



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**CAMBIOS FUNCIONALES Y MORFOLÓGICOS EN EL ISLOTE PANCREÁTICO
MATERNO DESPUÉS DEL DESTETE.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. en C. GUSTAVO EDUARDO CANUL MEDINA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

DRA. CRISTINA REVILLA MONSALVE
FACULTAD DE MEDICINA
DRA. MARTHA ELIA PEREZ ARMENDARIZ
FACULTAD DE MEDICINA

Ciudad de México. Marzo 2021



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.

Este trabajo fue realizado en la "**Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/ Instituto Nacional de Pediatría**"

AGREDECIMIENTO

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) de la UNAM por permitirme realizar el doctorado en su plan de estudios y las facilidades otorgadas en todas las entidades académicas participantes, así como por la oportunidad de continuar con mis estudios de doctorado y mi formación como científico

A mi familia

A la Dra. Cristina Fernández Mejía al laboratorio en la Unidad de Genética de la Nutrición - UNAM/INP.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez y a la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

Al Dr. Victor Garzón Cortés y a la M.V.Z. Rubí Zavala Gaytán de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

El comité tutor que evaluó el desarrollo de este proyecto fue integrado por:

Dra. Martha Elia Pérez Armendáriz

Facultad de Medicina, UNAM

Dra. Cristina Revilla Monsalve

Facultad de Medicina, UNAM

El trabajo realizado para esta tesis fue posible gracias al apoyo de:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CVU/becario: 416286

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y
Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM
proyecto: IN 206617 y beca doctoral IN 206617

Instituto Nacional de Pediatría y los Fondos Federales-INP
proyecto: 031/2015

Proyecto de CONACyT Ciencia Básica A1-S-10101

Para la realización de este proyecto, también se agradece a las siguientes personas por su apoyo, colaboración, así como asistencia técnica y metodológica:

Dra. Leticia Riverón-Negrete
Dra. Karina Pastén-Hidalgo
Lic. Paulina Morales-Castillo
M en C Francisco García- Vázquez
M en C Brianda Berenice López Aviña
Lic. Lilian Esparza Rosales
M en C. Zazil Olivares Sandoval
Dr. Jonathan Alcántar Fernández
Lic. Armando Elizalde Gualito

Se agradece también al Jurado para el Examen Doctoral designado por el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas e integrado por:

| | |
|-------------------------------------|---|
| Dr. Ignacio Camacho Arroyo | Facultad de Medicina, UNAM |
| Dra. María Cristina Fernández Mejía | Instituto de Investigaciones Biomédicas |
| Dr. Armando Roberto Tovar Palacio | Facultad de Medicina, UNAM |
| Dra. Yazmín Macotela Guzmán | Instituto de Neurobiología, UNAM |
| Dr. Samuel Canizales Quinteros | Facultad de Medicina, UNAM |

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. RESUMEN | 9 |
| 2. ABSTRACT | 10 |
| 3. ABREVIATURAS | 11 |
| 4. INTRODUCCIÓN..... | 13 |
| El páncreas | 13 |
| Páncreas exocrino | 14 |
| Páncreas endocrino | 14 |
| La insulina..... | 15 |
| Las células beta y secreción de insulina | 15 |
| Masa de los islotes pancreáticos | 17 |
| | 18 |
| Plasticidad de los islotes pancreáticos | 18 |
| Cambios en los islotes pancreáticos maternos durante la gestación | 19 |
| Cambios metabólicos durante la lactancia y poslactancia | 19 |
| Páncreas exocrino materno durante la lactancia y poslactancia | 19 |
| Cambios en los islotes pancreáticos maternos durante la lactancia | 20 |
| Cambios en los islotes pancreáticos maternos durante la poslactancia | 20 |
| Adaptaciones fisiológicas y metabólicas maternas durante la lactancia y post- lactancia en otros tejidos | 21 |
| Hueso..... | 21 |
| <i>El hueso materno durante la lactancia.</i> | 22 |
| <i>El hueso materno durante la poslactancia.</i> | 23 |
| Serotonina..... | 23 |
| Serotonina y células beta | 24 |
| Osteocalcina..... | 25 |
| Osteocalcina y las células beta..... | 26 |
| Calcio..... | 28 |
| Calcio durante la gestación y lactancia..... | 28 |
| Receptor extracelular sensor de calcio (CaSR)..... | 29 |
| Calcio y células beta | 30 |
| Otras hormonas | 30 |
| Prolactina | 30 |
| Glucocorticoides | 31 |
| Progesterona..... | 32 |
| Estradiol..... | 33 |
| 10. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 35 |
| 11. JUSTIFICACIÓN..... | 35 |
| 12. HIPÓTESIS..... | 36 |
| 13. OBJETIVOS..... | 36 |
| Objetivos particulares | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 14. MATERIALES Y MÉTODOS | 36 |
| Modelo animal y diseño experimental | 36 |
| Inmunohistoquímica y análisis morfométricos | 37 |
| Análisis de insulina y glucagon en el islote..... | 37 |
| Tamaño y número de células por islote | 39 |
| Análisis de proliferación celular | 39 |
| Curvas de tolerancia a la glucosa, curvas de tolerancia a la insulina y secreción de insulina durante la prueba de tolerancia a la glucosa | 40 |
| Cuantificación de insulina, osteocalcina y calcio ionizado. | 40 |
| Análisis de serotonina en el islote | 41 |
| Análisis estadístico | 41 |
| 15. RESULTADOS | 42 |
| Cambios en el peso corporal y el peso del páncreas materno durante la poslactancia. | 42 |
| Cambios en la morfometría y morfología de los islotes maternos durante la poslactancia | 42 |
| Área de los islotes pancreáticos materno | 42 |
| Distribución de frecuencia de área en los islotes maternos | 44 |
| Fracción del área de los islotes pancreáticos materno | 45 |
| Masa de los islotes pancreáticos materno | 45 |
| | 46 |
| Cambios en la composición de células alfa y células beta en los islotes maternos durante la poslactancia..... | 46 |
| Número de células beta en los islotes maternos..... | 47 |
| Tamaño individual de las células beta en los islotes maternos | 47 |
| Número de células alfa en los islotes maternos | 47 |
| Tamaño individual de las células alfa en los islotes maternos..... | 47 |
| Cambios en la proliferación de los islotes maternos durante la poslactancia | 48 |
| Cambios en la homeostasis de la glucosa materna durante la poslactancia..... | 51 |
| Concentración de glucosa en sangre | 51 |
| Tolerancia a la glucosa..... | 52 |
| Curva de tolerancia a la insulina..... | 52 |
| Cambios en la insulina basal y secreción in-vivo de insulina materna durante la poslactancia | 52 |
| | 53 |
| Cambios en la concentración de osteocalcina descarboxilada en suero materno durante la poslactancia..... | 54 |
| Cambios en la concentración de calcio en suero materno durante la poslactancia..... | 55 |
| Cambios en el contenido de serotonina en las células beta materna durante la poslactancia | 56 |
| | 57 |
| 16. DISCUSIÓN | 58 |
| 17. CONCLUSIÓN | 67 |

18. PERSPECTIVAS67
19. REFERENCIAS69
20. ANEXO87

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. COMPARACIÓN DE LA ANATOMÍA DE PÁNCREAS HUMANO Y ROEDOR..... | 13 |
| FIGURA 2. COMPOSICIÓN DEL ISLOTE PANCREÁTICO DE RATÓN Y HUMANO | 15 |
| FIGURA 3. MODELO DE LA PRIMERA FASE DE SECRECIÓN DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSA EN LA CÉLULA-BETA | 17 |
| FIGURA 4. REGULADORES DE LA MASA EN LAS CÉLULAS BETA | 18 |
| FIGURA 5. ESTRUCTURA DEL HUESO..... | 22 |
| FIGURA 6. SÍNTESIS DE SEROTONINA. | 24 |
| FIGURA 7. SÍNTESIS DE OSTEOCALCINA EN EL OSTEOLASTO | 26 |
| FIGURA 8. COMUNICACIÓN HORMONAL ENTRE EL HUESO Y LA CÉLULA-BETA..... | 28 |
| FIGURA 9. PESO CORPORAL TOTAL Y PESO DE PÁNCREAS | 42 |
| FIGURE 10. MORFOMETRÍA DEL ISLOTE PANCREÁTICO | 44 |
| FIGURE 11. MORFOMETRÍA DEL ISLOTE PANCREÁTICO | 46 |
| FIGURA 12. COMPOSICIÓN DE LOS ISLOTES PANCREÁTICOS | 48 |
| FIGURA 13. PROLIFERACIÓN EN EL ISLOTE PANCREÁTICO. | 51 |
| FIGURA 14. CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN AYUNO Y NO-AYUNO..... | 51 |
| FIGURA 15. PRUEBAS DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA E INSULINA, Y SECRECIÓN IN-VIVO DE INSULINA .. | 54 |
| FIGURA 16. CONCENTRACIÓN DE OSTEOCALCINA DESCARBOXILADA Y CALCIO IONIZADO EN SUERO | 56 |
| FIGURA 17. CONTENIDO DE SEROTONINA EN EL ISLOTE PANCREÁTICO. | 57 |
| FIGURA 18. CAMBIO TEMPORAL EN LA MORFOLOGÍA DEL ISLOTE, METABOLISMO DE LA GLUCOSA, CONCENTRACIÓN DE CALCIO, OSTEOCALCINA Y SEROTONINA. | 66 |

1. RESUMEN

El islote pancreático tiene la capacidad de adaptarse a diferentes demandas metabólicas y cambios hormonales a través de modificación en su tamaño y secreción hormonal. Después del destete (poslactancia), la fisiología materna establece cambios hormonales y una alta demanda de glucosa con el fin de remineralizar el hueso. Existe poca información acerca de la homeostasis de la glucosa y cambios en los islotes pancreáticos maternos durante la poslactancia. Nuestro estudio examinó la morfología de los islotes maternos y la homeostasis de la glucosa durante los primeros catorce días de poslactancia en ratones de la cepa C57BL/6NHHsd. Dentro de los hallazgos destacan: comparado con el día del destete, se encontró un rápido incremento en el área de los islotes maternos y en el número de células beta desde el primer día de poslactancia, alcanzando su máximo valor al tercer día de poslactancia. Estos cambios fueron acompañados por modificaciones en la secreción de insulina inducida por glucosa, tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina materna. La concentración de osteocalcina descarboxilada en suero (hormona producida en el hueso que favorece la secreción de insulina, proliferación de los islotes pancreáticos y sensibilidad a la insulina) se incrementó significativamente en los primeros días de poslactancia. Sin embargo, es poco probable que la osteocalcina descarboxilada desencadene el inicio de la proliferación en los islotes, ya que éste se observó incrementada desde antes del destete. Asimismo, el incremento de la osteocalcina descarboxilada no concuerda con la disminución en la sensibilidad a la insulina. La presencia de serotonina en los islotes se encontró disminuido durante la poslactancia. La concentración de calcio en suero se observó aumentada previo al destete, y disminuyó gradualmente a partir del primer día de poslactancia. Después de los cambios observados en los primeros días de poslactancia, al día catorce de poslactancia el área de los islotes y homeostasis de glucosa materna regresaron a los niveles observados en el grupo control. Este hallazgo reconoce por primera vez que, durante el estado fisiológico de poslactancia, se presenta un incremento en el área del islote y secreción de insulina. Estos resultados abren un nuevo campo de oportunidades para la identificación de moléculas y mecanismos que participen en estos procesos y que ayuden en el desarrollo de estrategias para combatir la diabetes.

2. ABSTRACT

Pancreatic islets adapt to metabolic requirements and the hormonal milieu by modifying their size and hormone secretions. Maternal glucose demands and hormonal changes occur after weaning, to rapidly re-establish bone mineralization. Minimal information exists about glucose metabolism and pancreatic islets after lactation. This study investigated islet morphology and glucose homeostasis for 14 days after lactation in C57BL/6NHHsd mice. Compared to the day of weaning, rapid expansion in the islets' area and number of beta cells were found from the first day post lactation, attaining maximum values on the third day post weaning. These changes were accompanied by modifications in glucose-induced insulin secretion, glucose tolerance and insulin sensitivity. Islet-cell proliferation was already augmented before lactation ceased. Serum undercarboxylated osteocalcin levels increased significantly during post lactation; however, it is unlikely that this enhancement participates in earlier cell proliferation augmentation or in decreasing insulin sensitivity. Islet was barely expressed, and serum calcium levels decreased. By the 14th day post weaning, islets' area and glucose homeostasis returned to age-matched virgin mice levels. These findings recognize for the first time that increases in islet area and insulin secretion occur during physiological post-weaning conditions. These results open up new opportunities to identify molecules and mechanisms participating in these processes, which will help in developing strategies to combat diabetes.

3. ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| 11 β HSD1 | 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 |
| 5-HT | Serotonina |
| 5-HTP | 5-hidroxitriptofano |
| ACTH | Hormona adrenocorticotrópica |
| AKT | Proteína cinasa B |
| AUC | Area bajo la curva |
| AVP | Vasopresina-arginina |
| BGLAP | Proteína ósea que contiene ácido gamma- carboxiglutámico |
| Ca ²⁺ | Calcio ionizado o libre |
| Calb1 | Calbindina 1 |
| CaSR | Receptor extracelular sensor de calcio |
| CRH | Hormonas liberadoras de corticotropina |
| ELISA/EIA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima |
| ERK1/2 | Cinasa regulada por señales extracelulares |
| ES | Error estandar |
| FGF21 | Factor de crecimiento fibroblástico 21 |
| FSH | Hormona foliculoestimulante |
| GCs | Glucocorticoides |
| GGCX | Gamma-glutamil carboxilasa |
| GK | Glucocinasa |
| Gla-Oc | Residuos carboxilados de la OC |
| Glu-Oc | Residuos descarboxilados de la OC |
| Glut2 | Transportador de glucosa tipo 2 |
| GnRH | Hormona liberadora de gonadotropina |
| GPRC6A | Receptor acoplado a proteína G |
| GR | Receptor de glucocorticoides |
| HPA | hipotálamo-pituitaria-adrenales |
| HRP | Peroxidasa de rábano |
| IAPP | Polipéptido amiloide de los islotes |
| IGFBP5 | Proteína 5 de Unión a Factor de Crecimiento Similar a la Insulina |
| JAK | Cinasa de Janus |
| KATP | Canal de potasio dependiente de ATP |
| L | Lactancia |
| LH | Hormona luteinizante |
| LIF | Factor Inhibidor de la Leucemia |
| MAPK | Proteína cinasas activadas por mitógenos |
| MKP-1 | Fosfatasa 1 de las proteina-cinasas activadas por mitógenos |
| NF- κ B | Factor nuclear kappa B |
| NO | Oxido nítrico |
| NOS2 | Oxido nítrico sintasa 2 |
| OC | Osteocalcina |
| PI3Ks | Fosfoinositol 3-cinasas |
| PIP | Proteína inducible de prolactina |
| PKC | Proteína cinasa C |

| | |
|-------|--|
| PL | Poslactancia |
| PR | Receptor nuclear de progesterona |
| PrIR | Receptor de prolactina |
| PTH | La hormona paratiroidea |
| PTHrP | Proteína relacionada con la hormona paratiroidea |
| RANK | Receptor activador del factor nuclear κ B |
| RANKL | Ligando del receptor activador del factor nuclear κ B |
| RASD1 | Proteína 1 relacionada con Ras inducida por dexametasona |
| SNC | Sistema nervioso central |
| STAT | Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción |
| Trpv5 | Receptor de potencial transitorio de la subfamilia 5 |

4. INTRODUCCIÓN

El páncreas

El páncreas es una glándula mixta constituida por tejido exocrino y tejido endocrino. Está situada en la zona mesentérica y presenta marcadas diferencias macroscópicas entre humano y roedores (Dolenšek et al., 2015; Mastracci y Sussel, 2012). En humanos, el páncreas se divide en tres partes; cabeza, cuerpo y cola (Braganza, 1994). En roedores el páncreas se clasifica en tres lóbulos: lóbulos duodenal, esplénica y gástrico (Dolenšek et al., 2015) (Figura 1). La parte esplénica se extiende del duodeno hasta el bazo, y representa el mayor volumen en el páncreas; su homólogo en humanos es el cuerpo y cola (Dolenšek et al., 2015). La parte duodenal se encuentra rodeando al duodeno y en humanos corresponde a la cabeza del páncreas (Böck et al., 1997; Villasenor et al., 2010). El lóbulo gástrico es la parte más pequeña del páncreas murino y se sitúa cerca del canal pilórico (Dolenšek et al., 2015). Los diferentes lóbulos que conforman el páncreas murino, se encuentran separados por tejido adiposo, tejido conectivo y tejido linfático (Dolenšek et al., 2015) (Figura 1).

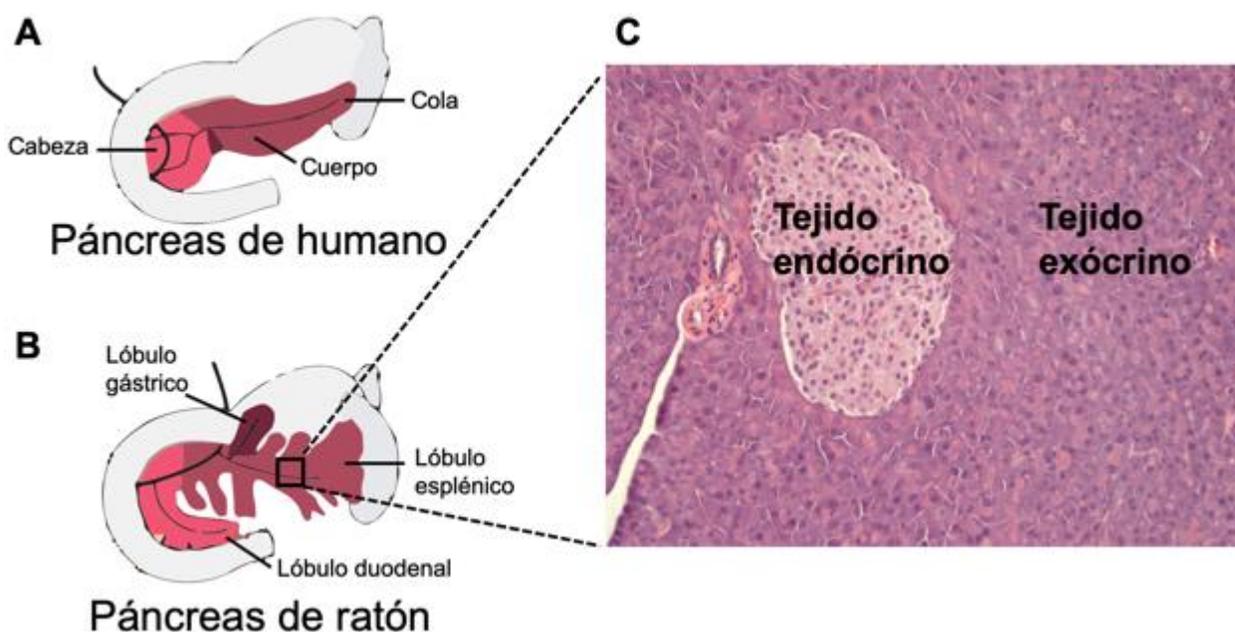


Figura 1. Comparación de la anatomía de páncreas humano y ratón. *Panel A:* Representación del páncreas humano conformado por cabeza, cuerpo y cola. *Panel B:* Representación del páncreas de ratón conformado por lóbulo gástrico, esplénico y duodenal. Imágenes tomadas y modificadas de Dolensek y col (2015). *Panel C:* Imagen de una sección de páncreas de ratón teñido con hematoxilina-eosina tomada a 20x que representa el tejido endocrino y exocrino.

Páncreas exocrino

El páncreas exocrino o tejido acinar, representa junto con el mesénquima entre el 96-99% del volumen total del páncreas (Rahier et al., 1981; Saito et al., 1978). Una de sus funciones es la digestión de los alimentos por medio de la síntesis y secreción de enzimas digestivas, bicarbonato y electrolitos (Ishiguro et al., 2012). Estas sustancias son secretadas en el intestino delgado en forma de jugo pancreático a través del conducto de Wirsung. Este conducto se une con el Conducto-hepático-común, donde finalmente libera el contenido pancreático hacia el lumen intestinal a través de la Ámpula de Váter (Gropper SS, 2013).

Páncreas endocrino

Los islotes pancreáticos o islotes de Langerhans, conforman la porción endocrina del páncreas y fueron descubiertos en 1869 por Paul Langerhans. Los islotes representan solamente entre el 1-5% del volumen total del páncreas (Kim y Hebrok, 2001), y se encuentran inmersos entre el tejido acinar. Los islotes tienen la función de regular la homeostasis de la glucosa a través de la secreción de diversas hormonas (Bouwens y Rooman, 2005; Rieck y Kaestner, 2010). Diferentes tipos celulares conforman la estructura de los islotes: células alfa (α) encargadas de sintetizar y secretar glucagon, células beta (β) sintetizan y secretan insulina, células delta (δ) sintetizan y secretan somatostatina, células épsilon (ϵ) grelina y células PP que sintetizan y secretan polipéptidos pancreáticos (Figura 2). En humanos, cerca del 55% de las células del islote son células beta, 35% células alfa y 11% células delta. Por otro lado, el islote pancreático murino está conformado aproximadamente en un 80% por células beta, 19% células alfa y el resto células-delta (Bouwens y Rooman, 2005; Lazo-De-La-Vega-Monroy, 2011). Las células épsilon, tanto en humanos como en roedores, son abundantes solamente durante el desarrollo y el nacimiento, y su número se reduce en la etapa postnatal (Brissova y Powers, 2008).

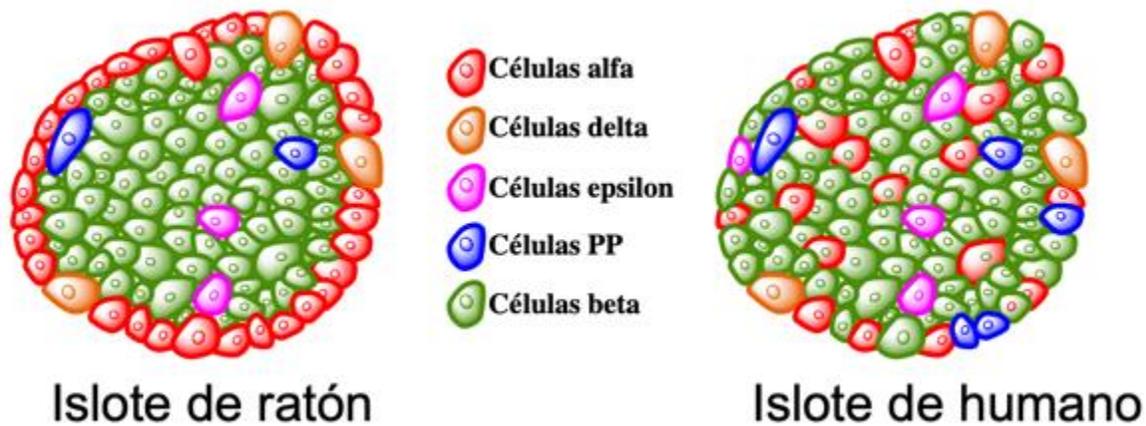


Figura 2. Composición del islote pancreático de ratón y humano. En roedores, las células beta se encuentran en el centro de los islotes, y los otros tipos celulares en la periferia. En los islotes humanos, las células beta se encuentran dispersas por todo el isloite en conjunto con los otros tipos celulares.

La insulina.

La insulina es una proteína constituida por 51 aminoácidos y un peso molecular de 5.8 kDa (Fu et al., 2013; Oyer et al., 1971). Se sintetiza a través de una serie de moléculas de una sola cadena que incluyen a la pre-proinsulina, proinsulina y varios productos de cortes intermedios. La insulina se almacena en gránulos secretores, en conjunto con el péptido C, el polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) y otros productos de secreción (Fu et al., 2013; Röder et al., 2016). Existen diversos factores que inician la transcripción del gen de la insulina en la célula-beta, estos factores incluyen a la propia insulina que actúa de manera autocrina sobre las propias células beta; sin embargo, es el metabolismo de la glucosa la principal vía que estimula la transcripción de la insulina (Artner y Stein, 2008; Fu et al., 2013).

Las células beta y secreción de insulina

Las células beta participan de manera importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa a través de la secreción de insulina (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía, 2009). La glucosa representa el principal estímulo en la secreción de insulina. La secreción de insulina estimulada por glucosa, requiere que la concentración de glucosa en sangre sea detectada por las células beta. Para poder censar de manera rápida y eficiente la glucosa, las células beta necesitan

estar localizadas cerca de los vasos sanguíneos, donde puedan recibir hasta 10 veces más flujo de sangre que las células exocrinas (Fu et al., 2013).

La secreción de insulina en respuesta a glucosa es pulsátil y bifásica (Stagner et al., 1980). Las oscilaciones de calcio dentro de las células beta, representan el estímulo para los diferentes pulsos de secreción de insulina en respuesta a la glucosa (Bergsten et al., 1994; Kar y Ray, 2005). La secreción bifásica de insulina inicia a los cinco minutos después de que las células beta detectan los niveles de glucosa, lo que desencadena el inicio del primer pico de secreción de insulina (fase de disparo), y seguido de un descenso en la secreción. Esta primera fase de secreción, representa la etapa en donde la mayor cantidad de insulina es secretada. La segunda fase de secreción es más lenta comparada con la primera fase, pero permite la amplificación y mantenimiento de la secreción durante varias horas hasta alcanzar la euglicemia en sangre. En la segunda fase de secreción, se secretan los gránulos de insulina remanentes que se encuentran más alejados de la membrana, mediante un mecanismo independiente de los canales de potasio acoplados a ATP (Curry et al., 1968; Lazo de la Vega Monroy, 2012; Röder et al., 2016).

