



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA *IN UTERO* SOBRE EL DESARROLLO Y FUNCIÓN DE LAS  
CÉLULAS ALFA DEL PÁNCREAS DE RATA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MEJÍA ARREOLA PABLO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA CRISTINA REVILLA MONSALVE**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

**DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2016**



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 el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 26 de octubre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **MEJÍA ARREOLA PABLO** con número de cuenta **306029446**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA IN UTERO SOBRE EL DESARROLLO Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS ALFA DEL PÁNCREAS DE RATA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA CRISTINA REVILLA MONSALVE**:

Presidente: DRA. ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDÁRIZ  
Vocal: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ  
Secretario: DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA  
Suplente: DR. ALONSO ANTONIO VILCHES FLORES  
Suplente: DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA

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

**A T E N T A M E N T E**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de enero de 2016

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **Agradecimientos**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM que me brindó nuevamente la oportunidad de ser uno más de sus alumnos, por fortalecer mis conocimientos, conocer más gente durante todo el proceso y por confiar en mí para llevar a cabo mi proyecto de investigación de la Maestría.

Un agradecimiento especial a CONACyT por darme la oportunidad de contar con una beca durante todo mi posgrado y sin la cual no hubiera salido adelante (545328/294527).

Un agradecimiento especial a mi directora de tesis, la Dra. María Cristina Revilla Monsalve por aceptarme en su laboratorio, confiar y brindarme su apoyo incondicional, tanto dentro como fuera de éste; porque me ha dedicado su tiempo y guía a través de mi proyecto y porque me ha enseñado, con su ejemplo, que amar lo que uno hace brinda grandes satisfacciones en la vida y por revelarme la belleza de la ciencia y la pasión con la que ésta debe realizarse, por enseñarme que no importa cuanto se sepa del campo, la curiosidad y el asombro son valores que deben persistir.

A la Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta y a la Dra. María Cristina Regina Fernández Mejía por haber pertenecido a mi comité tutor, por dirigirme semestre tras semestre, darme sus consejos y compartir sus conocimientos para realizarme académicamente.

En primer lugar quiero agradecer y dedicar especialmente este humilde trabajo a la persona que me heredó con su ejemplo las virtudes más valiosas de vida que un nieto pueda tener, las cuales son, disciplina, perseverancia, respeto y amor a tu profesión, a mi abuelo que en paz descansa:

**GREGORIO MEJÍA VILCHIS**

Agradezco el apoyo, la confianza y el amor que siempre me demostraron durante este bello proceso, pero sobre todo quiero agradecer nuevamente el regalo más hermoso y misterioso que existe “la vida”, ya que si no hubiese nacido gracias a mis padres nada de esto hubiese sido posible:

**ARTURO MEJÍA Y YOLANDA ARREOLA**

**GRACIAS**

Gracias por enseñarme que a pesar de las condiciones adversas que se puedan presentar en la vida, la voluntad y el amor que pueda existir entre un padre y su hija son fuerzas más sólidas que cualquier fuerza física, química o biológica, a mi sobrina y hermano:

**LEAH MEJÍA Y ARTURO MEJÍA**

Agradezco a la persona más especial que me acompañó durante este largo y tortuoso camino, que sabe perfectamente que durante la maestría hay alegrías, satisfacciones, frustraciones y llanto, pero que a pesar de ello elegimos el quehacer científico como un estilo de vida y una vocación hermosa, a mi novia:

**BRENDA TOLEDO ROJAS**

Quiero dar mi reconocimiento y las gracias a mi amiga quien me sigue y toma de ejemplo en esta profesión, a quien siempre confío en mí y quien fue mi brazo derecho en el laboratorio, fue un honor trabajar hombro a hombro, estoy seguro que serás una gran Química Fármaco Bióloga:

**MÓNICA ROJAS ZAMORATE**

A mi profesor y gran amigo, gracias a usted llegué con la Dra. Revilla y pude iniciar este hermoso camino:

**MIGUEL ÁNGEL PALOMINO GARIBAY**

Finalmente quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México y a todos mis profesores que durante mi formación aportaron su conocimiento, experiencia y dedicación. Gracias por fomentar, cultivar y enriquecer mi curiosidad científica, gracias por mostrarme que la investigación no solo son artículos, plantear una hipótesis, obtener resultados y conclusiones para contestar una pregunta en concreto, sino que la investigación representa un sinfín de posibilidades extraordinarias que enriquecen la cultura y el alma del ser humano a través del intelecto y la imaginación.

# Índice

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Diabetes Mellitus .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Diabetes Materna.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Alteraciones en el desarrollo inducidos por el ambiente hiperglucémico .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Homeostasis de la glucosa.....</b>	<b>11</b>
<b>4. Organización del páncreas .....</b>	<b>19</b>
<b>5. Desarrollo del páncreas .....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 Factores de transcripción en el desarrollo temprano del páncreas.....</b>	<b>22</b>
<b>5.2 Desarrollo, diferenciación y maduración de las células <math>\alpha</math> .....</b>	<b>24</b>
<b>6. Fisiología y regulación de la célula <math>\alpha</math> del páncreas endócrino.....</b>	<b>26</b>
<b>7. Estreptozotocina como agente inductor de hiperglucemia crónica en modelos murinos.....</b>	<b>28</b>
<b>8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>31</b>
<b>9. HIPÓTESIS .....</b>	<b>31</b>
<b>10. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>32</b>
<b>10.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>32</b>
<b>11. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>11.1 Apareamiento.....</b>	<b>33</b>

<b>11.2 Lote control</b> .....	<b>33</b>
<b>11.3 Lote experimental</b> .....	<b>34</b>
<b>11.4 Inmunohistoquímica</b> .....	<b>36</b>
<b>11.5 Western Blotting</b> .....	<b>37</b>
<b>11.6 Curva de tolerancia a la glucosa</b> .....	<b>37</b>
<b>11.7 Análisis estadístico</b> .....	<b>38</b>
<b>12. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>12.1 Peso de ratas gestantes</b> .....	<b>39</b>
<b>12.3 Número de reabsorciones y fetos por camada</b> .....	<b>41</b>
<b>12.4 Medidas morfométricas de fetos y crías</b> .....	<b>41</b>
<b>12.6 Expresión de Arx y Brn4</b> .....	<b>45</b>
<b>12.7 Expresión de Arx y Brn4 en fetos de 17 y 21 días</b> .....	<b>46</b>
<b>12.8 Expresión de insulina y glucagon en fetos de 17 y 21 días</b> .....	<b>51</b>
<b>12.9 Expresión de Arx y Brn4 en crías de 20, 28 y 90 días</b> .....	<b>54</b>
<b>12.1 Expresión de insulina y glucagon en crías de 20, 28 y 90 días</b> .....	<b>61</b>
<b>12.11 Curva de tolerancia a la glucosa</b> .....	<b>65</b>
<b>13. DISCUSIÓN</b> .....	<b>67</b>
<b>14. CONCLUSIONES</b> .....	<b>77</b>
<b>15. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>78</b>

## Abreviaturas

AR	Ácido retinoico
ADA	Asociación Americana de diabetes
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
ArGP	Proteína relacionada con agutí
RNAm	Ácido ribonucleico mensajeros
Arx	Aristalesrelatedhomeobox
BCAAs	Biomarcadores propuestos son los aminoácidos de cadenas ramificadas
DG	Diabetes gestacional
dpn	Día post-natal
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
E	Día embrionario
G1P	Glucosa 1-fosfato
G6F	Glucosa 6 fosfato
GIP	Péptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido similar al glucagon tipo 1
GLUT	Facilitadores del transporte de glucosa independientes de sodio
Hb9	Homeobox 9
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
IOD	Densidad óptica integrada
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MafA	Musculoaponeuroticfibrosarcomaoncogenehomolog a
MafB	Musculoaponeuroticfibrosarcomaoncogenehomolog b
ncRNAs	RNA no codificantes
Ngn3	Neurogenin 3

Nkx 2.2	Homeoboxproteinnkx 2.2
NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropéptido Y
O-GlcNAc	O-ligado N-acetilglucosamina
Pax4	Paired box 4
Pax6	Paired box 6
PC2	Prohormona convertasa 2
Pdx1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PKC	Proteína cinasa K
POMC	Molécula pro-opiomelanocortina
PN	Post-natales
Ptf1a	Pancreas transcription factor 1 <sup>a</sup>
Rb	Retinoblastoma
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SGLT	Transportadores de glucosa dependiente de sodio
STZ	Estreptozotocina
Wnt	Wnt-β-catenina
YAP	Yes-associated protein

## Resumen

**INTRODUCCIÓN.** El desarrollo del páncreas endocrino es controlada por una compleja red de vías de señalización y factores de transcripción que determinan la diferenciación, el desarrollo, el mantenimiento y la función de los diferentes tipos de células de los islotes de Langerhans. Las células alfa tienen un papel importante en la homeostasis de la glucosa y su diferenciación se rige principalmente por los factores de transcripción Arx y Brn4. Estudios experimentales y clínicos han demostrado que la hiperglucemia *in utero* altera el desarrollo de los islotes de Langerhans, el cual provoca el desarrollo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares en la vida post-natal adulta.

**OBJETIVOS.** Identificar cambios en la expresión de Arx, Brn4, de insulina, de glucagón en fetos y crías de ratas hiperglucémicas, así mismo, identificar alteraciones en el metabolismo de la glucosa en crías de 28 y 90 días.

**MÉTODOS.** Los experimentos se llevaron a cabo en ratas gestantes de la cepa Sprague Dawley. Al quinto día de la gestación el grupo experimental recibió una inyección ip de 40 mg / kg de estreptozotocina en buffer de acetato de sodio. El grupo control recibió 0,3 ml ip. del vehículo. Los páncreas se obtuvieron de fetos de 17 (E17) y 21 (E21) días y de crías de 20, 28 y 90 días de vida postnatal (pnl). Se realizaron los análisis inmunohistoquímicos, de densidad óptica integrada (IOD), la determinación de la expresión de Arx y Brn4 por western blot y la prueba de tolerancia oral a la glucosa a las crías.

**RESULTADOS.** Los niveles de glucosa, peso y tamaño de los fetos y crías mostraron una disminución en el grupo experimental. Los análisis de inmunohistoquímica, del IOD y los ensayos por medio de western blot de Arx demostraron un aumento en su expresión en el día E17 ( $p < 0.01$ ). En E21, 20, 28 y 90 dpn mostró una disminución de la expresión de Arx ( $p < 0.01$ ). En E17, 28 y 90 dpn mostraron un aumento de la expresión de Brn4 ( $p < 0.01$ ). El E21 y 20 dpn mostró un aumento en la expresión de Brn4 ( $p < 0.05$ ). La expresión de la insulina y el glucagón en E17 y 20 dpn demostraron tener una disminución de la expresión y en E21 mostraron un aumento ( $p < 0.01$ ). Crías de 28 días mostraron una disminución en la señal de la insulina, así mismo, la expresión de glucagón se incrementó ( $p < 0.01$ ). En 90 pnl la expresión de insulina mostró un aumento y por otro lado glucagón mostró una disminución en su expresión ( $p < 0.01$ ). En 28 y 90 dpn mostraron alteraciones en la curva de tolerancia a la glucosa en los grupos experimentales ( $p < 0.01$ ).

**CONCLUSIONES.** La hiperglucemia materna indujo un retraso en el desarrollo de las células alfa y una alteración en la expresión de Arx y Brn4 en los fetos y crías. Estas alteraciones repercutieron en la diferenciación de las células alfa y en su funcionamiento en la vida post-natal.

## Abstract

**INTRODUCTION.** Development of the endocrine pancreas is controlled by a complex network of signaling pathways and transcription factors that determine the differentiation, development, maintenance and function of the different cell types of the Langerhans islets. Alpha cells have an important role in the glucose homeostasis and its differentiation is mainly governed by Arx and Brn4. Experimental and clinical studies have demonstrated that hyperglycemia *in utero* deregulates the development of the Langerhans islets that results in metabolic and cardiovascular diseases in adulthood.

**AIMS.** Identify changes in the expression of Arx and Brn4 in fetuses and offspring of hyperglycemic rats.

**METHODS.** Experiments were carried out in pregnant Sprague Dawley rats. The 5<sup>th</sup> day of gestation the experimental group received an ip injection of 40mg/Kg of streptozotocin in sodium acetate buffer. The control group received 0.3ml ip. of the vehicle. Pancreas were obtained from fetuses of 17 (E17) and 21(E21) days and from offspring of 20, 28 and 90 days of post natal life (pnl). Immunohistochemical and IOD analyses, determination of the expression of Arx and Brn4 were performed and oral glucose tolerance test were carried.

**RESULTS.** The glucose, weight and size of fetuses and offspring was decreased in the experimental group. The immunohistochemical, the integrity optic density(IOD) analysis and the western blot of Arx demonstrated an increase on day E17 ( $p<0.01$ ). On E21, 20, 28 and 90 pnl showed a decrease of the expression of Arx ( $p<0.01$ ). On E17, 28 and 90 pnl an increase of the expression of Brn4 ( $p<0.01$ ) was observed. On E21 and 20 pnl showed an increase in the expression of Brn4 ( $p<0.05$ ). The signal of insulin and glucagon on E17 and 20 pnl was decreased and in E21 de signal was increase ( $p<0.01$ ). On 28 pnl the signal of insulin was decreased and the signal of glucagon was increased ( $p<0.01$ ). And in 90 pnl the signal of insulin was increased and the signal of glucagon was decreased ( $p<0.01$ ). In 28 and 90 pnl the metabolism of glucose was altered y the experimental group ( $p<0.01$ ).

**CONCLUSIONS.** Maternal hyperglycemia induced a delay in the development of the the  $\alpha$  cells and an altered expression of Arx and Brn4 in fetuses and offspring. These alterations will have an impact not only in the differentiation of the alpha cells but also in their function in adulthood.

# **EFECTO DE LA HIPERGLUCEMIA *IN UTERO* SOBRE EL DESARROLLO Y FUNCION DE LAS CÉLULAS ALFA DEL PANCREAS DE RATA**

## **Introducción**

La presente tesis tiene como objetivo analizar las alteraciones que se presentan durante la diferenciación y desarrollo de las células alfa bajo condiciones hiperglucémicas en fetos y crías de rata mediante la evaluación de la expresión de los factores de transcripción Arx y Brn4, así como, las alteraciones en la curva de tolerancia a la glucosa y en la expresión de insulina y glucagon.

## **1. Diabetes Mellitus**

La Diabetes Mellitus es un desorden metabólico de múltiples etiologías, caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, que resulta de defectos en la secreción y en la acción de la insulina (ALAD, 2013). Este padecimiento ha sido clasificado en varias categorías: La diabetes tipo 1 (DT1), es aquella que se caracteriza por una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  reduciendo la síntesis de la insulina, (Diabetes DOF, 2012; Grieco F, *et al*, 2012; Yeung WC *et al*, 2011; Stene LC *et al*, 2012; Sacks DB *et al*, 2011; Yin H *et al*, 2001; Rasschaert J *et al*, 2003); La diabetes tipo 2 (DT2), se presenta con mayor frecuencia en la población en este tipo de diabetes el páncreas es capaz de producir insulina, pero los órganos y tejidos no responden a los mecanismos de acción de esta hormona, desarrollando una resistencia a insulina (Shankaracharya OD *et al*, 2011; Gunasekaran U *et al*, 2011; Mannucci E, *et al*, 2007; Christensen M *et al*, 2011); La diabetes gestacional (DG), caracteriza es detectada entre la 24 y 28 semanas de embarazo y se caracteriza por presentar resistencia a insulina.

La diabetes materna (DM) a diferencia de la diabetes gestacional es aquella en la que las mujeres embarazadas fueron diagnosticadas con DT1 o DT2 antes ó desde el inicio del embarazo.

Datos de la Federación Internacional de la Diabetes (IDF) en el 2013, revelaron que la diabetes afecta a 382 millones de personas en el mundo y se estima que para 2035 habrá 592 millones de personas con esta enfermedad. La mayoría de los casos se presentan en países en vías de desarrollo (Wild S *et al*,

2004; Centers for Disease Control and Prevention, 2011). La IDF reportó que el 16.9% (21.4 millones) de recién nacidos se desarrollaron en un ambiente hiperglucémico, y que la hiperglucemia materna se presenta con mayor frecuencia en mujeres de entre los 35 y 45 años de edad.

Durante las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes en México ha incrementado y actualmente, figura como la primera causa de muerte en nuestro país. Datos de la ENASUT (2012) señalan que 6.4 millones de adultos mexicanos con diabetes, es decir, 9.2% de los adultos en México han sido diagnosticados con diabetes.

### **1.1 Diabetes Materna**

La hiperglucemia durante el embarazo, incrementa el riesgo de aparición de efectos adversos tanto para el feto como para la madre. Se ha demostrado que el riesgo durante la diabetes materna para la madre es presentar una mayor susceptibilidad de desarrollar preeclampsia y presentar complicaciones durante el parto, poniendo en riesgo la vida de la madre y el feto y se incrementa el riesgo de presentar malformaciones, obesidad, diabetes, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares en la vida post-natal (PN) adulta (Figura 1). (Fernández JL *et al*, 2010; IDF atlas 2013).

Durante la segunda mitad del embarazo, a partir de la semana 20, se presentan varias adaptaciones metabólicas para proveer de glucosa, lípidos y aminoácidos para el desarrollo del feto. En este periodo hay un aumento en las concentraciones de la prolactina y lactógeno placentario humano (somatomatotropina coriónica humana), dando como resultado un incremento en el número de las células  $\beta$  del páncreas y en la secreción de insulina. Se ha demostrado que la diabetes materna modifica las concentraciones de estas hormonas afectando el número de células  $\beta$  y alterando la secreción y sensibilidad a la insulina, dando como resultado una hiperglucemia en la madre. Entre otras adaptaciones metabólicas se encuentra la hipertrigliceridemia, la cual es definida como un incremento de triglicéridos en la sangre entre un 100-200%, lo que permite la acumulación de reservas de lípidos, los cuales son utilizados en las etapas finales del embarazo para el crecimiento del feto. Este fenómeno está

acompañado por un incremento en la síntesis en el hígado de lipoproteínas de baja densidad (LDL). La hipercolesterolemia es una respuesta adaptativa presente durante el embarazo para satisfacer la demanda de lípidos que requiere el feto para su desarrollo.

En la diabetes materna los niveles de triglicéridos, LDL, colesterol y glucosa se incrementan aún más debido a un aumento en los niveles de estriol y a la presencia de la resistencia a la insulina, este conjunto de modificaciones metabólicas presentes en la diabetes materna, trae como consecuencia alteraciones en el desarrollo de los fetos (Leiva A *et al*, 2011).



**Figura 1.** Alteraciones en la madre, el feto y durante el embarazo producidos por la Diabetes.

La diabetes materna afecta al 7% de las embarazadas en México y al 16.9% de mujeres a nivel mundial, esto ubica a la diabetes materna como la principal enfermedad que causa alteraciones durante el desarrollo del feto, incrementando la probabilidad de desarrollar enfermedades metabólicas en la vida adulta de la descendencia. En 2013 la IDF estimó que 21.4 millones de mujeres

presentaron hiperglucemia durante el embarazo, la incidencia difiere entre poblaciones, países, el grado de obesidad, la raza ó grupo étnico, la edad de la madre, estilo de vida, antecedentes familiares con DT2 y los criterios que se utilicen para diagnosticar la enfermedad. Se ha demostrado que los países en vías de desarrollo presentan una incidencia mayor que en países desarrollados (Sánchez LS *et al*, 2008; MetzgerBE *et al*, 2008 y 2010).

Los criterios para diagnosticar la presencia de diabetes materna recomendado por la ADA (American Diabetes Association) son evaluados por una prueba de tolerancia a la glucosa oral con un ayuno de 8 horas a una dosis de 75g de glucosa oral, esta prueba debe realizarse preferentemente antes del embarazo, al inicio del embarazo y entre las 24 y 28 semanas de gestación, los criterios para el diagnóstico de hiperglucemia materna antes o durante el embarazo se muestran en la Tabla 1 A y B (Ryan EA *et al*, 2011; American Diabetes Association, 2012; Hadden *et al*, 2014). Se han propuesto nuevos métodos a nivel metabólico a fin de detectar en etapas tempranas biomarcadores que permitan revelar alteraciones metabólicas en mujeres embarazadas. Dentro de los biomarcadores propuestos para el diagnóstico en etapas tempranas está un aumento la dimetilarginina asimétrica (ADMA), la cual es un inhibidor competitivo del óxido nítrico sintetasa (NO), teniendo como consecuencia una disfunción endotelial. Otros biomarcadores propuestos son los aminoácidos de cadenas ramificadas (BCAAs), entre los que están la valina, leucina y la isoleucina que son considerados como factores de riesgo debido a que contribuyen al desarrollo de la resistencia a la insulina. Los aminoácidos aromáticos como la tirosina y la fenilalanina han sido propuestos como biomarcadores debido a que alteran el funcionamiento en el metabolismo del hígado (Huynh *et al*, 2014). Sin embargo estos nuevos métodos aún presentan inconsistencias en el perfil metabólico debido a la variación que hay entre las diferentes poblaciones, estilos de vida, edades y estado de salud. Se necesitan más estudios para poderlos utilizar como una herramienta de diagnóstico oportuno en la diabetes materna, además, es necesario reducir los costos que generan realizar este tipo de pruebas.

Las condiciones en las que se desarrollan los órganos y tejidos de los embriones y fetos, está determinado por el ambiente *in utero*. El desarrollo en un medio hiperglucémico induce una reprogramación fetal que en gran medida determinará el estado de salud de la descendencia, la cual es el resultado de la predisposición genética y los factores ambientales a los cuales se expone un individuo desde las primeras etapas del desarrollo y hasta las condiciones en la vida PN.

## A

<b>Debe alcanzarse o superarse los valores mínimos en la prueba oral de tolerancia a la glucosa:</b>		
<b>Prueba</b>	<b>Hiperglucemia en el embarazo</b>	<b>Hiperglucemia en el embarazo y diabetes</b>
<b>Glucosa en plasma en ayunas</b>	≥92 mg/dL	≥126 mg/dL
<b>Glucosa en plasma después de 1 hora de administración</b>	≥180 mg/dL	≥200mg/dL
<b>Glucosa en plasma después de 2 horas de administración</b>	≥153 mg/dL	≥171mg/dL
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	≤5.1%	≥6.5%
<b>Glucosa en plasma casual*</b>	≤140mg/dL	≥200 mg/dL

# B

Visita Prenatal	
<b>Glucosa en plasma en ayunas, HbA<sub>1c</sub> o glucosa en plasma al azar * en todas (o tan sólo en mujeres de alto riesgo)</b>	Si el resultado no es un diagnóstico de diabetes manifiesta y:  a) La glucosa en plasma en ayunas $\geq$ 92mg/dL y $<$ 126mg/dL ( $\geq$ 5.1% y $<$ 7%) el diagnóstico es hiperglucemia durante el embarazo  b) La prueba e glucosa en plasma en ayunas $<$ 92mg/dL (5.1%) a las 24 – 28 semanas con la prueba oral de tolerancia a la glucosa de 75 g
24 – 28 semanas de gestación	
<b>Prueba oral de tolerancia a la glucosa de 75 g con ayuno de 8 horas</b>	A mujeres que no hayan presentado alteración en la curva de tolerancia a la glucosa oral en la visita prenatal

**Tabla 1.** Criterios de diagnóstico y detección de hiperglucemia materna antes y durante el embarazo. Tomado de Hadden *et al*, 2014

## 2. Alteraciones en el desarrollo inducidos por el ambiente hiperglucémico

El desarrollo es un proceso en el que están involucrados la expresión de diversos genes, modificaciones epigenéticas, factores ambientales y nutricionales. Diversas investigaciones en modelos murinos han demostrado que el desarrollo en un ambiente hiperglucémico *in utero* incrementa la probabilidad del 5-10% de que los fetos presenten malformaciones y entre el 15-20% presenten reabsorciones espontáneas (Pociot F *et al.*, 2010; Reece EA, 2012; Chew EY *et al.*, 1995; Best RM *et al*, 1997; Hayslett JP *et al*, 1987a,b; Reece EA *et al.*, 1998b; Fischer , 2007).

La hiperglucemia durante la morfogénesis, es el principal factor teratogénico que induce la mayoría de los defectos en el desarrollo embrionario y fetal así como alteraciones metabólicas en la vida PN. El aumento característico de la diabetes materna en las concentraciones del ácido araquidónico, de mioinositol, de

prostaglandina y de hipercetonemia, son las principales modificaciones que incrementan el estrés oxidativo afectando los procesos de diferenciación y desarrollo de los tejidos embrionarios y fetales. En modelos murinos se ha demostrado que la hiperglucemia *in utero* trae como consecuencia que la descendencia presente un retraso en el desarrollo, bajo peso y talla al nacer, alteraciones en la diferenciación y desarrollo de órganos, incremento en la morbilidad y mortalidad perinatal e incrementa la susceptibilidad para desarrollar alteraciones metabólicas en la vida adulta del organismo como el síndrome metabólico, obesidad, hipertensión y diabetes. Sin embargo, estudios realizados en ratas y ratones gestantes han reportado resultados controversiales y se ha demostrado que la severidad en las alteraciones, depende de los niveles de glucosa que presenta la madre durante la gestación (Wahabi *et al*, 2012; Fetita LS *et al*, 2006; Ladon MB *et al*, 2009; Crowther CA *et al*, 2005; Green AS *et al*, 2010; Simmons RE *et al*, 2001).

Reportes clínicos y evidencias experimentales en modelos murinos han demostrado que la hiperglucemia materna puede afectar el proceso de morfogénesis de cualquier órgano, siendo los defectos del tubo neural y las malformaciones cardiovasculares son las anomalías más comunes asociadas con el desarrollo en un ambiente hiperglucémico *in utero* (Onroy A *et al*, 2015) Tabla 2.

Los modelos animales han sido utilizados ampliamente en la investigación de la diabetes, la mayoría de estos estudios se realizan en roedores. Existen diferentes métodos para inducir diabetes experimental, se pueden clasificar en los inducidos por: agentes químicos como la estreptozotocina (STZ) y el alloxana; por técnicas de biología molecular donde se han obtenido diferentes cepas de ratones knock-out y knock-in tales como los ratones Ob/Ob y db/db; también están los modelos de restricción nutricional, restricción uterina, virales y quirúrgicos. La inducción de hiperglucemia materna por medio de la administración de estreptozotocina (STZ) en modelos murinos, asemeja las alteraciones presentes en el humano y el ambiente *in utero* que se alteran en el embarazo y el desarrollo. Las concentraciones elevadas de glucosa incrementan los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo, lo cual repercutirá de manera directa en el desarrollo y diferenciación de los órganos y tejidos, debido a que pierden la capacidad de sintetizar antioxidantes, presentan alteraciones en las membranas, disfunción mitocondrial e incremento en la fosforilación oxidativa y la activación de vías de señalización apoptóticas. Al conjunto de estas alteraciones

se denomina embriopatía lo cual lleva a modificaciones genéticas y epigenéticas (Dhanasekaran N et al., 1999; Reece EZ et al., 2002; Ornoy A et al., 2009).

HUMANO			RATA	
SNC	Sistema Cardiovascular	Estructuras Craneofaciales	Malformaciones congénitas	Alteraciones en el crecimiento
<b>Anencefalia</b>	Síndrome hipoplásico del corazón izquierdo o derecho	Microsomia hemifacial	Coartación de la aorta	Macrosomía
<b>Acrania</b>	AVSD y VSD	Labio o paladar leporino	Teratología de Fallot	Visceromegalia
<b>Mielomeningocele</b>	Atresia tricuspídea	Microtia	Hipoplasia del corazón izquierdo	Organomegalia
<b>Arrinencefalia</b>	Atresia mitral	Micrognatia	Defectos del septum auricular	Enfermedad vascular
<b>Microcefalia</b>	Doble entrada del ventrículo izquierdo	Microftalmia	Anancefalia	Retraso en la maduración pulmonar
<b>Exencefalia</b>	Doble salida del ventrículo derecho	Displasia frontonasal	Estenosis pulmonar	Trombosis de la vena renal
<b>Holoprosencefalia</b>	Transposición de los grandes vasos	Opacidad del cristalino	Síndrome de regresión caudal	Muerte fetal
<b>Espina bífida</b>	Teratología de Fallot		Hidrocefalea	

**Tabla 2.** Alteraciones más frecuentes en descendencia que se desarrolló en un ambiente hiperglucémico *in utero* en humanos y modelos murinos.

Estudios realizados en modelos murinos han demostrado que la diabetes materna altera la expresión del 30% de los genes y factores de transcripción involucrados en el desarrollo de los órganos en etapas embrionarias y fetales. Se ha demostrado que el principal factor de transcripción de las células  $\beta$  sufre modificaciones a nivel epigenético demostrando tener una disminución en la expresión de PDX1 debido a una baja acetilación de H3 (histona 3) y H4 (histona 4) así como de una disminución de H3K4me3 (tri-metilación de la lisina 4 de la histona 3) en el promotor de PDX1 dando como resultado alteraciones en el

desarrollo y diferenciación de este tipo celular (Pavlinkova G *et al* 2009). De manera similar se ha reportado que el factor de transcripción Arx responsable de la diferenciación y desarrollo de las células  $\alpha$  el promotor del gen de Arx es acetilado y el promotor de PDX1 es metilado permitiendo el inicio y diferenciación de este tipo celular.

En la DT2 se ha observado que las células  $\alpha$  juegan un papel fundamental debido a que sirven como una fuente de reserva para ser transdiferenciadas e incrementar el número de células  $\beta$ , este fenómeno se da metilando el promotor del gen de Arx y desmetilando el promotor del gen de Pdx1, este proceso compensa la deficiencia en el funcionamiento de las células  $\beta$  (Onroy A *et al*, 2015; Bramswig NC *et al*, 2014; Habener J *et al*, 2012; Yang Y *et al*, 2011; Pavlinkova G *et al*, 2009; Riedel M *et al*, 2012).

### **3. Homeostasis de la glucosa**

La homeostasis de la glucosa es regulada por la síntesis y secreción de glucagón e insulina por parte de las células  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. Depende de la tasa de glucosa que entra a la circulación y por la que es removida de circulación. La glucogenólisis y la gluconeogénesis son las principales fuentes de obtención de energía durante el estado pre-prandial.

La sensación de hambre y saciedad está modulada por el hipotálamo llevando a la producción de neuropéptidos, como el neuropéptido Y (NPY), la proteína relacionada con agutí (ArGP) y la molécula pro-opiomelanocortina (POMC), que estimulan órganos como el páncreas, intestino y tejido adiposo, que responden y promueven la producción de hormonas peptídicas, como la insulina, la amilina, el glucagón, el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), que son los principales glucorreguladores de los niveles de glucosa en sangre (Tabla 3).

El glucagón, sintetizado por las células  $\alpha$  del páncreas, es la principal hormona peptídica catabólica compuesta por 29 aminoácidos, fue descrita por primera vez en 1950 por el investigador Roger Unger. Y tiene como principal función el mantenimiento de la normoglucemia por medio de la degradación

del glucógeno del hígado, promover la gluconeogénesis y la cetogénesis (Gerich JE *et al*, 1974).

La insulina es la principal hormona con funciones anabólicas la cual está compuesta por 51 aminoácidos, es sintetizada y secretada por las células  $\beta$  del páncreas. Su principal función es la disminución de la glucosa en respuesta al incremento de las concentraciones de este carbohidrato en el plasma sanguíneo en respuesta a un estado post-prandial (Wallum BJ *et al*, 1992).

