.05$  comparado con el control. Los datos representan la media  $\pm$  ES.

## LACTANCIA

Uno de los problemas enfrentados en el desarrollo del trabajo experimental durante la lactancia, radicó en que el grupo alimentado con la dieta deficiente en triptofano cometía canibalismo hacia sus crías, esto ocasionó la necesidad de evitar el ataque de las madres deficiente en triptofano

hacia sus crías, sin eliminar el estímulo de la lactancia, el cual es importante para la secreción hormonal[83-85] por lo que se restringió la lactación a un periodo de 4 horas (lactancia pausada) sujeto a observación; también se incluyó un segundo grupo sometido a un proceso de lactancia continua o normal en el que las crías estaban las 24 horas del día con su madre.

### CAMBIOS QUE SE PRODUCEN EN EL PERIODO DE LACTANCIA EN RESPUESTA AL TIPO DE LACTANCIA.

El grupo control con lactancia continúa, presenta una tendencia de mayor consumo de alimento y mayor ganancia de peso a lo largo de la lactancia, comparado con el grupo control sometido a lactancia pausada. (Figura 12 y 13).

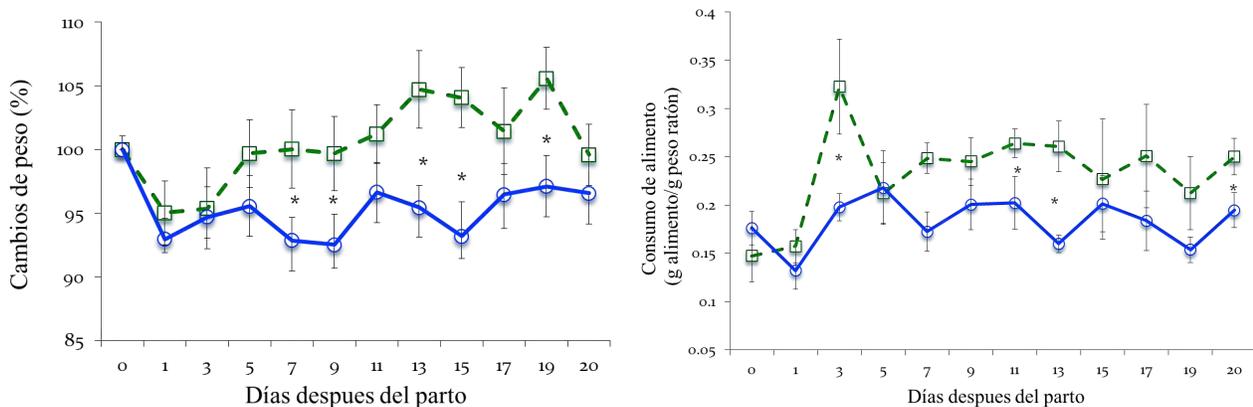


Figura 12 y 13 .Porcentaje de cambios de peso corporal (grafica de la izquierda) y consumo de alimento (grafica de la derecha) lo largo del periodo de cuatro semanas después del parto en ratones control lactancia pausada (círculos azules) y control lactancia continua (línea punteada). n=6 ratones para cada grupo. \* $p \leq 0.05$  comparado con el control Los datos representan la media  $\pm$  ES.

Al final de la lactancia, el análisis de las concentraciones de insulina en sangre reveló que el grupo alimentado con dieta control bajo lactancia continua presentó una concentración mayor de insulina (0.91 ng/ml) comparado con el grupo bajo dieta control de lactancia pausada, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $P \geq 0.05$ ) (Figura 14). Por el contrario, el grupo lactancia continua en el análisis de las concentraciones de glucosa durante la prueba de tolerancia reveló una concentración de glucosa menor a los 15 y 30 minutos ( $P \leq 0.05$ ) comparado con el grupo de lactancia pausada (Figura 15).

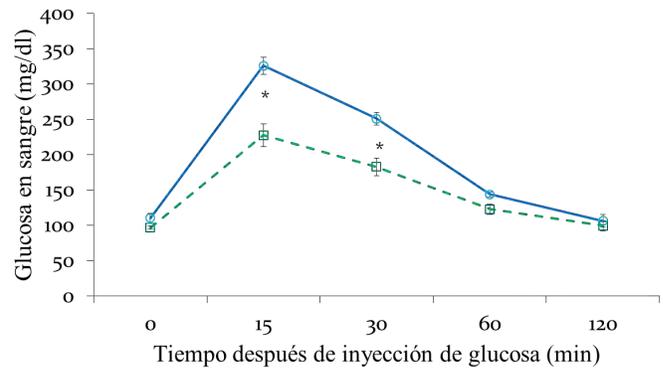
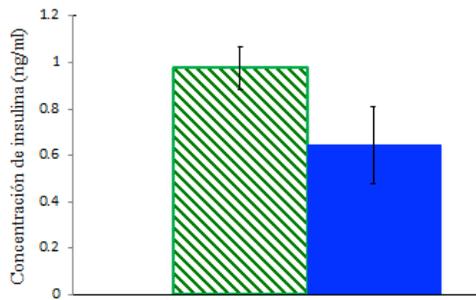


Figura 14 y 15. Concentración de insulina en sangre ( grafica de la izquierda) y curva de tolerancia a la glucosa (grafica de la derecha) al final de la lactancia en ratones control lactancia pausada (barra con relleno azul y circulo azules) y control lactancia continua (barra con relleno lineal y línea punteado); n = 6-7 animales por grupo. \*P≤ .05. Los datos

En nuestro estudio, el tipo de lactancia no modificó el peso del páncreas en los ratones (Figura 16).

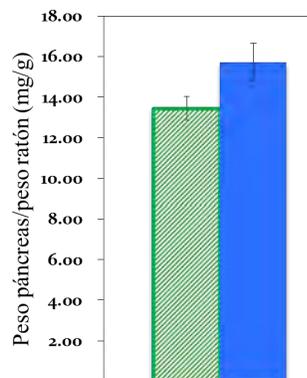


Figura 16. Peso páncreas en ratones control lactancia pausada (barra con relleno azul) y controla lactancia continua (barra con relleno lineal); n = 5-7 animales por grupo. \*P≤.05. Los datos representan la media ± ES.

Con respecto en el tamaño promedio de los islotes encontrados al final de la lactancia, nuestros estudios también revelaron que el tipo de lactancia a la que estuvieron sometidos los ratones produjo diferencias en la morfología de los islotes. Se encontró que los islotes de las ratones con lactancia pausada tuvieron mayor tamaño promedio de islotes ( 20 480  $\mu\text{m}^2$  ) (Figura 17, 18 y 19) , mayor proporción de células beta (91.18 %) y menor de células alfa (8.82 %) (Figura 20 y 21) que los animales bajo lactancia normal ( 12 709  $\mu\text{m}^2$  tamaño promedio de islote; 88.33 % células beta y 11.67 % células alfa) (P≤0.05).