De manera más detallada, en el inicio de la secreción de insulina, primero se requiere que la glucosa sea transportada al interior de las células beta por difusión facilitada a través de proteínas transportadoras de glucosa (GLUT2 en roedores, GLUT1 en humanos). Dentro de las células beta, la glucosa es fosforilada por la enzima glucocinasa formando glucosa-6-fosfato. La glucocinasa es considerada como la enzima limitante en la glucólisis y representa un importante sensor de glucosa para las células beta (Matschinsky, 1996; Suckale y Solimena, 2008). La completa oxidación de la glucosa en la glucólisis, ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, incrementa los niveles intracelulares de ATP y el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP (KATP) (Matschinsky, 1996). Posteriormente, se despolariza la membrana plasmática, y se activan los canales de calcio y sodio dependientes de voltaje. El flujo de iones calcio y sodio despolarizan aún más la membrana, lo que desencadena la apertura de los canales de calcio tipo L y de otros canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC). Luego, se desencadenan potenciales de acción que incrementan los niveles de calcio intracelular, y permiten la activación, translocación, fusión y exocitosis de los gránulos de insulina (Ashcroft et al., 1994; Rorsman y Renstrom, 2003) (Figura 3).

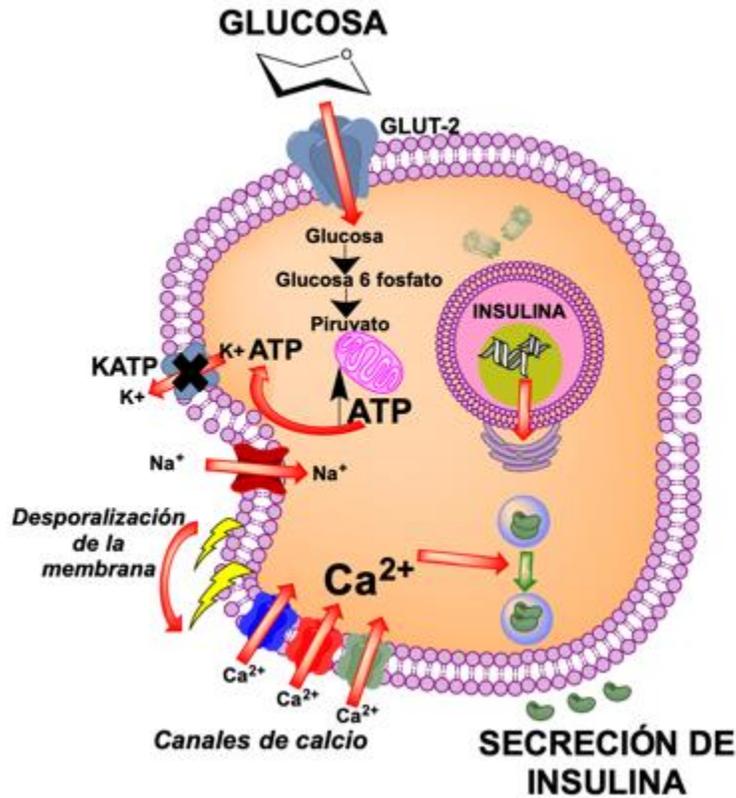


Figura 3. Modelo de la primera fase de secreción de insulina estimulada por glucosa en la célula-beta. La captación y metabolismo de la glucosa en las células beta permite el incremento de los niveles de ATP, cierre de los canales de K⁺, despolarización de la membrana plasmática y entrada de calcio del medio extracelular. El incremento de calcio desencadena la fusión de los gránulos que contienen insulina con la membrana plasmática y la secreción de insulina a torrente circulatorio.

Masa de los islotes pancreáticos

La masa de los islotes (mg por páncreas), se determina multiplicando el porcentaje total del área de los islotes (dentro del área total pancreático) y el peso del páncreas (Chintinne et al., 2012). Los mecanismos principales que incrementan la masa de las células beta, y por lo tanto también la de los islotes son: 1) incremento del tamaño celular o hipertrofia, 2) neogénesis a partir de células progenitoras o células pluripotenciales localizadas en el páncreas, 3) incremento en la replicación celular a partir de células preexistentes, y 4) transdiferenciación o formación de nuevas células a través de la desdiferenciación de otros linajes celulares (Bouwens y Rومان, 2005). Los mecanismos que disminuyen la masa de las células beta son: 1) apoptosis o muerte

celular programada, 2) atrofia o disminución del tamaño celular y 3) autofagia (Bouwens y Rooman, 2005) (Figura 4).

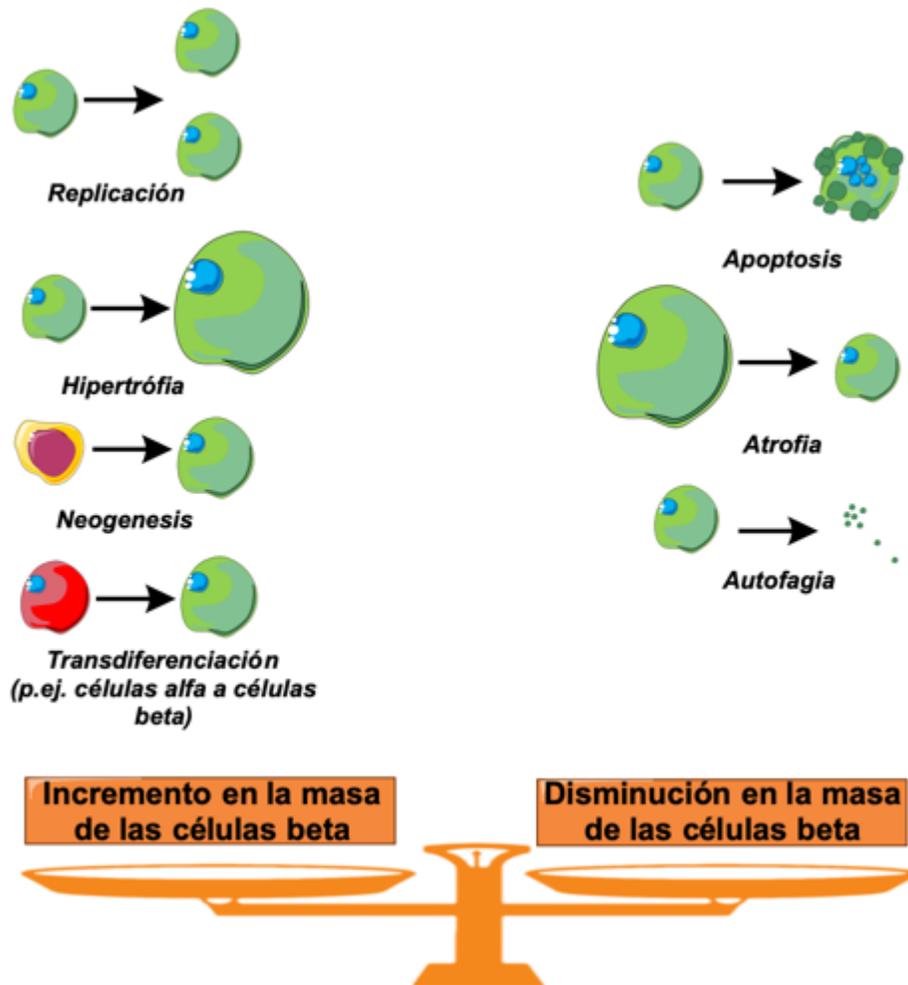


Figura 4. Reguladores de la masa en las células beta. Los mecanismos principales que incrementan la masa de las células beta son: la hipertrofia, neogénesis, replicación celular y transdiferenciación. Por otro lado, los mecanismos que disminuyen la masa de las células beta son: apoptosis, atrofia y autofagia (Bouwens y Rooman, 2005)

Plasticidad de los islotes pancreáticos

Los islotes pancreáticos, y en especial las células beta, presentan una “*plasticidad*” en su tamaño y función que le permite adaptarse ante diferentes demandas metabólicas y cambios hormonales (Matveyenko et al., 2008). Por ejemplo, las células beta responden a los cambios en las demandas de insulina, modificando su tamaño y secreción de insulina (Bernard-Kargar y Ktorza, 2001); tal

como acontece durante la gestación y lactancia y cuyos cambios están modulados por control hormonal, en respuesta a los cambios fisiológicos en estas etapas (Baaziz y Curry, 1993; Baeyens et al., 2016; Burnol et al., 1986, 1987; Marynissen et al., 1983, 1985; Nielsen, 2016; Rieck y Kaestner, 2010).

Cambios en los islotes pancreáticos maternos durante la gestación

Durante la gestación, los islotes pancreáticos maternos modifican su morfología y función debido a la resistencia a la insulina materna presente en este periodo y lo que ocasiona incremento en la secreción de insulina materna y aumento en el tamaño de los islotes maternos (Baeyens et al., 2016; Green y Taylor, 1972; Nielsen, 2016; Parsons et al., 1992; Rieck y Kaestner, 2010). Diversos experimentos han demostrado que la prolactina, lactógeno placentario y serotonina, son responsables de estas modificaciones en los islotes materno durante la gestación (Baeyens et al., 2016; Kim et al., 2010; Parsons et al., 1992; Sorenson y Brelje, 1997).

Cambios metabólicos durante la lactancia y poslactancia

La lactancia y la poslactancia, representan dos periodos en los que diversos tejidos maternos atraviesan por intensos cambios morfológicos y funcionales, orquestados por modificaciones hormonales (Canul y Fernandez, 2019). La lactancia representa un periodo priorizado hacia la síntesis y secreción de leche materna. El hueso materno es el principal reservorio mineral en mamíferos, por lo que durante la lactancia este tejido manifiesta una profunda desmineralización para asegurar las demandas minerales. Después del destete, existen nuevos cambios hormonales maternos que revierten los cambios que se realizaron durante la lactancia. (Canul y Fernandez, 2019).

Páncreas exocrino materno durante la lactancia y poslactancia

Existe poca información sobre el páncreas exocrino materno durante la lactancia. Estudios en ratas han demostrado que el peso del páncreas materno se incrementa durante la lactancia (Rolls et al., 1979). También se han observado modificaciones en la actividad y secreción de algunas enzimas digestivas. Por ejemplo, a partir de la segunda mitad de la lactancia (pico de lactancia) la tripsina y α -quimotripsina incrementan su actividad; por otro lado, la actividad de la amilasa está disminuida (Mizoguchi y Imamichi, 1987; Rolls et al., 1979).

A la segunda semana de poslactancia, el peso del páncreas disminuye, y las actividades de las enzimas digestivas se restituyen hasta alcanzar los valores previos a la gestación (Mizoguchi y Imamichi, 1987; Rolls et al., 1979).

Cambios en los islotes pancreáticos maternos durante la lactancia

Después del parto, los diversos cambios fisiológicos y metabólicos ocurridos durante la gestación, se revierten hasta alcanzar los valores previos al inicio de la gestación (Canul y Fernandez, 2019). Durante la lactancia, las células beta maternas reducen su proliferación e incrementan su apoptosis (Marynissen et al., 1983; Scaglia et al., 1995). Además, se reduce la secreción de insulina estimulada por glucosa (Hubinont et al., 1986; Hubinont CJ, 1887). Hasta la fecha, existe poca información acerca de los mecanismos que participan en las modificaciones de los islotes maternos durante la lactancia. No obstante, se ha propuesto que los glucocorticoides y el calcio, podrían participar en la involución de las células beta durante la lactancia (Anhe et al., 2007; Weinhaus et al., 2000). En apoyo a esto, se ha observado que en la parte final de la gestación en roedores, se incrementan los niveles de corticosterona en sangre (Cohen, 1976; Dupouy et al., 1975). Durante la lactancia, la succión de las crías sobre la glándula mamaria de la madre, estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides en las glándulas adrenales (Walker et al., 1992). Interesantemente, se ha demostrado que los islotes pancreáticos poseen la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1), esencial para la síntesis de cortisol (Davani et al., 2000; Lellis-Santos et al., 2012; Swali et al., 2008). Durante la lactancia, en los islotes maternos los glucocorticoides participan en el incremento de los niveles de Fosfatasa 1 de las proteínas-cinasas activadas por mitógenos (MKP-1) (Nicoletti-Carvalho et al., 2010) y de la Proteína 1 relacionada con Ras inducida por dexametasona (RASD1) (Lellis-Santos et al., 2012). Esto desencadena una disminución en la activación de las Cinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK 1/2), inhibición de la adenilato ciclasa y la Proteína cinasa C (PKC); y finalmente disminución en la proliferación de las células beta y secreción de insulina (Lellis-Santos et al., 2012; Nicoletti-Carvalho et al., 2010).

Cambios en los islotes pancreáticos maternos durante la poslactancia

Hasta la fecha, ningún artículo ha documentado lo que acontece en los islotes maternos en la poslactancia. Sin embargo, un artículo de Marynissen demostró que al día del destete, no se

presenta ningún cambio en el área de los islotes maternos comparado con el grupo control (Marynissen et al., 1983).