La amilina (IAPP islet amyloid polypeptide) es una hormona peptídica neuroendócrina compuesta por 37 aminoácidos que es co-expresada y co-secretada con la insulina en las células  $\beta$  en respuesta a un estado post-prandial en una relación 1:100. Sus efectos son complementarios a los que desempeña la insulina para regular las concentraciones de glucosa por medio de dos vías: 1) suprimiendo la secreción de glucagon en el estado post-prandial, lo que da por resultado la disminución de secreción de glucosa por parte del hígado, 2) disminuyendo la tasa de absorción de alimentos en los intestinos y reduciendo el consumo de alimentos, puesto que disminuye el vaciamiento gástrico e inhibe la secreción digestiva, disminuyendo los niveles de ácido gástrico, enzimas pancreáticas y secreción de bilis (Moore CX *et al*, 1991; Cooper GJ *et al*, 1987; Ogawa A *et al*, 1990; Koda JE *et al*, 1992).

<b>PÁNCREAS</b>	<b>HORMONA</b>	<b>FUNCIÓN</b>
célula $\alpha$	Glucagon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimula el rompimiento del glucogeno almacenado en el hígado.</li> <li>• Promueve la gluconeogenesis hepática.</li> <li>• Promueve la cetogenesis.</li> </ul>
célula $\beta$	Insulina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promueve la captación de glucosa en las células.</li> <li>• Suprime la secreción de glucagon post-prandial.</li> <li>• Promueve la síntesis de proteínas y lípidos.</li> <li>• Promueve el uso de glucosa como fuente de energía.</li> </ul>
célula $\beta$	Amilina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suprime la secreción de glucagon post-prandial.</li> <li>• Disminuye la absorción de alimentos.</li> <li>• Reduce el consumo de alimentos.</li> </ul>
<b>INTESTINO</b>		
célula K	GIP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimula la secreción de insulina post-prandial.</li> <li>• Regula la síntesis de lípidos.</li> </ul>
célula L	GLP-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimula la secreción de insulina dependiente de glucosa.</li> <li>• Inhibe la secreción de glucagon post-prandial.</li> <li>• Disminuye la absorción de alimentos.</li> <li>• Reduce el consumo de alimentos.</li> </ul>
<b>HIPOTÁLAMO</b>		
Neuropéptidos	NPY	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genera señales que promueven la ingesta de alimentos</li> </ul>
	ArGP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genera señales que promueven la ingesta de alimentos</li> <li>• En el tejido adiposo disminuye la expresión de enzimas lipogénicas, aumenta la acumulación de grasa y disminuye el graso energético</li> </ul>
	POMC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe la sensación de hambre y aumenta la actividad del sistema nervioso simpático.</li> <li>• Reduce la secreción basal de insulina</li> </ul>

**Tabla 3.** Funciones de las principales hormonas glucorreguladoras y de los neupéptidos involucrados en la estimulación de la sensación de hambre y saciedad.

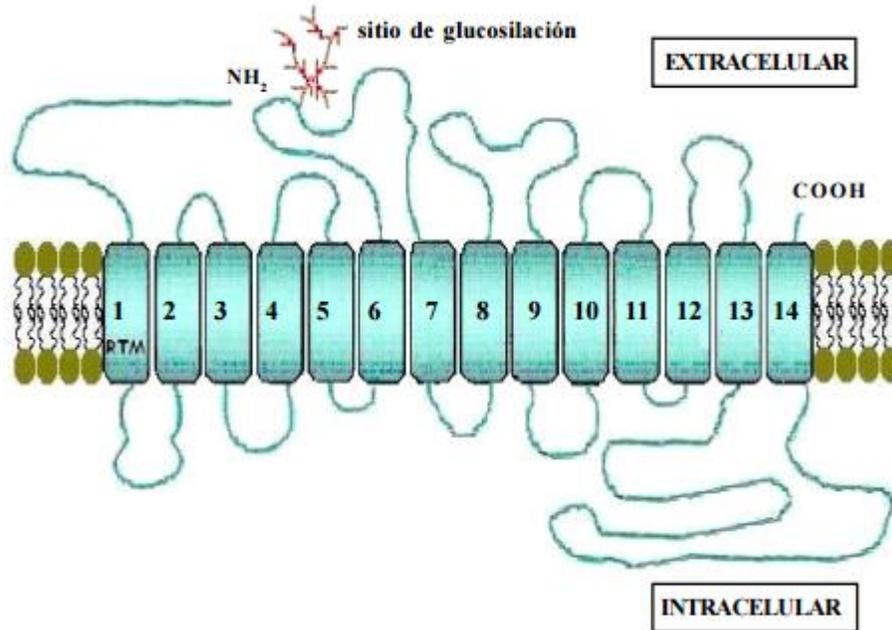
En la década de 1960 los investigadores Perley y Kipnis demostraron que posterior a la ingesta de alimentos se potenciaba la secreción y función de la insulina, a este efecto se le denominó efecto incretina. Este fenómeno ocurre por la regulación hormonal de la GLP-1 y GIP (Péptido insulínico dependiente de glucosa) sintetizadas en el intestino y son secretadas en respuesta al consumo de alimentos ricos en grasas y carbohidratos que potencializan la secreción de insulina para regular la homeostasis de la glucosa (Perley MJ *et al*, 1967).

La GIP participa en la secreción de insulina y regula el metabolismo de lípidos, sin embargo, no inhibe la secreción de glucagón. La GLP-1 estimula la secreción de insulina, suprime la secreción de glucagón después de la ingesta de alimentos, disminuye la absorción de alimentos e inhibe el consumo de alimentos debido a la disminución de la sensación de saciedad que provoca; ambos son sintetizados por el intestino en las células K y L respectivamente. (Yip RG *et al*, 2000; Vilsboll T *et al*, 2001; Matsuyama T *et al*, 1988).

El metabolismo de la glucosa comienza con su transporte intracelular, esta molécula ingresa a la célula mediante dos tipos de transportadores: los transportadores de glucosa dependiente de sodio (SGLT) y sistemas facilitadores del transporte de glucosa independientes de sodio (GLUT). Los primeros se expresan principalmente en epitelios que se encargan de la absorción y de la reabsorción de nutrientes, como el epitelio del intestino delgado y el epitelio tubular renal. Las 14 proteínas GLUT que existen se expresan en todas las células del organismo y permiten transportar la glucosa de un compartimento a otro (Castrejón V *et al*, 2007)

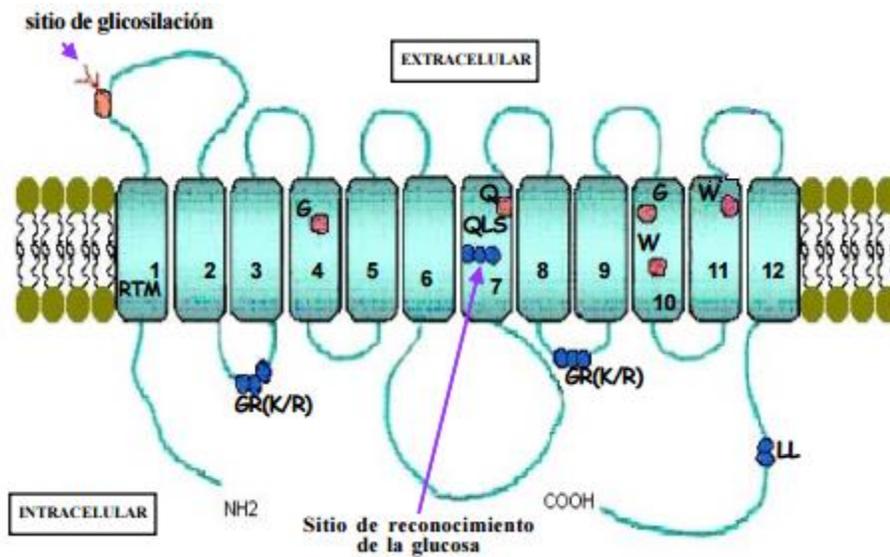
La familia de los SGLT son transportadores que acoplan el ingreso de  $\text{Na}^+$  y glucosa aprovechando el gradiente electroquímico a favor de la entrada del  $\text{Na}^+$ , transportando a la hexosa en contra de un gradiente de concentración. Esta familia incluye a los transportadores de glucosa intestinal y renal SGLT1 y SGLT2 respectivamente. La estructura de los SGLTs consta de 14 dominios transmembranales tipo  $\alpha$ -hélice, con 7 asas intracelulares y 6 extracelulares, con sus grupos amino y carboxilo terminales del lado extracelular y un sitio de glicosilación entre los segmentos 6 y 7. El transporte de  $\text{Na}^+$  se realiza en una región cercana al amino terminal y la glucosa entra por la región cercana al carboxilo terminal. Inicialmente la interacción con el  $\text{Na}^+$  promueve un cambio conformacional en la proteína que aumenta la afinidad por la glucosa. El gradiente

químico de  $\text{Na}^+$  que impulsa el transporte de la glucosa se mantiene por acción de la bomba ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Scheepers A *et al*, 2004; Brown *et al*, 2000), Figura 2.



**Figura 2.** Esquema de la estructura de los sistemas de transporte SGLT. Presentan 14 dominios transmembranales. Los sitios carboxilo y amino terminal se encuentran del lado extracelular. En el asa que conecta a los segmentos transmembranales 6 y 7 se encuentra un sitio de glicosilación.

Los GLUT constituyen una familia de proteínas transmembranales, encargadas del transporte de los monosacáridos al interior de todas las células. Son glicoproteínas con 12 dominios hidrofóbicos transmembranales con una estructura  $\alpha$  helicoidal conectados entre sí por 13 asas hidrofílicas, 6 de ellas son asas extracelulares y 5 intracelulares; la primera asa es externa y en algunos GLUT presenta un sitio de glicosilación. Tienen sus grupos amino y carboxilo terminales del lado citosólico de la membrana (Figura 3). La selectividad a la glucosa está determinada por una serie de 500 residuos de aminoácidos altamente conservados, poseen un oligosacárido ligado a N. Se han identificado 14 GLUT divididos en tres subfamilias de acuerdo a las similitudes en su secuencia y a sus características funcionales, como su especificidad al sustrato y su ubicación tisular (Wu X *et al*, 2002; Castrejón V *et al*, 2007).



**Figura 3.** Esquema de la estructura de los GLUT. Se componen de 12 dominios transmembranales, conectadas por asas hidrofílicas. Las terminaciones amino y carboxilo se encuentran en la parte citoplasmática y presentan una serie de aminoácidos muy conservados entre todos los transportadores. G= glicina; R= arginina; Q= glutamina; L= leucina; K= lisina; S= serina; W= triptófano

El mantenimiento de las concentraciones de glucosa está en función del estado post-prandial, en este estado la glucosa es fosforilada a glucosa 6 fosfato (G6F) por la hexocinasa y oxidada en la vía glucolítica formando piruvato y ATP; el piruvato es oxidado a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en las mitocondrias, en donde se producen 30 a 32 moles de ATP (Osorioet al, 2012).

La glucosa se almacena en el hígado y en el músculo en forma de glucógeno en el proceso metabólico de la glucogénesis. En esta vía metabólica la glucosa se convierte en G6P por la acción de la hexocinasa (en músculo) o de la glucocinasa (en hígado), la G6P se convierte en glucosa 1-fosfato (G1P) por la acción catalítica de la fosfoglucomutasa, G1P se convierte en UDP-glucosa mediante la UDP-glucosa pirofosforilasa; la glucógeno sintasa cataliza la formación de los enlaces  $\alpha$  (1→4) entre las unidades de glucosa del glucógeno, por último, la enzima ramificadora del glucógeno (transglucosilasa), cataliza la transferencia de un segmento de 6-7 residuos de un lugar a otro de una misma cadena lineal, o de una cadena a otra, formando enlaces  $\alpha$  (1→6), que conduce a una molécula de glucógeno altamente ramificada que es almacenada. Así mismo, en el tejido adiposo se almacena en forma de triacilgliceroles a partir de la acetil

CoA proveniente del piruvato, estos procesos son realizados gracias al efecto de la insulina. (American Diabetes Association, 2004).

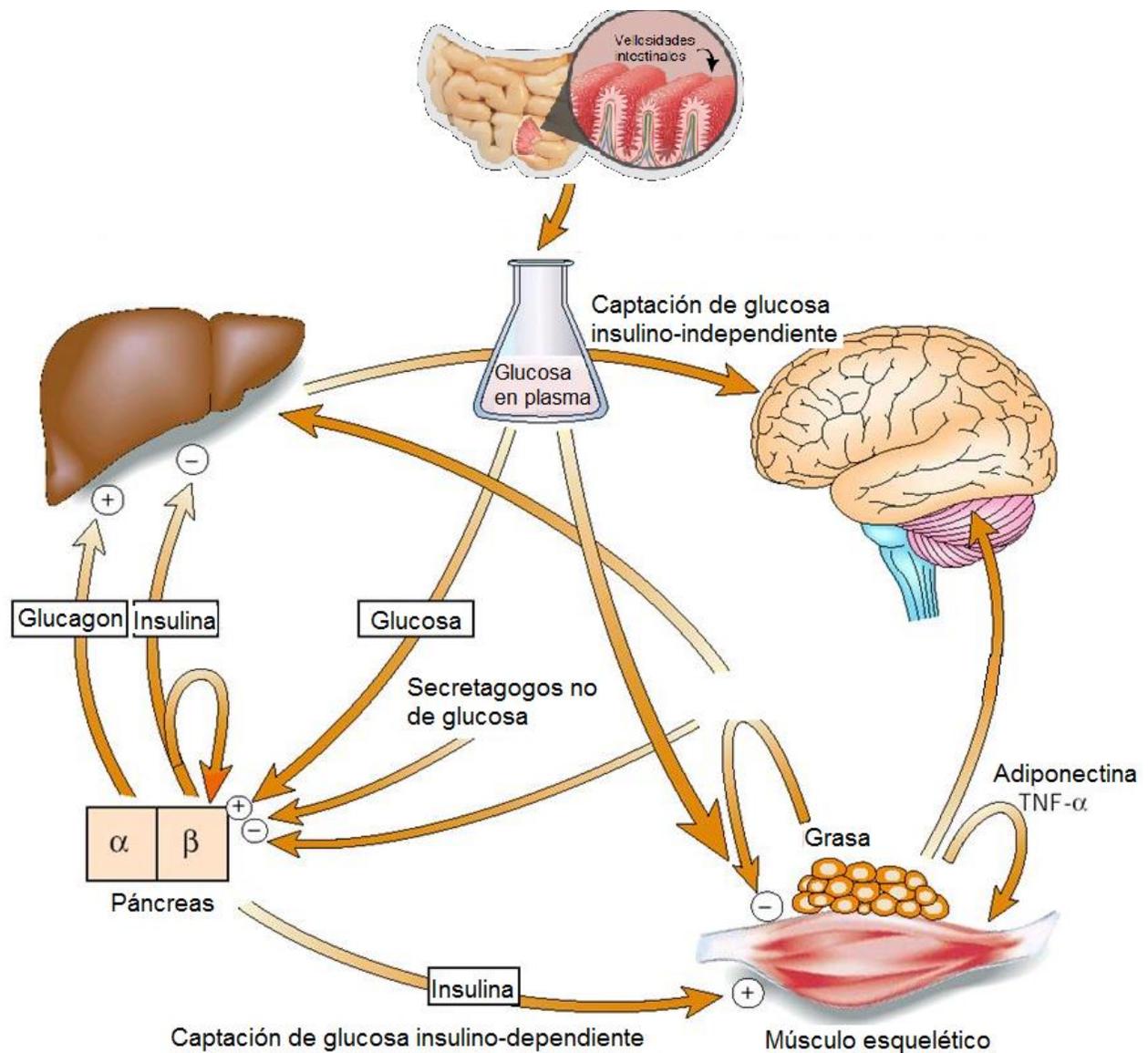
Durante un estado de ayuno (4-12h) es esencial mantener las concentraciones de glucosa para evitar un estado hipoglucémico, este proceso está regulado principalmente por la secreción de glucagon por la célula  $\alpha$  del páncreas endócrino, el glucagon es la principal hormona peptídica con funciones catabólicas, por lo que durante el estado de ayuno se activan principalmente las vías metabólicas de la glucogenolisis en el hígado y el músculo, en esta vía metabólica se rompe el glucógeno para secretar glucosa al plasma sanguíneo, este rompimiento del glucógeno se lleva a cabo mediante la glucógeno fosforilasa que cataliza la fosforolisis de los enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) del glucógeno para convertirlo en G1P que mediante la acción de la fosfoglucomutasa se convierte a G6P; en músculo, la G6P entra en la vía de la glucolisis produciendo piruvato que puede dar lactato o CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en las mitocondrias.

Así mismo, se activa la vía de la gluconeogénesis en el hígado, fenómeno que sólo ocurre en este órgano en un estado de ayuno moderado, en esta ruta metabólica, se sintetiza glucosa *de novo* a partir de precursores de aminoácidos como la alanina y el lactato, finalmente en el tejido adiposo ocurre la degradación de ácidos grasos y triglicéridos.

Hormonas como la noradrenalina y el cortisol participan en el mantenimiento de las concentraciones de la glucosa y la obtención de ATP en un estado de ayuno prolongado (>12h), estas hormonas inducen la síntesis de cuerpos cetónicos a partir de la oxidación parcial de los ácidos grasos en el hígado, que se transportan hacia tejidos extrahepáticos, donde actúan como fuente de energía en el ayuno prolongado y la inanición, así como en la degradación de proteínas para la obtención de aminoácidos en el músculo para la obtención *de novo* de glucosa a partir de la gluconeogénesis (Bolli GB *et al*, 1999; Hirsch IB *et al*, 1999).

La diabetes es una enfermedad que se caracteriza por alterar la homeostasis de la glucosa, presentar resistencia a la insulina o pérdida de la síntesis de esta hormona, lo que significa una disminución en los efectos ejercidos para disminuir las concentraciones de glucosa plasmática, lo que provoca una deficiencia en la regulación de la síntesis y secreción de glucagon, ocasionando

una hiperglucagonemia, alterando la regulación de la gluconeogenesis, glucogenolisis y la secreción de glucosa en el hígado. Por otro lado los efectos ejercidos por la amilina, la GLP-1, la GIP en conjunto con la insulina provocan alteraciones tales como: 1) absorción rápida de alimentos, 2) mayor consumo de alimentos y 3) se pierde la capacidad de regular la secreción de insulina y glucagon post-prandial.



**Figura 4.** Esquema de todos los órganos involucrados en la homeostasis de la glucosa

#### 4. Organización del páncreas

El páncreas es una glándula mixta del sistema digestivo formado por tejido exocrino y endócrino. El páncreas exocrino está constituido por células ductales y células acinares, este grupo de células representan un 95-99% de la masa total del páncreas. Las células acinares producen enzimas como la amilasa, la lipasa y la fosfolipasa que participan en la digestión de nutrientes, enzimas que son liberadas por las redes ductales hacia el duodeno (Pan FCet *al*, 2011).

El tejido endócrino del páncreas está compuesto por los islotes de Langerhans que representan entre el 1-5% de la masa total del páncreas. Los islotes están compuestos por cinco diferentes tipos celulares, cada una de estas células sintetiza diferentes hormonas, las células  $\alpha$  se encargan de sintetizar glucagon, las células  $\beta$  sintetizan insulina y amilina, las células  $\delta$  sintetizan y liberan somatostatina, las células que sintetizan el polipéptido pancreático son las células PP y finalmente las células encargadas de sintetizar y secretar la grelina son las células  $\epsilon$ .

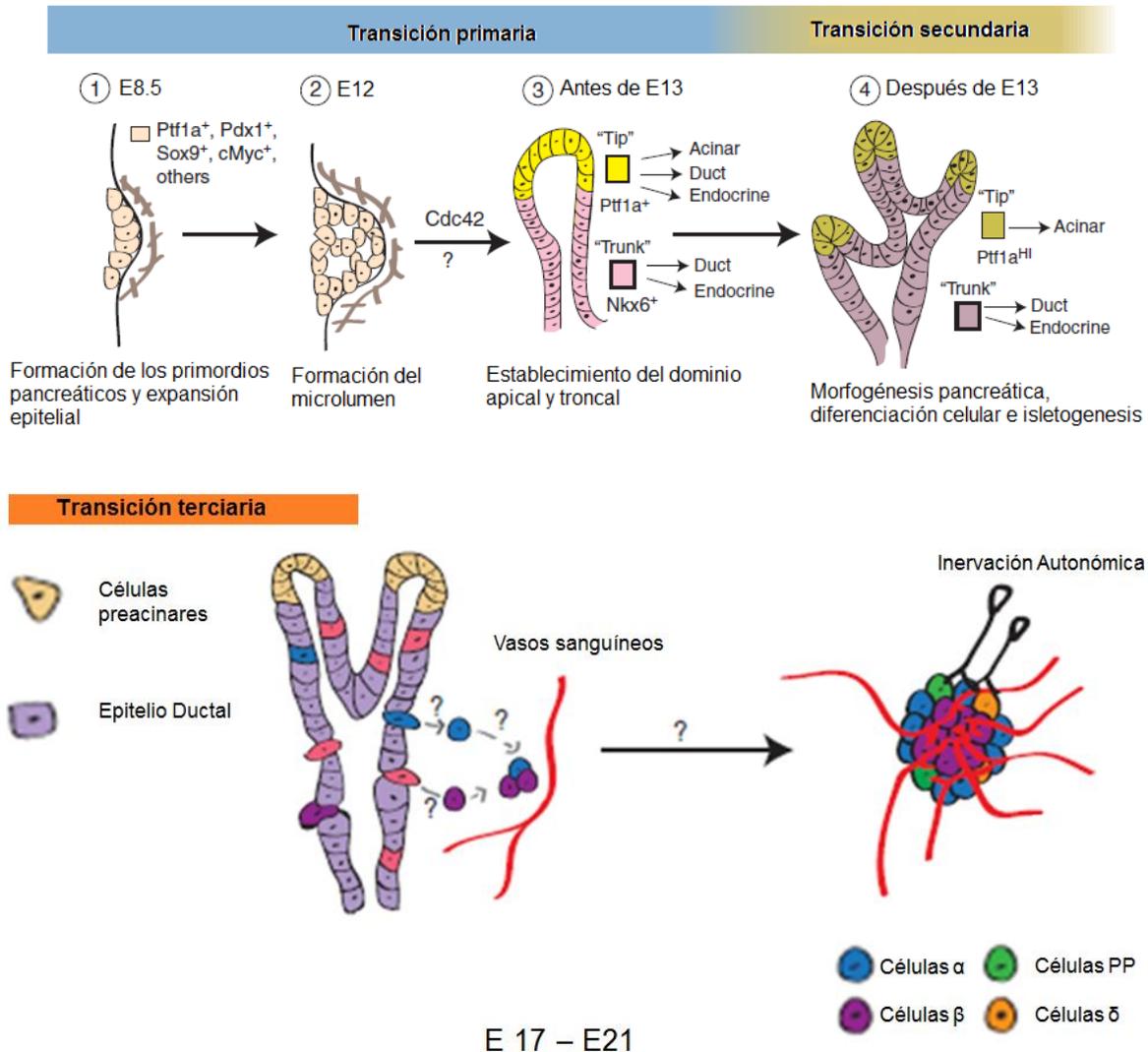
En modelos murinos, la organización de los islotes se caracteriza por contener un porcentaje muy alto de células  $\beta$  en el centro, rodeadas por las células  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  y PP (Figura 5).

La insulina y el glucagon se encargan de regular los niveles de glucosa en la sangre, el polipéptido pancreático es un potente inhibidor de la secreción de las enzimas del páncreas exocrino, la grelina se encarga de regular el apetito y la somatostatina regula la secreción de la insulina, el glucagon y el PP (Bonaf C *et al*, 2008).

## 5. Desarrollo del páncreas

El desarrollo del páncreas es un proceso complejo y altamente regulado que involucra vías de señalización y la expresión de una serie de factores de transcripción que se activan en forma jerárquica y temporal y que son capaces de iniciar y mantener la diferenciación de los distintos tipos celulares del páncreas así como su función y de obtener un órgano con el tamaño adecuado.

El estudio del desarrollo del páncreas de ratas se ha dividido en tres transiciones. La primera transición ocurre durante la organogénesis temprana y se conoce como fase transicional primaria o primera transición y ocurre desde el día embrionario E8.5 al E12.5, en la que se forman los primordios pancreáticos, dorsal y ventral que sufren un proceso de evaginación alrededor del mesénquima que contendrá las células progenitoras multipotentes del páncreas. Durante esta transición en el día E10.5 comienza la coexpresión de glucagon e insulina. La segunda transición ocurre entre E13 y E16.5, y en ésta se inicia el proceso de tubulogénesis ductal así como la diferenciación de las células que componen el tejido endócrino y el tejido exocrino del páncreas. Entre E12 y E14 las células progenitoras multipotentes forman un dominio troncal que dará origen a las células ductales y de manera parcial se alojan las células endócrinas y un dominio apical quedará origen a las células acinares. La tercera transición se presenta desde E16.5 hasta el nacimiento, a esta transición se le denomina isletogénesis. Durante esta fase las células endócrinas alojadas parcialmente en el dominio troncal del páncreas comienzan a migrar a través de la matriz extracelular alrededor del mesénquima en donde finalmente se agregan para formar los islotes de Langerhans (Bonalet *et al*, 2008). Los islotes no se forman totalmente hasta poco antes del nacimiento en E18-19 y continúan su remodelación y maduración durante 2 ó 3 semanas posteriores al nacimiento (Holland *et al*, 2002; Kelly C *et al*, 2011; Zaret KS *et al*, 2008)(Figura 5).



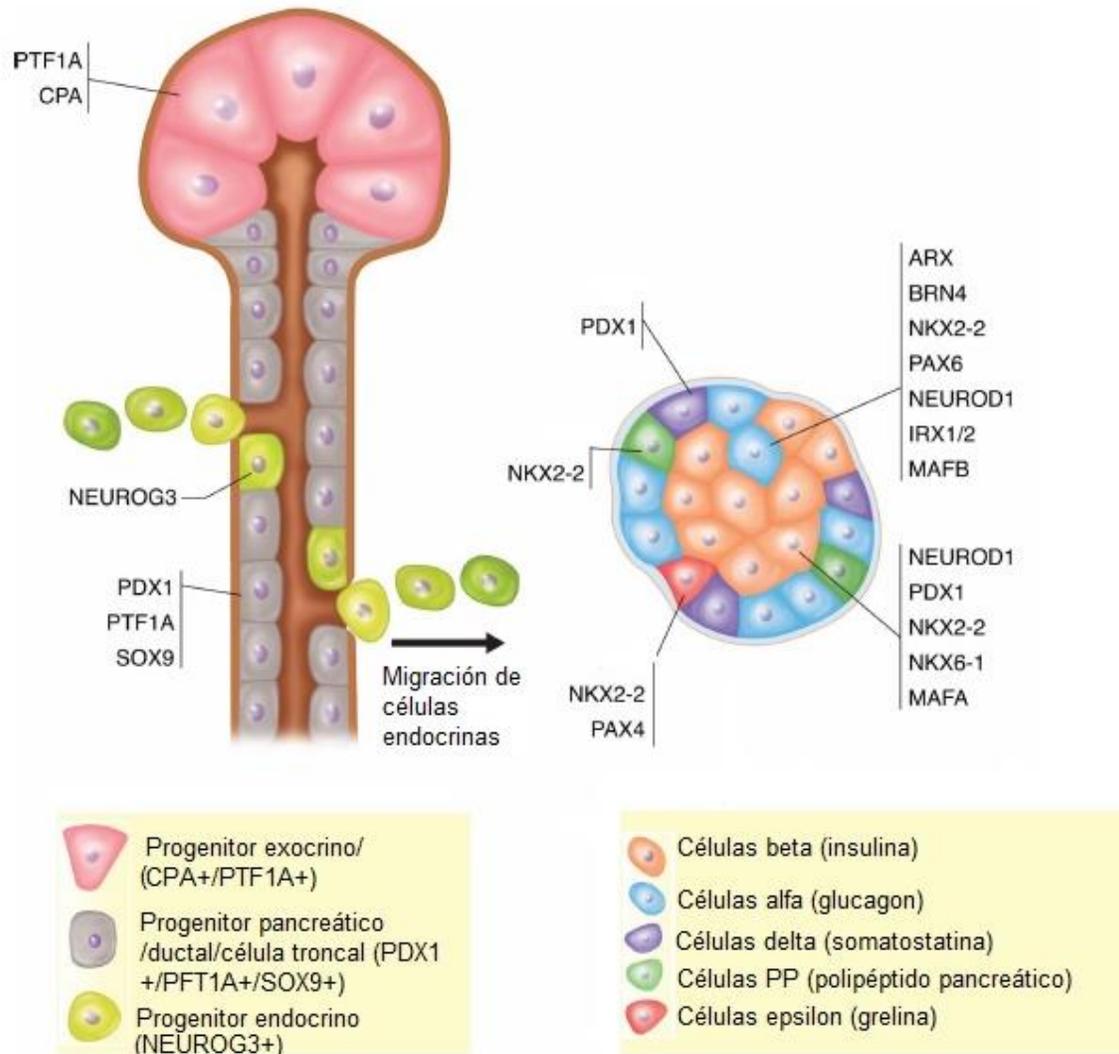
**Figura 5.** Esquema del desarrollo del páncreas. Primera transición, donde se forman los primordios pancreáticos (dorsal y ventral) y va desde E8.5 a E12.5. Segunda y tercera transición, ocurre la tubulogénesis ductal, diferenciación de células endocrinas y exocrinas e isletogénesis. Tomada y modificada de Cecil *et al*, 2012.

El ácido retinóico (RA) participa en el desarrollo del páncreas, el cual define la posición anterior-posterior endodérmica del páncreas. Estudios realizados en ratones han demostrado que el RA tiene efectos específicos en el desarrollo del dominio dorsal pancreático. *Aldh1a2* es un gen que codifica la enzima requerida para la síntesis de RA y se expresa en el mesénquima dorsal del páncreas. La supresión de este gen conduce a la agenesia de la parte dorsal pancreática. (Mastracci TL *et al*, 2012). La vía de señalización HIPPO-YAP es importante para controlar el tamaño de los órganos y la homeostasis de los tejidos. Originalmente fue identificada en *Drosophila melanogaster* y se ha demostrado que está

altamente conservada en mamíferos. Consta de una cascada de cinasas, Mstl 1/2 y Lats 1/2. El complejo Mstl 1/2 cinasas se une a la proteína scaffold Sav1, haciendo que se fosforile y active Lats 1/2 cinasas que a su vez se une a Mob1, otra proteína scaffold para fosforilar a yes-associated protein (YAP) en una secuencia de cinco residuos de serina. La fosforilación de YAP puede provocar una retención citoplasmática, degradación o alteraciones en la proliferación celular, dependiendo de la posición de la fosforilación. Estudios en modelos murinos han demostrado que la vía de señalización HIPPO-YAP es una vía principal que se activa de manera temprana en el desarrollo del páncreas, se ha demostrado que la inactivación de YAP a través de su fosforilación inhibe la división celular de las células pancreáticas dando como resultado una reducción en el tamaño del órgano (BinZhao LL et al, 2011; Xian L et al, 2015).

### **5.1 Factores de transcripción en el desarrollo temprano del páncreas**

Se ha realizado poca investigación sobre la diferenciación del linaje exócrino del páncreas, por lo cual no se han establecido cuales son todos los factores de transcripción que participan en el desarrollo y función de las células acinares y ductales. Estudios recientes han demostrado que la masa celular exócrina depende en gran parte de las células positivas a Pdx1, así como de la expresión a Ptf1a y MIST1 a partir del día E13.5 que son factores que están altamente involucrados en el desarrollo del páncreas exócrino. En la diferenciación también participan vías de señalización como Wnt/ $\beta$ -catenina y Notch, que son requeridos en la expansión y diferenciación de los progenitores exócrinos (Claire B et al, 2008).