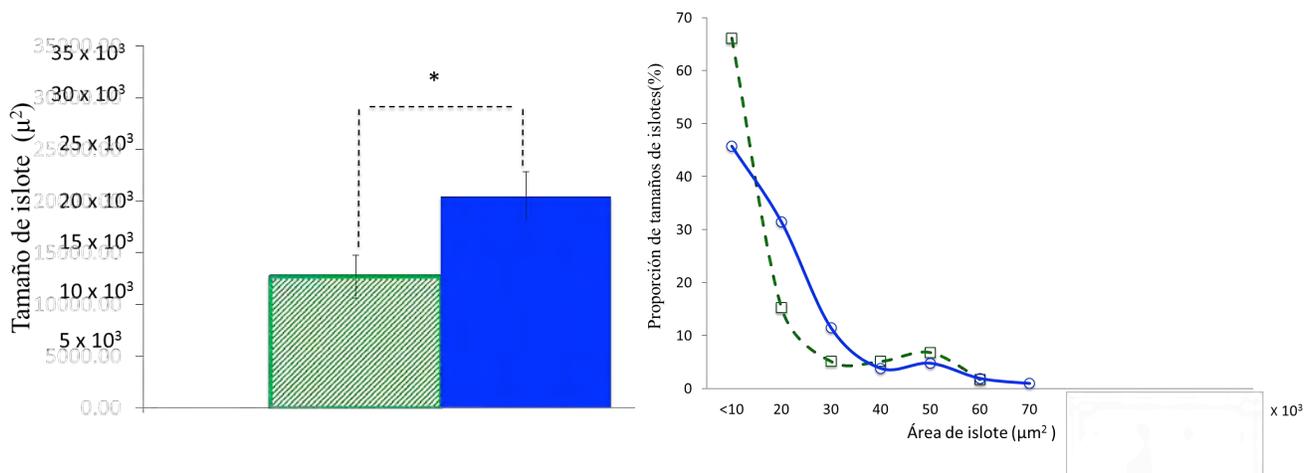


Figura 17 y 18. Tamaño de los islotes (grafica de la izquierda) en ratones control lactancia pausada (barra con relleno azul) y control lactancia continua (barra con relleno lineal);  $n = 5-7$  animales por grupo. Distribución de frecuencias del tamaño de los islotes (grafica de la derecha), expresado como el porcentaje del número total de islotes medidos en ratones control (círculos azules) y ratones control lactancia continua (línea punteada).  $n = 122$  islotes (deficiente en triptofano) y 111 islotes (control lactancia pausada).  $*P \leq .05$ . Los datos representan la media  $\pm$  ES.

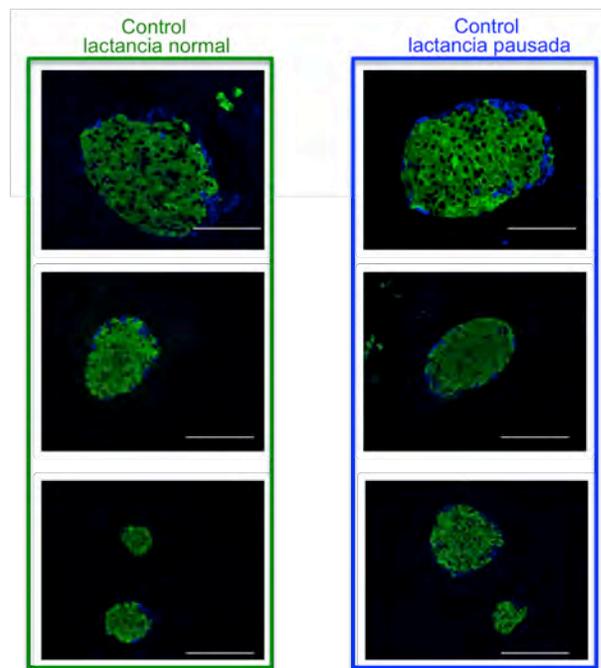


Figura 19. Cortes de páncreas de ratonas madres al final de una lactancia de 21 días y alimentados con una dieta control lactancia pausada (panel de la izquierda) y dieta control lactancia continua (panel de la derecha). Los cortes se tiñeron por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-insulina (verde) y anti-glucagon (azul) para localizar a los islotes pancreáticos. Las fotografías corresponden a islotes representativos de los encontrados en 4-5 individuos de cada grupo experimental. Las barras equivalen a 50 µm.

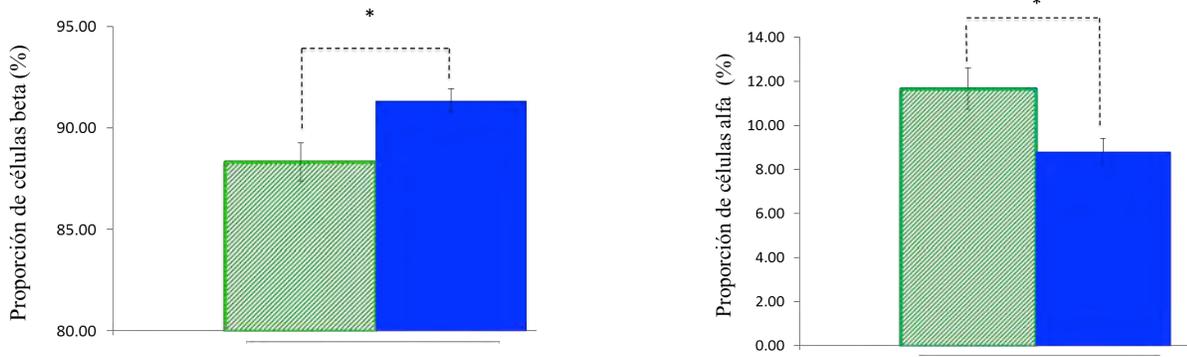


Figura 20 y 21. Proporción de células beta (grafica de la derecha) y alfa (grafica de la izquierda) en el islote de las madres al final de una lactancia de 21 días y alimentados con una dieta control lactancia pausada (barra con relleno azul) y dieta control lactancia continua (barra con relleno lineal);  $n = 122$  islotes (deficiente en triptofano) y  $111$  islotes (control lactancia pausada). Los valores representan la media  $\pm$  ES.  $*p \leq 0.05$  comparado con el control.

## CAMBIOS QUE SE PRODUCEN EN EL PERIODO DE LACTANCIA EN RESPUESTA AL TIPO DE DIETA

El grupo experimental con dieta deficiente en triptofano, se sometió también al proceso de lactancia pausada, al igual que el grupo control.

### Peso corporal y consumo de alimento.

El tipo de dieta en los grupos de lactancia pausada no produjo cambios significativos en el porcentaje de cambio en el peso corporal ni en el consumo de alimento durante estos periodos (Figura 22 y 23).

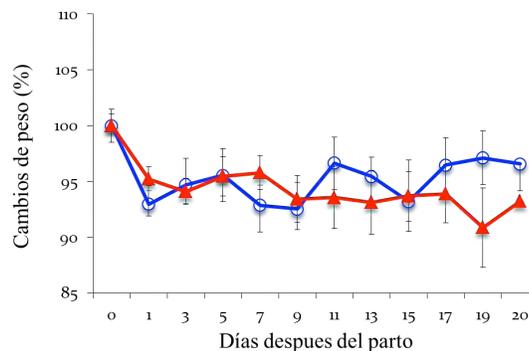


Figura 22. Porcentaje de cambios de peso corporal a lo largo del periodo de cuatro semanas después del parto en ratones control (círculos azules) y ratones deficientes en triptofano (triángulos rojos).  $n=6$  ratones para cada grupo. Los datos representan la media  $\pm$  ES.