Adaptaciones fisiológicas y metabólicas maternas durante la lactancia y post- lactancia en otros tejidos

Hueso.

El hueso es un tejido que participa como soporte estructural del cuerpo, protección para los órganos internos, locomoción, punto de unión para el músculo esquelético, formación de células rojas (hematopoyesis), balance ácido-base del cuerpo y homeostasis mineral a través de la absorción (captación) y resorción mineral (liberación) (Kini y Nandeesh, 2012; Taichman, 2005). Interesantemente, en los últimos años se ha demostrado que el hueso actúa como tejido endocrino por a su capacidad de producir y secretar hormonas que regulan diversas funciones en el cuerpo (DiGirolamo et al., 2012).

El hueso se divide en dos partes según su microestructura y localización: 1) hueso cortical o hueso compacto, y 2) hueso trabecular o esponjoso (Clarke, 2008) (Figura 5). El hueso está conformado entre un 50-70% por minerales (hidroxiapatita, carbonato de calcio, magnesio, potasio y flúor), 20-40% por una matriz orgánica (células, proteoglicanos, glicoproteínas y glicosaminoglicanos), 5-10% por agua y menos del 3% por lípidos (Clarke, 2008). Los diferentes tipos celulares que conforman el hueso se dividen en dos grupos: 1) las que derivan de las células madre mesenquimales: preosteoblastos, osteoblastos, células de linaje-óseo y osteocitos; y 2) las que derivan de las células madres hematopoyéticas: monocitos, preosteoclastos y osteoclastos (Buckwalter et al., 1995; Canul y Fernandez, 2019; Clarke, 2008; Florencio-Silva et al., 2015) (Figura 5).

Los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos, son importantes para el recambio y remodelación ósea (Baron, 2008). Los osteoblastos participan en la mineralización ósea a través de la formación de la matriz celular y síntesis de proteínas y hormonas (Eriksen, 2010; Raggatt y Partridge, 2010; Raisz y Kream, 1983). Los osteocitos representan aproximadamente el 90% del contenido celular, y participan en la remodelación ósea a través de su apoptosis y capacidad de adoptar propiedades de células fagocíticas (Canul y Fernandez, 2019; Teti y Zallone, 2009). Los

osteoclastos participan en la remodelación ósea gracias a su capacidad de desmineralización cuando la matriz ósea necesita ser destruida (Baron, 2008).

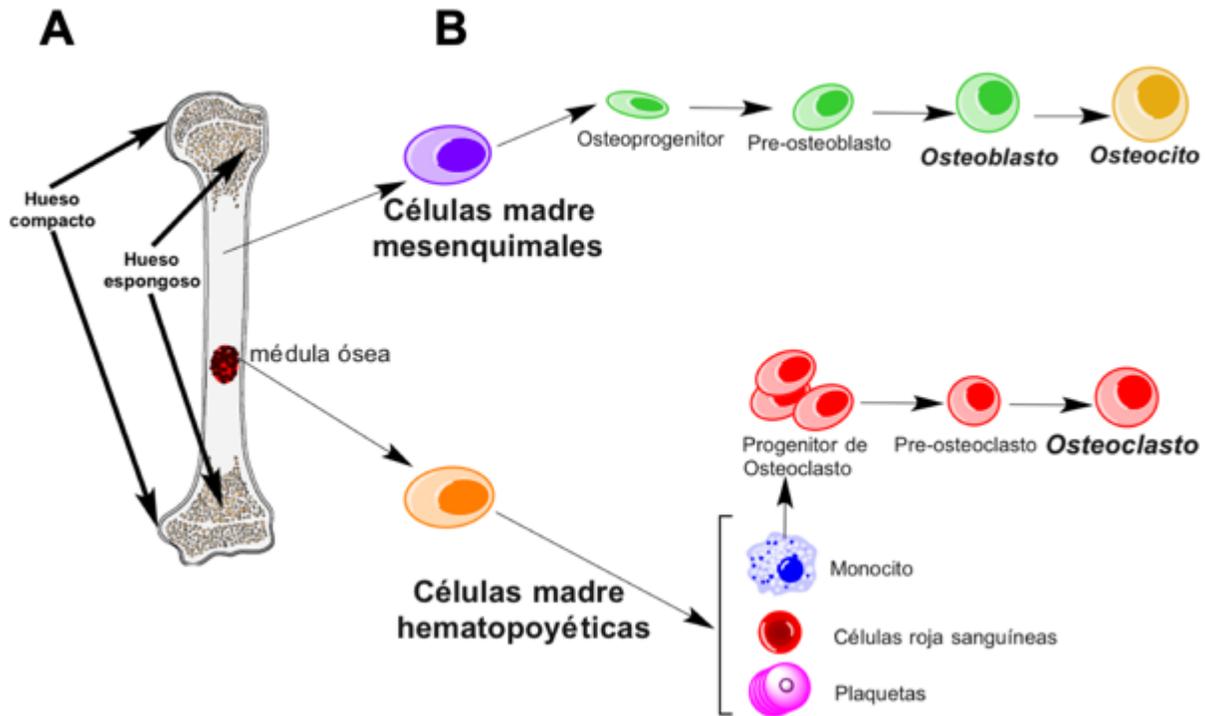


Figura 5. Estructura del hueso. *Panel A:* Partes del hueso según su microestructura y localización. *Panel B:* Diferentes tipos celulares que conforman el hueso.

El hueso materno durante la lactancia.

Durante la lactancia, el hueso representa la principal fuente de minerales para la producción de leche materna (Kalkwarf et al., 1997; Kovacs, 2011, 2016; Kovacs y Kronenberg, 1997). En este periodo, los osteoclastos incrementan su número y actividad (Baron, 2008; Canul y Fernandez, 2019) y los osteocitos empiezan a expresar genes característicos de los osteoclastos (Teti y Zallone, 2009). Los osteoblastos también incrementan su número, pero el recambio óseo está favorecido hacia la pérdida de la masa ósea (Tojo et al., 1998).

Los mecanismos que inician la pérdida de la masa ósea no están del todo claros. Sin embargo, estudios en ratas han demostrado que el incremento de la prolactina (Suntornsaratoon et al., 2009; Thongchote et al., 2008); la disminución de la hormona liberadora de gonadotropina, la inhibición de la hormona luteinizante y foliculo-estimulante, el decremento en las

concentraciones de progesterona y estradiol (Hall y Guyton, 2000), así como el aumento de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) (Ardeshirpour et al., 2010) y del factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21) podrían participar en la resorción ósea durante la lactancia (Bornstein et al., 2014).

El hueso materno durante la poslactancia.

Un evento importante en las primeras semanas de poslactancia, se observa en el hueso materno, en donde se produce una intensa remineralización y aumento en su densidad (Collins et al., 2013; Kirby et al., 2011; Kovacs, 2016; Liu et al., 2012; Miller y Bowman, 2007). El proceso de remineralización ósea comienza 24 horas después del destete, e inicia con el incremento en la apoptosis en los osteoclastos a través de la disminución del *Receptor activador del factor nuclear κB* (RANK) (Canul y Fernandez, 2019; Miller y Bowman, 2007). Los osteocitos comienzan a expresar genes característicos de los osteoblastos (Teti y Zallone, 2009) y se incrementa el número de osteoblastos, lo que finalmente permite el aumento y la recuperación de la masa ósea (Ardeshirpour et al., 2007; Miller y Bowman, 2007). Los mecanismos y factores que participan en la recuperación de la masa ósea materna continúan en debate hasta la fecha. Pero, el retorno a los niveles normales del medio hormonal: prolactina, hormona liberadora de gonadotropina, hormona luteinizante, hormona folículo-estimulante y estrógenos, podrían estar involucrados en la remineralización ósea (Canul y Fernandez, 2019).

Por otro lado, en periodos de intensa diferenciación de osteoblastos y mineralización ósea, tal como sucede durante la poslactancia, la glucosa representa el principal sustrato energético para llevar a cabo estas acciones (Esen et al., 2013; Lecka-Czernik y Rosen, 2015; Nichols y Neuman, 1987). Además, el incremento en los requerimientos de glucosa por parte del tejido óseo materno, podría repercutir en el metabolismo global materno afectando la homeostasis de glucosa durante la poslactancia (Dirckx et al., 2018).

Serotonina

La serotonina, o 5-hidroxitriptamina (5HT), es una molécula con numerosas funciones en todo el cuerpo. La primera reacción en su síntesis está catalizada por la enzima triptófano hidroxilasa para formar el 5-hidroxitriptófano (5HTP), finalmente el 5HTP se convierte a serotonina por la enzima descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (Mohammad-Zadeh et al., 2008) (Figura 6).

La acción de la serotonina está mediada por una gran familia de receptores acoplados a proteínas G, y a la apertura de canales iónicos (Hoyer et al., 2002).

En el sistema nervioso central (SNC), la función de la serotonina como neurotransmisor, está relacionada con la acción del sistema serotoninérgico para regular, por ejemplo, la temperatura, apetito, ciclo del sueño, emesis, conducta sexual y nocicepción. Por lo tanto, algún daño en este sistema, podría resultar en la aparición de trastornos psiquiátricos y neurológicos (Kandel et al., 2001). La serotonina está presente no solo en el cerebro, sino también en otros tejidos como el pulmón, riñón, hígado, plaquetas, tracto gastrointestinal, musculo, glándula mamaria, hueso y páncreas (Mohammad-Zadeh et al., 2008). La serotonina participa en la agregación plaquetaria mediada por el receptor 5-HT₂ (Hilton y Cumings, 1971). También está involucrada en el desarrollo de las glándulas mamarias, en la regulación de la síntesis y secreción de leche materna; así como en la producción de PTHrP durante la lactancia (Canul y Fernandez, 2019; Chiba et al., 2018; Marshall et al., 2014; Matsuda et al., 2004; Pai y Horseman, 2008). La serotonina también participa en la regulación del metabolismo y densidad del hueso (Collet et al., 2008; Ducey y Karsenty, 2010). En el intestino, regula la motilidad y secreción de diversos componentes al lumen intestinal (Mawe y Hoffman, 2013; Shepherd, 1963).

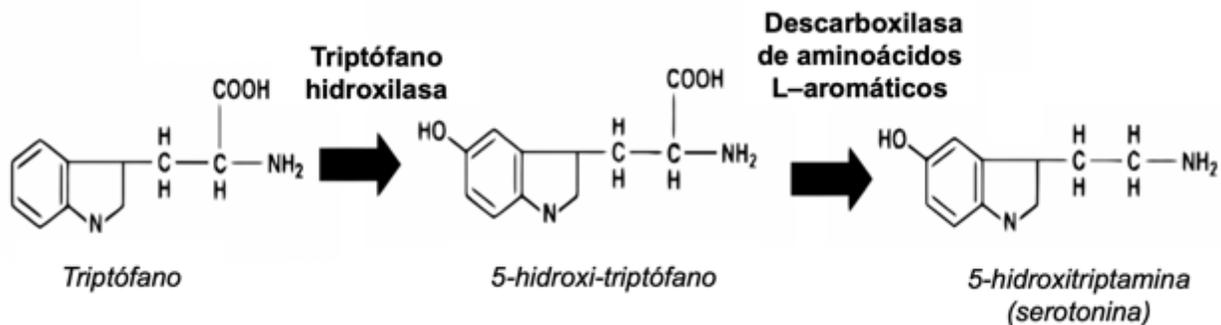


Figura 6. Síntesis de serotonina. El aminoácido esencial L-triptófano es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano por la triptófano hidroxilasa. Después, el 5-HTP es descarboxilado por la descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos para formar serotonina.

Serotonina y células beta

Si bien, la presencia de serotonina en las células beta se conocía desde los años 80's, su función permaneció desconocida hasta el año 2010 (Bird et al., 1980; Kim et al., 2010). Actualmente se sabe que la serotonina regula la masa de las células beta y la secreción de insulina durante la

gestación (Kim et al., 2010; Ohara et al., 2013), periodo en el que los cambios metabólicos y hormonales, generan un estado fisiológico de resistencia a la insulina para sobrellevar las demandas energéticas del feto (Canul y Fernandez, 2019). Por lo anterior, las células beta se ven en la necesidad de incrementar su masa y secreción de insulina, con el objetivo de aumentar la cantidad de insulina y compensar la resistencia a la insulina (Herrera, 2000). Si este mecanismo no se lleva a cabo, podrían aparecer alteraciones en la homeostasis de la glucosa materna y el riesgo de desarrollar diabetes gestacional (Kim et al., 2010).