**Figura 6.** Diferenciación de los tipos celulares de los islotes de Langerhans. Células progenitoras multipotentes (PDX1, SOX9, PTF1A) presentes en epitelio ductal durante el desarrollo del páncreas y factores de transcripción presentes en el desarrollo y diferenciación cada tipo celular. Tomada y modificada de *Mastraciet et al*, 2012.

La morfogénesis y el desarrollo del páncreas endócrino es regulado por una cascada de factores de transcripción (Martin M *et al*, 2007; Lyttle BM *et al*, 2008). La diferenciación de las células endócrinas requiere que se activen vías de señalización en tiempos determinados y cualquier alteración provocará modificaciones en la diferenciación del tejido endócrino. Son muchos los factores que participan en la diferenciación del páncreas endócrino y otros más que son responsables del mantenimiento y función de éste. En ratas, la expresión de Ngn3

(neurogenin 3) inicia en E8.5, y da origen a los progenitores de las células endócrinas. La expresión de factores de transcripción río abajo de Ngn3, inducirá el desarrollo y diferenciación de cada uno de las células que componen a los islotes de Langerhans (Bonal C y Herrera PL, 2008; Figura 6).

## 5.2 Desarrollo, diferenciación y maduración de las células $\alpha$

A través de estudios genéticos realizados sobre el desarrollo de los diferentes tipos celulares del páncreas, se han identificado factores que participan en el desarrollo y maduración de las células  $\alpha$ , tales como Arx y Foxa2 que juegan un papel crucial en la diferenciación inicial y terminal de las células  $\alpha$ , respectivamente. Otros factores como Foxa1, Pax6, Brn4, 1SL-1 y MafB regulan la transcripción del preproglucagon para dar origen al glucagon.

La diferenciación de las células  $\alpha$  comienza por la represión en la expresión del factor de transcripción Pax4 (paired box 4) y Arx (aristaless-related homeobox). Los RNA mensajeros (RNAm) de Pax4 pueden ser detectados en las células del páncreas en desarrollo a partir de E9.5, su expresión es restringida en células que sintetizan y secretan insulina y presenta un decremento en su expresión poco tiempo después del nacimiento (Collombat *et al*, 2003). Embriones que no presentan la expresión de Pax4 pero si expresan los factores de transcripción Pdx1 y Hb9 (homeobox 9) en la primera transición del desarrollo de este órgano, muestran que no hay diferenciación de las células  $\beta$  del páncreas, indicando que Pax4 es requerido durante la transición secundaria para la diferenciación de las células  $\beta$ . Se ha reportado que la falta en la expresión de Pax4 en ratas, induce un decremento en el número de las células  $\delta$  y un incremento en el número de células que expresan glucagon y grelina. Pax4 reprime la síntesis del factor de transcripción Arx inhibiendo la diferenciación de las células  $\alpha$ , también actúa como un represor transcripcional de la expresión de glucagon y grelina por la unión directa a su promotor (Liu Z *et al*, 2011).

En contraste a la función que Pax4 desempeña en la diferenciación de las células  $\beta$  del páncreas, el factor de transcripción Arx es el responsable de la diferenciación inicial de las células  $\alpha$  del páncreas, el cual actúa río abajo de la Ngn3 (Kubo A *et al*, 2011). La mutación del factor de transcripción Arx en ratas ocasiona una pérdida completa en la diferenciación de las células  $\alpha$  y un

incremento en el número de células  $\beta$  y  $\delta$ . La inhibición en la expresión de Arx es regulada cuando comienza la síntesis de Pax4 y la represión en la expresión de Pax4 inicia cuando Arx es sintetizada, indicando que Arx y Pax4 se inhiben mutuamente debido a que Arx tiene sitios de unión en el promotor de Pax4 y viceversa. Estos datos resaltan la importancia del balance en la síntesis de estos factores de transcripción para poder realizar de manera correcta el proceso de diferenciación celular de las células  $\alpha$  y  $\beta$ . Nkx 2.2 (homeoboxproteinnkx 2.2) inicia su expresión de forma paralela a Pax4 mostrando que su presencia es fundamental en las primeras etapas de la diferenciación de las células  $\beta$ .

El factor de transcripción Pax6 (paired box 6) inicia su síntesis en el epitelio pancreático en E9.5-10.5, y se expresa en células positivas a insulina y células positivas a glucagon. Pax6 es esencial para la formación de las células  $\alpha$ , la mutación de este factor induce una reducción en la síntesis de glucagon (Hart AW *et al*, 2013).

MafA (musculoaponeuroticfibrosarcomaoncogenehomolog a) y MafB (musculoaponeuroticfibrosarcomaoncogenehomolog b) son miembros de una gran familia de factores involucrados en la transcripción de insulina y glucagon. Ambos son responsables de la maduración de las células  $\alpha$  y  $\beta$ , sin embargo, MafA es exclusivo para las células  $\beta$  y MafB se encuentra en los dos tipos celulares y en la etapa adulta su expresión se limita sólo en las células  $\alpha$ . Finalmente Pdx1 limita su expresión a las células  $\beta$  a partir de E17 permitiendo la maduración de estas células y regulando la transcripción de los marcadores de las células  $\beta$  como son Glut2 y la glucocinasa (Hang Y *et al*, 2011). A partir de E14.5, Brn4 se expresa sólo en las células  $\alpha$ , y es responsable de la expresión de glucagon y de mantener la identidad de estas células durante el desarrollo y en la vida adulta del organismo (Liu J *et al*, 2011).

Se ha demostrado que la presencia de GLP-1(glucagonlikepeptide 1) inhibe la expresión de Rb (retinoblastoma), lo cual da resultados controversiales, ya que la inhibición de la expresión de Rb induce la proliferación de células  $\beta$ , pero ocasiona que se detenga el ciclo celular de las células  $\alpha$ , así mismo, la expresión de p107 induce que se detenga el ciclo celular de las células  $\alpha$  y la inhibición de ambas proteínas induce la proliferación de las células  $\alpha$  (Woo *et al*, 2014).

Durante la diferenciación y el desarrollo de las células endócrinas (E10.5) hay una población celular que coproduce las hormonas peptídicas de insulina y glucagon, sin embargo, conforme avanza el desarrollo, esta población de celular disminuye. Se ha demostrado que esta población expresa el factor de transcripción Arx presente exclusivamente durante la diferenciación de las células  $\alpha$  y no expresa el factor de transcripción Pdx1 el cual es exclusivo para la diferenciación de las células  $\beta$ . Se ha sugerido que estas células representan una fase transitoria durante el desarrollo que llevan a la maduración de las células  $\alpha$ , sin embargo, debido a esta característica, han sido propuestas para realizar ensayos de reprogramación celular y realizar la conversión de células  $\alpha$  a células  $\beta$  en enfermedades como la DM. Se ha reportado que el desarrollo en un ambiente hiperglucémico altera la expresión de los factores de transcripción que participan en los procesos de diferenciación y desarrollo de diversos linajes celulares (Pavlinkova G *et al*, 2009).

## **6. Fisiología y regulación de la célula $\alpha$ del páncreas endócrino**

Las células  $\alpha$  son las encargadas de la síntesis y secreción del glucagon, estas células tienen un papel fundamental en incrementar los niveles de glucosa en condiciones hipoglucémicas para mantener la homeostasis de la glucosa por medio de la degradación del glucógeno, promover la gluconeogénesis y la cetogénesis. La síntesis del glucagon en las células  $\alpha$  pancreáticas, comienza a partir de la expresión del gen del preproglucagon, la expresión de este gen dará origen a la síntesis de hormonas peptídicas como el glucagon, GLP1 y GLP2. La síntesis y maduración de estos péptidos se da gracias a la reacción enzimática de las prohormonas convertasas (PC). La expresión de los subtipos de PC va a mediar la producción de las diferentes hormonas peptídicas. La prohormona convertasa 2 (PC2) se expresa únicamente en las células  $\alpha$ , lo que dará origen al glucagon, posteriormente esta hormona es secretada por la célula  $\alpha$  del páncreas endócrino (Gerich *et al*, 1974). El glucagon se encarga de liberar glucosa, la insulina es una hormona sintetizada y secretada por la célula  $\beta$  del páncreas endócrino que ejerce acciones opuestas al glucagon, la insulina disminuye las concentraciones de glucosa en la sangre y activa las vías metabólicas de la glucólisis y de la glucogenogénesis (Gromada *et al*, 2007; Leunget *et al*, 2005).

La secreción de glucagon está regulada a diferentes niveles, la principal depende de las concentraciones de glucosa en la sangre, al disminuir las concentraciones de glucosa sanguínea, la célula  $\alpha$  secreta glucagon al hígado y activa la vía de la glucogenólisis en el hígado y el músculo, en esta vía metabólica se rompe el glucógeno para secretar glucosa al plasma sanguíneo, así mismo, se activa la vía de la gluconeogénesis en el hígado, fenómeno que sólo ocurre en este órgano en un estado de ayuno moderado, en esta ruta metabólica, se sintetiza glucosa *de novo* a partir de precursores de aminoácidos como la alanina y el lactato, finalmente en el tejido adiposo ocurre la degradación de ácidos grasos y triglicéridos, estos procesos sirven para mantener las concentraciones de glucosa.

La secreción de glucagon en las células  $\alpha$  en condiciones de hipoglucemia, se da por un incremento intracelular de la relación ATP/ADP, el cual va a activar los canales de potasio dependientes de ATP (KATP), éste a su vez va a inducir un disparo en el potencial de acción en el cual va a haber activación de los canales de sodio y de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv), finalmente los canales de calcio se activan incrementando las concentraciones de calcio intracelular induciendo la secreción de los gránulos de glucagon al medio extracelular (Rorsman *et al*, 2014)

En contraparte al incrementarse los niveles de glucosa sanguínea se inhibe la activación de los KATP por el incremento en las concentraciones ATP/ADP, así mismo, se inhibe la activación de los canales de Na, de los canales de potasio dependiente de voltaje (Kv) y disminuyen los niveles intracelulares de calcio, impidiendo la secreción de los gránulos de glucagon. Otro mecanismo de regulación es a nivel endocrino, al incrementarse las concentraciones de insulina se inhibe la liberación de glucagon y de manera opuesta al disminuir las concentraciones de insulina se incrementa la liberación de glucagon, también la secreción de somatostatina por parte de la célula  $\delta$  regula la liberación de glucagon. En la célula  $\alpha$  se expresa el receptor tipo 2 de somatostatina, este receptor es un receptor acoplado a proteínas G inhibitoras, al momento de activarse este receptor se inhibe la liberación de glucagon al haber un incremento en los niveles de esta hormona peptídica (Rorsman *et al*, 2014).

Las células  $\alpha$  y  $\beta$  del páncreas endócrino pueden ser regulados por los neurotransmisores GABA y glutamato, ambos neurotransmisores son sintetizados en la célula  $\beta$  y pueden regular la secreción de glucagon, por un lado la liberación de GABA a la célula  $\alpha$  ejerce su acción en los receptores GABAA y GABAB dando como resultado la inhibición de la secreción de glucagon y de manera opuesta la liberación de glutamato y la unión a su receptor AMPA induce la liberación de vesículas de glucagon (Braun M *et al*, 2004; Frankilet *al*, 2004; Sakurai *Het al*, 1974; Kumar *Uet al*, 1999).

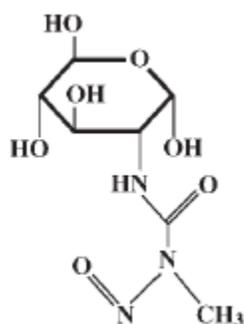
En la fisiopatología de la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2, la célula  $\alpha$  presenta un incremento desregulado en la secreción de glucagon contribuyendo a que se presente constantemente una condición de hiperglucemia. En la diabetes tipo 1 se presenta una hiperplasia de las células  $\alpha$  y una disminución de las células  $\beta$  dando como resultado un incremento en los niveles de glucagon, como consecuencia hay una activación de las rutas metabólicas de la glucogenólisis y la gluconeogénesis provocando un incremento en las concentraciones de glucosa en la sangre. En la diabetes tipo 2 la resistencia a la insulina que puede definirse como la incapacidad de la insulina de ejercer su acción sobre su receptor y la pérdida en la regulación de la secreción de glucagon, contribuyen a que se presente un incremento en los niveles de glucosa.

## **7. Estreptozotocina como agente inductor de hiperglucemia crónica en modelos murinos**

La STZ (2-deoxy-2(3-methyl-3-nitrosouredio)-D-glucopyranosa; es una glucosamina-nitrosourea, es un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces achromogenes*. Es un agente diabetogénico ampliamente utilizado para inducción de hiperglucemia experimental en modelos murinos. Su acción citotóxica es ejercida directamente sobre las células  $\beta$  pancreáticas de manera específica y rápida que da por resultado la necrosis celular irreversible (Wu J *et al*, 2015; Szkudelzki T, 2012).Figura 7

La administración de la STZ induce una respuesta trifásica: 1) a las dos horas después de la administración, los niveles de glucosa se elevan por procesos

de glucogenolisis en el hígado, 2) 10 horas después de la administración los niveles de glucosa descienden y 3) a las 24 horas después de la administración de STZ se produce una hiperglicemia crónica y es eliminada por la orina en 48 horas. La severidad de la hiperglicemia inducida depende de la dosis de STZ que es administrada. Se sabe que a dosis elevadas ( $\geq 40\text{mg/kg}$ ) se produce una necrosis masiva de las células  $\beta$  y un incremento significativo en los niveles de glucosa en ratas. Dosis intermedias ( $35\text{mg/kg}$ - $40\text{mg/kg}$ ) se induce una necrosis moderada de las células  $\beta$  y disminuyen la efectividad de la insulina similar al que se presenta en la diabetes tipo 2 (DT2). A dosis bajas ( $\leq 35\text{mg/kg}$ ) no induce hiperglicemia crónica (Islam S *et al*, 2012; Junod A *et al*; 1967).



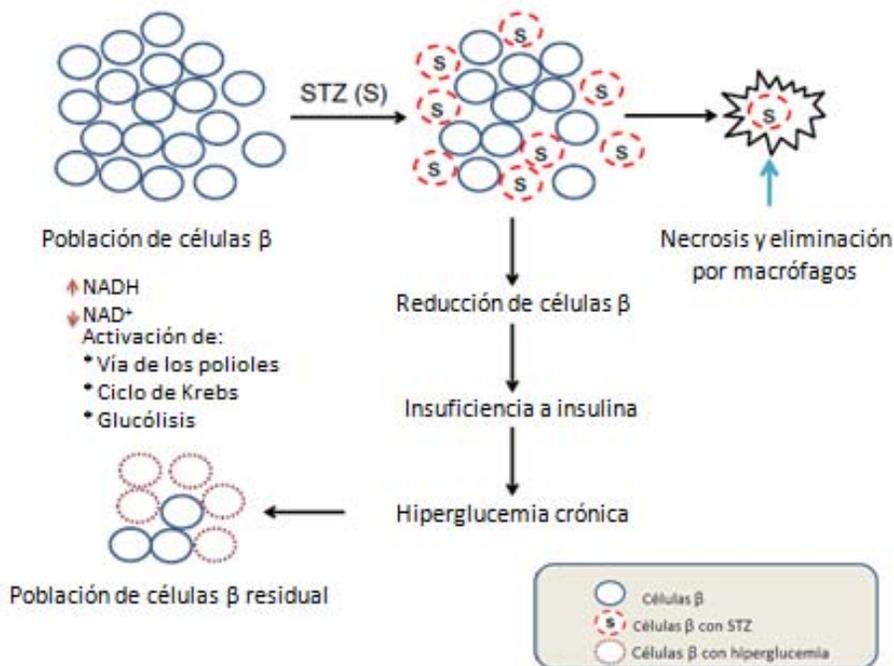
**Figura 7.** Estructura química de la estreptozotocina.

La STZ está compuesta por una molécula de glucosa acoplada a una molécula de metilnitrosourea altamente reactiva que ejerce los efectos citotóxicos. La STZ es reconocida por el transportador GLUT2 presente en las células  $\beta$ , es metabolizada por el hígado y rápidamente eliminada por excreción renal, sin embargo, GLUT2 también es expresado en menor proporción en el hígado y el riñón. Debido a que su vida media en el plasma sanguíneo es de 15 minutos se puede asumir que cualquier daño presente en estos órganos es debido al incremento en los niveles de glucosa y no por la administración de STZ.

Debido al proceso de necrosis y a la disminución de la masa celular  $\beta$ , el incremento en los niveles de glucosa activa vías de señalización y bioquímicas que incrementan las concentraciones intracelulares de NADH/NAD<sup>+</sup>, esto crea un ambiente pseudohipóxico caracterizado por un estrés reductivo, la vía de la hexosamina modifica la proteína O-ligado N-acetilglucosamina (O-GlcNAc), activa

la proteína cinasa K (PKC). La activación de la vía de los polioles da por resultado la acumulación de sorbitol, de fructosa, la formación de metilglioxal y de enediol. Todos estos procesos culminan en la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y junto a la insuficiencia de producir antioxidantes alteran el funcionamiento de las células  $\beta$  por la alteración en procesos redox que inducen alquilaciones en el DNA y la fragmentación de esta molécula ((Wu *et al*, 2015; Szkudelzki T, 2012) Figura 8.

Las complicaciones provocadas por la hiperglucemia son derivadas de la glucotoxicidad crónica que induce un estrés directo en las células  $\beta$  por las concentraciones elevadas de glucosa que traen como consecuencia efectos adversos en el funcionamiento de estas células. Se ha demostrado que los efectos glucotóxicos en las células  $\beta$ , muestran alteraciones en el funcionamiento de las mitocondrias, incrementando los niveles de ROS y alterando el funcionamiento de este tipo celular.



**Figura 8.** Destrucción parcial de las células  $\beta$  por acción de la STZ, reducción de la masa celular  $\beta$  e inducción de hiperglucemia crónica. Tomado y modificado de Wu *et al*, 2015.

## 8. Planteamiento del problema

Se ha demostrado que el ambiente hiperglucémico *in utero*, en el que se desarrollan los productos de madres diabéticas, afecta la diferenciación y desarrollo del páncreas, lo que provocará efectos adversos en la vida adulta del organismo que tendrá un mayor riesgo de desarrollar diabetes, obesidad, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares (Sánchez LSet *al*, 2008). Sin embargo, no hay estudios que revelen el mecanismo de acción a través del cual se generan estas alteraciones en la etapa embrionaria, fetal y post-natal que repercutirán en la vida adulta de los descendientes de madres diabéticas.

Debido a la importancia que tiene la célula  $\alpha$  del páncreas en regular la homeostasis de la glucosa, es importante realizar investigaciones en modelos animales para identificar qué mecanismos se alteran durante la diferenciación y desarrollo de las células  $\alpha$  en un ambiente hiperglucémico.

Por tal motivo en este estudio se propuso analizar las alteraciones en la expresión de los factores de transcripción Arx y Brn4 los cuales participan en la diferenciación, desarrollo, mantenimiento y función de las células  $\alpha$ , así como demostrar las alteraciones en la expresión de glucagon en tiempos fetales y post-natales.

## 9. Hipótesis

El ambiente hiperglucémico *in utero* provocará alteraciones en la expresión de los factores de transcripción requeridos para la diferenciación, mantenimiento y función de las células  $\alpha$  (Arx y Brn4) a los 17 y 21 días fetales, a los 20,28 y 90 días post-natales y en consecuencia afectará la homeostasis de la glucosa y ocasionarán alteraciones metabólicas en la vida adulta de las crías.

## 10. Objetivo General

Identificar los cambios en la expresión de los factores de transcripción que participan en la diferenciación y mantenimiento de las células  $\alpha$  (Arx y Brn4) en fetos y crías de ratas hiperglucémicas y compararlos con la de fetos y crías de ratas sanas.

### 10.1 Objetivos particulares

- Comparar niveles de glucosa y peso de ratas gestantes con hiperglucemia con ratas gestantes sanas.
- Comparar peso y tamaño de fetos de 17 y 21 días de gestación que se desarrollaron con hiperglucemia *in utero* con fetos de madres sanas.
- Comparar peso, tamaño, niveles de glucosa y peso del páncreas de crías de 20, 28 y 90 días que se desarrollaron en un ambiente hiperglucémico con crías sanas.
- Identificar en el páncreas de fetos y crías hiperglucémicas los cambios de expresión de los factores de transcripción Arx y Brn4 y compararlos con fetos y crías sanas por medio de técnicas inmunohistoquímicas y de western blot.
- Identificar cambios en la señal positiva de insulina y glucagon en tejido pancreático en fetos y crías hiperglucémicas y compararlos con fetos y crías sanas por medio de técnicas inmunohistoquímicas.
- Comparar las curvas de tolerancia a la glucosa de crías de 28 y 90 días del grupo control y experimental.

## 11. Materiales y Métodos

### 11.1 Apareamiento

Se aparearon 30 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley con un peso de 250-300 g con machos de fertilidad comprobada durante toda una noche. Al día siguiente a las 8:00 a.m. se realizaron frotis vaginales; la presencia de espermatozoides en el frotis determinó éste como el día 1 de la gestación (Figura 9 y 10).

### 11.2 Lote control

A 15 ratas gestantes de la cepa Sprague-Dawley se les administró día E5 una dosis i.p de 0.2-0.3ml de amortiguador de acetatos a 0.1M a un pH 4.3, dependiendo su peso.

Se formaron los siguientes grupos.

- **Grupo 1C:** 3 ratas gestantes sanas que se sacrificaron a los 17 días de gestación (inicio de la proliferación endocrina).
- **Grupo 2C:** 3 ratas gestantes sanas que se sacrificaron a los 21 días de gestación (término de la formación de islotes durante la gestación).
- **Grupo 3C:** 3 ratas gestantes sanas cuyas crías fueron sacrificadas a los 20 días de nacidas (maduración del páncreas antes del destete).
- **Grupo 4C:** 3 ratas gestantes sanas cuyas crías fueron sacrificadas a los 28 días de nacidas (respuesta del páncreas endócrino a la dieta).
- **Grupo 5C:** 3 ratas gestantes sanas cuyas crías fueron sacrificadas a los 90 días de nacidas (adaptaciones y mantenimiento del páncreas endócrino (Figura 9)).

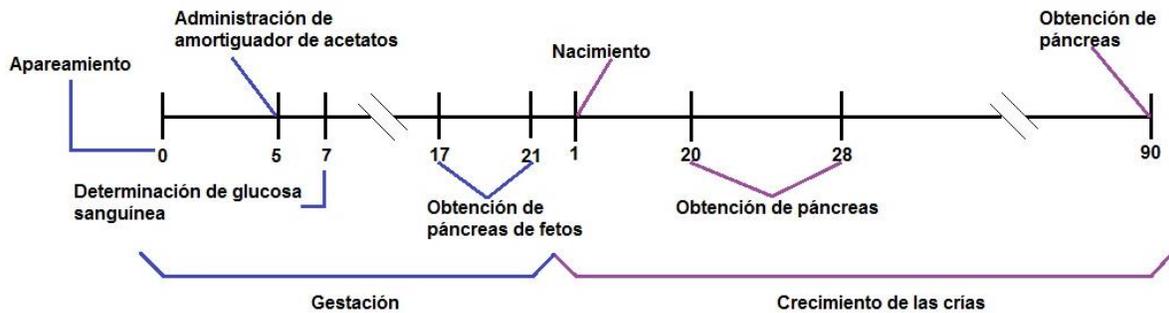
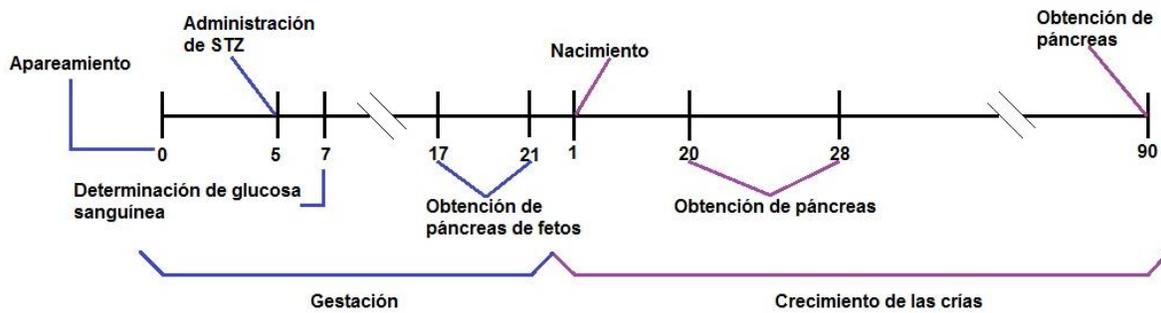


Figura 9. Diseño experimental y línea del tiempo del lote control.

### 11.3 Lote experimental

A 15 ratas gestantes de la cepa Sprague-Dawley se les administró al día E5 una dosis ip de 40mg/Kg de STZ en amortiguador de acetatos a 0.1M a un pH 4.3. A las 48 hrs después de la administración de STZ, se les determinaron los niveles de glucosa sanguínea de la vena caudal (glucómetro Accu-Check®), las que presentaron niveles  $\geq 200$ mg/dL fueron consideradas diabéticas. Se formaron los siguientes grupos:

- **Grupo 1E:** 3 ratas gestantes diabéticas que se sacrificaron a los 17 días de gestación (inicio de la proliferación endocrina).
- **Grupo 2E:** 3 ratas gestantes diabéticas que se sacrificaron a los 21 días de gestación (término de la formación de islotes durante la gestación).
- **Grupo 3E:** 3 ratas gestantes diabéticas cuyas crías fueron sacrificadas a los 20 días de nacidas (maduración del páncreas endócrino antes del destete).
- **Grupo 4E:** 3 ratas gestantes diabéticas cuyas crías fueron sacrificadas a los 28 días de nacidas (respuesta del páncreas endócrino a la dieta).
- **Grupo 5E:** 3 ratas gestantes diabéticas cuyas crías serán sacrificadas a los 90 días de nacidas (adaptaciones y mantenimiento del páncreas endócrino; Figura. 10).



**Figura 10.** Diseño experimental y línea del tiempo del lote experimental

Durante la gestación a las ratas se les determinó una vez por semana peso, y glucosa sanguínea (glucómetro Accu-Check®). A los días, 17 y 21 de gestación se sacrificaron por dislocación cráneo-cervical y se determinó el número de fetos vivos, muertos y el número de reabsorciones. Los fetos se pesaron en balanza analítica (Sartorius EMBM) y se midieron con un vernier (Mitutoyo CD-6" CSX) de la cabeza a la cola para obtener la talla, se registró la presencia y tipo de malformaciones macroscópicas. A través de la decapitación de los fetos, se succionó sangre con ayuda de un capilar, la muestra de sangre se colocó en una tira reactiva para determinar los niveles de glucosa sanguínea (glucómetro Accu-Check®). Se les extirpó el páncreas, se pesó y fijó en una solución de formol-PBS al 10%. El tejido pancreático se deshidrató en alcoholes graduales (50%-100%) durante 60 min en cada cambio, se transfirió a xilol durante 30 minutos y se incluyó en Paraplast® (Leica). Se realizaron cortes de 5µm con un micrótomo (KEDEE KD-3358) y se montaron en portaobjetos tratados con Poli-L-lisina (Sigma®).

Las crías de 20, 28 y 90 días se pesaron en balanza (Sartorius EMBM), se midieron con una cinta métrica de la cabeza a la punta de la cola y se les determinaron los niveles de glucosa sanguínea una vez por semana (glucómetro Accu-Check®). Posteriormente fueron sacrificadas por decapitación, se obtuvo el páncreas, se pesó en una balanza analítica (Sartorius EMBM), se fijaron en una solución de formol-PBS al 10% e incluyeron en Paraplast® (Leica). Se realizaron cortes de 5µm con un micrótomo (KEDEE KD-3358) y se montaron en portaobjetos tratados con Poli-L-lisina (Sigma®) y se procesaron con técnicas de inmunohistoquímica.

El proyecto fue aprobado por la Comisión Local de Investigación del IMSS (R-2009-3604-21) y el uso y manejo de los animales de laboratorio se realizó bajo la norma establecida NOM-062-ZOO-1999, en todos los procedimientos experimentales se evitó cualquier daño o sufrimiento innecesario de los animales.

#### **11.4 Inmunohistoquímica**

Los cortes de páncreas montados en portaobjetos tratados con Poli-L-lisina (Sigma®) se colocaron 30 minutos en una incubadora con control de temperatura a 60°C y posteriormente en xilol por 30 minutos a temperatura ambiente. Los cortes se hidrataron con alcoholes graduales (100%--50% y PBS 1x) durante 10 minutos cada uno. Se colocaron durante 10 minutos en el recuperador de antígeno 5x (Rodent Decolaker) a una temperatura de 120°C, se permeabilizaron las membranas de los cortes histológicos con PBS1x-triton 0.25% durante 10 minutos. Se colocó el inhibidor de peroxidasa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10%) durante 20 minutos, se lavaron con PBS1x-tritón 0.25% durante 10 minutos, se depositaron 2 gotas de bloqueador de proteínas (ImmunoDNA Background Blocker) durante 30 minutos y se agregó el anticuerpo primario, para Arx (Santa Cruz Biotechnology) utilizando una dilución 1:100, para Brn4 (Abcam) una dilución 1:300, para insulina se utilizó una dilución 1:400 (Thermo Scientific) y para glucagon se usó una dilución 1:500 (Thermo Scientific) en PBS1x-tritón 0.25%, todos los anticuerpos se dejaron incubando toda la noche a una temperatura de 4°C.

Al día siguiente se realizaron 4 lavados con PBS1x-tritón 0.25% 10 minutos cada uno, se agregó una gota de biotina (Biocare) durante 30 minutos, se hicieron otros 4 lavados con PBS1x-tritón 0.25% durante 10 minutos, se depositó una gota de avidina-HRP durante 30 minutos, se realizaron 4 lavados con PBS1x-tritón 0.25% durante 10 minutos y se reveló con diaminobenzidina (1:100; BioSB) durante 1 minuto. Se contratiñó con hematoxilina de Harris durante 1 minuto y se deshidrató en alcoholes graduales (70%-100%) durante 3 minutos en cada alcohol, se depositaron en xilol por 3 minutos y se montaron con entellan (Sigma).

Se realizaron análisis de densidad óptica integrada (IOD) a partir de imágenes obtenidas por medio de microscopio óptico (Nikon ecilpse E400) para obtener valores semi-cuantitativos de la expresión de proteínas en el tejido por medio del Software Image Pro Plus®.

## **11.5 Western Blotting**

En los diferentes tiempos de estudio se obtuvieron muestras de páncreas que se congelaron inmediatamente a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se trituraron en morteros congelados para conservar la muestra, se agregó buffer de lisis suplementado con un inhibidor de proteasas, las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se mantuvieron durante 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron (eppendorf centrifuge 5402) a 12.500 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se recuperó el sobrenadante. Al sobrenadante se le cuantificó la concentración de proteína por medio del método de Bradford.