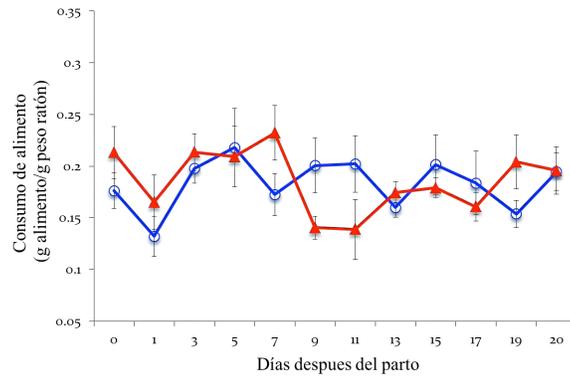


Figura 23. Consumo de alimento a lo largo del periodo de cuatro semanas después del parto en ratones control (círculos azules) y ratones deficientes en triptófano (triángulos rojos). n=6 ratones para cada grupo. Los datos representan la media  $\pm$  ES.

### Curva de tolerancia a la glucosa.

Al final de la lactancia, el análisis de las concentraciones de glucosa durante la prueba de tolerancia reveló diferencias ( $P \leq 0.05$ ) a los minutos 15 y 30 después de la administración de glucosa, entre los grupos que estuvieron bajo lactancia pausada recibiendo dieta control y dieta deficiente en triptófano (Figura 24).

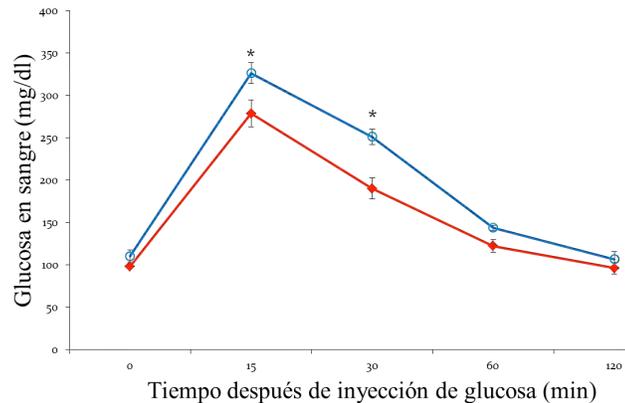


Figura 24. Curva de tolerancia a la glucosa al final de la lactancia en ratones control (círculos azules) y ratones deficientes en triptófano (rombo rojos). n = 7 animales por grupo. \* $P \leq 0.05$  comparado con el control. Los datos representan la media  $\pm$  ES.

### Concentración de insulina en suero.

Al final de la lactancia, el análisis de las concentraciones de insulina en sangre reveló que el grupo alimentado con una dieta deficiente en triptófano, presentó una concentración de 0.378 ng/ml de insulina en tanto que el grupo control sometido a lactancia pausada presentó

0.645ng/ml. Sin embargo, este resultado no muestra diferencia significativa entre los grupos (Figura 25).

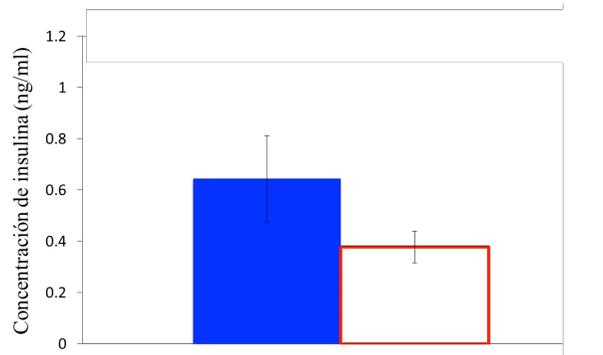


Figura 25. Concentración de insulina en sangre la final de la lactancia en ratones control lactancia pausada (barra relleno azul) y deficiente en triptofano (barra sin relleno); n = 6 animales por grupo. Los datos representan la media  $\pm$  ES.

### Peso del páncreas.

Al final de la lactancia se encontró que la diferencia del tipo de dieta modificó el peso del páncreas; siendo menor el peso del páncreas en los ratones alimentados con la dieta deficientes en triptofano (Figura 26) comparado con el control lactancia pausada.

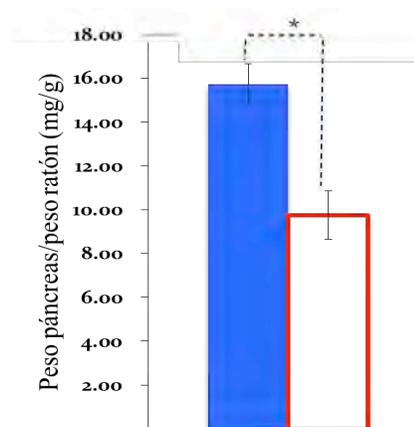


Figura 26. Peso páncreas en ratones control lactancia pausada (barra con relleno azul) y deficiente en triptofano (barra sin relleno); n = 5-7 animales por grupo. \* $P \leq 0.05$ . Los datos representan la media  $\pm$  ES.

## Histología y morfología del islote.

Con respecto en el tamaño promedio de los islotes encontrados al final de la lactancia, parece existir una tendencia de menor tamaño en el grupo con deficiencia en triptofano, no obstante esta diferencia no es significativa estadísticamente ( $P \geq 0.05$ ) (Figura 27). En el grupo que recibió la dieta deficiente de triptofano se encontró un número escaso de islotes con tamaño entre 50,000 y 60,000  $\mu\text{m}^2$ , en tanto que en el grupo de lactancia pausada que recibió la dieta control se observan islotes hasta de 70,000  $\mu\text{m}^2$  los cuales no se observaron en los animales del grupo deficiente (Figura 28 y 29). El análisis de la frecuencia de las células beta reveló que el grupo control de lactancia pausada presentó mayor porcentaje de células beta (91.18 %) (Figura 30) y un menor porcentaje de células alfa (8.82 %) (Figura 31), que los presentados en el grupo deficiente en triptofano bajo el mismo tipo de lactancia (87.06 % células beta y 12.94 % células alfa) ( $P \leq 0.05$ ).

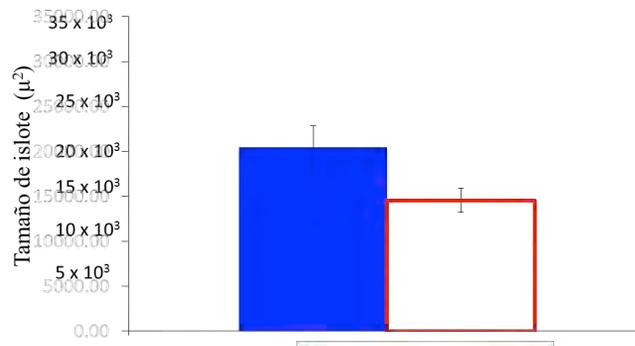


Figura 27. Tamaño de los islotes en ratones control lactancia pausada (barra con relleno azul) y deficiente en triptofano (barra sin relleno);  $n = 5-7$  animales por grupo.  $*P \leq 0.05$ . Los datos representan la media  $\pm$  ES.