Osteocalcina

La osteocalcina, también llamada proteína BGLAP (Gorai et al., 1998; Obrant et al., 1999) es una proteína no-colágena de bajo peso molecular (5,700 Da) presente en gran cantidad en la matriz ósea. La osteocalcina es sintetizada principalmente en los osteoblastos del hueso, y se le considera como un marcador de mineralización ósea y diferenciación de los osteoblastos (Zoch et al., 2016). Su síntesis y actividad dependen de la vitamina D, vitamina K y de numerosas modificaciones post-traduccionales que incluyen carboxilaciones en los tres residuos de ácido gamacarboxiglutámicos (Gla), lo que le confiere a esta hormona una alta afinidad por los iones de calcio e incorporación a los cristales de hidroxiapatita en el hueso (Lee et al., 2000; Seibel, 2003) (Figura 8). La vitamina D 1,25-dihydroxy-D (1,25(OH) 2D) o calcitrol, regulación la transcripción del gen de osteocalcina a través del receptor nuclear de vitamina D (Lee et al., 2000; Wolf, 2009). La vitamina K es un cofactor determinante en la carboxilación de la osteocalcina y mediado por la enzima gamma-glutamyl carboxilasa (GGCX). La osteocalcina puede encontrarse descarboxilada (Glu-osteocalcina); o con una, dos o tres carboxilaciones (Gla-osteocalcina), lo que repercute en sus propiedades fisicoquímicas y de afinidad por los iones calcio y las hidroxiapatitas en el hueso (Lee et al., 2000). Entre menos residuos carboxilados tenga la osteocalcina, menor afinidad por los iones de calcio y las hidroxiapatitas tendrá. No obstante, tanto la Gla-osteocalcina y la Glu-osteocalcina pueden encontrarse tanto en el hueso como en el torrente circulatorio (Ferron et al., 2010a), pero la osteocalcina descarboxilada se encuentra principalmente en circulación (Ferron et al., 2008a).

Recientemente se ha reconocido al hueso como un tejido endocrino, por su capacidad de sintetizar y secretar hormonas que regulan el metabolismo; un ejemplo de estos factores es la Glu-osteocalcina (osteocalcina descarboxilada) que ha sido objeto de gran estudio en los últimos años (Lee et al., 2007; Shirakawa et al., 2017). Se ha demostrado que la Glu-osteocalcina

participa en la regulación de la visceral, tolerancia a la glucosa, sensibilidad a la insulina, secreción de insulina y la masa de los islotes pancreáticos (Motyl et al., 2010a). Por otra parte, la Glu-osteocalcina se considera como marcador de la concentración de vitamina K en el cuerpo (Sokoll y Sadowski, 1996), por lo que la deficiencia de vitamina K incrementa la concentración en sangre de Glu-osteocalcina. Finalmente, se ha observado que la administración exógena de Glu-osteocalcina incrementa la secreción de insulina, proliferación de las células beta y la sensibilidad a la insulina (Ferron et al., 2008b; Lee et al., 2007).

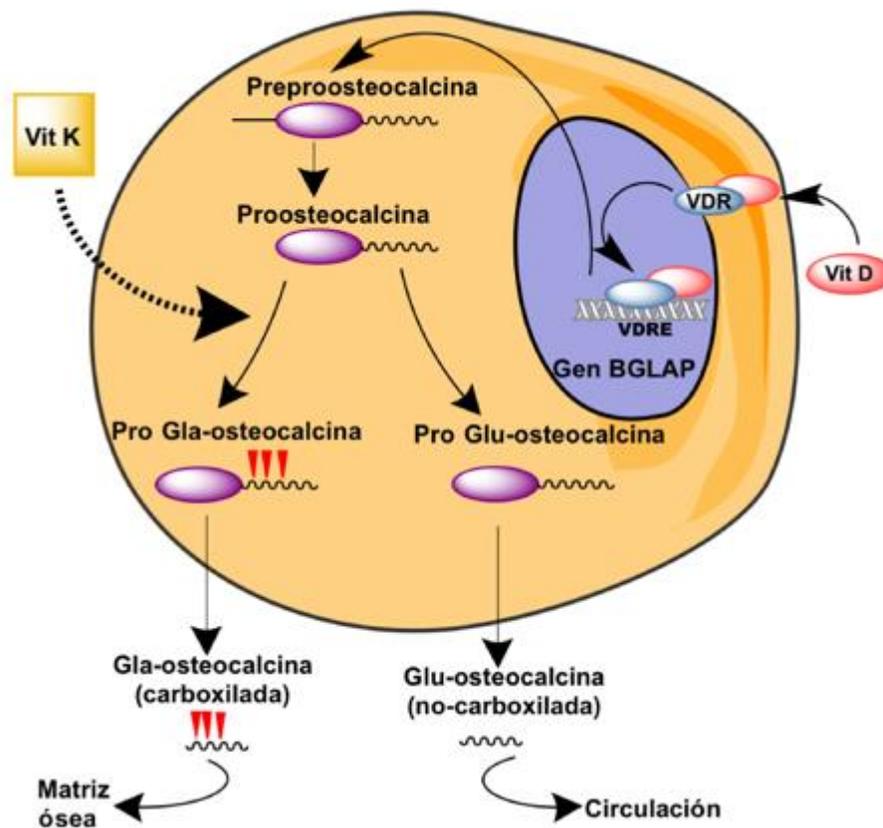


Figura 7. Síntesis de osteocalcina en el osteoblasto. El gen BGLAP de osteocalcina se transcribe gracias a la vitamina D. Después de su transcripción y traducción, el péptido pre-proosteocalcina sufre proteólisis formando un péptido proosteocalcina de 75 aminoácidos. Después, la osteocalcina se carboxila en los residuos Glu en la posición 17,21 y 24 con ayuda de la vitamina K y formar pro-Glu osteocalcina. Este proceso solamente ocurre en cierta proporción sobre la nueva osteocalcina que está siendo sintetizada. La pro-Gla y Glu-osteocalcina sufren proteólisis que da como resultado la osteocalcina madura carboxilada y descarboxilada. Ambas formas de la osteocalcina son secretadas del osteoblasto, donde finalmente la Gla-osteocalcina se une al calcio e hidroxapatito, y la Glu-osteocalcina es liberada más fácilmente a la circulación.

Osteocalcina y las células beta

En años recientes se ha encontrado una comunicación hormonal entre el hueso y los islotes pancreáticos (Ng, 2011; Schwetz et al., 2012). Karsenty en el 2006, fue el primero en postular la existencia de una regulación hormonal en el metabolismo energético mediado por el hueso (Karsenty y Ducy, 2006). En el 2007, este mismo grupo de investigación confirmaría que los osteoblastos secretan una sustancia al torrente circulatorio que afecta a las células beta pancreáticas y regula el metabolismo de la glucosa (Lee et al., 2007). Actualmente se conoce que esta comunicación entre el hueso y las células beta está mediada por la hormona osteocalcina en su forma descarboxilada (Glu-osteocalcina). La Glu-osteocalcina promueve en las células beta, aumento en la secreción de insulina y su masa (Ferron et al., 2008b; Lee et al., 2007; Motyl et al., 2010b; Sullivan et al., 2013; Wei et al., 2014). A su vez, la insulina aumenta la densidad y síntesis de osteocalcina en el hueso (Fulzele et al., 2010). Existe fuerte evidencia tanto *in-vitro* como *in-vivo*, que la acción de la osteocalcina está regulada por el receptor acoplado a proteínas G de la familia C 6A (GPRC6A), una proteína de siete dominios transmembranal. No obstante, se ha documentado que el receptor GPRC6A es el punto de interacción de diversos ligandos como la L-arginina, L-lisina, L-ornitina, minerales, y otras hormonas (Clemmensen et al., 2014; Pi et al., 2015, 2016). A pesar de esto, la osteocalcina mediante el receptor GPRC6A, regula directamente la producción de insulina y proliferación de las células beta, por lo que actualmente se está estudiando como blanco terapéutico para la creación de medicamentos que mimeticen la estructura de la Glu-osteocalcina como tratamiento para los pacientes con diabetes tipo 2 (Pi et al., 2011, 2016; Wei et al., 2014) (**Figura 8**);

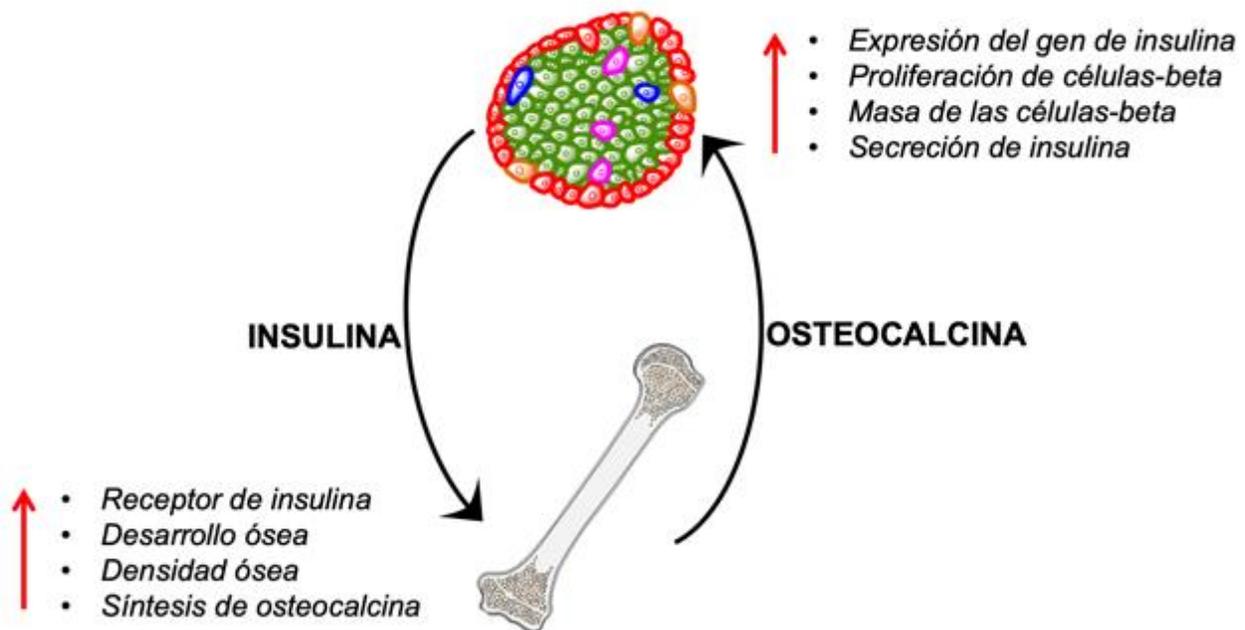


Figura 8. Comunicación hormonal entre el hueso y la célula-beta. El hueso sintetiza Glu-osteocalcina el cual promueve en las células beta, incrementos en la expresión del gen que codifica para la insulina, en la proliferación celular y en la secreción de insulina. A su vez, esta insulina llega al hueso y mediante el receptor de insulina, participa en su desarrollo, incrementa la absorción de calcio en los osteoblastos y aumento en la densidad del hueso, y en la regulación de la síntesis de osteocalcina.

Calcio

El calcio es uno de los iones más abundantes en el planeta y en los mamíferos (Riccardi y Kemp, 2012). Es tal su importancia, que existen proteínas especializadas que almacenan y transportan calcio intracelular, así como mecanismo que detectan su concentración en el medio extracelular (Riccardi y Kemp, 2012). Mas del 99% del calcio de los mamíferos se almacena en forma de hidroxapatita en el hueso (Yu y Sharma, 2019). En sangre, el calcio puede estar presente en 3 formas: 1) el 40% está unida a proteínas (por ejemplo albumina y globulina) y el cual no puede ser utilizado por los tejidos, 2) entre el 9-15% está en forma complejado o quelatado (fosfato de calcio, carbonato de calcio) y el cual puede ser utilizado por los diferentes tejidos, y 3) entre 45-51 % está en forma ionizado (libre) y el cual es utilizado preferentemente por los tejidos para sus funciones fisiológicas (Canul y Fernandez, 2019; Yu y Sharma, 2019).

La homeostasis de calcio se lleva a cabo por hormonas que regulan los transportadores de calcio en el intestino, riñón y hueso. Las principales hormonas reguladoras de calcio son: la hormona paratiroidea (PTH), 1,25 hidroxivitamina D3 (vitamina D3) y la calcitonina (Keung y Perwad, 2018; Munoz y Hu, 2016).

La hormona paratiroidea (PTH) es secretada por las glándulas paratiroides en respuesta al decremento de la concentración de calcio en sangre. Esto produce incremento en la reabsorción de calcio, incremento en la secreción de vitamina D3 en el riñón e incremento en la absorción de calcio en el intestino. La PTH también estimula la resorción de calcio en el hueso, particularmente durante la lactancia (Keung y Perwad, 2018; Munoz y Hu, 2016).

La calcitonina es secretada por las células parafoliculares de la tiroides (células C) en respuesta al incremento de la concentración de calcio en sangre. La calcitonina estimula la reabsorción de calcio en el hueso a través de los osteoblastos. De igual forma, la calcitonina inhibe la reabsorción de calcio en el riñón e intestino, e incrementa la excreción de calcio a través de la orina (Keung y Perwad, 2018; Munoz y Hu, 2016).