Las muestras de proteínas con una concentración de  $40\mu\text{g/ml}$  se separaron en un gel de poliacrilamida al 12%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en cámara húmeda (Bio Rad®) a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Para confirmar la transferencia de proteínas se tiñó con rojo Ponceau, se bloqueó la membrana con albúmina al 1.5% (Amresco®) durante 1 hora a temperatura ambiente y se dejó incubando con el anticuerpo primario toda la noche. Para Arx (Santa Cruz Biotechnology) se utilizó una dilución 1:500, para Brn4 una dilución 1:300 (Abcam), posteriormente se realizaron lavados con PBS 1x durante 10 minutos cada uno y se incubó con el anticuerpo secundario de cabra IgG anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:1000 durante una hora a temperatura ambiente, una vez terminado el tiempo de incubación se realizaron lavados con PBS 1x durante 10 minutos cada uno y finalmente se colocó un volumen de 6 ml de revelador (Bio Rad®) para determinar la presencia de las bandas de interés.

La determinación cuantitativa de las proteínas se realizó por medio del software Image Studio Lite Ver 5.2.

## **11.6 Curva de tolerancia a la glucosa**

Para determinar la presencia de alteraciones en el metabolismo de la glucosa, a las crías de 28 y 90 días se les sometió a un ayuno de 12 horas y se les administró glucosa con una dosis de  $2\text{g/kg}$  vía i.p. Las muestras sanguíneas se obtuvieron de la vena caudal y las concentraciones de glucosa se midieron con un glucómetro automático (Accu-Chek®) en los tiempos 0, 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de la glucosa.

## 11.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los diferentes grupos se expresaron como promedio y error estándar (E.E). El análisis estadístico para determinar si las mediciones obtenidas presentaron distribución normal fueron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, se realizaron graficas de distribución de los datos, a los valores no paramétricos se les realizó la prueba de Mann-Whitney U con una significancia de  $p \leq 0.05$  y los datos con distribución normal se les realizó un t-student y una ANOVA con una prueba post-hoc de Tukey con una significancia de  $p \leq 0.05$ . Los programas estadísticos que se utilizarán son el SPSS.

Los resultados obtenidos por medio de western blot e inmunohistoquímica de la expresión de Arx y Brn4 en los grupos controles y experimentales en fetos de 17 y 21 días de gestación y en crías de 20, 28 y 90 días se realizó análisis de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, se obtuvo una  $p < 0.01$  (Z), este resultado indicó que los valores obtenidos no presentaron distribución normal.

Los resultados obtenidos de las curvas de tolerancia a la glucosa fueron analizados por medio del área bajo la curva a través del método de la regla trapezoidal, donde la curva obtenida se divide en secciones que se aproximan a trapecios en su forma y se calcula el área de cada una de ellas mediante la fórmula del área del trapecio. Con los resultados obtenidos se observaron si hay una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos. El programa que se utilizó es Excel.

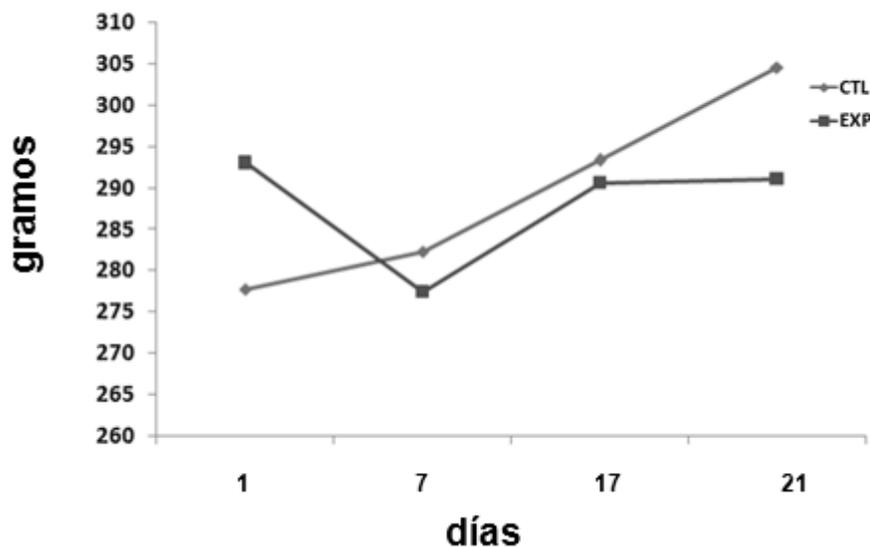
## 12. Resultados

### 12.1 Peso de ratas gestantes

El día 1 de la gestación el peso promedio de las ratas gestantes del grupo control (n=20) fue de  $277 \pm 0.49\text{g}$ , a los días 7 y 17 presentaron un promedio de  $282 \pm 0.84\text{g}$  y  $293 \pm 1.6\text{g}$  respectivamente y a los 21 días se obtuvo un promedio de  $304 \pm 1.3\text{g}$ .

La hiperglucemia provocó una disminución en el peso de las ratas, obteniendo un promedio de  $293 \pm 0.56\text{g}$ ,  $277 \pm 0.53\text{g}$ ,  $290 \pm 0.82\text{g}$  y  $291 \pm 0.79\text{g}$  de peso respectivamente, estos datos no presentaron diferencias significativas comparado con el grupo control (n=25; Figura. 11.A).

**A**

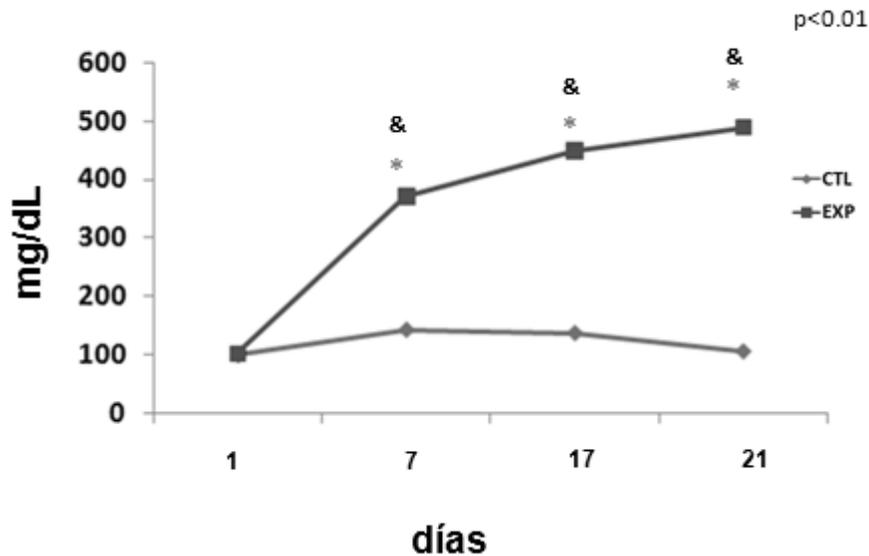


**Figura 11. Peso de ratas gestantes.** (A) La inducción de hiperglucemia en ratas gestantes disminuye el peso comparado con ratas gestantes del grupo control.

## 12.2. Glucosa de ratas gestantes

El promedio de los niveles de glucosa del grupo control el día 1 de gestación fue de  $99.8 \pm 0.56$  mg/dL, a los 7, 17 y 21 días mostraron un incremento no significativo en los niveles de glucosa con valores promedio de  $142.7 \pm 0.53$  mg/dL,  $137.2 \pm 0.82$  mg/dL y  $106.3 \pm 0.79$  mg/dL respectivamente (n=20). Sin embargo, la administración de STZ en el grupo experimental indujo un incremento significativo ( $p \leq 0.01$ ) en los niveles de glucosa con valores promedio de  $101.8 \pm 0.42$  mg/dL,  $369.2 \pm 2.01$  mg/dL,  $447.8 \pm 1.77$  mg/dL y  $487.2 \pm 2.43$  mg/dL respectivamente (n=25);  $p < 0.01$ ; Figura. 12. A).

A



**Figura 12. Niveles de glucosa sanguínea de ratas gestantes.** (A) La administración de STZ incrementa de manera significativa los niveles de glucosa. Cambios significativos entre el grupo experimental (\*), respecto a al día 1 de gestación. Las diferencias entre cada grupo se muestra con &(p<0.01).

### 12.3 Número de reabsorciones y fetos por camada

El número promedio de fetos por camada en el grupo control fue de 11 y en el grupo experimental fue de 7 fetos. En el grupo experimental el promedio de reabsorciones por camada fue de 4 y no se observaron malformaciones. Se registraron 3 días de retraso en el nacimiento de las crías, 3 muertes y 12 reabsorciones completas en ratas gestantes. No se presentaron reabsorciones ni malformaciones en el grupo control (Tabla. 4).

	Control	Experimental
Número de fetos	11	7
Número de reabsorciones	0	4

**Tabla 4. Fetos y reabsorciones por camada.** Número de fetos y reabsorciones por camada presentes en el grupo control y en el grupo experimental.

### 12.4 Medidas morfométricas de fetos y crías

Los pesos en los grupos controles de fetos de 17 y 21 días fueron  $0.53 \pm 0.02$ g y  $4.15 \pm 0.01$ g respectivamente. La hiperglucemia *in utero* provocó una disminución significativa en el peso de los fetos, que fue de  $0.46 \pm 0.1$ g y  $3.32 \pm 0.08$ g respectivamente, lo que representa una disminución de 13.21% y 20% (n=6; p<0.01; Tabla. 5).

El promedio obtenido de la medición de cabeza-rabadilla de los fetos de los grupos controles fue de  $16.57 \pm 0.06$ mm y  $36.80 \pm 0.06$ mm, los grupos experimentales tuvieron un promedio de  $15.63 \pm 0.06$ mm y  $33.82 \pm 0.19$ mm, mostrando una reducción del 5.68% y 8.1% (n=6; p≤0.01; Tabla. 5).

La medición de la cabeza en los grupos controles fue de  $9.39 \pm 0.03$ mm y  $16.03 \pm 0.04$ mm, en los grupos experimentales fue de  $8.87 \pm 0.04$ mm y  $13.89 \pm 0.10$ mm lo que representa una reducción del 5.54% y 13.35% respectivamente (n=6; p≤0.01; Tabla. 5).

La media de la medición cabeza-cola fue de  $23\pm 0.05\text{mm}$  y  $50.45\pm 0.10\text{mm}$  en los grupos controles y en los grupos experimentales fue de  $21.24\pm 0.10\text{mm}$  y  $46.51\pm 0.2\text{mm}$  presentando una disminución del 7.66% y 7.81% ( $n=6$ ;  $p\leq 0.01$ ; Tabla. 5).

Fetos		Peso (g)	Cabeza – rabadilla (mm)	Cabeza (mm)	Cabeza – cola (mm)
17 días	Control	$0.53\pm 0.02$	$16.57\pm 0.06$	$9.39\pm 0.03$	$23\pm 0.05$
	Experimental	$0.46\pm 0.01^*$	$15.63\pm 0.06^*$	$8.87\pm 0.04^*$	$21.24\pm 0.10^*$
21 días	Control	$4.15\pm 0.01$	$36.80\pm 0.06$	$16.03\pm 0.04$	$50.45\pm 0.10$
	Experimental	$3.32\pm 0.08^*$	$33.82\pm 0.19^*$	$13.89\pm 0.10^*$	$46.51\pm 0.2^*$

**Tabla 5. Medida de fetos de 17 y 21 días.** El desarrollo en un ambiente hiperglucémico disminuye el peso, la talla de cabeza-rabadilla, cabeza y cabeza-cola en fetos de 17 días comparado con el grupo control ( $p\leq 0.01$ ).

La media del peso en crías controles de 20, 28 y 90 días fue de  $42.03\pm 0.8\text{g}$ ,  $66.2\pm 1.74\text{g}$  y  $259.8\pm 0.8\text{g}$ , en los grupos experimentales los promedios fueron de  $22.5\pm 0.6\text{g}$ ,  $39.8\pm 1.72\text{g}$  y  $349.1\pm 0.5\text{g}$ , lo que representó una disminución del 54% y 39.88% en crías de 20 y 28 días. Las crías de 90 días mostraron un incremento del 34.37%, en todos los grupos las diferencias fueron estadísticamente significativas comparadas con el grupo control ( $n=7$ ;  $p<0.01$ ; Tabla. 6.).

La media obtenida en la talla de las crías de los grupos controles fueron de  $18\pm 0.25\text{cm}$ ,  $23.1\pm 0.42\text{cm}$  y  $48.92\pm 0.88\text{cm}$ . El promedio de la talla de las crías del grupo experimental fue de  $15.25\pm 0.22\text{cm}$ ,  $20.1\pm 0.31\text{cm}$  y  $39.9\pm 0.61\text{cm}$  respectivamente, demostrando una reducción del 17%, 13% y 18.44% en la talla ( $n=7$ ;  $p\leq 0.01$ ; Tabla. 6.).

El promedio del peso del páncreas de las crías de los grupos controles fue de  $0.18\pm 0.02\text{g}$ ,  $0.25\pm 0.03\text{g}$  y  $1.18\pm 0.03\text{g}$ , el promedio de peso de los páncreas de los grupos experimentales fue de  $0.05\pm 0.005\text{g}$ ,  $0.013\pm 0.05\text{g}$  y  $0.77\pm 0.05\text{g}$ , representando una reducción de 27.8%, 5,2% y 65.25% ( $n=7$ ;  $p\leq 0.01$ ; Tabla. 6.)

Crías		Peso (g)	Talla (cm)	Peso del páncreas (g)
20 días	Control	42.03±0.8	18±0.25	0.18±0.02
	Experimental	22.5±0.6*	15.25±0.22*	0.05±0.005*
28 días	Control	66.2±1.74	23.1±0.42	0.25±0.03
	Experimental	39.8±1.72*	20.1±0.31*	0.013±0.05*
90 días	Control	259.8±0.8	48.92±0.88	1.18±0.03
	Experimental	349.1±0.5*	39.9±0.61*	0.77±0.05*

**Tabla 6. Medidas de crías de 20, 28 y 90 días.** El desarrollo en un ambiente hiperglucémico disminuye el peso, la talla, cabeza y el peso del páncreas en crías de 20, 28 y 90 días comparados con el grupo control ( $p \leq 0.01$ ).

### 12.5 Niveles de glucosa en fetos de 17 y 21 días y en crías de 20, 28 y 90 días

El promedio de los niveles de glucosa en fetos de 17 y 21 días controles fueron de  $35.76 \pm 0.19 \text{ mg/dL}$  y  $32.6 \pm 0.19 \text{ mg/dL}$  respectivamente. Los grupos experimentales mostraron un incremento significativo en los niveles de glucosa promediando  $395.5 \pm 0.77 \text{ mg/dL}$  y  $373.75 \pm 0.49 \text{ mg/dL}$  en fetos de 17 y 21 días ( $p < 0.01$ ; Tabla. 7).

Fetos		Glucosa (mg/dL)
17 días	Control	$35.76 \pm 0.19$
	Experimental	* $395.5 \pm 0.77$
21 días	Control	$32.6 \pm 0.19$
	Experimental	* $373.75 \pm 0.49$

**Tabla 7. Niveles de glucosa en fetos de 17 y 21 días.** El desarrollo en un ambiente hiperglucémico incrementa los niveles de glucosa en fetos de 17 y 21 días ( $p < 0.01$ ).

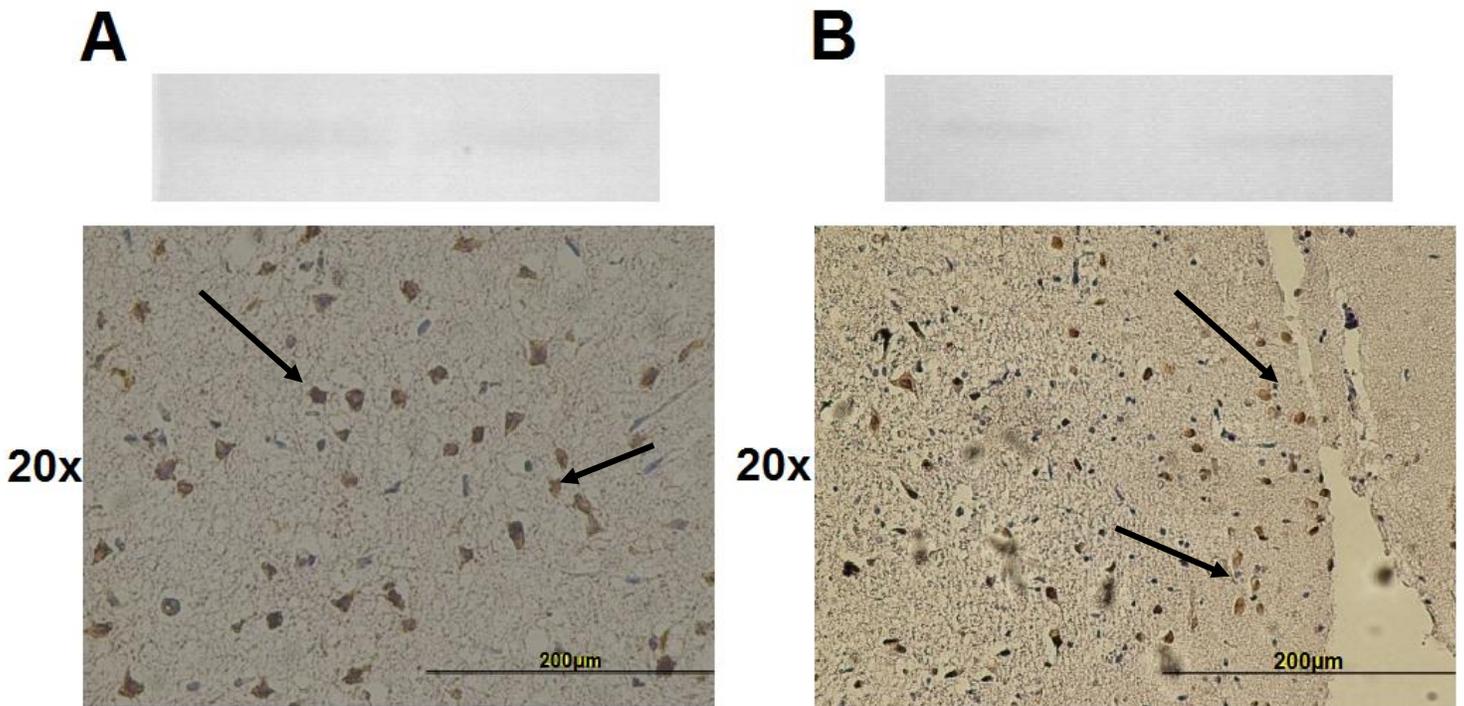
El promedio de los niveles de glucosa sanguínea fueron  $133.11 \pm 3.71$  mg/dL,  $149.32 \pm 5.26$  mg/dL y  $79.33 \pm 0.9$  mg/dL en las crías de los grupos controles de 20, 28 y 90 días respectivamente. En los grupos experimentales se obtuvieron valores de  $126.03 \pm 3.75$  mg/dL,  $157.7 \pm 13.19$  mg/dL y  $112.28 \pm 0.59$  mg/dL, presentando una disminución del 94.7% en crías de 20 días y un aumento del 105.6% y 104.5% en crías de 28 y 90 días ( $n=7$ ;  $p \leq 0.01$ ; Tabla 8).

Crías		Glucosa (mg/dL)
20 días	Control	$133.11 \pm 3.71$
	Experimental	$126.03 \pm 3.75$
28 días	Control	$149.32 \pm 5.26$
	Experimental	$157.7 \pm 13.19$
90 días	Control	$79.33 \pm 0.9$
	Experimental	$112.28 \pm 0.59$

**Tabla 8. Niveles de glucosa en crías de 20, 28 y 90 días.** El desarrollo en un ambiente hiperglucémico disminuye los niveles de glucosa en crías de 20 días, y en crías de 28 y 90 aumenta los niveles de glucosa sanguínea.

## 12.6 Expresión de Arx y Brn4

Los factores de transcripción Arx y Brn4, son factores que se expresan preferentemente en cerebro y páncreas, por tal motivo, se usó el tejido cerebral y las proteínas totales de cerebro como control positivo para la identificación de los factores de transcripción por medio de inmunohistoquímica y western blot (Figura 13. A y B).



**Figura 13. Expresión de Arx y Brn4 en tejido y proteínas totales de corteza cerebral.** (A y B) Detección de la señal de Arx y Brn4 a través western blot e inmunohistoquímica .

## 12.7 Expresión de Arx y Brn4 en fetos de 17 y 21 días

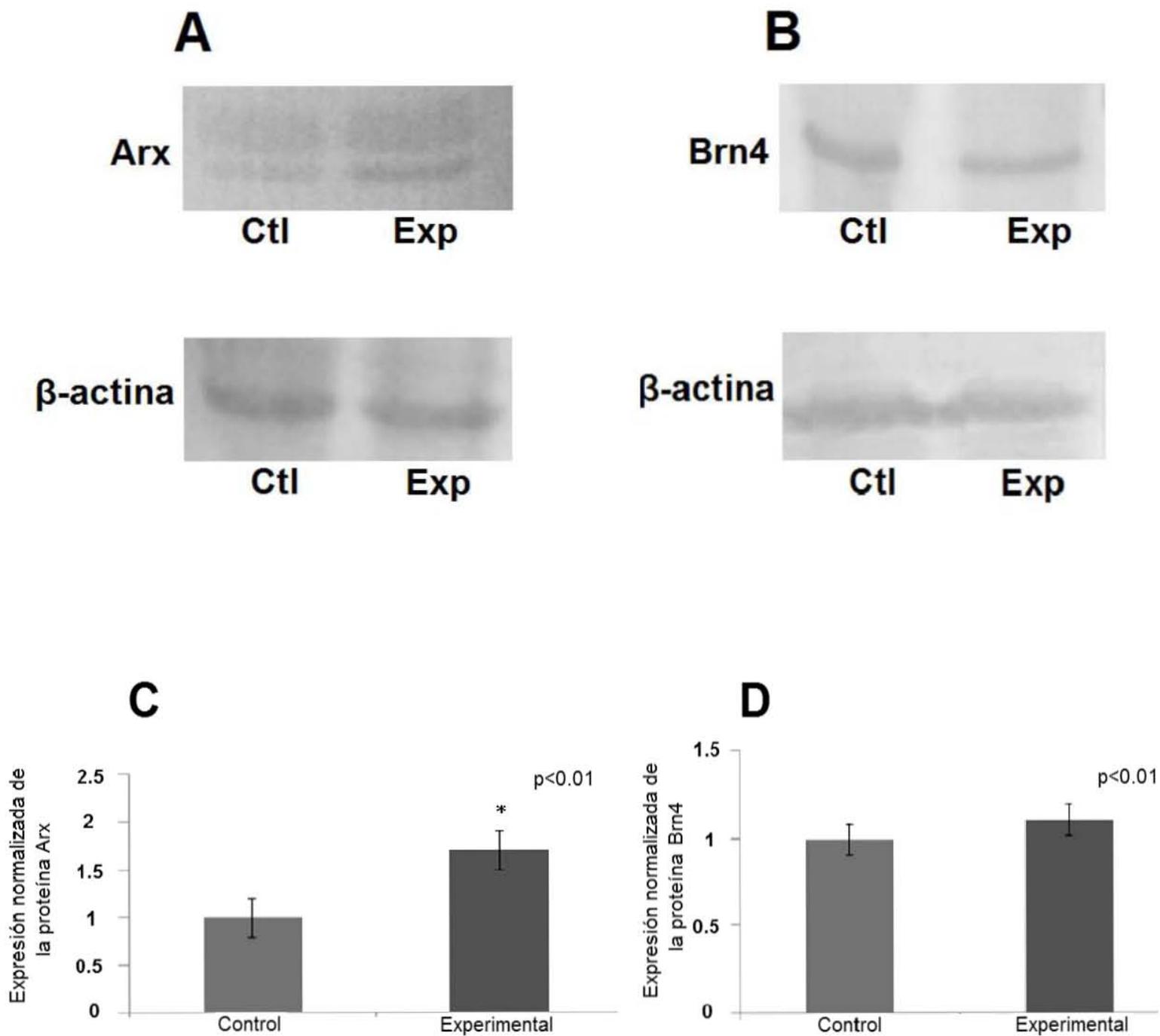
Todos los análisis de western blot fueron normalizados y cuantificados a partir del control de carga  $\beta$ -actina.

El análisis semicuantitativo de la expresión de Arx por western blot en fetos de 17 y 21 días en los grupos control presentó promedios de 840666 INT/mm<sup>2</sup> y 2037500 INT/mm<sup>2</sup>, respectivamente. En los grupos experimentales se obtuvieron promedios de 1436666 INT/mm<sup>2</sup> y 961500 INT/mm<sup>2</sup>, lo que indica un aumento significativo en la expresión de 1.7 veces en 17 días y una disminución de 0.47 veces en 21 días ( $p \leq 0.01$ ; 58kDa; Figura 14 y 16. A y C).

La cuantificación de la inmunopositividad por medio del IOD de Arx fue en promedio de 1.5 y 17.8 en grupos controles en fetos de 17 días y 21 días (Figura 13 y 14. C y G) respectivamente. Mientras que en el grupo experimental se obtuvieron medias de 1.83 y 3.23 respectivamente, mostrando un incremento significativo en los niveles de expresión de Arx generados por el ambiente hiperglucémico durante el desarrollo a los 17 días y un decremento a los 21 días con una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.01$ ; Figura 15 y 17. A, B y E).

La expresión de Brn4 (38kDa) se analizó por western blot, obteniendo promedios de 34600 INT/mm<sup>2</sup> y 204000 INT/mm<sup>2</sup> para 17 y 21 días fetales respectivamente para los grupos control y en grupos experimental se obtuvieron medias de 38400 INT/mm<sup>2</sup> y 34500 INT/mm<sup>2</sup> respectivamente. Se observó un aumento significativo de 1.10 veces en la expresión de Brn4 en 17 días y una disminución significativa de 0.16 veces en 21 días ( $p \leq 0.01$ ; Figura 14 y 16. B y D).

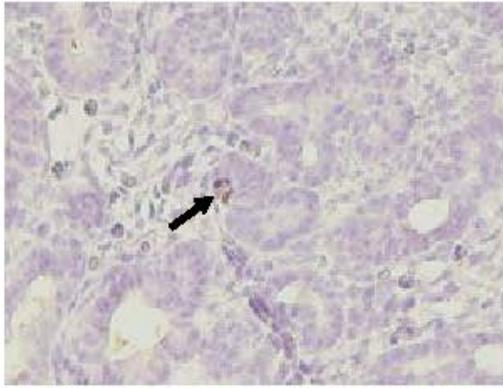
El análisis del IOD en fetos de 17 y 21 días en el grupo control de Brn4 se obtuvo una media de 16.72 y 10 respectivamente (Figura. 15 y 17. E y H). En el grupo experimental se obtuvieron promedios de 37.23 y 9.13, respectivamente, lo que demostró una mayor señal positiva en 17 días y una señal positiva menor a los 21 días, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.01$ ; Figura 14 y 16. C, D y F).



**Figura 14. Modificaciones de la expresión de Arx y Brn4 en fetos de 17 días.** (A y B) Western Blot correspondiente a Arx y Brn4. (C y D) Normalización de la expresión de la proteína de Arx y Brn4 (n=6).