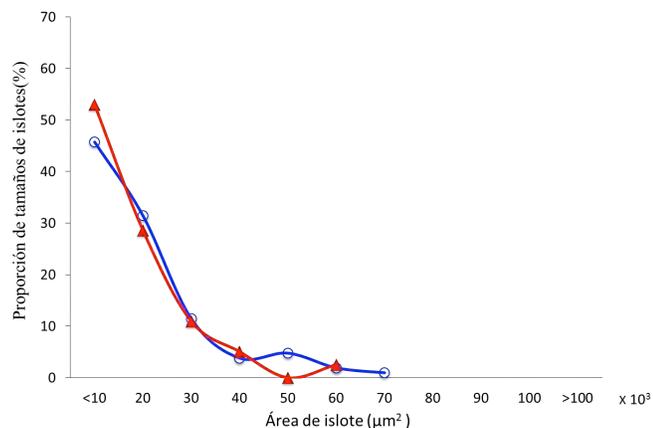


Figura 28. Distribución de frecuencias del tamaño de los islotes, expresado como el porcentaje del número total de islotes medidos en ratones control (círculos azules) y ratones deficientes en triptofano (triángulos rojos).  $n = 122$  islotes (deficiente en triptofano) y 111 islotes (control lactancia pausada).

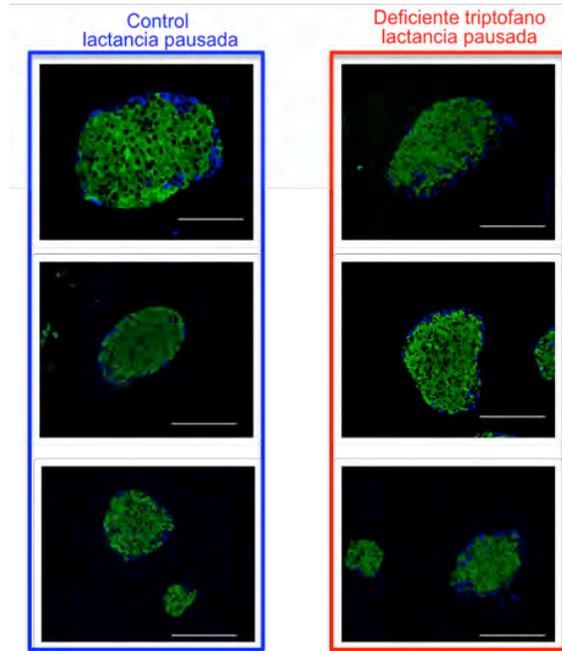


Figura 29 . Cortes de páncreas de ratonas madres al final de una lactancia de 21 días y alimentados con una dieta control (panel de la izquierda) y una dieta deficiente de triptofano (panel de la derecha). Los cortes se tiñeron por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-insulina (verde) y anti-glucagon (azul) para localizar a los islotes pancreáticos. Las fotografías corresponden a islotes representativos de los encontrados en 4-5 individuos de cada grupo experimental. Las barras equivalen a 50  $\mu$ m.

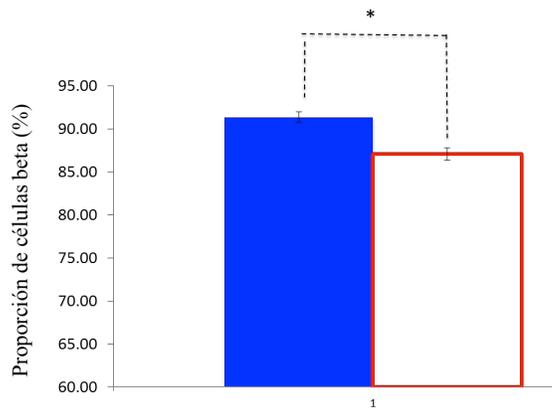


Figura 30. Proporción de células beta en el islote de las madres al final de una lactancia de 21 días y alimentados con una dieta control (barra con relleno azul) y una dieta deficiente de triptofano (barra sin relleno); n = 122 islotes (deficiente en triptofano) y 111 islotes (control lactancia pausada). Los valores representan la media  $\pm$  ES. \* $p \leq 0.05$  comparado con el control.

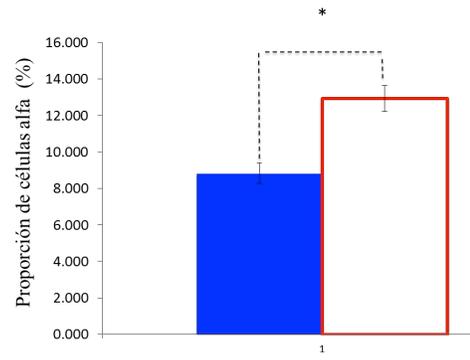


Figura 31. Proporción de células alfa en el islote de las madres al final de una lactancia de 21 días y alimentados con una dieta control (barra con relleno azul) y una dieta deficiente de triptofano (barra sin relleno); n = 122 islotes (deficiente en triptofano) y 111 islotes (control lactancia pausada). Los valores representan la media  $\pm$  ES. \* $p \leq 0.05$  comparado con el control.

## Discusión de Resultados

Actualmente, la serotonina ha despertado gran interés debido a su participación en la modulación de diversas funciones en tejidos periféricos, incluyendo el páncreas [40, 42, 45-64]. Desde los años 80s se conocía que los islotes pancreáticos almacenaban serotonina [63], sin embargo su función era desconocida. Fue hasta el 2010 que se pudo elucidar la función de ésta en los islotes pancreáticos, en particular durante la gestación. Se ha encontrado que la serotonina durante la primera mitad de la gestación aumenta en la replicación de las células  $\beta$  para incrementar la masa de las células  $\beta$ , a través del receptor 5- hidroxitriptamina 2b (HTR2b) [40]. aumenta en la replicación de las células  $\beta$  para incrementar la masa de las células  $\beta$ , a través del receptor 5- hidroxitriptamina 2b (HTR2b). La inhibición de la síntesis de serotonina por restricción dietaria de triptófano o inhibición de la Tph1, no permite la expansión de la masa de las células  $\beta$  e induce intolerancia a la glucosa durante la gestación sin afectar la sensibilidad de la insulina. En el periodo final de la gestación, se encontró que existe una disminución en la expresión del receptor *HTR2b* y se aumenta la expresión del receptor *5HTR1d*. Se ha propuesto que los cambios en la expresión de estos receptores son los responsables de la disminución de la proliferación y la masa de las células  $\beta$  en las etapas finales de la gestación y la lactancia. Con una estrategia mediante la restricción de triptofano, similar a la que se utilizó para revelar que la serotonina participaba en la expansión de la masa de los islotes durante la gestación [40], estudiamos cuál es la participación de la serotonina durante el final de la gestación y la lactancia en ratones a los que se les administró una dieta deficiente baja en contenido de su precursor, el triptofano.

### EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE TRIPTOFANO AL FINAL DE LA GESTACIÓN

Se sabe que en los roedores los islotes han alcanzado su tamaño máximo el día 14 de gestación [28, 29, 40]. Con el fin de dilucidar qué acción tiene la serotonina en el islote pancreático durante la etapa final de la gestación, se investigó cuál es el efecto de la deficiencia de su precursor, el triptofano, a partir de este día. Los resultados revelaron que la administración de la dieta deficiente en triptofano repercute en la homeostasis de la glucosa, la ganancia de peso y el consumo de alimento durante el periodo de estudio. La carencia de triptofano y su participación como precursor de otras moléculas con funciones en la regulación de apetito y el

sistema nervioso central (serotonina, niacina y melatonina); podrían dar una explicación de los efectos observados en el consumo de alimento y ganancia de peso.