De manera normal, el calcio total se mantiene en un rango entre 8.5–10.5 mg/dl (4.3–5.3 mEq/L o 2.2–2.7 mmol)(Goldstein, 1990). Durante la gestación, tanto en roedores como en humanos el incremento del volumen vascular materno ocasiona una disminución en la concentraciones de calcio total sérico (Kovacs, 2016). En humanos los niveles de calcio ionizado se mantienen en concentración normales a lo largo de gestación; sin embargo en roedores, debido al número de crías, los niveles de calcio ionizado disminuyen (Kovacs, 2016). Durante la lactancia, la concentración de calcio total y calcio ionizado no presentan modificaciones, aunque algunos murinos pueden presentar modificaciones en las concentraciones de esta molécula, en respuesta al número de crías, al tipo de dieta, tamaño de las crías, cepa de ratón, o estado de ayuno (Kovacs, 2016). Al momento del destete, el calcio en suero se incrementa transitoriamente tanto en roedores como en humanos debido al cese abrupto en la captación de calcio por la glándula mamaria (Kovacs, 2016).

Receptor extracelular sensor de calcio (CaSR)

Es tal la importancia de calcio en el cuerpo, que existen mecanismos que detectan su concentración en el medio extracelular; esto se lleva a cabo a través de los receptores extracelulares sensores de calcio (CaSR). El receptor extracelular sensor de calcio (CaSR) fue descubierto en el 1993 (Brown et al., 1993) y se identificó como el primer receptor acoplado a proteína G (GPCRs) activado por calcio ionizado (Ca^{2+}) (Riccardi y Kemp, 2012). El CaSR pertenece al grupo C de los receptores GPCRs (Alexander et al., 2011). Si bien el Ca^{2+} es el ligando fisiológico de los CaSRs, diversos aminoácidos pueden modular alostéricamente la sensibilidad de Ca^{2+} para unirse al receptor CaSR. Además, otros di-tri cationes polivalentes también pueden activar los CaSRs independientemente de la presencia de Ca^{2+} (Nemeth, 2004; Riccardi y Kemp, 2012).

La principal función fisiológica del receptor extracelular sensor de calcio (CaSR), es la regulación de homeostasis de agua y de iones divalentes como el calcio (Riccardi y Kemp, 2012). Este receptor está presente en las glándulas mamarias, hueso, riñón, entre otros tejidos. Los CaSRs mantienen la homeostasis del Ca^{2+} a través de dos procesos: 1) regulación de la secreción de PTH por la glándula paratiroidea, y 2) a través de la regulación de órganos que participen en la homeostasis de calcio, como el riñón y el hueso (Riccardi y Brown, 2010; Riccardi y Kemp, 2012).

Durante la lactancia, el CaSR se expresa abundantemente en las glándulas mamarias para regular la liberación calcio en el hueso a través de la síntesis y secreción de PTHrP (VanHouten et al., 2004). Otras funciones del receptor extracelular sensor de calcio incluyen la regulación de hormonas y secreción de fluidos, regulación de señales neuronales, y probablemente regulación del desarrollo fetal (Riccardi y Kemp, 2012).

Calcio y células beta

Como se menciona anteriormente, el calcio regula la secreción de insulina en las células beta a través de oscilaciones en su concentración intracelular, y mediante enzimas y canales dependientes de Ca^{2+} (Wollheim y Sharp, 1981). Ha sido reportado que los CaSRs se expresan en las células beta de roedores y humanos (Squires, 2000), y su activación participa en el incremento de la secreción de insulina (Gray et al., 2006; Jones et al., 2007). Además, los CaSRs favorecen la comunicación entre las células beta para detectar las concentraciones locales de Ca^{2+} (el cual es liberado junto con la insulina) y de esta forma incrementar la secreción de insulina (Gray et al., 2006; Jones et al., 2007).

Otras hormonas

Prolactina

La prolactina es una hormona peptídica (23 kD) secretada por las células lactotropas en la glándula pituitaria anterior, y fue nombrada así por su participación en la producción de leche durante la lactancia (Riddle et al., 1933). La prolactina también es responsable del desarrollo de las glándulas mamarias, regulación del metabolismo, así como del crecimiento y desarrollo de diversos tejidos (Gregerson, 2006). La acción de la prolactina está mediada por el receptor de prolactina (PrlR) que activa la vía Jak2–Stat5, MAP cinasa, y la vía PI3K–Akt (Radhakrishnan et al., 2012). Durante la gestación y lactancia, la prolactina incrementa su concentración en sangre y participa de manera activa, junto con otras hormonas, en la regulación de diversas funciones en el páncreas, hipotálamo, hígado y tejido adiposo, con el objetivo de mantener la homeostasis metabólica inherente a estas etapas (Macotela et al., 2020; Ramos-Romn, 2011; Trott et al., 2012). Durante la gestación, la prolactina contribuye en: incremento de la ingestión de comida (hiperfagia) y ganancia de peso corporal materno, incremento en la masa de la células

beta, resistencia a la insulina, y aumento del tejido adiposo materno (Kim et al., 2010; Naef y Woodside, 2007; Ramos-Romn, 2011; Ruiz-Herrera et al., 2017). Además, la prolactina es crucial para el inicio del crecimiento y desarrollo de las glándulas mamarias y diferenciación de las células alveolares (Hennighausen y Robinson, 2005; Horseman y Gregerson, 2013).

Durante la lactancia, la prolactina participa en: decremento de la concentración de progesterona y estradiol, continuación del crecimiento y desarrollo de las glándulas mamarias, alveologénesis, síntesis de los componentes proteicos y lipídicos de la leche, galactopoyesis, por mencionar algunas funciones (Gregerson, 2006; Hall y Guyton, 2000; Kovacs, 2016). De igual forma, participa en la movilización hacia la glándula mamaria de glucosa, lípidos, aminoácidos y calcio para producción de la leche (Barber et al., 1992; Canul y Fernandez, 2019; Macotela et al., 2020). Respecto al metabolismo de calcio, la prolactina participa en la resorción ósea (Suntornsaratoon et al., 2009), estimula la absorción de calcio en el intestino (Thongchote et al., 2008; Wongdee et al., 2016, 2019) e incrementa la reabsorción de calcio en los riñones (Kovacs, 2016). Por otro lado, al día del destete y durante la poslactancia, la disminución de la prolactina es importante para la involución de la glándula mamaria (Rakopoulos et al., 2006; Watson, 2006) y la remineralización ósea (Canul y Fernandez, 2019; Miller y Bowman, 2007).

Glucocorticoides

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas que se sintetizan y secretan en las glándulas adrenales. El principal glucocorticoide en humanos es el cortisol y en ratones la corticosterona. Los glucocorticoides regulan numerosos procesos fisiológicos como por ejemplo el metabolismo energético, la respuesta inmune, maduración de órganos como el pulmón y el riñón entre otros, así como el desarrollo fetal durante la gestación (Gross y Cidlowski, 2008). La secreción pulsátil de los glucocorticoides está regulado por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA) siguiendo ritmos circadianos y ultradianos (Whirledge y Cidlowski, 2017). Para la secreción de los glucocorticoides, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la vasopresina-arginina (AVP), esta última conocida también como la hormona antidiurética (ADH), lo que estimula la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la glándula pituitaria anterior y la síntesis de los glucocorticoides en la corteza de las glándulas adrenales (Whirledge y Cidlowski, 2017). La acción de los glucocorticoides se lleva a cabo mediante dos tipos de receptores presentes en la mayoría de los tejidos del cuerpo: el receptor de

glucocorticoides (GR) y el receptor de mineralocorticoides (MR) (Kadmiel y Cidlowski, 2013). El receptor de glucocorticoides es un receptor intracelular que pertenece a una subfamilia de la superfamilia de receptores nucleares (H. et al., 2004; Solano y Arck, 2020). Esta superfamilia también incluye los receptores de mineralocorticoides (MR), progesterona, andrógenos y estrógenos (Gronemeyer et al., 2004). Después de unirse a su receptor, el complejo receptor/glucocorticoide puede translocarse al núcleo para actuar como factor transcripcional y unirse a regiones específicas en el DNA y regular la expresión de diversos genes (H. et al., 2004; Solano y Arck, 2020).

Durante la gestación, los glucocorticoides incrementan en roedores y humanos (Wieczorek et al., 2019)(Carr et al., 1981) y participan en diversas funciones tanto en la madre como en el feto. Por ejemplo, los glucocorticoides intervienen en el desarrollo y maduración de diversos órganos en el feto, en particular en la maduración de los pulmones (Chida et al., 2011), aseguran la demanda energética materno-fetal (Wieczorek et al., 2019) y regulan el sistema inmune materno (Solano y Arck, 2020). Al momento del parto, los glucocorticoides se incrementan aún más, lo que sugiere que probablemente participen en el inicio y/o modulación del parto, sin embargo esta teoría hasta la fecha continúa en debate (Hollanders et al., 2017; Solano y Arck, 2020). Por otro lado, durante la lactancia los glucocorticoides actúan como señal anti-apoptótica en la glándula mamaria (Moran et al., 2000; Shiu y Iwasiow, 1985), y junto con la insulina y prolactina, participan en la síntesis de los componentes de la leche e intervienen en la secreción de leche en la glándula mamaria (Lechner et al., 1997; Schwalm y Tucker, 1978). Inmediatamente después del destete y durante los primeros días de poslactancia, la concentración de corticoesterona en ratas disminuye transitoriamente comparado con lo observado durante la lactancia (Windle et al., 2013).

Progesterona

La progesterona es una hormona esteroidea sintetizada en la corteza de las glándulas adrenales, en las gónadas (ovarios y testículos) y en el cuerpo lúteo y placenta durante la gestación (Goletiani et al., 2007). Su síntesis deriva del colesterol y tiene numerosas funciones en el cuerpo y el sistema reproductor (Arab et al., 2019; Magon y Kumar, 2012). La acción de la progesterona es a través de dos vías: vía genómica y no-genómica. La vía no-genómica es por medio de la

activación del receptor membranal de progesterona (mPRs) acoplados a proteína G (Boonyaratanakornkit et al., 2008; Valadez-Cosmes et al., 2016). La vía genómica se realiza a través de un receptor nuclear de progesterona (PR) localizado en el citoplasma. Una vez unido a su receptor nuclear, la progesterona se transloca al núcleo para regular la expresión de diversos genes. Existen tres isoformas del receptor nuclear de progesterona: PR-A, PR-B, y PR-C (Taraborrelli, 2015; Wetendorf y DeMayo, 2014).

Además de su participación durante el ciclo menstrual, la progesterona es crítica durante la gestación para el mantenimiento del endometrio, disminución de la contracción en el miometrio al momento de la implantación, regulación de la producción de mediadores inflamatorios, inicio del desarrollo de la glándula mamaria e inhibición de la lactancia y desarrollo del sistema nervioso central (SNC) en el feto (Arab et al., 2019; Wagner y Quadros-Mennella, 2017). Así mismo, junto con el estradiol, participa en el recambio óseo durante la gestación, lactancia y poslactancia (Prior, 2018).

Durante las primeras semanas de gestación, el cuerpo lúteo incrementa la secreción de progesterona y estradiol; sin embargo, después de la semana siete, disminuye su síntesis e incrementa la síntesis en los trofoblastos de la placenta, siendo este la principal fuente de producción de estas hormonas durante el resto de la gestación (Napso et al., 2018). Este incremento, junto con el aumento en los estrógenos e inhibina, producen disminución en la síntesis de la hormona folículo-estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Soma-Pillay et al., 2016). Durante la primera mitad de la lactancia en ratas, se incrementa gradualmente la concentración de la hormona y luego disminuye al final de la lactancia (Camacho-Arroyo et al., 2018; Grota y Eik-Nes, 1967; Taya, 1992). En la poslactancia, la progesterona en conjunto con el incremento de la hormona liberadora de gonadotropina, hormona luteinizante, hormona folículo-estimulante, podría participar en la recuperación e incremento de la densidad ósea (Prior, 2018).

Estradiol

El estradiol es una hormona producida por los ovarios durante la etapa reproductiva en mamíferos, y participa en la regulación del ciclo menstrual y en diversas funciones en diferentes órganos del cuerpo (Mauvais-Jarvis et al., 2013). Además del estradiol, otros tipos de estrógenos son: estrona, estriol y estetrol (Thomas y Potter, 2013). El estradiol puede ser sintetizado en diferentes tejidos extra gonadales, incluyendo la placenta durante la gestación (Simpson, 2003). Para la síntesis de

estradiol, la estrona puede ser convertida a estradiol por la enzima 17 Beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17-beta-HSD), o por aromatización de la testosterona (Escobar et al., 2011; Thomas y Potter, 2013). La acción del estradiol es a través del receptor intracelular de estradiol (ER). El ER es sintetizado como dos subtipos: ER alfa y ER beta (Green et al., 1986; Kastner et al., 1990; Kuiper et al., 1996). La interacción del receptor de estradiol con coactivadores es fundamental para el inicio de la expresión génica, siendo el coactivador 1 de receptor esteroide (SRC1) uno de los principales (Zhang et al., 2011).