**A**

Arx

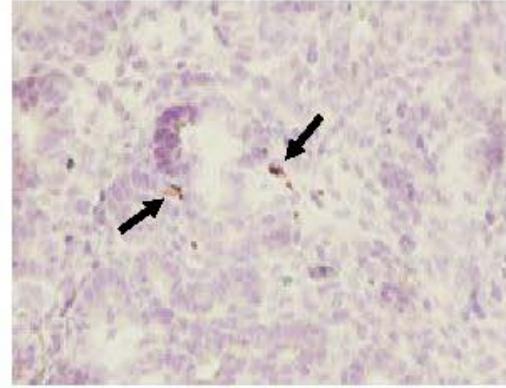


20x

Ctl

**B**

Arx

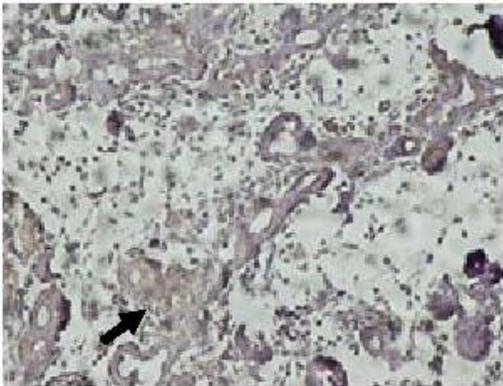


20x

Exp

**C**

Brn4

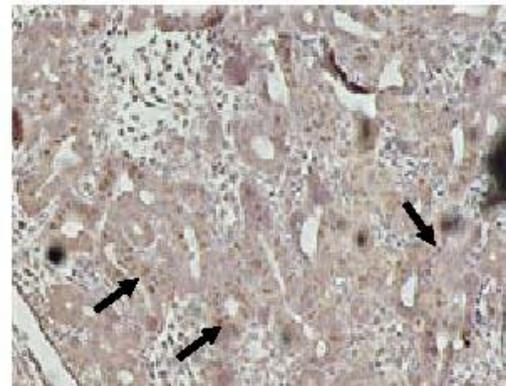


20x

Ctl

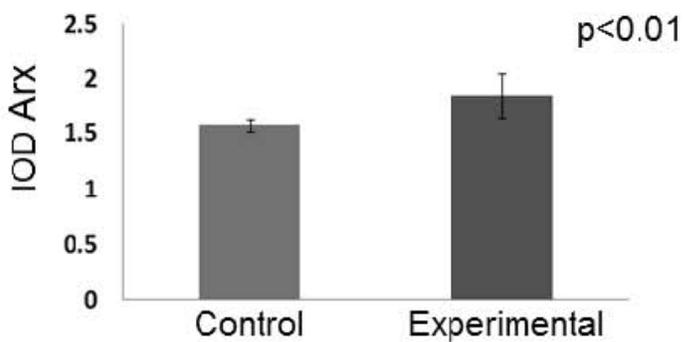
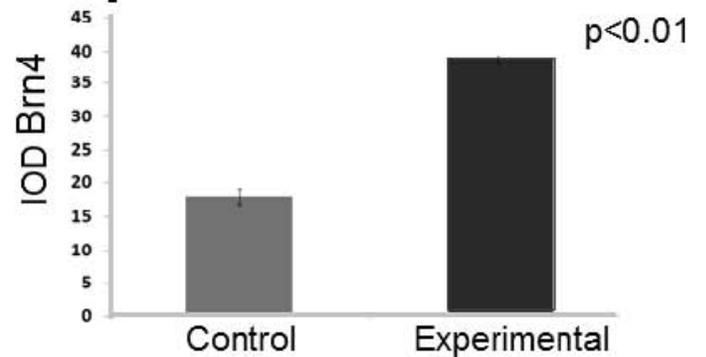
**D**

Brn4

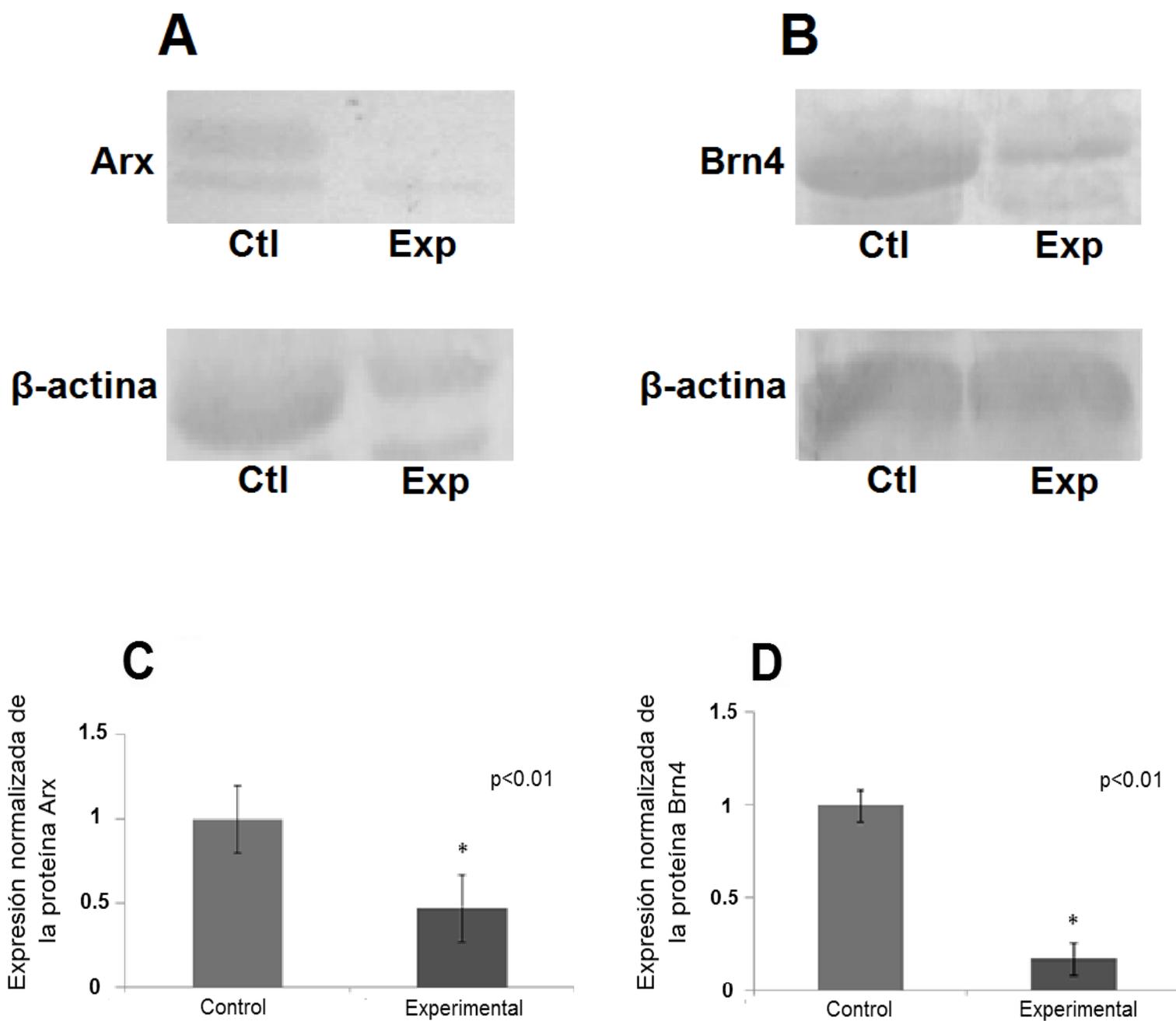


20x

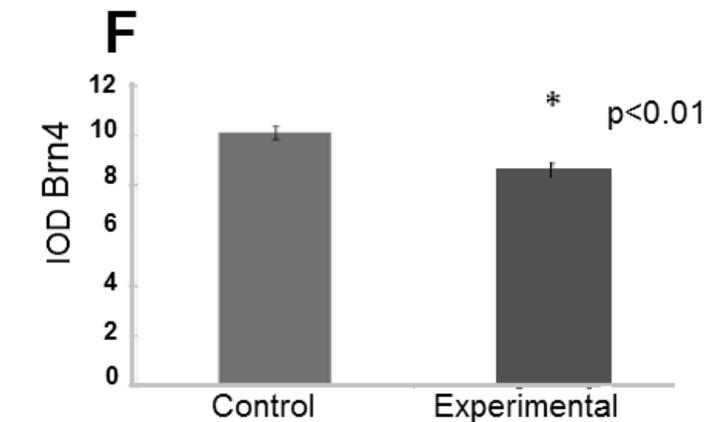
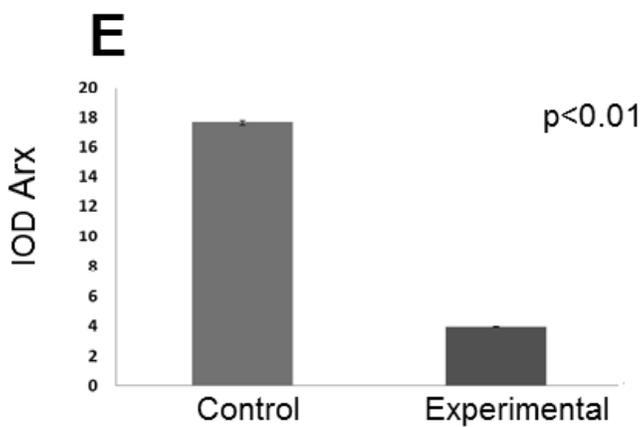
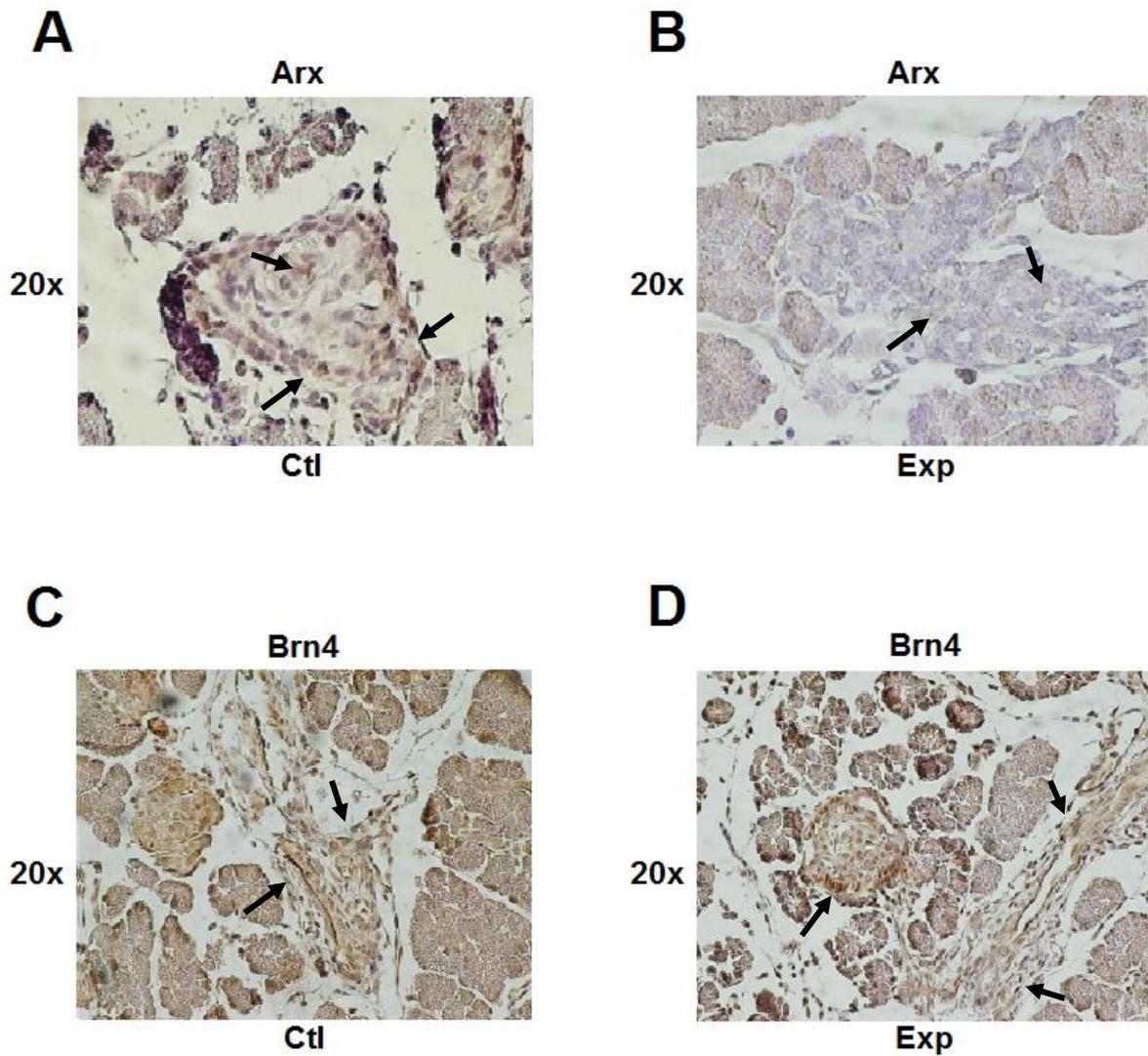
Exp

**E****F**

**Figura 15. Modificaciones de la expresión de Arx y Brn4 en fetos de 17 días.** (A y B) Inmunopositividad de Arx. (C y D). Inmunopositividad de Brn4.. (E) Aumento en los niveles de expresión de Arx comparado contra el grupo control ( $p \leq 0.01$ ). (F). Aumento en los niveles de expresión de Brn4 comparado contra el grupo control ( $n=6$ ;  $p \leq 0.01$ ).



**Figura 16. Modificaciones de la expresión de Brn4 y Arx en fetos de 21 días.** (A y B) Western Blot correspondiente a Arx y Brn4. (C y D) Normalización de la expresión de la proteína de Arx y Brn4 (n=6).

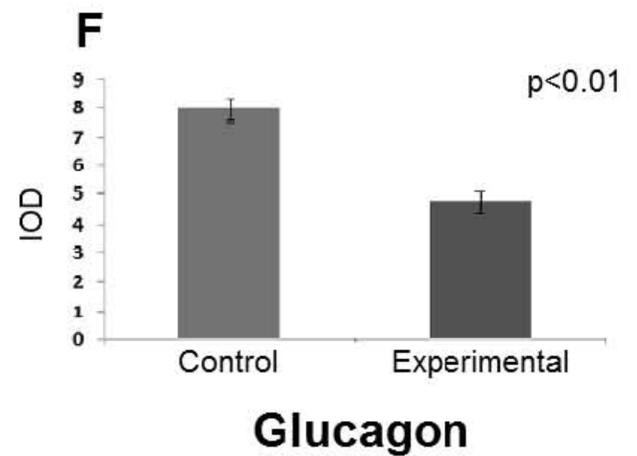
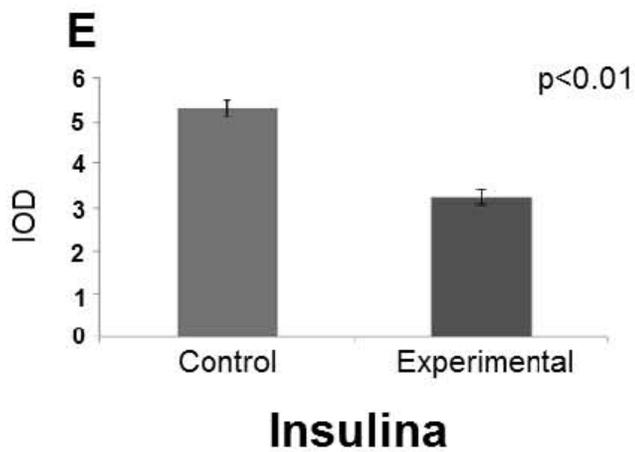
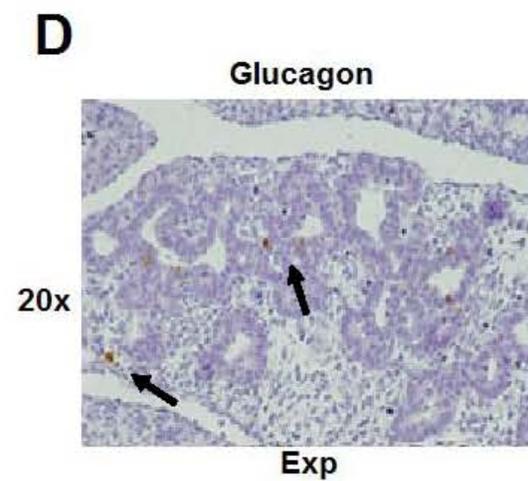
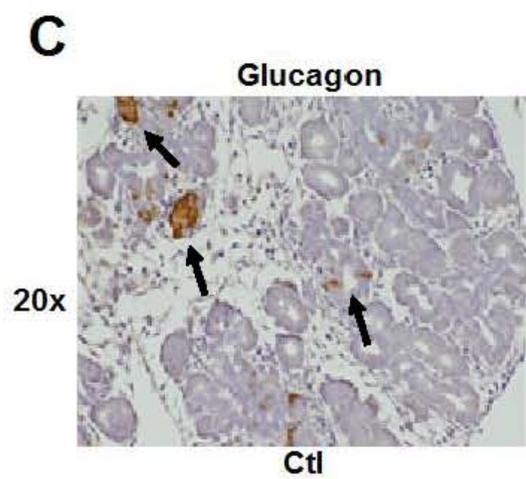
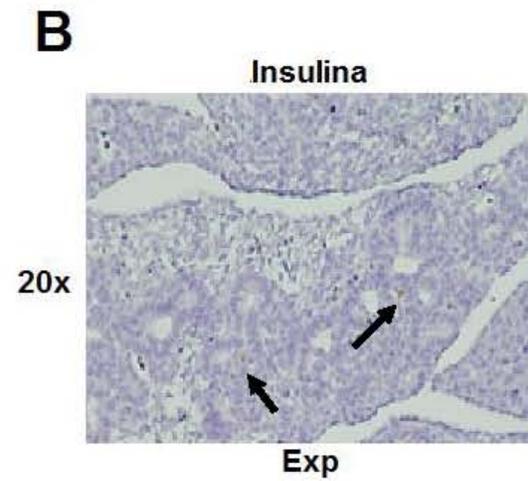
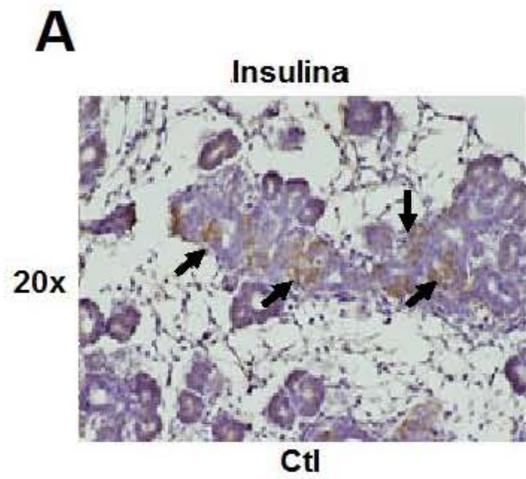


**Figura 17. Expresión de Arx y Brn4 en fetos de 21 días.** (A y B) Inmunopositividad correspondiente a Arx. (C y D) Inmunopositividad de Brn4. (E) Disminución en los niveles de expresión de Arx comparado contra el grupo control ( $p \leq 0.01$ ). (F). Disminución en los niveles de expresión de Brn4 comparado contra el grupo control ( $n=6$ ;  $p \leq 0.01$ ).

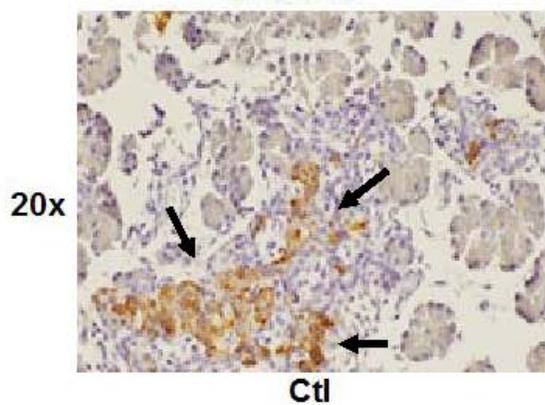
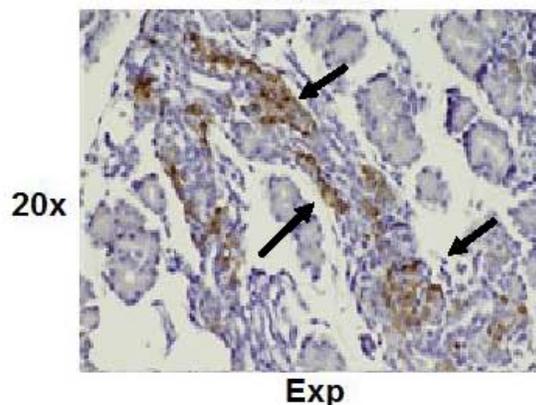
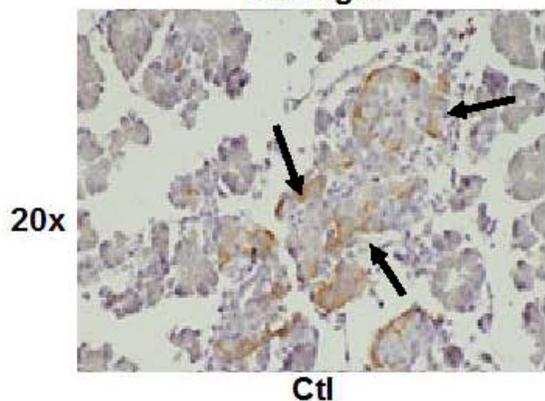
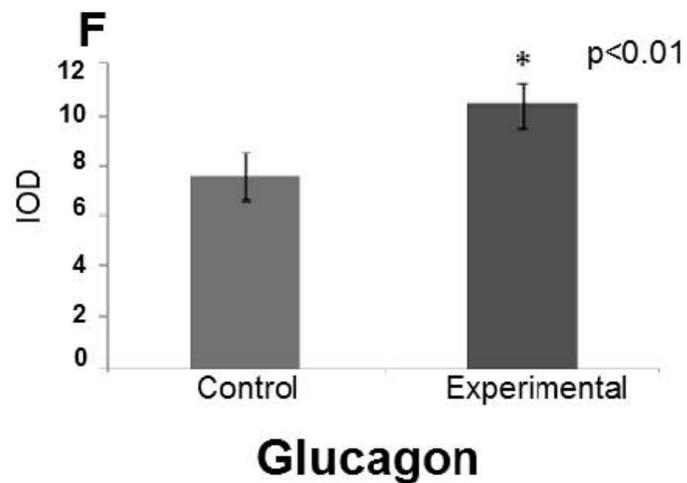
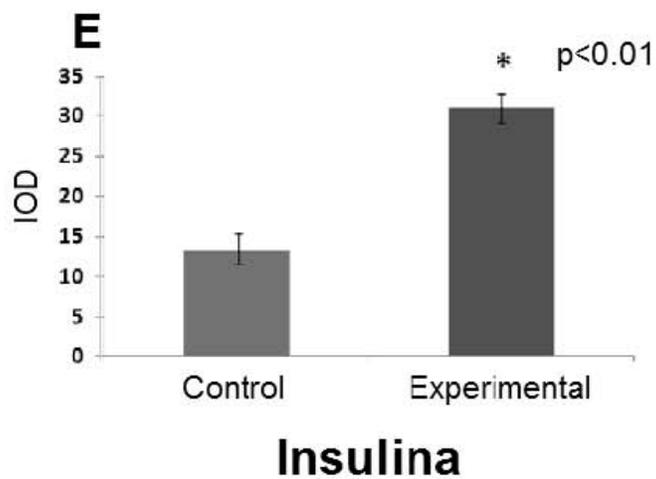
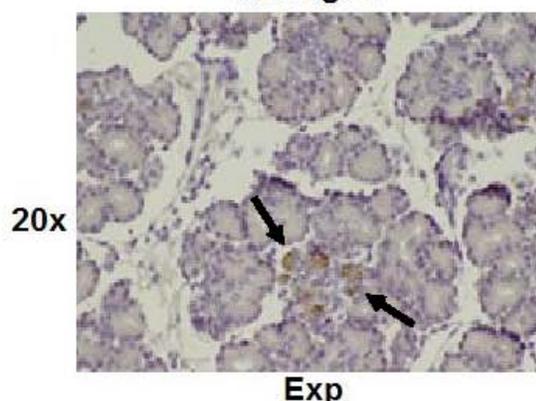
## **12.8 Expresión de insulina y glucagon en fetos de 17 y 21 días**

El análisis de IOD de insulina en los grupos controles fue en promedio de 5.30 y 13.42 en 17 y 21 días respectivamente ( $p < 0.01$ ; Figura. 18 y 19. A y E). En grupos experimentales se obtuvo una media de 3.23 y 30.97 respectivamente (Figura. 18 y 19. B y E). A los 17 días la inmunopositividad se detectó en la región troncal del páncreas en desarrollo (Figura 18 y 19. A y B) y a los 21 días se detectó un incremento en la inmunopositividad distribuida en el centro del islote ( $p < 0.01$ ; Figura. 18 y 19. A y B ).

El análisis cuantitativo del IOD realizado para glucagon mostró un promedio de 7.95 y 7.54 a los 17 y 21 días respectivamente en los grupos control ( $p < 0.01$ ; Figura. 18 y 19. C y F). En los grupos experimental se obtuvo una media de 4.75 y 10.31 respectivamente ( $p < 0.01$ ; Figura. 18 y 19. D y F); indicando una disminución significativa en la inmunopositividad a los 17 días y un aumento significativo a los 21 días ( $p \leq 0.01$ ).



**Figura 18. Expresión de insulina y de glucagon en fetos de 17 días.** (A y B) Inmunopositivity de insulina. (C y D) Inmunopositivity de glucagon. (E y F). El ambiente hiperglucémico disminuye los niveles de expresión de insulina y glucagon comparado contra el grupo control (n=6;  $p \leq 0.01$ ).

**A****Insulina****B****Insulina****C****Glucagon****D****Glucagon**

**Figura 19. Expresión de insulina y de glucagon en fetos de 21 días.** (A y B) Inmunoposividad de insulina. (C y D) Inmunoposividad de glucagon. (E y F). El ambiente hiperglucémico incrementa los niveles de expresión de insulina y glucagon comparado contra el grupo control. (n=6; p<0.01).

## 12.9 Expresión de Arx y Brn4 en crías de 20, 28 y 90 días

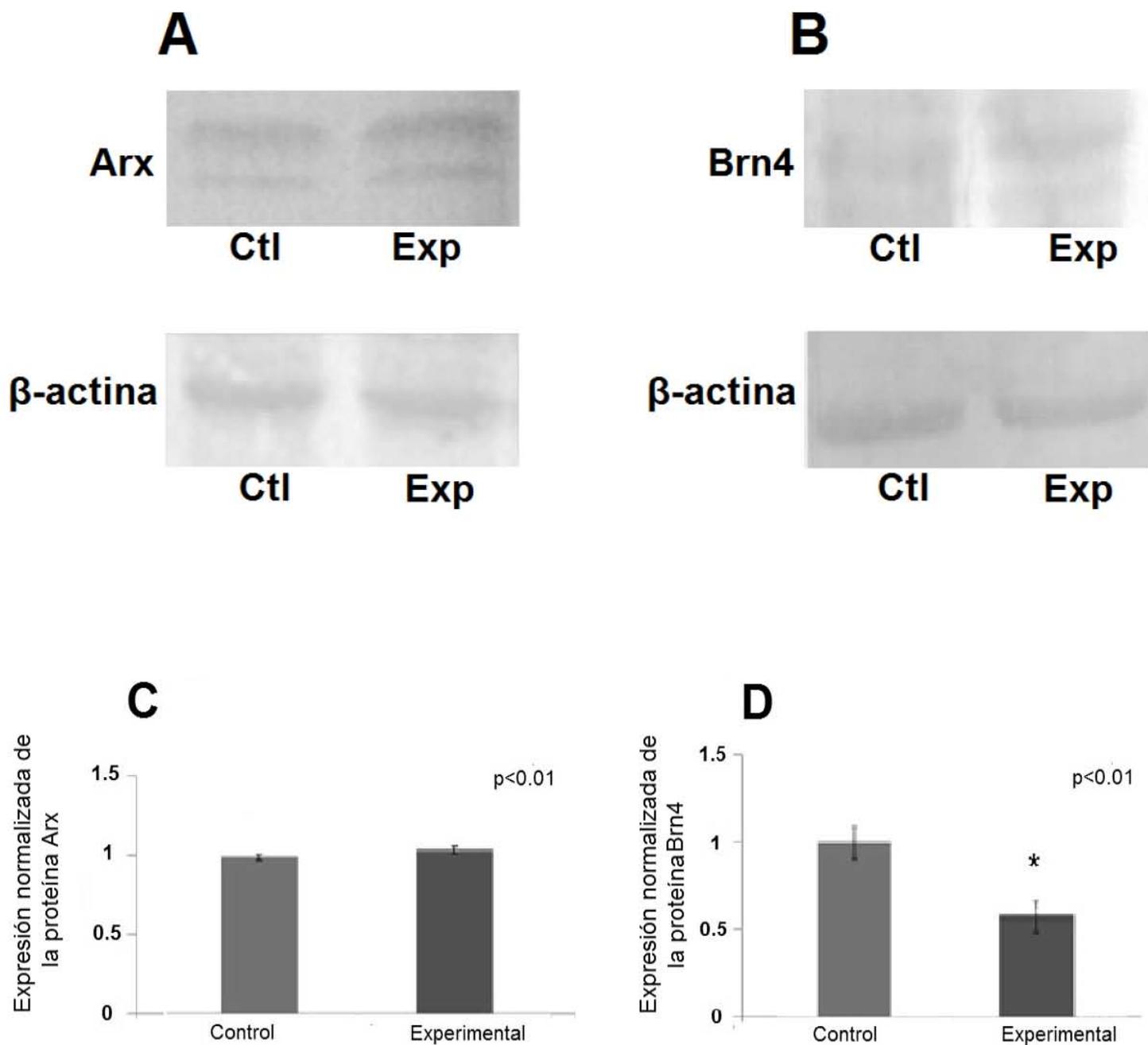
Los datos obtenidos por medio de western blot e inmunohistoquímica en la expresión de Arx y Brn4 en los grupos controles y experimentales en crías de 20, 28 y 90 días se realizó análisis de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, se obtuvo una  $p < 0.01$  (Z), este resultado indicó que los valores obtenidos no presentaron distribución normal. Todos los análisis de western blot fueron normalizados y cuantificados a partir del control de carga  $\beta$ -actina.

El análisis cuantitativo de la expresión de Arx (58kDa) por medio de western blot en crías controles de 20, 28 y 90 días fue en promedio de 318000INT/mm<sup>2</sup>, 8344.38INT/mm<sup>2</sup> y 8871.4INT/mm<sup>2</sup> respectivamente. La expresión en los grupos experimentales presentaron un promedio de 332750INT/mm<sup>2</sup>, 8338INT/mm<sup>2</sup> y 6819INT/mm<sup>2</sup>. En crías de 20 días representó un aumento no significativo de 1.04 veces, mientras que en crías de 28 y 90 días disminuyeron significativamente 0.99 y 0.7 veces respectivamente ( $p < 0.01$ ; Figura 20, 22 y 24. A y C).

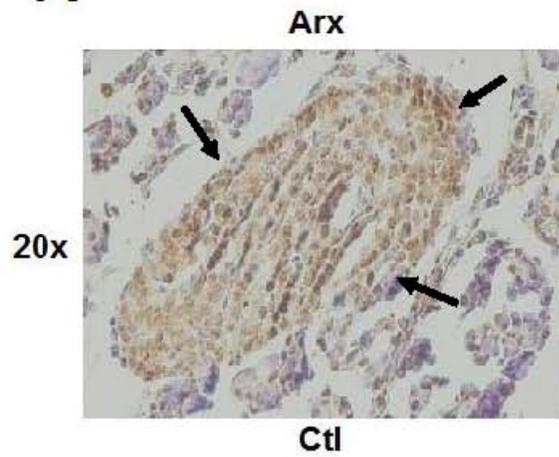
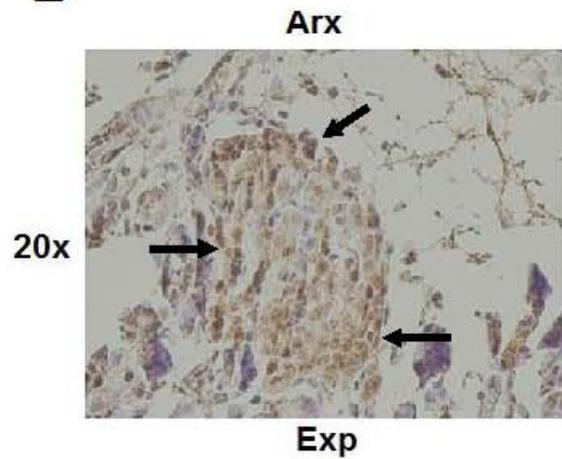
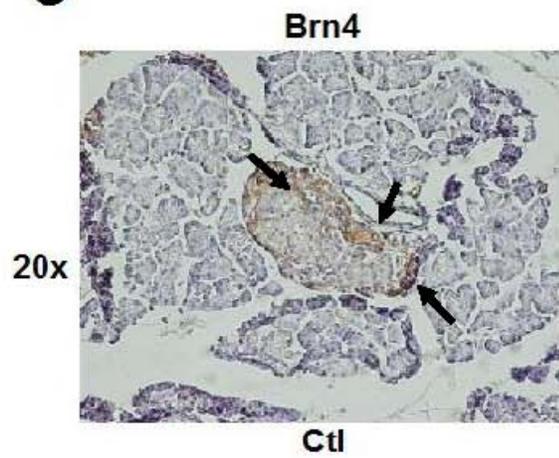
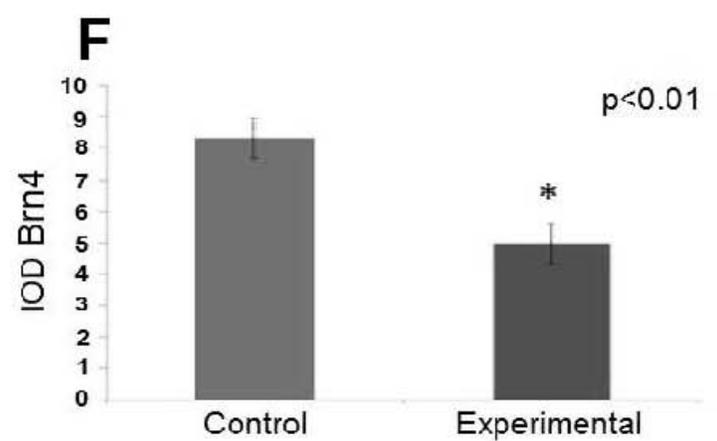
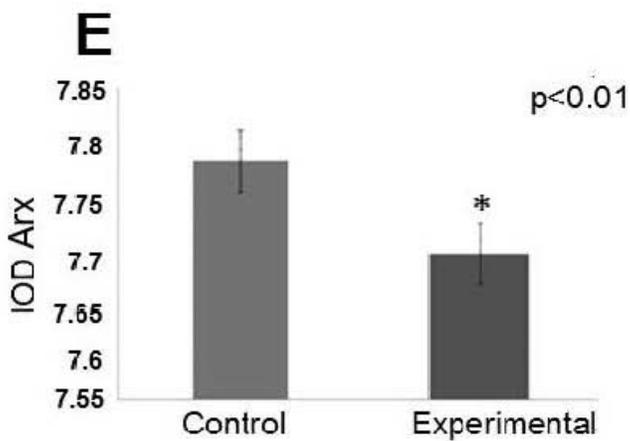
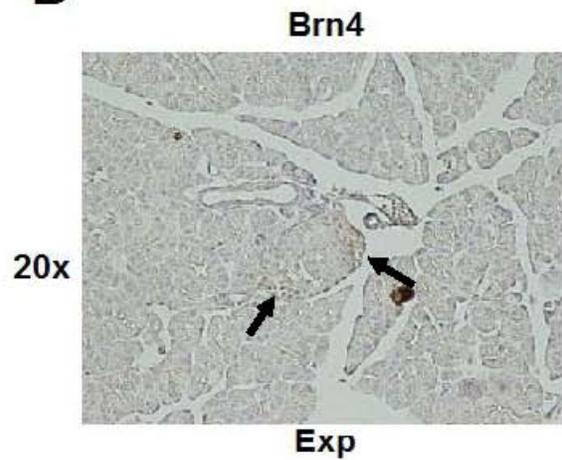
El análisis del IOD de Arx en crías controles de 20, 28 y 90 días mostraron un promedio de 7.76, 5.52 y 12.62 (Figura. 17, 18, y 19. C y G). La inmunopositividad fue observada en la periferia del islote, así mismo, la cuantificación en los grupos experimentales mostraron una disminución en la señal, presentando promedios de 7.68, 2.62 y 5.20 respectivamente ( $p < 0.01$ ; Figura 21, 23 y 25. A, B y E).