Con respecto a la homeostasis de la glucosa, tres días después del inicio de la dieta (día 17 de gestación) se observan modificaciones en la curva de tolerancia, encontrándose que el grupo deficiente presentó menor concentración de glucosa al minuto 15. (Figura 11). En la regulación de las concentraciones sanguíneas en la curva de tolerancia a la glucosa participan tanto el proceso de secreción de insulina como la sensibilidad de los tejidos periféricos a la hormona. Dado que en este periodo existe resistencia a la insulina [86], la curva de tolerancia en los animales del grupo control resulta acorde con el efecto fisiológico en este periodo. La mejor tolerancia a la glucosa en el grupo deficiente podría deberse a una mejor respuesta a la acción de la insulina en los tejidos periféricos, por lo que será necesario efectuar otros estudios específicamente dirigidos a analizar la sensibilidad a la insulina (prueba de tolerancia a la insulina o clamps hiperinsulinemia-euglucemia) que permitan resolver esta duda. Si bien podría considerarse que una mejor tolerancia a la glucosa en el grupo deficiente es benéfica, hay que recordar que la función de la resistencia a la hormona durante el embarazo tiene como finalidad favorecer la nutrición del feto, lo que sugiere que en las ratonas deficientes se ve comprometido el desarrollo del producto. Hubiese sido interesante analizar el peso de las crías, sin embargo esta medición no se efectuó para evitar el rechazo de la madre a amamantar a los retoños por la manipulación de éstos.

A partir del cambio de dieta el día 14 y hasta el final de la gestación, la deficiencia de triptofano también repercute en el de peso corporal y consumo de alimento de la madre. En nuestros experimentos, el grupo con la dieta deficiente en triptofano presentó un menor consumo de alimento (Figura 10) y una menor ganancia (4.1 %) de peso corporal comparado con el grupo control (24.3%) (Figura 9). La carencia de este aminoácido esencial y su participación como precursor de la serotonina quien cumple una función importante en el sistema nervioso central al regular el apetito [42, 87] podrían dar una explicación de los efectos observados.

## COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS CON DIFERENTE TIPO DE LACTANCIA

El modelo experimental con el que se trabajó en esta tesis nos permitió observar que existen diferencias entre los efectos que produce una lactancia continua y una discontinua. Encontramos que existe mayor consumo de alimento en el grupo sometido a una lactancia

continua. Esta observación coincide con estudios [88-90] que han encontrado que en ausencia de transferencia de nutrientes a las crías, las madres lactantes consumen menor cantidad de alimento. Los resultados revelaron que los grupos que estuvieron bajo lactancia pausada presentaron menor tolerancia a la glucosa, comparada con el grupo que estuvo bajo lactancia continua (Figura 24). Este hallazgo resulta sorprendente ya que sugiere que la frecuencia de succión tiene un efecto sobre la homeostasis de la glucosa; sin embargo, este efecto no parece estar ligado a la masa de los islotes ya que el área de los islotes y la frecuencia de las células beta es mayor en el grupo bajo lactancia pausada que en el grupo de lactancia continua. Por lo tanto, aunque el grupo sometido a lactancia pausada presenta mayor tamaño en los islotes y mayor proporción de células beta, se presenta menor tolerancia a la glucosa, lo que posiblemente está relacionado con menor sensibilidad a la insulina, por lo que será necesario efectuar otros estudios específicamente dirigidos a analizar la sensibilidad a la insulina (prueba de tolerancia a la insulina o clamps hiperinsulinemia-euglucemia). Se encontraron también diferencias entre los dos grupos en la proporción de células alfa por islote, siendo menor en el grupo de lactancia pausada (Figura 31). Otra diferencia entre los dos grupos se encontró en la distribución del área de los islotes, que en el caso de la lactancia pausada se observó una mayor frecuencia de islotes de tamaños entre 10,000-20,000  $\mu\text{m}^2$ , en tanto que en el grupo lactancia continua predominan islotes entre 1 000-8 000  $\mu\text{m}^2$  (Figura 28) Este es el primer estudio que muestra que el tipo de lactancia afecta la distribución de área de los islotes.

Diversos estudios reportan la importancia de la lactancia en la homeostasis de la glucosa e incidencia de Diabetes Mellitus 2 [91-97], sin embargo existe poca información de los eventos que acontecen en el islote durante este periodo Este trabajo es el primero en analizar los cambios en la distribución de área de los islotes al final de la lactancia y las diferencias que produce la restricción parcial de la lactancia en la homeostasis de la glucosa y la masa de los islotes. Son necesarios más estudios que determinen las repercusiones del tipo de lactancia en la función y morfología de los islotes, así como el curso temporal de cambios en la función y morfología de los islotes lo largo de la lactancia.

Como se señaló en la sección de resultados, con el fin de restringir el canibalismo de las ratonas bajo la dieta deficiente de triptofano, se trabajó con dos grupos experimentales, sometidos a cada uno a un proceso de lactancia consistente en colocar las crías durante 4 horas al día, que

se denomina lactancia pausada. Bajo este tipo de amamantamiento, uno de ellos se mantuvo con la dieta control y otro con la dieta deficiente en triptofano.

### COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS DE LACTANCIA PAUSADA

La comparación entre los grupos de lactancia pausada reveló que la restricción del triptofano en la madre no afectó significativamente el peso corporal, el consumo de alimento ni el tamaño promedio de los islotes con respecto al grupo control bajo lactancia pausada.

En nuestro estudio encontramos que la frecuencia de las células beta fue menor en el grupo deficiente de triptofano, también se observó menor insulina en suero, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa. La curva de tolerancia a la glucosa del grupo deficiente de triptófano muestra menor área bajo la curva que en el grupo control. Dado que en nuestros estudios se encontró que la dieta deficiente de triptofano disminuye la proporción de las células beta, resulta más probable que esta mayor tolerancia a la glucosa está ligada a una mejor respuesta a la acción de la insulina en los tejidos periféricos que ha una mejor secreción de insulina, sin embargo será necesario realizar otros estudios que nos permitan responder esta incógnita

La frecuencia de las células alfa fue mayor en el grupo deficiente del aminoácido. Con respecto a esta observación, estudios en desnutrición proteica, revelan que en los islotes sometidos a esta deficiencia aumentan el número de células alfa en los islotes [98]. Los resultados aquí obtenidos indican que un efecto similar se produce con la carencia de un aminoácido esencial como lo es el triptófano. Otro aspecto que se vio afectado por la deficiencia de triptofano fue el peso del páncreas, el cual fue menor al del grupo control (Figura 26). Dado que el tejido mayoritario del páncreas corresponde al tejido acinar, la observación obtenida en este estudio sugiere que la deficiencia del aminoácido podría estar afectando a este componente del páncreas. Si bien el efecto de la deficiencia de triptófano sobre el tejido acinar resulta interesante y ameritaría estudios posteriores, para este proyecto las alteraciones en la función y estructura del tejido exocrino escapan de los objetivos planteados.