Durante la gestación, el estradiol participa en la regulación del metabolismo de calcio al regular: la síntesis de vitamina D y de calcitonina, el metabolismo de hueso y la absorción de calcio en el intestino (Colin et al., 1999; Van Cromphaut et al., 2003; Kovacs, 2016). Además, el estradiol también modula las adaptaciones del sistema inmune materno (Solano y Arck, 2020). Por otro lado, durante lactancia la síntesis de estradiol se encuentra disminuida por el incremento de la prolactina (Kovacs, 2016; Lephart et al., 1992), así como por la ausencia de la placenta, principal fuente de síntesis de estradiol durante la gestación. Sin embargo en roedores, se ha reportado incremento en el estradiol en el día diez de lactancia (Taya y Greenwald, 1982). En humanos, la concentración de estradiol está disminuida durante las primeras semanas lactancia y luego se retorna a los niveles normales (Kovacs, 2016). Durante la lactancia el estradiol participa en la resorción ósea (Canul y Fernandez, 2019; Vanhouten y Wysolmerski, 2003), estimula la producción de PTHrP en la glándula mamaria (Rabbani et al., 2005), participa en la lactogenesis (Neville et al., 2002) y modula la expresión de calcitonina en la tiroides (Silver y Naveh-Many, 1993).

En la poslactancia, la disminución en la concentración de prolactina, así como incremento en la hormona liberadora de gonadotropina, y hormona folículo-estimulante, promueven incremento de los estrógenos, incluyendo el estradiol. En la poslactancia, el estradiol incrementa la apoptosis en los osteoclastos (Kovacs, 2016)

10. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Observaciones previas en nuestro laboratorio encontrando un aumento en la masa de los islotes pancreáticos maternos en el período después del destete (poslactancia) dieron origen a este proyecto. No existen trabajos en la literatura que reporten cambios morfológicos o funcionales en los islotes maternos en la poslactancia, por lo que en este trabajo planteamos investigar los cambios celulares y funcionales que acontecen en los islotes pancreáticos maternos durante la poslactancia. También, proponemos estudiar los mecanismos que participan en el crecimiento de los islotes, analizar cambios en la tolerancia a la insulina y a la glucosa, así como cambios en hormonas y metabolitos que pudiesen intervenir en las modificaciones que acontecen en los islotes maternos en la poslactancia. Dado que en este periodo la remineralización del hueso es un evento fisiológico de gran importancia, proponemos estudiar a la osteocalcina descarboxilada; una hormona ósea que tiene acciones sobre el islote pancreático y la tolerancia a la insulina.

11. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas la diabetes mellitus se ha posicionado como una de las enfermedades más importantes a nivel mundial, alcanzando proporciones epidémicas. En México, esta enfermedad se ha colocado como la principal causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres.

La disminución parcial o total de la masa y función de las células beta, es el común denominador en la aparición de los diferentes tipos de diabetes, por lo que son esenciales las investigaciones encaminadas a la identificación de las moléculas y mecanismos que regulan estos procesos (Hudish et al., 2019; Meier y Bonadonna, 2013; Weir et al., 2001).

Este trabajo ofrece una gran oportunidad de analizar cambios en el islote pancreático en un periodo fisiológico nunca antes estudiado, y que servirán como base para identificar moléculas y mecanismos involucrados en el incremento de la masa de los islotes; abriendo así un nuevo campo de estudio. Este conocimiento ayudará en el desarrollo de estrategias para la prevención y tratamiento de la diabetes.

12. HIPÓTESIS

En la poslactancia se aumenta la morfología de los islotes pancreáticos maternos, la secreción de la insulina, la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina a través del incremento en suero de la hormona osteocalcina descarboxilada.

13. OBJETIVOS

Caracterizar los cambios morfológicos y de composición celular, así como los mecanismos que acontecen en los islotes pancreáticos maternos durante las primeras dos semanas de poslactancia.

Objetivos particulares

Caracterizar en ratonas madre los cambios en la poslactancia sobre:

1. Morfometría de los islotes.
2. Porcentaje de proliferación de los islotes.
3. Homeostasis de la glucosa.
4. Concentraciones séricas de insulina, osteocalcina y calcio ionizado.
5. Secreción *in-vivo* de insulina estimulada por glucosa.
6. Contenido de serotonina en el islote pancreático.

14. MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo animal y diseño experimental

Ratonas de la cepa C57BL/6NHHsd fueron mantenidas bajo ciclos de luz-obscuridad de 12 horas, y con libre acceso a agua y alimento durante todo el periodo experimental (Envigo 2019S, Indianapolis, Indiana, USA), excepto en los periodos de ayuno. Los ratones fueron manejados de acuerdo con los principios de cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO- 1999; www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/), y en conformidad con los protocolos establecidos por el Comité de Ética para la Experimentación de Bioterio del Instituto de Investigación de

Biomédicas y por el Comité de Ética para la Experimentación Biomédica del Instituto Nacional de Pediatría (Proyecto 031/2015).

Se formaron grupos de apareamiento colocando dos hembra de nueve semanas de edad y un macho en una misma jaula durante tres días. La revisión y presencia del tapón vaginal en el área genital de las hembras, se utilizó para confirmar el éxito de la cópula, y aquellas hembras que lo presentaban fueron colocadas en cajas separadas e individuales considerando el día de aparición del tapón como el día 0 de gestación. Para la reconfirmación de la gestación, se tomaron en cuenta el aumento de peso corporal y conductas de “nidación” de las hembras. A partir del día de aparición del tapón vaginal, el macho fue removido de la caja de cruce. Al día del parto, el número de crías en la camada fue ajustada a 4-6 por ratona lactante, y el resto de las crías fueron anestesiados y sacrificados con Sevorane (Sevoflurane, Abbot Laboratories, Mexico). Las muestras de tejidos y sangre se obtuvieron en el día del destete (L21), un día, tres, siete y catorce días después del destete, así como un grupo de ratonas vírgenes (pareadas según la edad del grupo experimental). Para la obtención de las muestras, las ratonas fueron ayunadas 16 horas y anestesiadas con Sevorane previo a la obtención de sangre y disección del páncreas. Finalmente, se administró una dosis letal de Sevorane (Sevoflurane, Abbott Laboratories, Ciudad de México, México). Las muestras biológicas fueron procesadas como se describe en los párrafos siguientes (para la extracción de sangre y páncreas). El peso corporal de las ratonas fue monitoreado a lo largo del protocolo, desde el momento de su adquisición hasta el día de la obtención de las muestras.

Inmunohistoquímica y análisis morfométricos

La fijación del tejido pancreático se realizó sumergiendo el tejido durante 6 horas en formalina-amortiguada PBS al 4% a temperatura ambiente. Después, se deshidrataron en una serie de concentraciones crecientes de etanol y xilol (etanol al 50°, 70°, 90°, 96° y 100°, etanol 100°/xilol y xilol puro, 1h en cada uno). Para la inclusión de los tejidos, estos se embebieron en parafina (Paraplast, Sherwood Medical Co.) durante una hora, y se montaron en cassettes histológicos para la obtención de cortes de 2 µm de grosor. Finalmente, los cortes se colocaron en laminillas tratadas con polilisina-L (Sigma-Aldrich),

Análisis de insulina y glucagón en el islote

Para la detección de insulina y glucagón, las laminillas se desparafinaron y rehidrataron con una serie de concentraciones de xilol y etanol en el orden inverso al utilizado en la deshidratación: 4 min en cada dilución y un lavado con PBS 1x por 5 min. Se realizó la recuperación de antígeno sumergiendo las laminillas en buffer de citratos (pH6) durante 20 min a 90°C. Luego, las laminillas se permeabilizaron con suero normal de cabra al 1% y Tritón X-100 al 0.3% durante 30 minutos, y se bloquearon con suero normal de cabra al 2%. Posteriormente, las laminillas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: anticuerpo policlonal de cobayo anti-insulina (1:100; Thermo Fisher Scientific # PA1-26938) o anticuerpo monoclonal de ratón anti-glucagón (1:4000; Sigma # G 2654, St Louis Mo, USA), ambos diluidos en PBS 1x con suero normal de cabra al 1%. Después de la incubación, las laminillas se lavaron 3 veces con PBS1x durante 3 minutos y se incubaron por 1 hora con sus respectivos anticuerpos secundarios: anti- inmunoglobulina G (IgG) de cobayo conjugado con Alexa Fluor488 (1:500) para la detección de insulina, y anti- inmunoglobulina G (IgG) de ratón conjugado con Cy3 (1:800) para la detección de glucagón (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA). Las laminillas se lavaron tres veces con PBS1x durante 5 minutos, y los núcleos se tiñeron con 4', 6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma, St. Louis MO, USA) durante 5 minutos para el conteo del número de células. Finalmente, las laminillas se cubrieron con cubreobjetos montados con medio para montaje fluorescente (Dako).

El análisis morfométrico de los islotes se realizó en el páncreas total de cada ratón usando cortes longitudinales de un área de $43.8 \pm 1.42 \text{ mm}^2$. Esto no permitió analizar todos los lóbulos que conforman el páncreas de ratón. El análisis fue realizado por tres personas independientes quienes desconocían el grupo experimental de estudio.

Para analizar el área y el número de células de los islotes, se obtuvieron micrografías utilizando un microscopio Olympus Olympus IX71 (Tokyo, Japón) acoplado a una cámara digital (Olympus DP72, Shinjuku City, Tokyo, Japón) bajo una magnificación de 20X. El área del páncreas total se analizó a partir de imágenes obtenidas con un microscopio Olympus BX51-WI acoplado a unidad de disco giratorio (DSU) (Shinjuku City, Tokyo, Japón), a 4X unida a una cámara Hamamatsu C9100 EM-CCD (Hamamatsu City, Japón). Todas las imágenes se adquirieron utilizando los mismos parámetros de configuración para todas las laminillas.

El área de los islotes se obtuvo mediante análisis manual e individual de cada islote. Los islotes con menos de 4 núcleos fueron considerados como "*cluster positivos a insulina*"

(Beamish et al., 2017; Montanya y Téllez, 2009). Para el conteo del área promedio de los islotes se analizaron los islotes con más de 4 núcleos (Beamish et al., 2017; Montanya y Téllez, 2009). La fracción (porcentaje) del área del islote fue determinado mediante la división de: la sumatoria del área de todos los islotes en una sección de páncreas, entre el área total de esa misma sección de páncreas, y multiplicando esta proporción por 100 (Toselli et al., 2014). Para obtener la masa del islote, se multiplicó la fracción del islote por el peso del páncreas. Para el análisis de la distribución del tamaño de los islotes, estos se clasificaron en tres categorías: islotes pequeños ($< 10,000 \mu\text{m}^2$), islotes medianos ($10,000\text{-}25,000 \mu\text{m}^2$) e islotes grandes ($> 25,000\mu\text{m}^2$) (Vasu et al., 2014). El resultado representa el promedio de 280–320 islotes de 3–4 cortes proveniente de 4–6 animales por cada grupo experimental.

Tamaño y número de células por islote

El área de las células alfa y células beta se determinó mediante delimitación manual del área positiva a glucagón e insulina en cada uno de los islotes. El número total de células alfa y células beta se obtuvo al contabilizar el número de núcleos positivos a DAPI. Para determinar el área individual de las células alfa, el área de las células alfa se dividió entre el número de núcleos presentes en esta misma área positiva a glucagón. De igual forma, para el área individual promedio de las células beta, el área de las células beta se dividió entre el número de núcleos presentes en esta misma área positiva a insulina (Scaglia et al., 1995). El resultado representa el promedio de 150–200 islotes tomados aleatoriamente de 2–3 cortes provenientes de 4–6 animales por cada grupo experimental. Los análisis morfométricos se obtuvieron con ayuda del programa Image J 1.40 software (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA).

Análisis de proliferación celular

La proliferación de los islotes se evaluó mediante el análisis de expresión nuclear de Ki67, utilizando un sistema de detección con polímeros libre de biotina (Novolink Polymer detection system Novocastra RE7260-CC, Leica, Wetzlar, Alemania). Las laminillas con cortes pancreáticos de 2- μm de grosor se desparafinaron, y se prosiguió con la recuperación de antígeno en una cámara de presión con buffer de citratos a 121°C por 30 segundos. Se utilizó peróxido de hidrogeno al 0.9% por 5 minutos para bloquear la actividad endógena de la peroxidasa. Después,

las laminillas se incubaron con anticuerpo monoclonal de conejo anti-Ki67 (1:100 clone Sp6 BioCare, Pacheco, CA, USA) por 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las laminillas se lavaron e incubaron con anti-inmunoglobulina G (IgG) de conejo conjugado HRP por 10 minutos a temperatura ambiente. Células positivas a Ki67 se detectaron utilizando solución de 3, 3'-diaminobenzidina (BioCare, Pacheco, CA, USA) por 5 minutos, y contrastado con hematoxilina.