La cuantificación obtenida en crías de los grupos controles de la expresión de Brn4 (39kDa) fue de 12300INT/mm<sup>2</sup>, 7061.96INT/mm<sup>2</sup> y 7137.4INT/mm<sup>2</sup> respectivamente. El promedio en la expresión de Brn4 en crías experimentales fue de 7140INT/mm<sup>2</sup>, 7130INT/mm<sup>2</sup> y 9278INT/mm<sup>2</sup>. En crías de 20 días se presentó una disminución significativa de 0.58 veces, mientras que en crías de 28 y 90 días presentaron un incremento no significativo de 1.009 y 1.3 veces respectivamente ( $p < 0.01$ ; Figura 20, 22 y 24. B y D).

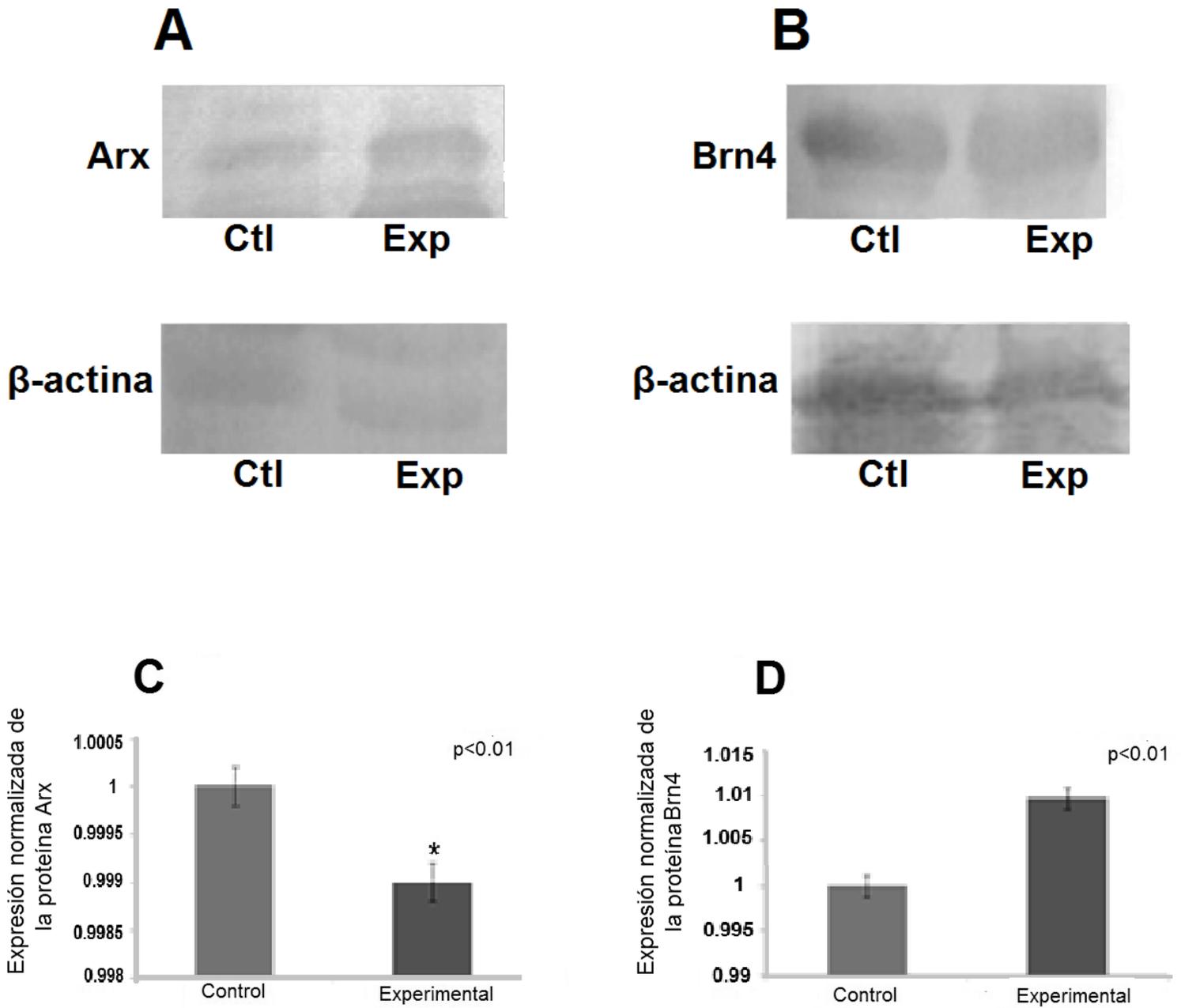
El IOD en los grupos controles de Brn4 se obtuvo una media de 8.23, 3.98 y 5.05, así mismo, los grupos experimentales mostraron un promedio de 5.28, 7.81 y 15.37 respectivamente ( $p < 0.01$ ; Figura 21, 23 y 25. C, D y F).



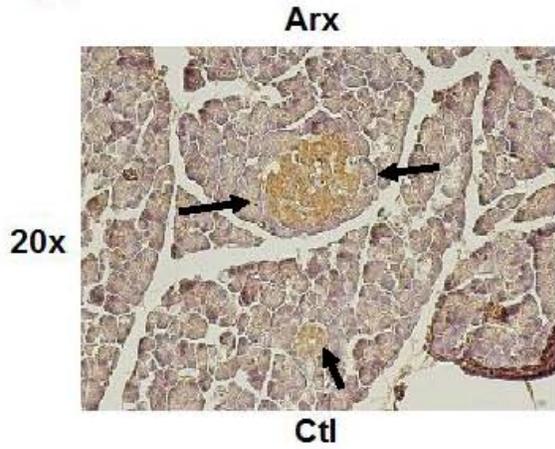
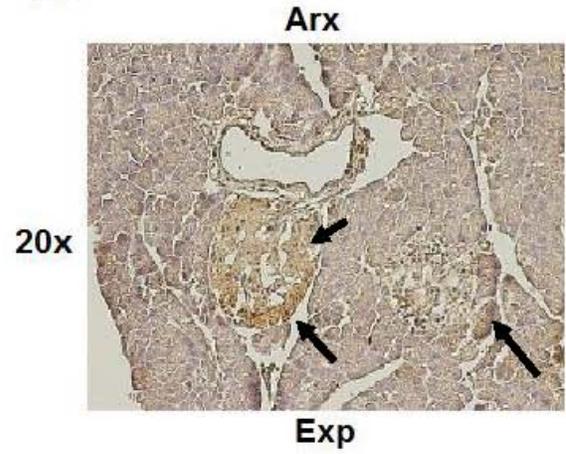
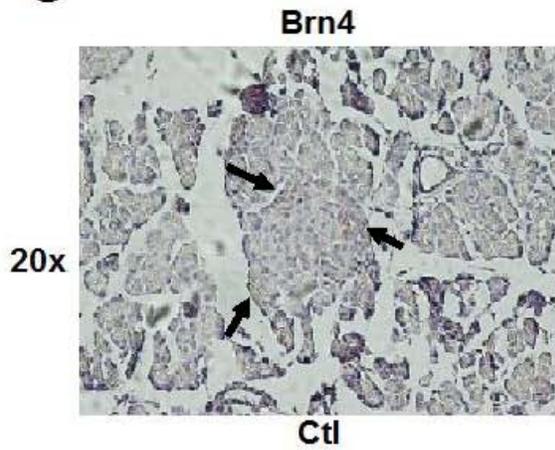
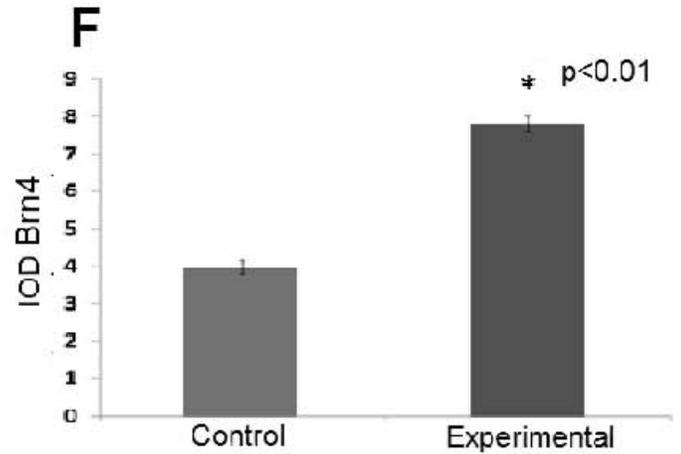
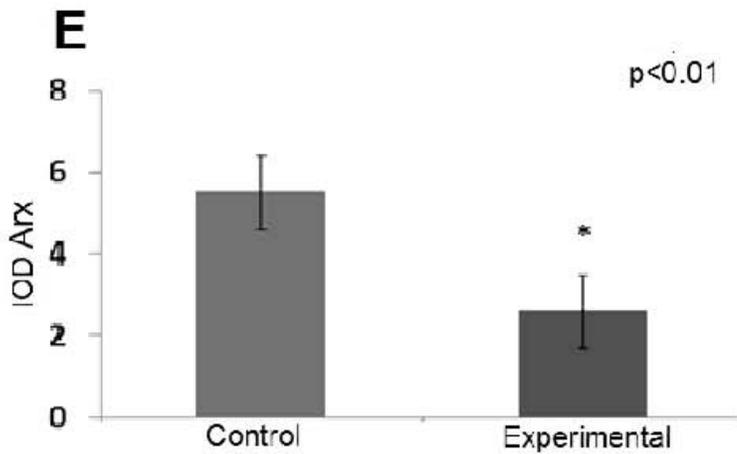
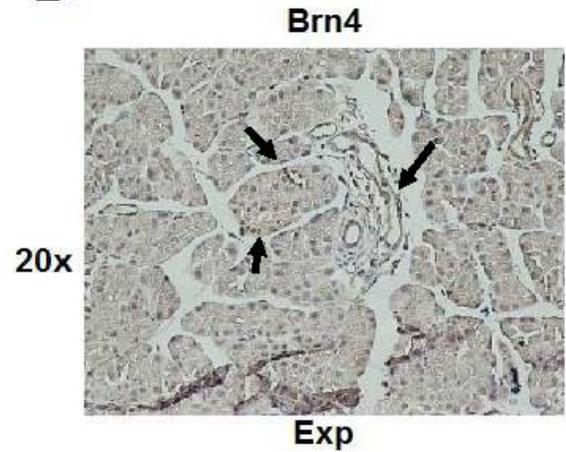
**Figura 20. Modificaciones de la expresión de Brn4 y Arx en crías de 20 días.** (A y B) Western Blot correspondiente a Arx y Brn4. (C y D) Normalización de la expresión de la proteína de Arx y Brn4 (N=6;  $p < 0.01$ ) (n=6).

**A****B****C****D**

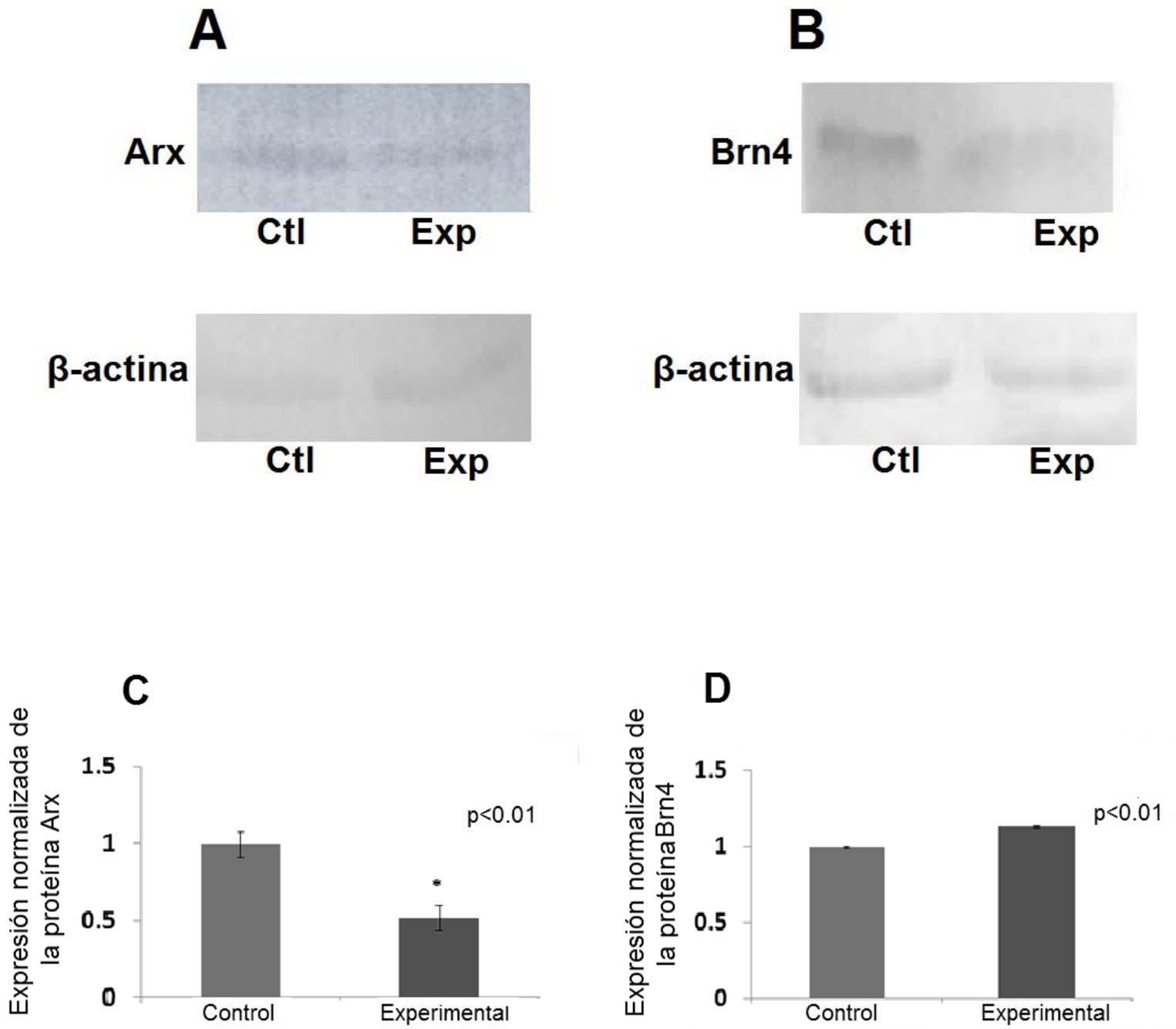
**Figura 21. Expresión de Arx y Brn4 en crías de 20 días.** (A y B) Inmunoposividad correspondiente a Arx. (C y D) Inmunoposividad de Brn4. (E) Disminución en los niveles de expresión de Arx comparado contra el grupo control ( $p \leq 0.01$ ). (F). Disminución en los niveles de expresión de Brn4 comparado contra el grupo control ( $n=6$ ;  $p \leq 0.01$ ).



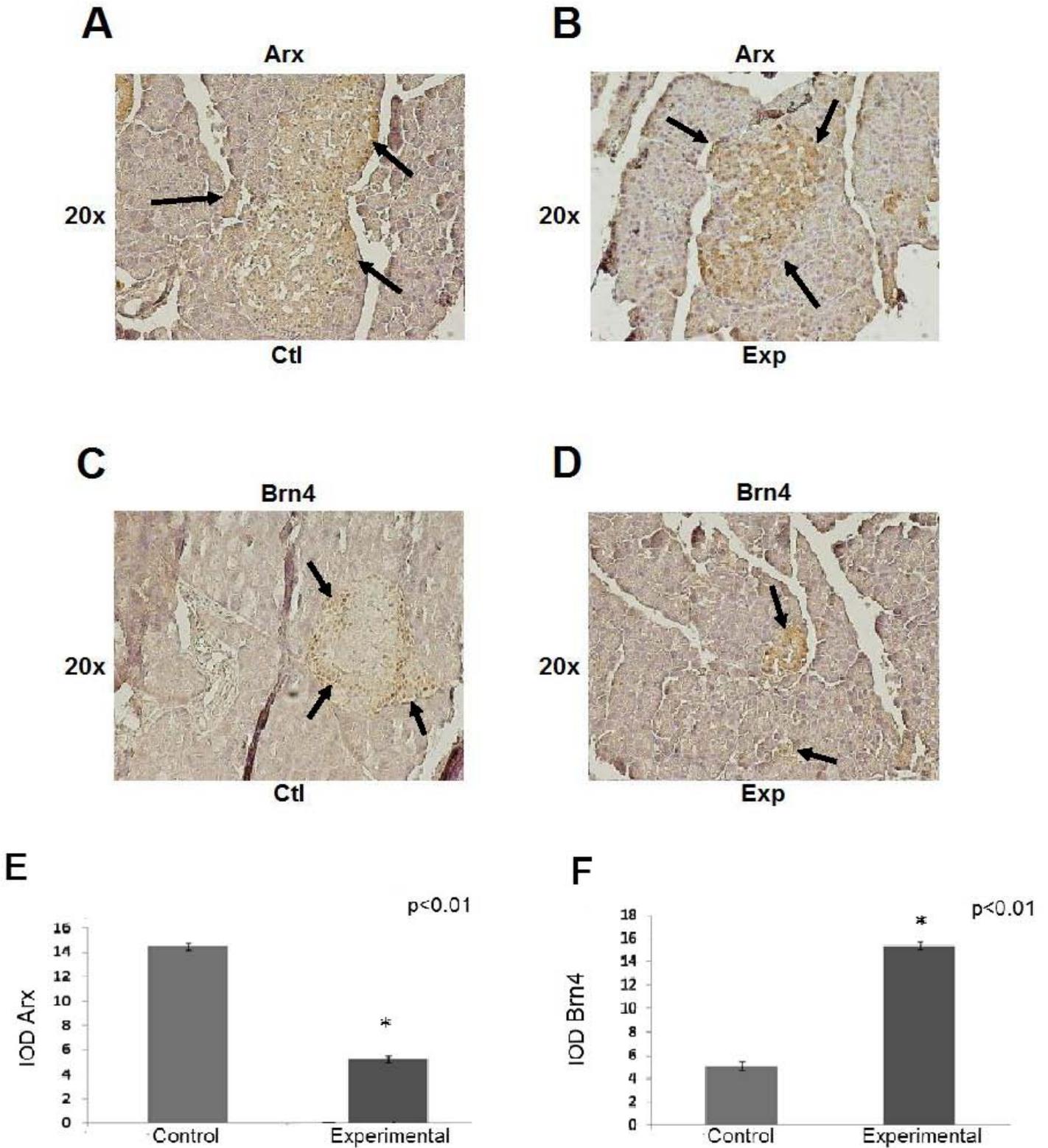
**Figura 22. Modificaciones de la expresión de Brn4 y Arx en crías de 28 días.** (A y B) Western Blot correspondiente a Arx y Brn4. (C y D) Normalización de la expresión de la proteína de Arx y Brn4 (n=6; p<0.01).

**A****B****C****D**

**Figura 23. Modificaciones de la expresión de Arx y Brn4 en crías de 28 días.** (A y B) Inmunopositividad correspondiente a Arx. (C y D) Inmunopositividad de Brn4. (E) Disminución en los niveles de expresión de Arx comparado contra el grupo control ( $p \leq 0.01$ ). (F) Aumento en los niveles de expresión de Brn4 comparado contra el grupo control ( $n=6$ ;  $p < 0.01$ ).



**Figura 24. Modificaciones de la expresión de Brn4 y Arx en fetos de 90 días.** (A y B) Western Blot correspondiente a Arx y Brn4. (C y D) Normalización de la expresión de la proteína de Arx y Brn4 (n=4;  $p < 0.01$ ).



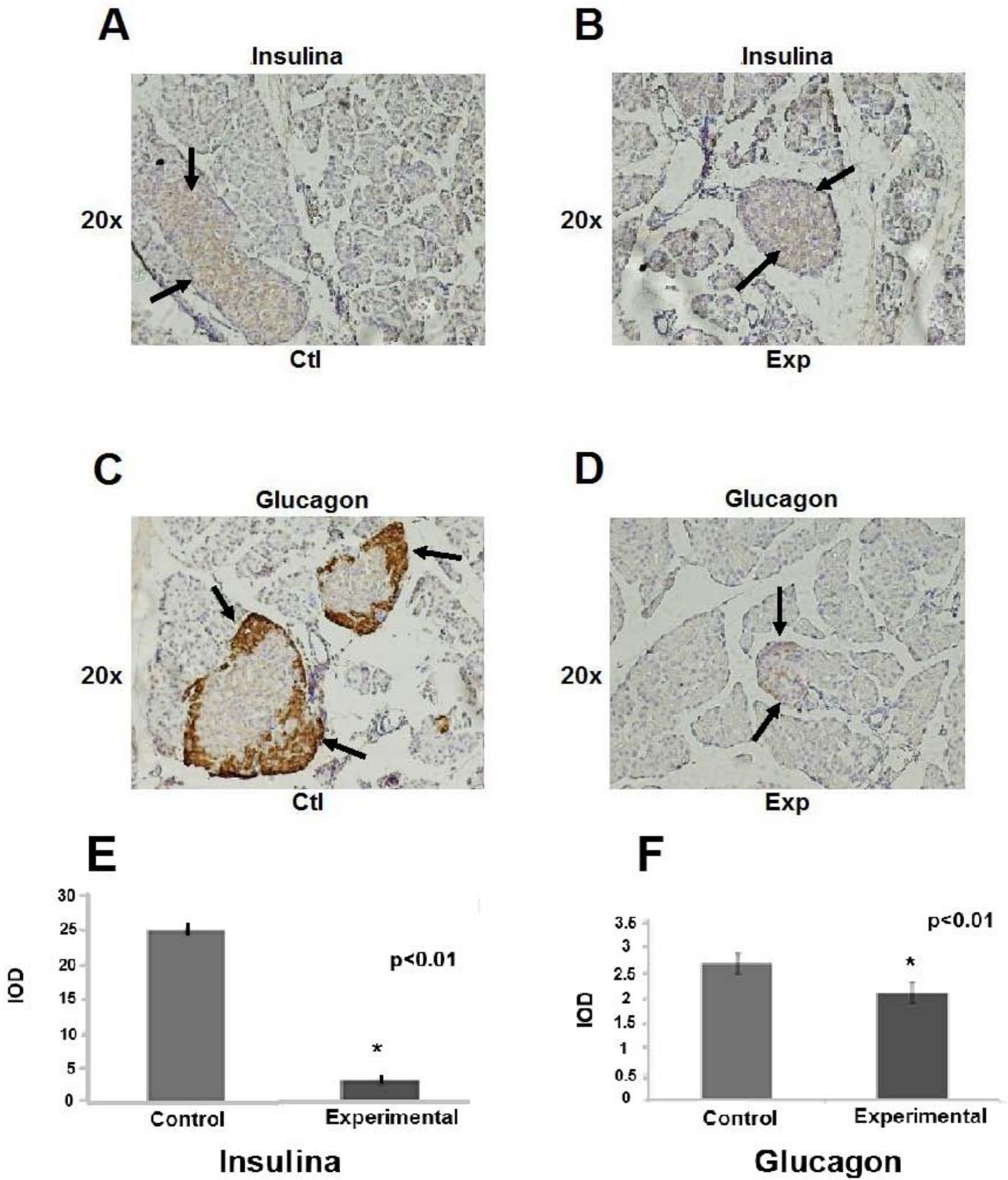
**Figura 25. Expresión de Brn4 y Arx en crías de 90 días.** (A y B) Inmunopositividad correspondiente a Arx. (C y D) Inmunopositividad de Brn4. (E) Disminución en los niveles de expresión de Arx comparado contra el grupo control. (F) Aumento en los niveles de expresión de Brn4 comparado contra el grupo control (n=4; p<0.01).

### **12.10 Expresión de insulina y glucagon en crías de 20, 28 y 90 días**

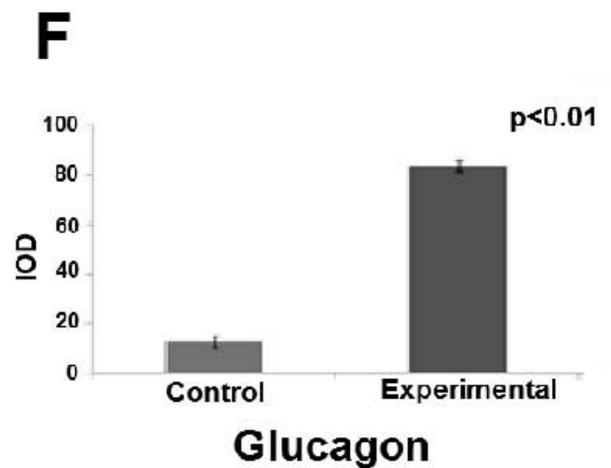
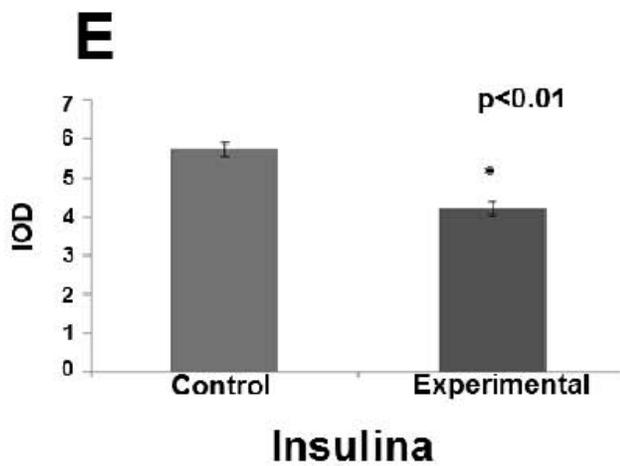
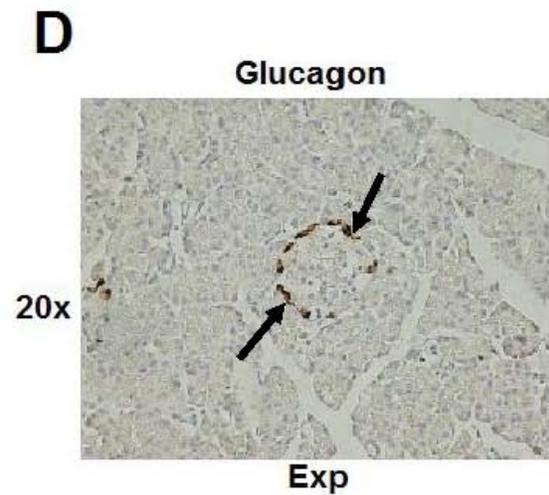
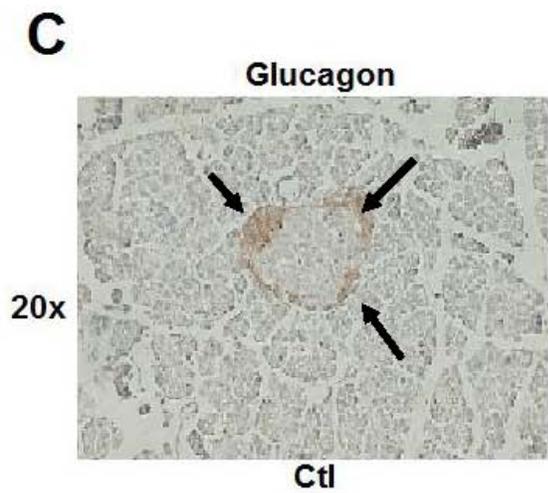
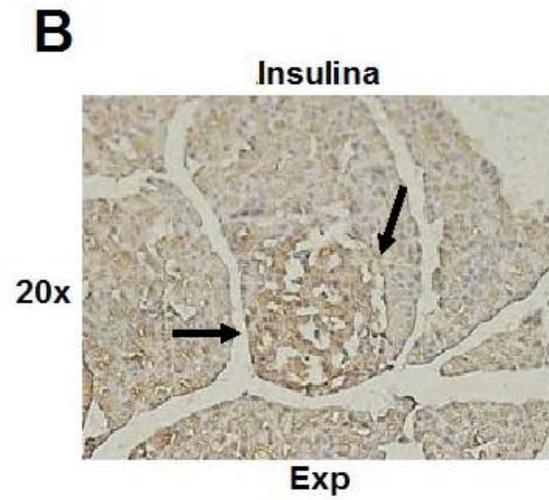
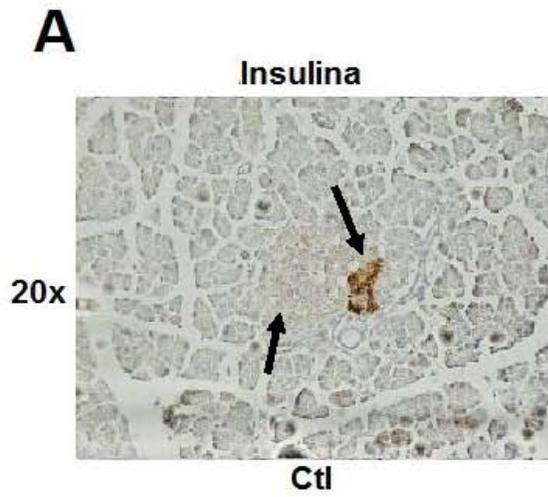
Los datos obtenidos por medio inmunohistoquímica en los grupos controles y experimentales en la expresión de insulina y glucagon en crías de 20, 28 y 90 días se realizó análisis de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, se obtuvo una  $p < 0.01$  (Z), este resultado indicó que los valores obtenidos no presentaron distribución normal.

Los resultados inmunohistoquímica de insulina en grupos controles se obtuvo un promedio de 2.62, 5.73 y 4.17 en crías de 20, 28 y 90 días respectivamente. En el grupo experimental se obtuvieron 2.11, 4.22 y 10.95 en crías de 20, 28 y 90 días respectivamente. Para todos los tiempos se obtuvieron diferencias significativas con una  $p < 0.01$  para 20 y 90 días y con una  $p < 0.05$  para 28 días. (Figura 26, 27 y 28. A, B y E).