## Conclusión

El consumo de una dieta deficiente en triptofano a partir del día 14 de gestación afecta la homeostasis de la glucosa, el consumo de alimento y la ganancia de peso corporal. Al día 17 de gestación, los animales con dieta deficiente de triptofano no muestran una curva de tolerancia a la glucosa típica que sugiera resistencia a la insulina, usualmente presente en la gestación.

La comparación entre el diferente tipo de lactancia (pausada vs. continua) reveló que la lactancia pausada aumentó el tamaño de los islotes, la proporción de células beta y el área bajo la curva de tolerancia a la glucosa, en tanto que disminuyó la proporción de células alfa y no tuvo cambios en el peso del páncreas.

Al término de 21 días de tratamiento después del parto, en los grupos de lactancia pausada se encontró que la deficiencia de triptofano no mostró diferencia en la curva de tolerancia a la glucosa comparados con el grupo control de lactancia pausada. El tamaño de los islotes y la proporción de las células beta fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) menores en el grupo con deficiencia de triptófano, y su proporción de célula alfa mayores que las del grupo control de lactancia pausada. Si bien hubo menor concentración de insulina en suero, esta no resultó estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

De acuerdo con el planteamiento del problema, se esperaba que la restricción de triptofano en la dieta disminuyera la síntesis de serotonina en las células beta y por ende la capacidad de interactuar con su receptor 5HT<sub>1d</sub>. De esta manera se esperaba que afectara al páncreas endocrino impidiendo la reversión de la hipertrofia acontecida durante la gestación, encontrándose al final de la lactancia islotes más grandes en el grupo con dieta restringida del aminoácido. Sin embargo se encontraron islotes más pequeños y con menos células beta que su grupo control correspondiente. Estudios específicamente diseñados bloqueando la interacción de la serotonina con su receptor serán necesarios para probar la acción de la serotonina en la restitución del tamaño del islote en etapas posteriores a la primera mitad de la gestación y la lactancia.

## Referencias

1. Drasutiene GS, Tutkuvienė J, Zakareviciene J, Ramasauskaite D, Kasilovskiene Z, Lauzikiene D, Drazdiene N, Barkus A, Arlauskiene A, Drasutis J: **[Changes in anthropometric and metabolic parameters in pregnancy and neonatal physical development during last decades]**. *Medicina (Kaunas)* 2007, **43**:10-26.
2. Al-Noaemi M, Shalayer M: **Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus: The Past, the Present and the Future, Gestational Diabetes**. 2011.
3. Lain KY, Catalano PM: **Metabolic changes in pregnancy**. *Clin Obstet Gynecol* 2007, **50**:938-948.
4. Schuit FC: **Is GLUT2 required for glucose sensing?** *Diabetologia* 1997, **40**:104-111.
5. Matschinsky FM: **Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm**. *Diabetes* 1996, **45**:223-241.
6. Gloyn AL, Tribble ND, van de Bunt M, Barrett A, Johnson PR: **Glucokinase (GCK) and other susceptibility genes for beta-cell dysfunction: the candidate approach**. *Biochem Soc Trans* 2008, **36**:306-311.
7. Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, Matsui J, Suzuki R, Komeda K, Hara A, Toyoda Y, Miwa I, Aizawa S, et al: **Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance**. *J Clin Invest* 2007, **117**:246-257.
8. Aguilar-Bryan L, Clement JPt, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J: **Toward understanding the assembly and structure of KATP channels**. *Physiol Rev* 1998, **78**:227-245.
9. Ashcroft FM, Proks P, Smith PA, Amala C, Bokvist K, Rorsman P: **Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells**. *Journal of Cellular Biochemistry* 1994, **55**:54-65.
10. Rorsman P, Renstrom E: **Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells**. *Diabetologia* 2003, **46**:1029-1045.
11. Mirmira RG, Kulkarni RN: **Metabolic Syndrome ePoster: Pancreatic islet function during normal metabolic physiology**. 2010.
12. Rieck S, Kaestner KH: **Expansion of beta cell mass in response to pregnancy**. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2010, **21**:151-158.
13. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Ropero AB, Quesada I: **The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance**. *J Physiol* 2009, **587**:5031-5037.
14. Rieck S, Kaestner KH: **Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy**. *Trends Endocrinol Metab* 2010, **21**:151-158.
15. Persaud SJ, Jones PM, Howell SL: **Staurosporine inhibits protein kinases activated by Ca<sup>2+</sup> and cyclic AMP in addition to inhibiting protein kinase C in rat islets of Langerhans**. *Mol Cell Endocrinol* 1993, **94**:55-60.
16. Bouwens L, Rooman I: **Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass**. *Physiological Reviews* 2005, **85**:1255-1270.
17. Chandra R, Liddle RA: **Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion**. *Curr Opin Gastroenterol* 2009, **25**:441-446.
18. Morimoto S, Morales A, Zambrano E, Fernandez-Mejia C: **Sex steroids effects on the endocrine pancreas**. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010, **122**:107-113.

19. McCarty MF: **cGMP may have trophic effects on beta cell function comparable to those of cAMP, implying a role for high-dose biotin in prevention/treatment of diabetes.** *Medical hypotheses* 2006, **66**:323-328.
20. Laychock SG: **Effects of guanosine 3',5'-monophosphate on glucose utilization in isolated islets of Langerhans.** *Endocrinology* 1987, **120**:517-524.
21. Vilches-Flores A, Tovar AR, Marin-Hernandez A, Rojas-Ochoa A, Fernandez-Mejia C: **Biotin increases glucokinase expression via soluble guanylate cyclase/protein kinase G, adenosine triphosphate production and autocrine action of insulin in pancreatic rat islets.** *J Nutr Biochem* 2010, **21**:606-612.
22. Aikin R, Hanley S, Maysinger D, Lipsett M, Castellarin M, Paraskevas S, Rosenberg L: **Autocrine insulin action activates Akt and increases survival of isolated human islets.** *Diabetologia* 2006, **49**:2900-2909.
23. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA: **Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation.** *Nature* 2004, **429**:41-46.
24. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: **Beta-Cell Deficit and Increased beta-Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes.** *Diabetes* 2003, **52**:102-110.
25. Rieck S, White P, Schug J, Fox AJ, Smirnova O, Gao N, Gupta RK, Wang ZV, Scherer PE, Keller MP, et al: **The Transcriptional Response of the Islet to Pregnancy in Mice.** *Molecular Endocrinology* 2009, **23**:1702-1712.
26. Freemark M: **Regulation of maternal metabolism by pituitary and placental hormones: roles in fetal development and metabolic programming.** *Horm Res* 2006, **65 Suppl 3**:41-49.
27. Catalano PM: **Pregnancy and lactation in relation to range of acceptable carbohydrate and fat intake.** *Eur J Clin Nutr* 1999, **53 Suppl 1**:S124-131; discussion S131-125.
28. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL: **Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion.** *Endocrinology* 1992, **130**:1459-1466.
29. Sorenson RL, Brelje TC: **Adaptation of Islets of Langerhans to Pregnancy: Beta Cell Growth, Enhanced Insulin Secretion and the Role of Lactogenic Hormones.** *Horm Metab Res* 1997, **29**:301,307.
30. Van Assche FA, Aerts L, De Prins F: **A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy.** *Br J Obstet Gynaecol* 1978, **85**:818-820.
31. Herrera E: **Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus.** *Eur J Clin Nutr* 2000, **54 Suppl 1**:S47-51.
32. Aerts L, Van Assche FA: **Intra-uterine transmission of disease.** *Placenta* 2003, **24**:905-911.
33. Amaral ME, Ueno M, Carvalheira JB, Carneiro EM, Velloso LA, Saad MJ, Boschero AC: **Prolactin-signal transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-signaling pathway.** *Horm Metab Res* 2003, **35**:282-289.
34. Freemark M, Avril I, Fleenor D, Driscoll P, Petro A, Opara E, Kendall W, Oden J, Bridges S, Binart N, et al: **Targeted Deletion of the PRL Receptor: Effects on Islet Development, Insulin Production, and Glucose Tolerance.** *Endocrinology* 2002, **143**:1378-1385.
35. Vasavada RC, Garcia-Ocaña A, Zawalich WS, Sorenson RL, Dann P, Syed M, Ogren L, Talamantes F, Stewart AF: **Targeted Expression of Placental Lactogen in the Beta**

- Cells of Transgenic Mice Results in Beta Cell Proliferation, Islet Mass Augmentation, and Hypoglycemia.** *Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**:15399-15406.
36. Brelje TC, Svensson AM, Stout LE, Bhagroo NV, Sorenson RL: **An Immunohistochemical Approach to Monitor the Prolactin-induced Activation of the JAK2/STAT5 Pathway in Pancreatic Islets of Langerhans.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2002, **50**:365-383.
  37. Huang C, Snider F, Cross JC: **Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy.** *Endocrinology* 2009, **150**:1618-1626.
  38. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW: **What Can We Learn from Rodents about Prolactin in Humans?** *Endocrine Reviews* 2008, **29**:1-41.
  39. Karnik SK, Chen H, McLean GW, Heit JJ, Gu X, Zhang AY, Fontaine M, Yen MH, Kim SK: **Menin Controls Growth of Pancreatic beta-Cells in Pregnant Mice and Promotes Gestational Diabetes Mellitus.** *Science* 2007, **318**:806-809.
  40. Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, Fujitani Y, Kawamori R, Miyatsuka T, Kosaka Y, et al: **Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy.** *Nat Med* 2010, **16**:804-808.
  41. Schraenen A, Lemaire K, de Faudeur G, Hendrickx N, Granvik M, Van Lommel L, Mallet J, Vodjdani G, Gilon P, Binart N, et al: **Placental lactogens induce serotonin biosynthesis in a subset of mouse beta cells during pregnancy.** *Diabetologia* 2010, **53**:2589-2599.
  42. Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM: **Serotonin: a review.** *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2008, **31**:187-199.
  43. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR: **Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2002, **71**:533-554.
  44. Kandel E: *Depression, mania and anxiety disorders.* In *Principles of Neural Science*. edn. New York: McGraw-Hill; 2001.
  45. Mitchell JR, Sharp AA: **Platelet Clumping in Vitro.** *Br J Haematol* 1964, **10**:78-93.
  46. O'Brien JR: **A Comparison of Platelet Aggregation Produced by Seven Compounds and a Comparison of Their Inhibitors.** *J Clin Pathol* 1964, **17**:275-281.
  47. Hilton BP, Cumings JN: **An assessment of platelet aggregation induced by 5-hydroxytryptamine.** *J Clin Pathol* 1971, **24**:250-258.
  48. Matsuda M, Imaoka T, Vomachka AJ, Gudelsky GA, Hou Z, Mistry M, Bailey JP, Nieport KM, Walther DJ, Bader M, Horseman ND: **Serotonin Regulates Mammary Gland Development via an Autocrine-Paracrine Loop.** *Developmental Cell* 2004, **6**:193-203.
  49. Stull MA, Pai V, Vomachka AJ, Marshall AM, Jacob GA, Horseman ND: **Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:16708-16713.
  50. Pai VP, Horseman ND: **Biphasic regulation of mammary epithelial resistance by serotonin through activation of multiple pathways.** *J Biol Chem* 2008, **283**:30901-30910.
  51. Collet C, Schiltz C, Geoffroy V, Maroteaux L, Launay JM, de Vernejoul MC: **The serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor controls bone mass via osteoblast recruitment and proliferation.** *FASEB J* 2008, **22**:418-427.

52. de Vernejoul MC, Collet C, Chabbi-Achengli Y: **Serotonin: good or bad for bone.** *Bonekey Rep* 2012, **1**:120.
53. Ducy P, Karsenty G: **The two faces of serotonin in bone biology.** *J Cell Biol* 2010, **191**:7-13.
54. Shepherd JJ: **Serotonin and Gut Motility.** *Br Med J* 1963, **2**:1589.
55. Liu HN, Ohya S, Nishizawa Y, Sawamura K, Iino S, Syed MM, Goto K, Imaizumi Y, Nakayama S: **Serotonin augments gut pacemaker activity via 5-HT<sub>3</sub> receptors.** *PLoS One* 2011, **6**:e24928.
56. Mawe GM, Hoffman JM: **Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013, **10**:473-486.
57. Furrer K, Rickenbacher A, Tian Y, Jochum W, Bittermann AG, Kach A, Humar B, Graf R, Moritz W, Clavien PA: **Serotonin reverts age-related capillarization and failure of regeneration in the liver through a VEGF-dependent pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:2945-2950.
58. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA: **Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration.** *Science* 2006, **312**:104-107.
59. Page IH: *Serotonin*. Chicago; 1968.
60. O'Steen WK, Barnard JL, Jr., Yates RD: **Morphologic changes in skeletal muscle induced by serotonin treatment: a light- and electron-microscope study.** *Exp Mol Pathol* 1967, **7**:145-155.
61. Leven RM, Gonnella PA, Reeber MJ, Nachmias VT: **Platelet shape change and cytoskeletal assembly: effects of pH and monovalent cation ionophores.** *Thromb Haemost* 1983, **49**:230-234.
62. Welles SL, Shepro D, Hechtman HB: **Vasoactive amines modulate actin cables (stress fibers) and surface area in cultured bovine endothelium.** *J Cell Physiol* 1985, **123**:337-342.
63. Boswell CA, Majno G, Joris I, Ostrom KA: **Acute endothelial cell contraction in vitro: a comparison with vascular smooth muscle cells and fibroblasts.** *Microvasc Res* 1992, **43**:178-191.
64. Eddahibi S, Fabre V, Boni C, Martres MP, Raffestin B, Hamon M, Adnot S: **Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin.** *Circ Res* 1999, **84**:329-336.
65. Bird JL, Wright EE, Feldman JM: **Pancreatic islets: a tissue rich in serotonin.** *Diabetes* 1980, **29**:304-308.
66. Weinhaus AJ, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL: **Dexamethasone Counteracts the Effect of Prolactin on Islet Function: Implications for Islet Regulation in Late Pregnancy.** *Endocrinology* 2000, **141**:1384-1393.
67. Nicoletti-Carvalho JE, Lellis-Santos C, Yamanaka TS, Nogueira TC, Caperuto LC, Leite AR, Anhe GF, Bordin S: **MKP-1 mediates glucocorticoid-induced ERK1/2 dephosphorylation and reduction in pancreatic ss-cell proliferation in islets from early lactating mothers.** *Am J Physiol I Metab* 2010, **299**:E1006-1015.
68. Anhe GF, Nogueira TC, Nicoletti-Carvalho JE, Lellis-Santos C, Barbosa HC, Cipolla-Neto J, Bosqueiro JR, Boschero AC, Bordin S: **Signal transducer and activator of transcription 3-regulated sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2 expression by prolactin and glucocorticoids is involved in the adaptation of insulin secretory response during the peripartum period.** *J Endocrinol* 2007, **195**:17-27.