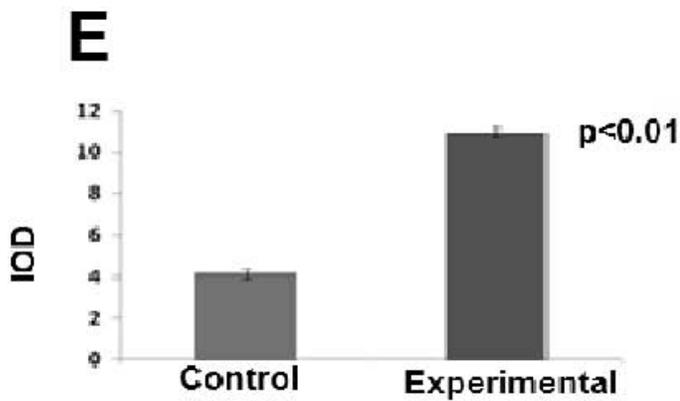
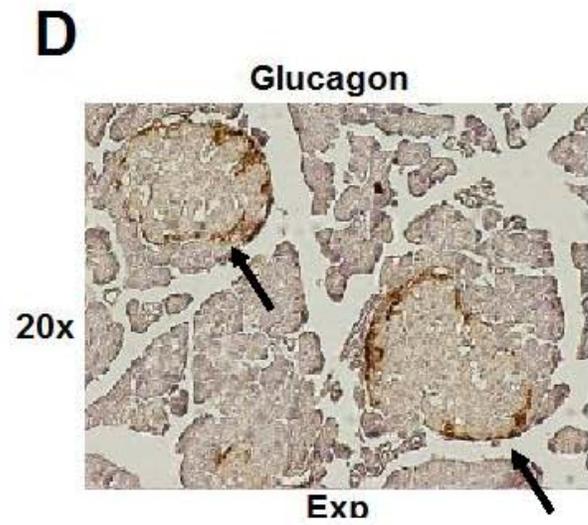
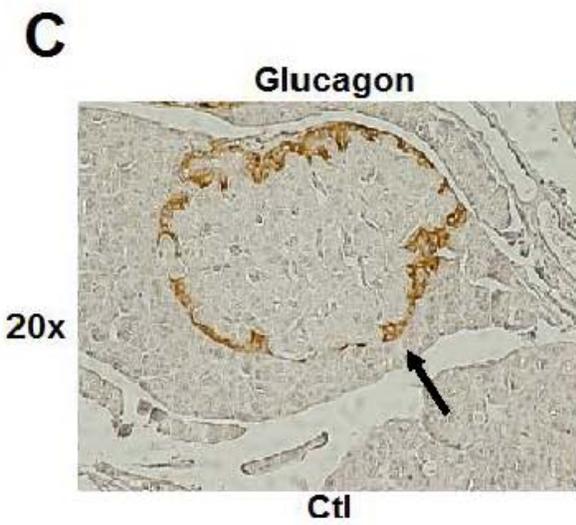
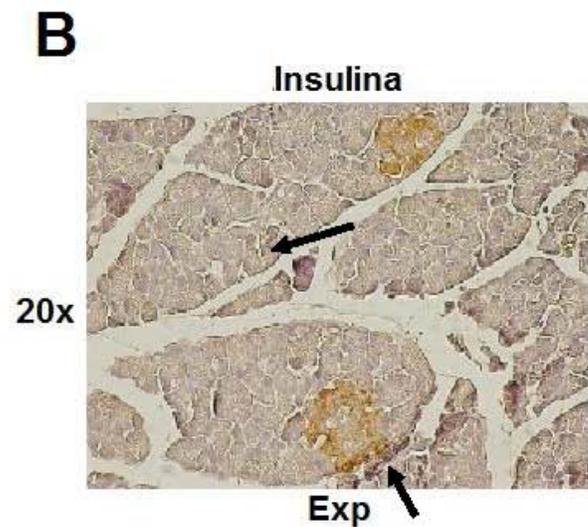
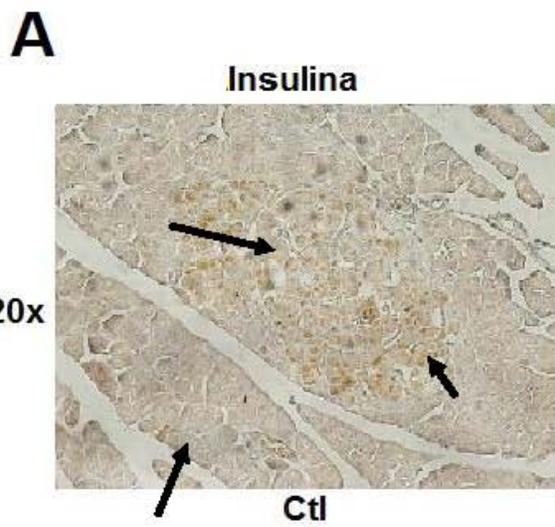
Los resultados obtenidos por inmunohistoquímica de glucagon del grupo control los resultados obtenidos fueron de 24.82, 12.87 y 47.30 para 20, 28 y 90 días respectivamente. En el grupo experimental se obtuvieron datos de 3.08, 83.37 y 29.34 en 20, 28 y 90 días respectivamente, la inmunopositividad se observa en todos los casos en la periferia de los islotes. En todos los tiempos se obtuvieron resultados significativos con una  $p < 0.01$ . (Figura 26, 27 y 28. C, D y F).



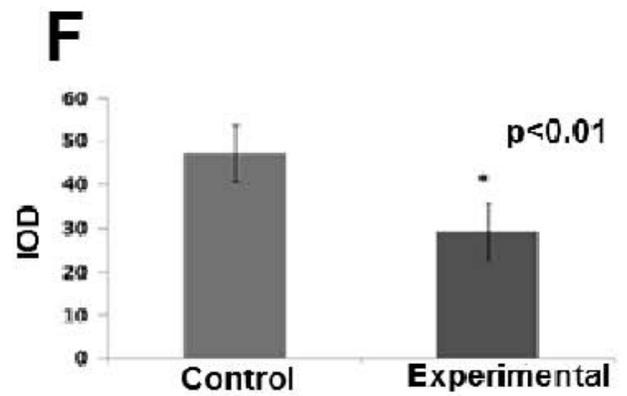
**Figura 26. Expresión de insulina y de glucagon en crías de 20 días.** (A y B) Inmunoposividad de insulina. (C y D) Inmunoposividad de glucagon. (E y F). El ambiente hiperglucémico disminuye los niveles de expresión de insulina y glucagon comparado contra el grupo control. (n=6; p<0.01).



**Figura 27. Expresión de insulina y glucagon en crías de 28 días.** (A y B) Inmunopositividad de insulina. (C y D) Inmunopositividad de glucagon. (E y F). El ambiente hiperglucémico disminuye los niveles de expresión de insulina e incrementa los niveles de glucagon comparado contra el grupo control. (n=6;  $p \leq 0.01$ ).



**Insulina**



**Glucagon**

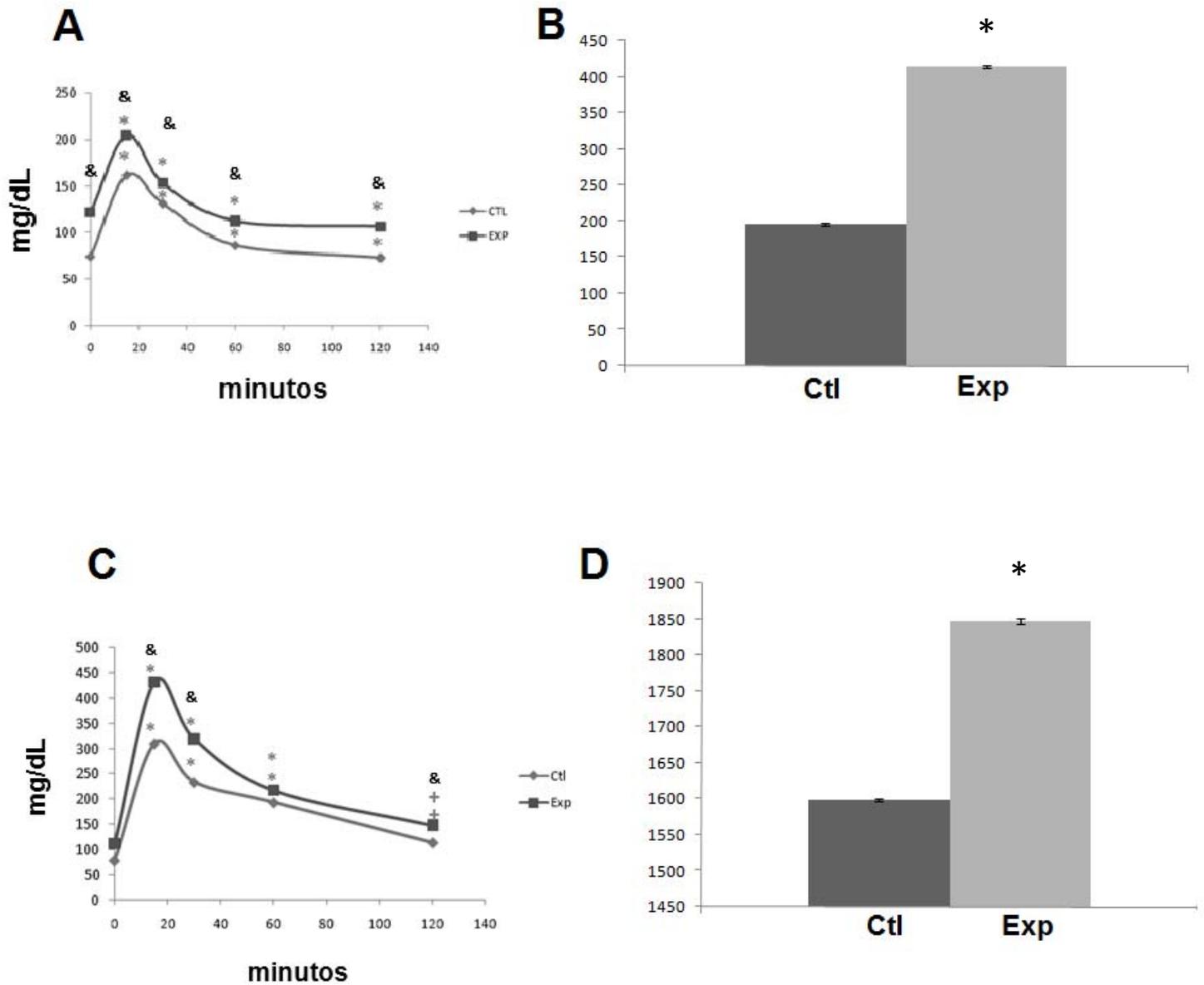
**Figura 28. Expresión de insulina y glucagon en crías de 90 días.** ((A y B) Inmunoposividad de insulina. (C y D) Inmunoposividad de glucagon. (E y F). El ambiente hiperglucémico incrementa los niveles de expresión de insulina y disminuye los niveles glucagon comparado contra el grupo control. (n=4;  $p \leq 0.01$ ).

### 12.11 Curva de tolerancia a la glucosa

La administración de glucosa a una dosis de 2g/Kg mostró un incremento en las concentraciones del carbohidrato. El nivel máximo de glucosa se presentó a los 15 minutos después de la inyección con respecto a los niveles basales de cada grupo.

Los niveles de glucosa a los 28 días post-natales en el grupo control al tiempo cero fueron de  $73 \pm 0.67$  mg/dL, el grupo experimental mostró un promedio de  $122 \pm 0.32$  mg/dL, a los 15 minutos el grupo control mostró una media de  $162 \pm 0.25$  mg/dL, en el grupo experimental fue de  $204 \pm 0.47$  mg/dL, a los 30 minutos fueron de  $131 \pm 0.61$  mg/dL y  $153 \pm 0.46$  mg/dL respectivamente, a los 60 minutos fueron de  $86 \pm 0.81$  mg/dL y  $112 \pm 0.72$  mg/dL y a los 120 minutos mostraron un promedio de  $73 \pm 43$  mg/dL y  $107 \pm 0.17$  mg/dL. El análisis del área bajo la curva del grupo experimental, mostró diferencias estadísticamente significativas comparadas con el grupo control. ( $p < 0.01$ ; Figura 29. A).

A los 90 días post-natales en el grupo control los niveles de glucosa al tiempo cero fue de  $79 \pm 0.33$  mg/dL, el grupo experimental mostró un promedio de  $112.2 \pm 0.50$  mg/dL, a los 15 minutos el grupo control mostró una media de  $309.83 \pm 0.55$  mg/dL, en el grupo experimental fue de  $432 \pm 2.19$  mg/dL, a los 30 minutos fueron de  $233 \pm 1.67$  mg/dL y  $319 \pm 1.79$  mg/dL respectivamente, a los 60 minutos fueron de  $194 \pm 1.36$  mg/dL y  $217 \pm 1.2$  mg/dL y a los 120 minutos mostraron un promedio de  $115 \pm 1.03$  mg/dL y  $148 \pm 0.92$  mg/dL. El análisis del área bajo la curva del grupo experimental, mostró diferencias estadísticamente significativas comparadas con el grupo control. ( $p < 0.01$ ; Figura 29. B).



**Figura 29. Curva de tolerancia a la glucosa de crías de 28 y 90 días (A, B, C y D)** El desarrollo en un ambiente hiperglucémico induce una intolerancia a la glucosa en crías de 28 y 90 días (n=7). \* Diferencias entre el mismo grupo comparado (\* $p \leq 0.01$ ; + $p \leq 0.05$ ). & Diferencias entre grupos (& $p \leq 0.05$ )

### 13. Discusión

La STZ es un agente inductor de diabetes experimental ampliamente usado en modelos murinos, debido a que induce un proceso necrótico y selectivo de manera específica a las células  $\beta$  pancreáticas. Se ha demostrado que dependiendo de la dosis administrada será el grado de hiperglucemia que se presente, a dosis altas de STZ ( $\geq 40\text{mg/kg}$ ) se induce una necrosis masiva de las células  $\beta$ , a dosis intermedias ( $35\text{mg/kg}$ - $40\text{mg/kg}$ ) se desarrolla intolerancia a la glucosa similar a la que se presenta en la DT2 y finalmente a dosis bajas ( $\leq 35\text{mg/kg}$ ) no inducen hiperglucemia crónica (Yan J, 2015; Chaudhry Z *et al*, 2013; King A, 2012; Szukudelski T *et al*, 2012).

En este estudio la administración de una dosis única de  $40\text{mg/kg}$  de STZ se realizó el quinto día de gestación STZ para garantizar que las alteraciones son provocadas por la hiperglucemia y no por un efecto de la STZ y así poder evaluar las alteraciones en los procesos de diferenciación y desarrollo del páncreas y en especial de las células  $\alpha$ .

Durante la gestación ocurren diversos cambios y adaptaciones metabólicas en la madre para proveer de carbohidratos, aminoácidos y lípidos al producto durante el desarrollo, dentro de estas adaptaciones están los cambios en la sensibilidad y secreción de la insulina e incremento en la masa de las células  $\beta$ , cambios que se dan por la síntesis de la prolactina y del lactógeno placentario. Durante el embarazo en condiciones normales, la síntesis de citocinas proinflamatorias van a dar como resultado un incremento en los niveles de glucosa durante este estado, todas estas modificaciones permiten el desarrollo normal de los embriones y fetos (Leiva A *et al*, 2011; Yessoufou A *et al*, 2011; Ballas J *et al*, 2012).

Diversos estudios clínicos y experimentales han demostrado que el desarrollo en un ambiente hiperglucémico *in utero* puede inducir diferentes alteraciones en embriones y fetos, tales como: malformaciones, retraso en el desarrollo en diferentes órganos de los fetos, así como, incremento en la susceptibilidad para que en la vida post-natal adulta la descendencia desarrolle obesidad, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, diabetes y enfermedades

cardiovasculares (Leiva *et al*, 2011; Yessoufou A *et al*, 2011; Ballas J *et al*, 2012; Green AS *et al*, 2010; Ornoy A *et al*, 2015; Kim C, 2014; Pettitt DJ *et al*, 1988).

Los estudios realizados en modelos animales han contribuido a elucidar algunos de los mecanismos de acción que participan en la diferenciación y desarrollo de las células y tejidos de los embriones y de los fetos, esto permite identificar algunas de las alteraciones provocadas por la hiperglucemia *in utero*, que incrementan el riesgo de presentar malformaciones y muerte fetal. Se ha demostrado que las concentraciones elevadas de glucosa incrementan los niveles de ROS y el estrés oxidativo, debido a que los tejidos fetales pierden la capacidad de sintetizar antioxidantes, lo que induce una disminución en las concentraciones de lípidos en las membranas, incrementa el metabolismo aeróbico, provoca disfunción mitocondrial, incrementa la fosforilación oxidativa mitocondrial, provoca daño al DNA y activa vías de señalización apoptóticas. Estas alteraciones ocasionan cambios a nivel epigenético debido a que es la interface entre el ambiente y la expresión de genes, posteriormente ocasionarán cambios a nivel genético (Dhanasekaran N *et al*, 1999; Reece EA *et al*, 2002; Ornoy A *et al*, 2009; Pavlinkova G *et al*, 2009; Ballas J *et al*, 2012; Pettitt DJ *et al*, 1988).

En este estudio se demostró que el desarrollo en un ambiente hiperglucémico severo, provocó la prolongación de la gestación como un mecanismo de compensación para completar el desarrollo, una reducción del número de fetos por camada y el medio adverso en el que se desarrollan en algunas ratas provocó reabsorciones. Aunado a ello, los fetos y las crías presentaron menor peso y talla que el de los controles. Los fetos que lograron llegar a término, fueron animales microsómicos. En las crías desarrolladas en un ambiente hiperglucémico se observó una disminución del peso del páncreas.

En la diabetes materna, los fetos están sometidos de manera constante a altos niveles de glucosa, lo cual provoca cambios adaptativos en el metabolismo de los fetos para poder sobrevivir a el ambiente hiperglucémico *in utero* en el que se desarrollan. Las adaptaciones metabólicas que desarrollan van a repercutir en su vida post-natal.

En animales gestantes con hiperglucemia, los niveles altos de glucosa, a las que está expuesto el feto, son facilitados por un incremento en el transporte de glucosa a través de la placenta. La placenta sirve como interface en la circulación

de nutrientes e intercambio de gases entre el feto y la madre, cualquier alteración en esta estructura, repercutirá en el ambiente uterino en donde se desarrolla el feto. En la diabetes materna, la placenta presenta un incremento en la síntesis de proteínas placentarias y modificaciones en su metabolismo, crecimiento y desarrollo. Se incrementa la proliferación de vasos y arterias lo cual trae como consecuencia una hipervascularización, un incremento en el intercambio de oxígeno y un mayor peso y tamaño (placentomegalia). Estos cambios son debido a modificaciones en las membranas del trofoblasto y al incremento en las concentraciones de colágeno tipo IV, el conjunto de estos cambios da como resultado una disfunción en la comunicación fetoplacental. En esta patología se pueden encontrar de manera excesiva macrófagos, el elevado número de estas células contribuyen a la síntesis de citocinas como la leptina, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6), estas citocinas subsecuentemente modifican el metabolismo de la placenta y promueven el desarrollo de la resistencia a insulina. Investigaciones de Taricco *et al* 2009, demostraron que la expresión de los transportadores de glucosa en la placenta no cambian, también observaron que las concentraciones de glucosa en arterias y venas del cordón umbilical no presentan modificaciones, sin embargo, encontraron que el incremento del flujo de glucosa entre la madre y feto es por una diferencia en los gradientes de concentración entre la madre y el feto. Otras investigaciones han reportado que el transporte de aminoácidos no se ve alterado por la hiperglucemia materna, el aumento o disminución en el transporte de aminoácidos depende del peso que presentan los fetos, lo cual favorecerá o afectará la tasa de crecimiento fetal. Al final de la gestación en ambientes hiperglucémicos, los fetos son capaces de regular por sí mismo la homeostasis de glucosa por la adaptación en la síntesis, secreción y acción de la insulina (Yessoufou A *et al*, 2011; Vambergue A *et al*, 2011; Taricco E *et al*, 2009; Aerts L *et al*, 2006).

Se ha demostrado que el desarrollo en un ambiente hiperglucémico en los islotes de Langerhans se presenta una hipertrofia de células endócrinas, hiperplasia de células  $\beta$  y un incremento en la biosíntesis de insulina. Estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran claramente que la respuesta a insulina en fetos se incrementa de manera proporcional al grado de hiperglucemia *in utero* dando como resultado una hiperinsulinemia (Aerts L *et al*, 1990; 2006; Kervran A *et al*, 1978).

El incremento en el metabolismo de ácidos grasos, colesterol y de glucosa en combinación con las adaptaciones antes descritas en una hiperglucemia moderada estimulan el anabolismo de los fetos dando origen a neonatos macrosómicos. Con niveles altos de glucosa, como los inducidos en este estudio, las células  $\beta$  sufren hiperplasia y posteriormente una desorganización funcional, dando paso de una hiperinsulinemia a una hipoinsulinemia, provocando una disminución en el anabolismo e incrementando procesos catabólicos obteniéndose neonatos microsómicos como los obtenidos en el presente estudio (Aerts L *et al*, 2006; Huynh J *et al*, 2014; Marseille TC *et al*, 2008; Khan NA *et al*, 2007; Clausen TD *et al*, 2009; Magnusson AL *et al*, 2004; Fig.1.).

Los factores genéticos y ambientales son fundamentales para el desarrollo del embrión y del feto, sin embargo, son escasos los estudios que describen las alteraciones ocasionadas a nivel molecular derivadas de la diabetes materna. Recientemente se ha reportado que la diabetes materna altera la expresión de los genes involucrados en el desarrollo, resultando en una morfogénesis anormal o una embriopatía. La hiperglucemia materna disminuye la expresión del factor de transcripción Pax3, el cual está involucrado en el desarrollo del tubo neural y la alteración en la expresión, propicia defectos en esta estructura durante el desarrollo. Se ha demostrado que la desregulación de Pax3 es debido al incremento del estrés oxidativo. Pavlinkova *et al* (2008) han demostrado que la vía de señalización de Wnt es afectada por la exposición a la diabetes materna, lo que demuestra que la hiperglucemia *in utero* altera la expresión de moléculas que juegan un papel fundamental en el desarrollo de diversos órganos y tejidos, lo que trae como consecuencia una alteración en la regulación transcripcional en el embrión y en el feto. Estos mismos estudios confirmaron que la hiperglucemia altera los niveles de expresión de los factores de transcripción y de los genes involucrados en el desarrollo, este fenómeno es debido al incremento de ROS que se genera en el ambiente intrauterino en la diabetes materna (Pavlinkova G *et al*, 2009; Wyman A *et al*, 2008; Ornoy A *et al*, 2015; Epstein DJ *et al*, 1991, 1993; Morgan SC *et al*, 2008; Pavlinkova G *et al*, 2008).

En este estudio se describen por primera vez, las alteraciones que provoca la hiperglucemia *in utero* en el desarrollo de las células  $\alpha$ , una de las principales células que participa en la regulación de las concentraciones de

glucosa. Los factores de transcripción Arx y Brn4, son factores que se expresan en cerebro y páncreas, sin embargo, hay evidencia suficiente que demuestra que estos factores de transcripción tienen un mayor nivel de expresión en las neuronas piramidales y que en el páncreas estas proteínas se expresan exclusivamente en las células  $\alpha$ , por tal motivo se utilizó el tejido cerebral y las proteínas totales de cerebro como control positivo para la identificación de los factores transcripcionales por medio de inmunohistoquímicas y western blot

El factor de transcripción Arx participa en procesos de proliferación de progenitores neuronales y en el desarrollo de la corteza cerebral, el tálamo, el hipocampo y el bulbo olfatorio. La pérdida de su función, mutación ó alteración en su expresión está asociada a defectos neuronales en el desarrollo, tales como fallas en la migración de interneuronas, desarrollo de epilepsias y retraso mental (Friocourt G *et al*, 2008; Ohira R *et al*, 2002; Fulp CT, *et al*, 2008; Cho G *et al*, 2014; Colasante G *et al*; 2013). Arx no se expresa únicamente en el desarrollo del encéfalo, también juega un papel fundamental en la diferenciación temprana de la célula  $\alpha$  pancreática y en el proceso de determinación celular en etapas fetales, su expresión es exclusiva en este tipo celular, esta proteína se expresa por primera vez en el desarrollo del páncreas a partir del E9.5 y su expresión es mantenida durante toda la vida post-natal, una disminución en su expresión va a inducir pérdida en el número de células  $\alpha$  debido a procesos de desdiferenciación celular y va a propiciar un incremento en los niveles de expresión de Pax4 lo que va a dar como resultado final un incremento en el número de las células  $\beta$  del páncreas endócrino, en contraparte, la sobreexpresión de esta proteína va a promover un incremento en el número de células  $\alpha$  y una disminución en el número de células  $\beta$  (Wilcox CL *et al*, 2013; Collombat P *et al*, 2003; Liu J, *et al*, 2011; Bramswig NC *et al*, 2011; Du A *et al*, 2012; Dhawan S *et al*, 2011; Xu S *et al*, 2013; George NM *et al*, 2012).

En el presente estudio, se evaluó por primera vez en diferentes tiempos fetales y en distintas edades post-natales, cómo el desarrollo en un ambiente hiperglucémico *in utero*, afecta la diferenciación y el desarrollo de las células  $\alpha$ . Los resultados de este estudio demostraron que durante el inicio del proceso de isletogénesis (tercera transición, E17-E21) en un ambiente hiperglucémico, Arx presentó un incremento en el número de células positivas y en sus niveles de expresión, comparado con el grupo control. Esto debido a que durante el

desarrollo en un ambiente con niveles altos de glucosa se induce un retraso en la diferenciación y desarrollo de este tipo celular, el cual se presenta como un mecanismo de compensación para llevar a cabo la diferenciación y obtener la cantidad adecuada de estas células. Al final de la tercera transición, el proceso de reorganización del tejido pancreático del grupo experimental se vió afectado debido a que las células endócrinas del páncreas presenta procesos de reorganización del tejido para conformar los islotes de Langerhans y los niveles de expresión de Arx son menores que en el grupo control, lo que indica la alteración durante el proceso de diferenciación de la célula  $\alpha$  al final del desarrollo. En crías de 20 días (lactancia), de 28 días (cambio en la dieta y maduración de las células  $\alpha$ ) y de 90 días (mantenimiento y adaptación de la célula  $\alpha$  al estilo de vida del animal), se presentó también una disminución en los niveles de expresión de este factor de transcripción, el cual puede repercutir en el número de células  $\alpha$ , debido a que Arx promueve la determinación y el número de células  $\alpha$  (Bonal C *et al*, 2008; O' Dowd JF *et al*, 2013; Zaret KS, 2008; George NM *et al*, 2012).

Brn4 es un factor de transcripción que se expresa en etapas tempranas del desarrollo, exclusivamente en las células positivas a glucagon del páncreas endócrino y continúa su expresión restringida a estas células en etapas post-natales. Brn4 se une de manera directa al elemento G1 del promotor del gen de preproglucagon estimulando de manera directa la expresión de glucagon, sin embargo, se ha demostrado que en animales mutantes que no expresan Brn4, no se afecta de manera significativa la biosíntesis y secreción de glucagon. Otros estudios han comprobado que Brn4 es un factor esencial para la expresión del preproglucagon que da lugar a la correcta expresión de glucagon en células  $\alpha$ . Se ha comprobado que la sobre-expresión de Brn4 en células  $\beta$  propicia la expresión de glucagon. A pesar de que Brn4 participa en la expresión de glucagon, hay otros factores de transcripción en las células  $\alpha$  como Mafk y Pax6 que también participan y regulan la expresión de glucagon, lo que demuestra la compleja regulación que presenta la expresión de glucagon la cual aún no se entiende por completo (Heller RS *et al*, 2004; Hussain MA *et al*, 2002; Bramswig N *et al*, 2011; Bonal C *et al*, 2008; Mathis JM *et al*, 1992; Artner I *et al*, 2006; Dames P *et al*, 2010; Hart AW *et al*, 2013; Gosmain Y *et al*, 2011).

En nuestro trabajo, el incremento en los niveles de Brn4 al inicio de la isletogénesis (E17), puede deberse a una alteración en el desarrollo, lo que deriva que la célula  $\alpha$  comience a funcionar como un mecanismo adaptativo por el desarrollo en ambientes hiperglucémicos severos. Al final del proceso de isletogénesis (E21) la disminución en la expresión de Brn4, puede deberse a mecanismos de compensación por la exposición a concentraciones elevadas de glucosa y así contrarrestar los efectos del ambiente intrauterino. Sin embargo, también hay que considerar la posibilidad que los factores de transcripción MafB y Pax6 también pueden tener alteraciones en su expresión, que junto con la de Brn4 pueden repercutir en la expresión de glucagon.

Como ya se mencionó con la hiperglucemia materna el feto lleva a cabo modificaciones metabólicas para poder adaptarse a las condiciones adversas a las que se expone en el ambiente intrauterino. Algunas de estas adaptaciones en la hiperglucemia severa es una prematura actividad en la síntesis y secreción de insulina, seguida de una hipoactividad de las células  $\beta$ , una exacerbación en la actividad catabólica y el desarrollo de neonatos microsómicos. Además de las alteraciones anteriormente descritas, hay que agregar los datos del presente trabajo que por primera vez se describen en etapas fetales, y con lo cual demostramos que las células  $\alpha$  también presentan adaptaciones que alteran su desarrollo (Quesada I *et al*, 2008; Artner I *et al*, 2006; Gosmain Y *et al*, 2011; Green AS *et al*, 2010; Simmons Ret *al*, 2001; Fig. 20).

Después del nacimiento y durante la lactancia, continúa con su proceso de maduración y reorganización del tejido pancreático el cual termina alrededor de los 21 días post-natales. Durante este periodo la leche materna contribuye a regular los niveles de glucosa ya las crías no regulan por sí mismas los niveles de glucosa. Por lo anterior se evaluó la expresión de Brn4 a los 20 días post-natales, previo al destete de las crías. Nuestros resultados mostraron una disminución en los niveles de expresión a Brn4 en crías que se desarrollaron en un ambiente hiperglucémico, este fenómeno se da como un proceso adaptativo para contrarrestar la dieta elevada en carbohidratos aportados por la madre durante la lactancia. La maduración de las células  $\alpha$  se completa cuando las crías dejan de consumir la leche materna y se realiza un cambio en la dieta. Nuestros resultados demostraron que los niveles de expresión de Brn4 en crías de 28 días, expuestas durante el desarrollo a niveles elevados de glucosa,

presentan un incremento en los niveles de expresión de este factor de transcripción, así como también hay un incremento en los niveles de expresión de glucagon. En crías de 90 días en las que se presentan procesos de adaptación y mantenimiento de las células  $\alpha$  en etapas adultas, encontramos un incremento en los niveles de expresión de Brn4 y una disminución en la expresión de glucagon. De manera general, el incremento o disminución de la expresión de Brn4 va a afectar la síntesis de glucagon, sin embargo, nuevamente hay que considerar la regulación que presenta MafB y Pax6 sobre la síntesis de esta hormona peptídica, las cuales, dependiendo de sus niveles de expresión junto con Brn4 pueden aumentar o disminuir la expresión de glucagon (Quesada I *et al*, 2008; Artner I *et al*, 2006; Gosmain Y *et al*, 2011; Green AS *et al*, 2010; Simmons R *et al*, 2001).

Todas las modificaciones y adaptaciones metabólicas en el desarrollo, inducen una reprogramación en el feto como un mecanismo de adaptación a la hiperglucemia *in utero*, estas modificaciones se dan a nivel genético, epigenético y en la expresión de factores de transcripción, que van a repercutir en la vida adulta, esto es debido al desarrollo de una memoria metabólica que trae como consecuencia alteraciones de manera directa en la expresión de Brn4 y en la fisiología de la célula  $\alpha$  pancreática en diferentes tiempos post-natales como se demuestra en este estudio (Yessoufou A *et al*, 2011; Ornoy A *et al*, 2015; Pavlinkova G *et al*, 2009).