69. Lellis-Santos C, Sakamoto LH, Bromati CR, Nogueira TC, Leite AR, Yamanaka TS, Kinote A, Anhe GF, Bordin S: **The regulation of Rasd1 expression by glucocorticoids and prolactin controls peripartum maternal insulin secretion.** *Endocrinology* 2012, **153**:3668-3678.
70. Burnol AF, Leturque A, Ferre P, Kande J, Girard J: **Increased insulin sensitivity and responsiveness during lactation in rats.** *Am J Physiol* 1986, **251**:E537-541.
71. Baaziz N, Curry DL: **Synthesis-secretion coupling of insulin: effect of pregnancy and lactation.** *Pancreas* 1993, **8**:316-324.
72. Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S: **Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas.** *Endocrinology* 1995, **136**:5461-5468.
73. Schraenen A, Lemaire K, de Faudeur G, Hendrickx N, Granvik M, Van Lommel L, Mallet J, Vodjdani G, Gilon P, Binart N, et al: **Placental lactogens induce serotonin biosynthesis in a subset of mouse beta cells during pregnancy.** *Diabetologia* 2010, **53**:2589-2599.
74. Shao J, Qiao L, Friedman JE: **Prolactin, progesterone, and dexamethasone coordinately and adversely regulate glucokinase and cAMP/PDE cascades in MIN6 beta-cells.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, **286**:E304-310.
75. Gremlich S, Roduit R, Thorens B: **Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic beta cells. Comparison with the effects of fatty acids.** *J Biol Chem* 1997, **272**:3216-3222.
76. Ohneda M, Johnson JH, Inman LR, Unger RH: **GLUT-2 function in glucose-unresponsive beta cells of dexamethasone-induced diabetes in rats.** *J Clin Invest* 1993, **92**:1950-1956.
77. Chen F, Zhu Y, Tang X, Sun Y, Jia W, Sun Y, Han X: **Dynamic regulation of PDX-1 and FoxO1 expression by FoxA2 in dexamethasone-induced pancreatic beta-cells dysfunction.** *Endocrinology* 2011, **152**:1779-1788.
78. Billaudel B, Sutter BC: **Direct effect of corticosterone upon insulin secretion studied by three different techniques.** *Horm Metab Res* 1979, **11**:555-560.
79. Billaudel B, Mathias PC, Sutter BC, Malaisse WJ: **Inhibition by corticosterone of calcium inflow and insulin release in rat pancreatic islets.** *J Endocrinol* 1984, **100**:227-233.
80. Lambillotte C, Gilon P, Henquin JC: **Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets.** *J Clin Invest* 1997, **99**:414-423.
81. Pierluissi J, Navas FO, Ashcroft SJ: **Effect of adrenal steroids on insulin release from cultured rat islets of Langerhans.** *Diabetologia* 1986, **29**:119-121.
82. Khan A, Ostenson CG, Berggren PO, Efendic S: **Glucocorticoid increases glucose cycling and inhibits insulin release in pancreatic islets of ob/ob mice.** *Am J Physiol* 1992, **263**:E663-666.
83. Matthiesen AS, Ransjo-Arvidson AB, Nissen E, Uvnas-Moberg K: **Postpartum maternal oxytocin release by newborns: effects of infant hand massage and sucking.** *Birth* 2001, **28**:13-19.
84. Uvnas-Moberg K, Widstrom AM, Marchini G, Winberg J: **Release of GI hormones in mother and infant by sensory stimulation.** *Acta Paediatr Scand* 1987, **76**:851-860.
85. Windle R, Wood S, Kershaw Y: **Adaptive Changes in Basal and Stress-Induced HPA Activity in Lactating and Post-Lactating Female Rats.** *Endocrinology* 2013, **154**:749-761.

86. Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Del Prato S: **Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes.** *Diabetes Metab Res Rev* 2003, **19**:259-270.
87. Montgomery GW, Flux DS, Greenway RM: **Tryptophan deficiency in pigs: changes in food intake and plasma levels of glucose, amino acids, insulin and growth hormone.** *Horm Metab Res* 1980, **12**:304-309.
88. Singh M: **Effect of niacin and niacin-tryptophan deficiency on pancreatic acinar cell function in rats in vitro.** *Am J Clin Nutr* 1986, **44**:512-518.
89. Singh M: **Effect of thiamin deficiency on pancreatic acinar cell function.** *Am J Clin Nutr* 1982, **36**:500-504.
90. El-Hodhod MA, Nassar MF, Hetta OA, Gomaa SM: **Pancreatic size in protein energy malnutrition: a predictor of nutritional recovery.** *Eur J Clin Nutr* 2005, **59**:467-473.
91. Stuebe AM, Rich-Edwards JW: **The reset hypothesis: lactation and maternal metabolism.** *Am J Perinatol* 2009, **26**:81-88.
92. Schwarz EB, Brown JS, Creasman JM, Stuebe A, McClure CK, Van Den Eeden SK, Thom D: **Lactation and maternal risk of type 2 diabetes: a population-based study.** *Am J Med* 2010, **123**:863 e861-866.
93. Stuebe AM, Rich-Edwards JW, Willett WC, Manson JE, Michels KB: **Duration of lactation and incidence of type 2 diabetes.** *JAMA* 2005, **294**:2601-2610.
94. Zhong S, Almario R, Dubrinsky M, Rose K, Lin PK, Grunberger G, Jen KL: **Repeated pregnancy without lactation: effects on maternal glycemic control, pregnancy outcome, carcass composition, and fat distribution in rats.** *Metabolism* 1990, **39**:1127-1132.
95. Chouinard-Castonguay S, Weisnagel SJ, Tchernof A, Robitaille J: **Relationship between lactation duration and insulin and glucose response among women with prior gestational diabetes.** *European Journal of Endocrinology* 2013, **168**:515-523.
96. Ziegler AG, Wallner M, Kaiser I, Rossbauer M, Harsunen MH, Lachmann L, Maier J, Winkler C, Hummel S: **Long-term protective effect of lactation on the development of type 2 diabetes in women with recent gestational diabetes mellitus.** *Diabetes* 2012, **61**:3167-3171.
97. Kjos SL, Henry O, Lee RM, Buchanan TA, Mishell DR, Jr.: **The effect of lactation on glucose and lipid metabolism in women with recent gestational diabetes.** *Obstet Gynecol* 1993, **82**:451-455.
98. Marroqui L, Batista TM, Gonzalez A, Vieira E, Rafacho A, Colleta SJ, Taboga SR, Boschero AC, Nadal A, Carneiro EM, Quesada I: **Functional and structural adaptations in the pancreatic alpha-cell and changes in glucagon signaling during protein malnutrition.** *Endocrinology* 2012, **153**:1663-1672.