Datos previos de nuestra línea de investigación y los del presente estudio demostraron que las condiciones hiperglucémicas *in utero* promueven alteraciones morfológicas y funcionales de los islotes de Langerhans. Por primera vez demostramos alteraciones en la expresión de los factores de transcripción Arx y Brn4, las cuales repercuten en alteraciones en la diferenciación, el desarrollo y funcionamiento de las células  $\alpha$ .

El glucagon y la insulina son las principales hormonas peptídicas que regulan el metabolismo de la glucosa. El glucagon es un regulador de la homeostasis de la glucosa, que actúa en respuesta en condiciones de hipoglucemia por acción de la insulina y en estados de ayuno severo, su síntesis se debe a la reacción enzimática de la prohormona convertasa 2 para dar lugar al glucagon a partir de la molécula del proglucagon. Posteriormente la hormona es liberada a la vena portal hepática en donde actúa directamente en

los receptores acoplados a las proteínas G (GPCR) del hígado para estimular la secreción de glucosa a partir de la glucogenolisis, así como, la síntesis *de novo* de glucosa a partir de precursores como el lactato, aminoácidos y el glicerol a través de la gluconeogénesis, también el glucagon participa en los procesos de cetogénesis y en la oxidación de ácidos grasos. Por otro lado las células  $\beta$  son las encargadas de la síntesis de insulina, la cual disminuye los niveles de glucosa, esta hormona es anabólica por excelencia debido a que en un estado postprandial incrementa la captación de glucosa en los tejidos, promueve la glucogenogénesis en el hígado, inhibe la secreción de glucagon y promueve la síntesis y almacenamiento de ácidos grasos y triglicéridos (Aronoff SL *et al*, 20014; Quesada I *et al*, 2008; Rorsman NJG *et al*, 2014).

En nuestro modelo de hiperglucemia severa, durante el desarrollo, en E17 la señal de insulina (IOD=3) y la señal para glucagon (IOD=4.5) son significativamente menor ( $p < 0.01$ ). Posteriormente en E21, la señal de insulina (IOD=30) y de glucagon (IOD=12) son significativamente mayor, mostrando un efecto contrario al observado en el día E17. En ambos grupos presentan un incremento significativo en los niveles de glucosa sanguíneo. Estas modificaciones dan paso a una hiperglucagonemia, siendo una evidencia clara de la alteración en la célula  $\alpha$  en este periodo fetal, tales como un incremento en el catabolismo del feto, obteniendo neonatos microsómicos, así como alteraciones en la expresión de los factores de transcripción encargados de la expresión de glucagon ( $p < 0.01$ ; Aronoff SL *et al*, 20014; Quesada I *et al*, 2008; Rorsman NJG *et al*, 2014; Aerts L *et al*, 1990; 2006; Kervran A S, L *et al*, 1978; Fig.1.).

La expresión de insulina (IOD=3) y de glucagon (IOD=2) en crías de 20 días que se desarrollaron en un ambiente hiperglucémico, mostraron una disminución significativa ( $p < 0.01$ ). Los niveles de expresión de insulina (IOD=4) en crías de 28 días fue significativamente menor en el grupo experimental, y la expresión de glucagon (IOD=80) aumentó significativamente, dando como resultado una sobreexpresión de glucagon, evidenciando una alteración de la célula  $\alpha$ . Estas alteraciones en la célula  $\alpha$  también se ven reflejadas con los niveles elevados de glucosa basal del grupo experimental después de un ayuno de 12 horas. La prueba de tolerancia a la glucosa demostró que estas crías presentan resistencia a la insulina y por ende una alteración en el

metabolismo de la glucosa ( $p < 0.01$ ; Aronoff SL *et al*, 2014; Quesada I *et al*, 2008; Rorsman NJG *et al*, 2014; Fig. 28).

Finalmente en crías experimentales de 90 días, la señal de insulina (IOD=11) presentó un aumento significativo en sus niveles de expresión y la señal de glucagon (IOD=30) mostró disminución en su expresión, indicando una disminución en la actividad de la célula  $\alpha$ . Sin embargo, las crías que se desarrollaron en un ambiente hiperglucémico demostraron en la prueba de la tolerancia a la glucosa tener resistencia a la insulina y alteraciones en el metabolismo de la glucosa ( $p < 0.01$ ; Fig. 28.).

Los cambios en la expresión de glucagon en las células  $\alpha$  y las alteraciones en la prueba de tolerancia a la glucosa son adaptaciones y tienen como finalidad regular la homeostasis de la glucosa de las crías que en la vida fetal estuvieron expuestas a condiciones hiperglucémicas. Aerts *et al* 1990, reportaron que los grupos que se desarrollaron en un ambiente intrauterino con niveles severos de glucosa, mostraron alteración en el metabolismo de este carbohidrato en etapas post-natales y adaptaciones en la célula  $\beta$  (Fig.1.) En este estudio se reporta por primera vez, las alteraciones a nivel molecular y fisiológicas que presenta la célula  $\alpha$  al ser expuestas a concentraciones elevadas de glucosa durante el desarrollo *in utero* en etapas post-natales. (Aronoff SL *et al*, 20014; Quesada I *et al*, 2008; Rorsman NJG *et al*, 2014; Aerts L *et al*, 1990).

## 14. Conclusiones

- El desarrollo en un ambiente hiperglucémico severo:
- Disminuye el peso y la talla de los fetos de 17 y 21 días
- Disminuye el peso, la talla y el peso del páncreas en crías de 20, 28 y 90 días
- Incrementa los niveles de expresión de Arx y Brn4 en E17 ( $p \leq 0.01$ ).
- Disminuye los niveles de expresión de Arx y Brn4 en E21 ( $p \leq 0.01$ ).
- Disminuye los niveles de expresión de Arx y Brn4 en crías de 20 días ( $p \leq 0.01$ ).
- Disminuye los niveles de expresión de Arx e incrementa los niveles de expresión de Brn4 en crías de 28 días ( $p \leq 0.01$ ).
- Disminuye los niveles de expresión de Arx y aumenta los niveles de expresión de Brn4 en crías de 90 días ( $p \leq 0.01$ ).
- Disminuye la expresión de insulina y glucagon en fetos de 17 días ( $p \leq 0.01$ ).
- Aumenta la expresión de insulina y glucagon en fetos de 21 días ( $p \leq 0.01$ ).
- Disminuye la expresión de insulina y glucagon en crías de 20 días ( $p \leq 0.01$ ).
- Disminuye la expresión de insulina y aumenta la expresión de glucagon en crías de 28 días ( $p \leq 0.01$ ).
- Aumenta la expresión de insulina y disminuye la expresión de glucagon en crías de 90 días ( $p \leq 0.01$ ).
- En crías de 28 y 90 días presentan una intolerancia a la glucosa.

## 15. Literatura citada

- Aerts, L., Holemans, K., & Van Assche, F. A. (1990). Maternal diabetes during pregnancy: Consequence for the offspring. *Diab.Metab. Rev.*, 6: 147–167.
- Aerts, L., Van Assache F. A. (2006). Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 38: 894-903.
- American Diabetes Association (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 27 (Suppl. 1): 35: S64-S71.
- American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations (2004). *Diabetes Care* 27 (Suppl. 1):S1–S150, 2004.
- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B., Want, L. Glucose Metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectrum*. 17(3): 183-190.
- Artner, I., Lay, J. L., Hang, Y., Elghazi, L., Schisler, J. C., Henderson, E., Sosa-Pinea, B., Stein, R. (2006). MafB An activator of the glucagon gene expressed in developing islet  $\alpha$  and  $\beta$  cells. *Diabetes*. 55: 297-304.
- Ballas, J., Moore, T. R., Ramos, G. A. (2012). Management of diabetes in pregnancy. *Curr Diab Rep*. 12:33-42.
- Best RM, Chakravarthy U. (1997). Diabetic retinopathy in pregnancy. *Br. J. Ophthalmol*. 81:249–251.
- BinZhao, Li Li, Lloyd Wang, Cun-Yu Wang, JindanYu, and Kun-LiangGuan. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes &Development* 26:54-68, 2012 by Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bolli GB, Di Marchi RD, Park GD, Pramming S, Koivisto VA: Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus. *Diabetologia* 42:1151–1167, 1999.

- Bonal, C., & Herrera, P. L. (2008). Genes controlling pancreas ontogeny. *The International journal of developmental biology*, 52(7), 823–35. doi:10.1387/ijdb.072444cb.
- Bonal, C., Herrera, P. L. (2008). Genes Controlling pancreas ontogeny. *Int J. Dev. Biol.* 52: 823-835.
- Bramswig N, Kaestner K. (2014). Transcriptional and epigenetic regulation in human islets. *Diabetologia*. 57: 451-454.
- Bramswig, N. C., Kaestner, K. H. (2011). Transcriptional regulation of  $\alpha$ -cell differentiation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 13: 13-20.
- Braun M, Wendt A, Buschard K, Salehi A, Sewing S, Gromada J, Rorsman P (2004) GABAB receptor activation inhibits exocytosis in
- Brown GK (2000). Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J Inherit Metab Dis* 23:237-246.
- Castrejón V, Carbó R (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la Glucosa. Instituto Nacional de Cardiología, Departamento de Fisiología, *REB* 26(2):49-57
- Cecil M. Benitez, William R. Goodyer and Seung K. Kim. (2012) Deconstructing pancreas developmental biology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; doi: 10.1101.
- Chaudhry, Z., Morris, D. L., Moss, D. R. (2013). Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice. *Laboratory Animals*. 47(4): 257-265.
- Chew EY, Mills JL, Metzger BE, et al. (1995). Metabolic control and progression of retinopathy. The Diabetes in Early Pregnancy Study. National Institute of Child Health and Human Development Diabetes in Early Pregnancy Study. *Diabetes care* 18:631–637.
- Cho, G., Lim, Y., Cho, I. T., Simonet, J. C., Golden, J. A. (2014). Arx together with FoxA2, regulates Shh floor plate expression. *Developmental Biology*. 393: 137-148.
- Christensen, M., Bagger, J. I., Vilsbøll, T., & Knop, F. K. (2011). The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy. *The review of diabetic studies : RDS*, 8(3), 369–81. doi:10.1900/RDS.2011.8.369.

- Cianni G, Micolli R, Volpe L, Lencioni C, Prato D. (2003). Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes and Metabolism Reviews*. 19(4). 259-270.
- Claire Bonal and Pedro L. Herrera. Genes controlling pancreas ontogeny. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 823-835 (2008); doi: 10.1387/ijdb.072444cb.
- Clausen, T. D., Mathiesen, E. R., Hansen, T., Damm, P. (2009). Overweight and the Metabolic Syndrome in Adult Offspring of Women with Diet-Treated Gestational Diabetes Mellitus or Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 94(7): 2464-2470.
- Colasante, G., Simonet, J. C., Calogero, R., Crispi S., Sessa, A., Cho, G., Golden, J. A., Broccoli, V. (2013). Arx regulates cortical intermediate progenitor cell expansion and upper layer neuron formation through repression of cdkn1c. *Cerebral Cortex*. 1-14.
- Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sorensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G., & Gruss, P. (2003). Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes & development*, 17(20), 2591–603. doi:10.1101/gad.269003.
- Cooper GJS, Willis AC, Clark A, Turner RD, Sim RB, Reid KB. (1987). Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreas of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8628–8632.
- Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS, Robinson JS. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2005;352:2477–2486.
- Dames, P., Puff, R., Weise, M., Parthofer, K. G., Göke, B., Götz M., Graw, J., Favor, J., Lechner A. (2010). Relative roles of the different Pax6 domains for pancreatic alpha cell development. *BMC Development Biology*. 10: 39.
- Dhanasekaran, N., Wu YK, Reece, E. A. (1999). Signaling pathways and diabetic embryopathy. *Semin Reprod Endocrinol* 17:167–174.
- Dhawan, S., Georgia, S., Tschén, S., Fan, G., Bhushan, A. (2011). Pancreatic  $\beta$  cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx. *Developmental Cell*. 20: 419-429.
- Diabetes, D. O. F. (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 35 Suppl 1, S64–71. doi:10.2337/dc12-s064.

- Du, A., McCracken, K. W., Walp, E., Terry, N. A., May, C. L. (2012). Arx is required for normal enteroendocrine cell development in mice and humans. *Dev Biol.* 365(1): 175-188.
- Epstein, D. J., Vekemans, M., Gros, P. (1991). Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell.* 67(4):767-774.
- Epstein, D. J., Vogan, K. J., Trasler, D. G., Gros P. (1993). A mutation within intron 3 of the Pax-3 gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the splotch (Sp) mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(2):532-536.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 20:1183–1197.
- Fernández-Morera, J. L., Rodríguez-Rodero, S., Menéndez-Torre, E., & Fraga, M. F. (2010). The possible role of epigenetics in gestational diabetes: cause, [doi:10.1155/2010/605163](https://doi.org/10.1155/2010/605163).
- Fetita, L.-S., Sobngwi, E., Serradas, P., Calvo, F., & Gautier, J.-F. (2006). Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(10), 3718–24. [doi:10.1210/jc.2006-0624](https://doi.org/10.1210/jc.2006-0624).
- Fineman MS, Giotta MP, Thompson RG, Kolterman OG, Koda JE. (1996). Amylin response following Sustacal ingestion is diminished in type II diabetic patients treated with insulin (Abstract). *Diabetologia* 39 (Suppl.1):A149.
- Franklin IK, Wollheim CB 2004 GABA in the endocrine pancreas: its putative role as an islet cell paracrine-signalling molecule.
- Friocourt, G., Kanatani, S., Tabato H., Parnavelas, J. G. (2008). Cell-Autonomous roles of ARX in cell proliferation and neuronal migration during corticogenesis. *The Journal of Neuroscience*. 28(22): 5794-5805.
- Fulp, C. T., Cho, G., Marsh, E. D., Golden, J. A. (2008). Identification of ARX transcription targets in the developing basal forebrain. *Human Molecular Genetics*. 17(23): 3740-3760.
- George, N. M., Day, C. E., Boerner, B. P., Johnson, R. L., Sarvetnick. (2012). Hippo signaling regulates pancreas development through inactivation of Yap. *Molecular and cellular Biology*. 32(24): 5116-5128.

- Gerich JE, Schneider V, Dippe SE, Langlois M, Noacco C, Karam J, Forsham P: Characterization of the glucagon response to hypoglycemia in man. *J Clin Endocrinol Metab* 38:77–82, 1974.
- Gosmain, Y., Cheyssac, C., Heddad Masson, M., Dibner, C., Philippe, J. (2011). Glucagon gene expression in the endocrine pancreas: the role of the transcription factor Pax6 in  $\alpha$ -cell differentiation, glucagon biosynthesis and secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 13(3): 31-38.
- Green, A. S., Rozance, P. J., & Limesand, S. W. (2010). Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. *The Journal of endocrinology*, 205(3), 211–24. doi:10.1677/JOE-09-0399.
- Green, A. S., Rozance, P. J., Limesnad, S.W. (2010). Consequences of a compromised intrauterine environment on islet function. *Journal of Endocrinology*. 205: 211-224.
- Grieco, F. a, Sebastiani, G., Spagnuolo, I., Patti, a, & Dotta, F. (2012). Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: how viral infections modulate beta cell function. *Clinical and experimental immunology*, 168(1), 24–9. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04556.
- Gunasekaran, U., & Gannon, M. (2011). Type 2 diabetes and the aging pancreatic beta cell. *Aging*, 3(6), 565–75. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3164365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Habener J, Stanojevic V. (2012).  $\alpha$ -cell role in  $\beta$ -cell generation and regeneration.
- Hang Y., Stein R. (2011). MafA and MafB activity in pancreatic  $\beta$  cells. *Trends Endocrinol Metab*; 22(9): 364–373.
- Hart, A. W., Mella, S., Mendrychowski, J., Van Heyningen, V., & Kleinjan, D. a. (2013). The developmental regulator Pax6 is essential for maintenance of islet cell function in the adult mouse pancreas. *PloS one*, 8(1), e54173. doi:10.1371/journal.pone.0054173.
- Hayslett JP, Reece EA. (1987a). Effect of diabetic nephropathy on pregnancy. *Am J Kidney Dis* 9:344–349.

- Hayslett JP, Reece EA. (1987b). Managing diabetic patients with nephropathy and other vascular complications. *Bailliere's Clin Obstet Gynaecol* 1:939–954.
- Heller, R. S., Stoffers, D. A., Liu, A., Schedl, A., Crenshaw III, E. B., Madsen, O. D., Serup, P. (2004). The role of Brn4/Pou3f4 and Pax6 in forming the pancreatic glucagon cell identity. *Development Biology*. 268: 123-134.
- Hirsch IB: Type 1 diabetes mellitus and the use of flexible insulin regimens. *Am Fam Physician* 60:2343–2352, 2355–2356, 1999.
- Holland, A. M., Hale, M. a, Kagami, H., Hammer, R. E., & MacDonald, R. J. (2002). Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12236–41. doi:10.1073/pnas.192255099.
- Holst JJ: Glucagon-like peptide 1: a newly discovered gastrointestinal hormone. *Gastroenterology* 107:1848–1855, 1994.
- Hussain, M. A., Millers, C. P., Habener, J. F. (2002). Brn4 transcription factor expression targeted to the early developing mouse pancreas induces ectopic glucagon gene expression in insulin- producing  $\beta$  cells. *The Journal of Biology Chemistry*. 277(18): 16028-16032.
- Huynh, J., Xiong, G. (2014). A systematic review of a metabolite profiling in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*. 57: 2453-2464.
- Huynh, J., Xiong, G., Bentley-Lewis, R. (2014). A systematic review of metabolite profiling in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*. 57: 2453-2465.
- Isabella Artner, Bruno Bianchi, Jeffrey C. Raum, Min Guo, Tomomi Kaneko, Sabine Cordes, Michael Siewekw and Roland Stein (2007); MafB is required for islet  $\beta$  cell maturation. *PNAS*, vol.104, no.10, 3853-3858.
- Islam, S., Wilson, D. R. (2012). Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Animals Models in diabetes Research*. 933: 161-174.
- Jacqueline F. O'Dowd and Claire J. Stocker. Endocrine pancreatic development: impact of obesity and diet. *Frontiers in Physiology* (2013); doi: 10.3389/fphys.2013.00170.
- Junod, A., Lambert, A. E., Orci, L., Pictet, R., Gobet, A. E. (1967). Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 126: 201-205.

- Kelly, C., McClenaghan, N. H., & Flatt, P. R. (2011). Role of islet structure and cellular interactions in the control of insulin secretion. *Islets*3(2), 41–47. doi:10.4161/isl.3.2.14805.
- Kervran, A., Guillaume, M., & Jost, A. (1978). The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia*15: 387–393.
- Khan, N. A. (2007). Role of lipids and fatty acids in macrosomic offspring of diabetic pregnancy. *Cell Biochem Biophys*. 48: 79-88.
- Kim, C. (2014). Maternal outcomes and follow-up after gestational diabetes mellitus. *Diabet Med*. 31(3): 292-301.
- King, A. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*. 166: 877-894.
- Koda JE, Fineman M, Rink TJ, Dailey GE, Muchmore DB, Linarelli LG. (1992) Amylin concentrations and glucose control. *Lancet*. 339:1179–1180.
- Kubo, A., Stull, R., Takeuchi, M., Bonham, K., Gouon-Evans, V., Sho, M., Iwano, M., et al. (2011). Pdx1 and Ngn3 overexpression enhances pancreatic differentiation of mouse ES cell-derived endoderm population. *PLoS one*, 6(9), e24058. doi:10.1371/journal.pone.0024058.
- Kumar U, Sasi R, Suresh S, Patel A, Thangaraju M, Metrakos P, Patel SC, Patel YC (1999) Subtype-selective expression of the five somatostatin receptors (hSSTR1–5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis. *Diabetes*48:77–85.
- Landon MB, Spong CY, Thom E, Carpenter MW, Ramin SM, Casey B, Wapner RJ, Varner MW, Rouse DJ, Thorp JM, Jr., Sciscione A, Catalano P, Harper M, Saade G, Lain KY, Sorokin Y, Peaceman AM, Tolosa JE, Anderson GB. A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. *N Engl J Med* 2009;361:1339–1348.
- Leiva, A., Pardo F., Ramírez, M. A. (2011). Fetoplacental vascular endothelial dysfunction as an early phenomenon in the programming of the adult human diseases in subjects born from gestational diabetes mellitus or obesity in pregnancy. *Experimental Diabetes Research*. 11:1-18.

- Liu, J., Hunter, C. S., Du, A., Ediger, B., May, C. L. (2011). Islet-1 Regulates Arx transcription during pancreatic islet  $\alpha$ -cell development. *J Biol Chem.* 286: 15352-15360.
- Liu, Z., Kim, W., Chen, Z., Shin, Y.-K., Carlson, O. D., Fiori, J. L., Xin, L., et al. (2011). Insulin and glucagon regulate pancreatic  $\alpha$ -cell proliferation. *PloS one*, 6(1), e16096. doi:10.1371/journal.pone.0016096.
- Longo L. (1983). Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy. *The American Journal of Physiology.* 245(5). R720-729.
- Lyttle BM, Li J, Krishnamurthy M, Fellows F, Wheeler MB, Goodyer CG, Wang R. (2008) Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas. *Diabetologia*, 51:1169-80.
- Magnusson, A. L., Waterman, I. J., Wennergren, M., Jansson T., Powell, T. L. (2004). Triglyceride Hydrolase Activities and Expression of Fatty Acid Binding Proteins in the Human Placenta in Pregnancies Complicated by Intrauterine Growth Restriction and Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 89(9): 4607-4614.
- Mannucci, E., Monami, M., Pala, L., Cocca, C., Cresci, B., Bardini, G., Masotti, G., et al. (2007). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*, 30(1), 193–4. doi:10.2337/dc06-2060.
- Marseille-Tremblay, C., Ethier-Chiasson, M., Lafond, J. (2008). Impact of maternal circulating cholesterol and gestational diabetes mellitus on lipid metabolism in human term placenta. *Molecular Reproduction and Development.* 75: 1054-1062.
- Martin M, Hauer V, Messmer M, Orvain C, Gradwohl G. (2007) Transcription factors in pancreatic development. Animal models. *Endocr Dev*, 12:24-32.
- Mathis, J. M., Simmons, D. M., He, X., Swanson, L. W., Rosenfeld, M. G. (1992). Brain 4: a novel mammalian POU domain transcription factor exhibiting restricted brain-specific expression. *The EMBO Journal.* 11(7): 2551-2561.
- Matsuyama T, Komatsu R, Namba M, Watanabe N, Itoh H, Tarui S. (1988). Glucagon-like peptide-1 (7-36 amide): a potent glucagonostatic and insulinotropic hormone. *Diabetes Res Clin Pract*5:281–284.

- Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, Damm P, Dyer AR, Leiva A, Hod M, Kitzmiller JL, Lowe LP, McIntyre HD, Oats JJ, Omori Y, Schmidt MI. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* 2010;33:676–682.
- Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DA. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008;358:1991–2002.
- Moore CX, Cooper GJS. (1991). Co-secretion of amylin and insulin from cultured islet beta-cells: modulation by nutrient secretagogues, islet hormones and hypoglycaemic agents. *Biochem Biophys Res Commun* 179:1–9.
- Morgan, S. C., Lee, H. Y., Relaix, F., Sandell, L. L., Levorse, J. M., Loeken, M. R. (2008). Cardiac outflow tract septation failure in Pax3-deficient embryos is due to p53-dependent regulation of migrating cardiac neural crest. *Mech Dev* 2008, 125(9–10):757-767.
- Morgan, S. C., Relaix, F., Sandell, L. L., Loeken, M. R. (2008). Oxidative stress during diabetic pregnancy disrupts cardiac neural crest migration and causes outflow tract defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 82(6):453-463.
- O' Doud, J .F., Stocker, C. J. (2013). Endocrine pancreatic development: impact of obesity and diet. *Frontiers of physiology.* 4: 1-11.
- Ogawa A, Harris V, McCorkle SK, Unger RH, Luskey KL. (1990). Amylin secretion from the rat pancreas and its selective loss after streptozotocin treatment. *J Clin Invest* 85:973–976.
- Ogihara T, Mirmira R.G. (2010). An islet in distress:  $\beta$  cell failure in type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Investigation.* 1(4): 123-133.
- Ohira, R., Zhang, Y. H., Guo, W., Dipple, K., McCabe, E. R. B. (2002). Human ARX gene: genomic characterization and expression. *Molecular Genetics and Metabolism.* 77: 179-188.
- Ornoy A, Reece EA, Pavlinkova G, Kappen C, Miller R. (2015). Effect of Maternal Diabetes on the Embryo, Fetus, and Children: Congenital Anomalies, Genetic and

Epigenetic Changes and Developmental Outcomes. Maternal diabetes and pregnancy outcome. 105: 43-72.

Pan, F. C., & Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 240(3), 530–65. doi:10.1002/dvdy.22584. *Physiol* 123:185–190 94.

Pavlinkova G, Salbaum JM, Kappen C. 2009. Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo. *BMC Genom* 10:274.

Pavlinkova, G., Salbaum, J. M., Kappen, C. (2008). Wnt signaling in caudal dysgenesis and diabetic embryopathy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 82:710-719.

Pavlinkova, G., Salbaum, J. M., Kappen, C. (2009). Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing. *BMC Genomics*. 10: 274.

Perley MJ, Kipnis DM. (1967). Plasma insulin response to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 46:1954–1962.

Pettitt, D. J., Aleck, K. A., Baird, R. (1988). Congenital susceptibility to NIDDM. Role of intrauterine environment. *Diabetes*. 37: 622-628.

Pociot F, Akolkar B, Concannon P, et al. (2010). Genetics of type 1 diabetes: what's next? 59:1561–1571.

Quesada, I., Tudurí, E., Ripoll, C., Nadal, A. (2008). Physiology of pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal of Endocrinology*. 199: 5-19.

Rasschaert J, Liu D, Kutlu B *et al.* (2003). Global profiling of double stranded RNA- and IFN-gamma-induced genes in rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2003; **46**:1641–57.

Reece EA, Leguizamon G, Homko C. (1998b). Pregnancy performance and outcomes associated with diabetic nephropathy. *Am J Perinatol* 15:413–421.

Reece EA. (2012). Diabetes-induced birth defects: what do we know? What can we do? *Curr Diab Rep* 12:24–32.

- Rice G.E, Illanes S.E., Mitchell M.D. (2012) Gestational diabetes mellitus: A positive predictor of type 2 diabetes?. *International Journal of Endocrinology*. 2012: 1-10.
- Riedel M, Asadi A, Wang R, Warnock G, Kieffer T. (2012). Immunohistochemical characterisation of cells co-producing insulin and glucagon in the developing human páncreas. *Diabetologia*. 55:372–381.
- Robertson R.P. (2009). $\beta$ -cell deterioration during diabetes: what's in the gun?. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 11(2): 98-107.
- Rorsman, P., Ramracheya, R., Rorsman, N. J. G., Zhang, Q. (2014). ATP-regulates potassium channels and voltage-gated calcium channels in pancreatic alpha and beta cells: similar functions but reciprocal effects on secretion. *Diabetologia*. 57: 1749-1761.
- Ryan, E. A. (2011). Diagnosing gestational diabetes. *Diabetologia*. 54: 480-486.
- Sacks, D. B., Arnold, M., Bakris, G. L., Bruns, D. E., Horvath, A. R., Kirkman, M. S., Lernmark, A., et al. (2011). Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 34(6), e61–99. doi:10.2337/dc11-9998.
- Sakurai H, Dobbs R, Unger RH 1974 Somatostatin-induced changes in insulin and glucagon secretion in normal and diabetic dogs. *J Clin Invest* 54:1395–1402.
- Sánchez. L. S., Sánchez. L. A., Hernández. M. M., Solorio. M. E., Torres. J. M., Guillén. J. M. (2008). Diabetes gestacional. Comportamiento de los factores de riesgo en población mexicana. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 46 (6): 659-662.
- Scheepers A, Joost H G, Schurmann A (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28:364-371.
- Shankaracharya, Odedra, D., Mallick, M., Shukla, P., Samanta, S., & Vidyarthi, A. S. (2012). Java-based diabetes type 2 prediction tool for better diagnosis. *Diabetes technology & therapeutics*, 14(3), 251–6. doi:10.1089/dia.2011.0202.
- Simmons, R. a, Templeton, L. J., & Gertz, S. J. (2001). Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes*, 50(10), 2279–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11574409>.

- Stene LC, Rewers M. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies. *Clin Exp Immunol* 2012; **168**:12–23.
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin- nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics on the animal model. *Experimental Biology and Medicine*. 237: 481-490.
- Taricco E, Radaelli T, Rossi G, Nobile de Santis MS, Bulfamante GP, Avagliano L, Cetin I. (2009). Effects of gestational diabetes on fetal oxygen and glucose levels in vivo. *BJOG*. 116: 1729-1735.
- Teresa L. Mastracci, Lori Sussel. The endocrine pancreas: insights into development, differentiation and diabetes. National Institutes of Health, 2012; 1(5): 609-628. doi:10.1002/wdev.44
- Vambergue, A., Fajardy, I. (2011). Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. *World J Diabetes*. 2(11): 196-203.
- Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. (2001). Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50:609–613.
- Wahabi, H. a, Alzeidan, R. a, & Esmail, S. a. (2012). Pre-pregnancy care for women with pre-gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health*, 12, 792. doi:10.1186/1471-2458-12-792.
- Wallum BJ, Kahn SE, McCulloch DK, Porte D: Insulin secretion in the normal and diabetic human. In *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P, Eds. Chichester, U.K., John Wiley and Sons, 1992, p. 285–301.
- Wilcox, C. L., Terry, N. A., Walp, E. R., Lee, R. A., May, C. L. (2013). Pancreatic  $\alpha$ -Cell specific deletion of mouse Arx leads to  $\alpha$ - Cell identity loss. *Plos One*. 8(6): e66214.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H.(2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*; 27:1047–1053.

- Wu X, Freeze HH (2002). GLUT 14, a duplication of GLUT 3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* 80(6): 553-557.
- Wu, J., Yan, L. J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell cytotoxicity.
- Wyman, A., Pinto, A. B., Sheridan, R., Moley, K. H. (2008). One-Cell Zygote Transfer from Diabetic to Nondiabetic Mouse Results in Congenital Malformations and Growth Retardation in Offspring. *Endocrinology*. 149(2): 466-469.
- Xu, S., Hayashi, Y., Takagishi, Y., Itoh, M., Murata, T. (2013). Aristaless-Related homeobox plays a key role in hyperplasia of the pancreas Islet  $\alpha$ -like cells in mice deficient in proglucagon-derived peptides. *Plos One*. 8(5): e64415.
- Yan, J. (2015). Streptozotocin-induced type I diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 8: 181-188.
- Yang Y, Thorel F, Boyer D. (2011). Context-specific  $\alpha$ -to- $\beta$ -cell reprogramming by forced Pdx1 expression. *Genes Dev*. 25: 1680-1685.
- Yessoufou, A., Moutairou, K. (2011). Maternal Diabetes in Pregnancy: Early and Long-Term Outcomes on the Offspring and the Concept of "Metabolic Memory". *Experimental Diabetes Research*. 2011:1-12.
- Yeung WC, Rawlinson WD, Craing MA. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ* 2011; **342**:d35.
- Yin H, Berg AK, Tuvemo T *et al*. Enterovirus RNA is found in peripheral blood mononuclear cells in a majority of type 1 diabetic children at onset. *Diabetes* 2002; **51**:1964–71.
- Yip RG, Wolfe MM. (2000). GIP biology and fat metabolism. *Life Sci* 66:91–103.
- Zaret, K. S. (2008). Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nature reviews. Genetics*, 9(5), 329–40. doi:10.1038/nrg2318.
- Zaret, K. S. (2008). Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nature Reviews*. 9: 329-340.