Curvas de tolerancia a la glucosa, curvas de tolerancia a la insulina y secreción de insulina durante la prueba de tolerancia a la glucosa

Todas las curvas de tolerancia a la glucosa y tolerancia a la insulina, se realizaron entre las 9:00 am–10:30 am. Para la prueba de tolerancia a la glucosa, los ratones se mantuvieron en ayuno toda la noche (16 h) antes de la prueba. y se les administró glucosa intraperitoneal a una dosis de 2 g/kg peso corporal. Se midieron las concentraciones de glucosa sanguínea antes de la inyección, y a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la inyección, y recolectando una gota de sangre de la punta de la cola (Glucómetro Abbott Freestyle Optium, Ciudad de México, México). Para el análisis de la secreción de insulina *in-vivo*, se colectaron muestras de sangre de la vena de la cola para la medición insulina en suero durante la prueba de tolerancia a la glucosa. Se analizó la insulina antes de la inyección de glucosa (tiempo 0), y a los 5, 20, 30 y 60 minutos posteriores a la inyección (Lazo de la Vega et al., 2013).

Para la prueba de tolerancia a la insulina, los ratones tuvieron acceso *ad libitum* de alimento y agua hasta el inicio de la prueba. Las concentraciones de glucosa se midieron en muestras de sangre de la cola antes de la inyección intraperitoneal (tiempo 0), y a los 15, 30 y 60 minutos posteriores a la inyección de 1 IU/kg de peso de insulina regular humana (Eli Lilly, Ciudad de México, México). Las concentraciones de glucosa se determinaron usando un glucómetro (Glucómetro Abbott Freestyle Optium, Ciudad de México, México). El área bajo la curva (AUCs) se determinó utilizando el software Prism versión 7 (GraphPad Software Inc.).

Cuantificación de insulina, osteocalcina y calcio ionizado.

Las muestras de sangre se obtuvieron en los días correspondientes mediante punción cardíaca y se colectaron en tubos de polipropileno con 5 ul de heparina y 5ul de inhibidor de proteasas Complete® (Roche). Los tubos se centrifugaron a 10000 x rpm durante 10 min a 4°C. Posterior a la centrifugación, el suero se colectó y almacenó a -70° C hasta su uso.

Las concentraciones de insulina se cuantificaron mediante ensayo ELISA, usando el de kit ALPCO (ALPCO Catálogo Número 80-INSRT-E0, Salem, NH, USA). El límite de detección fue de 0.124 ng/mL.

La osteocalcina descarboxilada se cuantificó usando un kit ELISA de alta sensibilidad para Glu-osteocalcina de ratón (TAKARA BIO INC. Cat. # MK129, Kusatsu, Shiga Prefecture, Japón) con límite de detección fue de 0.25 ng/mL.

El calcio ionizado se determinó por ensayo colorimétrico con el Kit QuantiChrom Calcium (DICA-500) (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) con limite de deteccion de 0.08 mg/dl. Todas las cuantificaciones se realizaron siguiendo las especificaciones de cada kit de ELISA. Las absorbancias se midieron usando un lector de placas de múltiple detección, Synergy HT BioTek (Winooski, Vermont, USA).

Análisis de serotonina en el islote

El contenido de serotonina en cada islote fue analizado en laminillas con corte de 2- μ m de grosor de páncreas mediante su detección por inmunofluorescencia, utilizando el método descrito anteriormente. Las laminillas fueron incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal anti-5-HT (Serotonina) de conejo (1:1000 InmunoStar, #20080, Dublin, Ohio, USA). Posteriormente, las laminillas se lavaron e incubaron con el anticuerpo anti-inmunoglobulina G (IgG) de conejo conjugado con Alexafluor594 (1:500) (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA). El número de células positivas a serotonina se expresó como el porcentaje respecto al número total de células en el islote.

Análisis estadístico

Los datos representan la media \pm ES. La letra “n” representa el número de muestras o sujetos evaluados. Los datos se analizaron por medio de una prueba de ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* para análisis múltiple. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism version 7. Los valores de *p* menores a 0.05 se consideraron como estadísticamente significativos.

15. RESULTADOS

Cambios en el peso corporal y el peso del páncreas materno durante la poslactancia.

A partir del día del cese de la lactancia, y durante los primeros catorce días de poslactancia, el peso corporal materno no presentó diferencias significativa entre el grupo control-edad virgen (control=23.4 ± 0.36 g), el grupo al día del destete (PL0= 24.4 ± 0.48 g), y los grupos de ratonas de uno, dos, tres, siete y catorce días de poslactancia (PL1= 24.1 ± 0.47 g; PL3= 23.8 ± 0.32 g; PL7= 23.4 ± 0.36 g y PL14= 24.6 ± 0.33 g) (**Figura 9A**). El peso del páncreas tampoco presentó diferencias significativas entre las ratonas al final de la lactancia (PL0= 389 ± 24.7 mg), y los grupos de ratonas de uno, dos, tres, siete y catorce días de poslactancia (PL1= 375 ± 15.0 mg; PL3= 371 ± 20.5mg; PL7= 394 ± 21.5 mg y PL14= 421 ± 17.3 mg) y el grupo de ratones control (control=357 ± 33.0 mg) (**Figura 9B**).

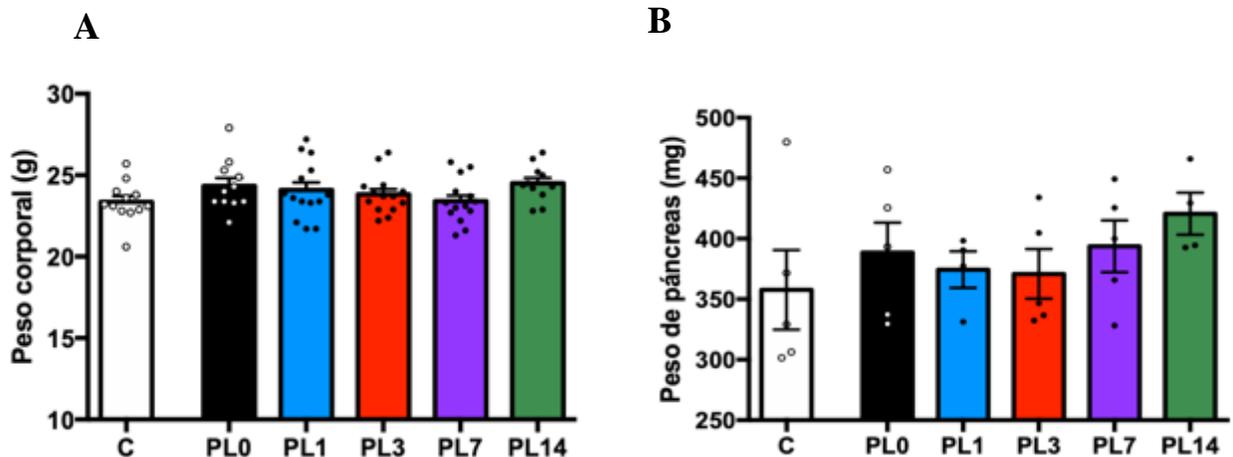


Figura 9. Peso corporal total y peso de páncreas. *Panel A:* Los puntos individuales en cada barra representa el peso corporal de cada ratón analizado. Las barras representan la media ± ES de 12–14 ratones por cada grupo experimental. *Panel B:* Los puntos individuales en cada barra representa el peso del páncreas de cada ratón analizado. Las barras representan la media ± ES de 4–5 ratones por cada grupo experimental.

Cambios en la morfometría y morfología de los islotes maternos durante la poslactancia

Área de los islotes pancreáticos materno

Para determinar si el ambiente hormonal y fisiológico de la poslactancia modifica la morfología de los islotes materno, se analizó y comparó el área promedio de los islotes al día del destete

(PL0) y uno, tres, siete y catorce días de poslactancia (PL1, PL3, PL7, and PL14) comparado con el grupo control. Como se muestra en la **Figura 10A y 10B**, la morfometría del islote se modificó durante la poslactancia. No se observaron diferencias entre el área promedio del islote al final de la lactancia (PL0=8,598 ± 729 μm²) y el grupo control (control=8,361 ± 625 μm²). Sin embargo, se observó un incremento significativo y gradual en el área promedio de los islotes al día uno (PL1=12,239 ± 819 μm²) y al día tres (PL3=15,102 ± 986 μm²) de poslactancia. Posteriormente de este incremento, el tamaño de islote disminuyó gradualmente (PL7=11,017 ± 829 μm²) (p < 0.05) hasta alcanzar al día catorce de poslactancia (PL14=8,250 ± 909 μm²), un área comparable a lo encontrado en el grupo control y al final de la lactancia (Imágenes representativas de los islotes se muestran en la figura **10B**).

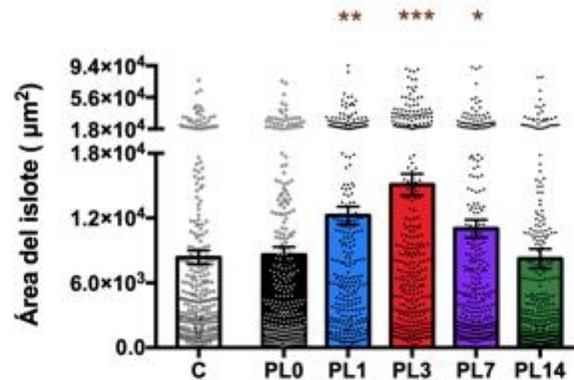
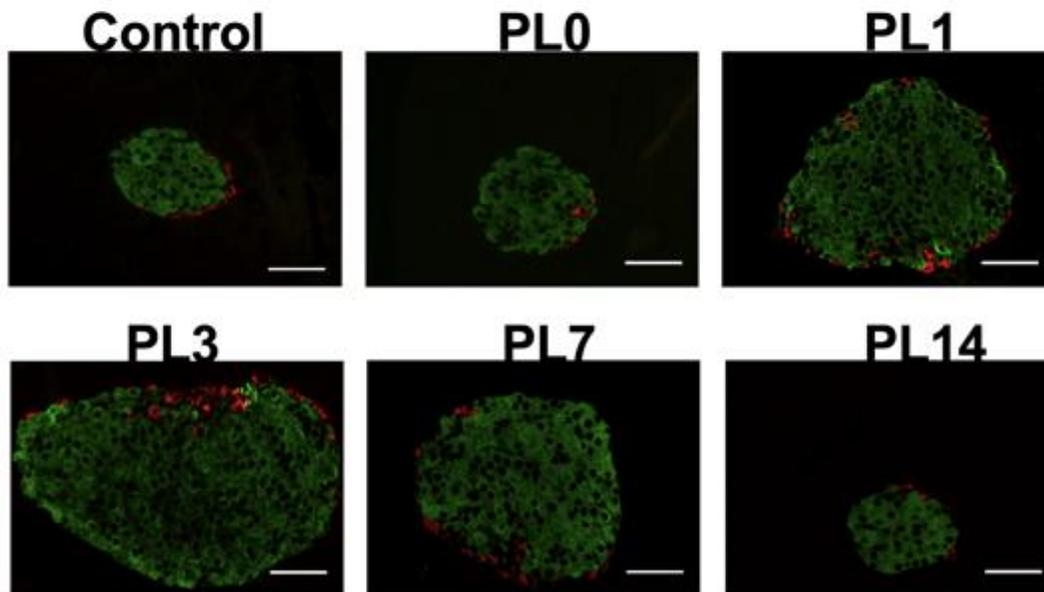
A**B**

Figure 10. Morfometría de los islotes pancreáticos. *Panel A:* Los puntos individuales en cada barra representa el área de cada islote analizado. Las barras representan la media \pm ES de 280–320 islotes de 4–6 ratones para los grupos control virgen (C), día del destete (PL0), y día 1 (PL1), tres (PL3), siete (PL7), y catorce (PL14) de poslactancia. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$ comparado con el grupo control. *Panel B:* Imágenes representativas de cortes de páncreas tratados con anticuerpo para insulina (verde) y glucagón (rojo) en ratones control (C), día del destete (PL0), y día 1 (PL1), tres (PL3), siete (PL7), y catorce (PL14). La escala equivale a 50 μm .

Distribución de frecuencia de área en los islotes maternos

El análisis de distribución en la frecuencia de área de los islotes reveló que, comparado con el grupo control y el grupo al día del destete, al día uno y tres días de poslactancia la proporción de islotes pequeños ($<10,000 \mu\text{m}^2$) disminuyó, y la proporción de islotes grandes ($>25,000 \mu\text{m}^2$) se incrementó de manera significativa. Al día catorce de poslactancia, la frecuencia de islotes pequeños y grandes retornaron a los observados al día del destete y en el grupo control. No se encontraron diferencias significativas en las distribuciones de los islotes de tamaño mediano ($10,000-25,000 \mu\text{m}^2$) (**Figura 11A**).

Fracción del área de los islotes pancreáticos materno

Al día del destete, la fracción del islote no presentó diferencias significativas comparado con lo observado en el grupo control (control= 0.42 ± 0.058 %; PL0= 0.46 ± 0.031 %). No obstante, al día uno y tres de poslactancia, se observó un incremento significativo ($p < 0.005$) en la fracción del islote (PL1= 0.70 ± 0.09 %; PL3= 0.69 ± 0.062 %); mismo que retornó de manera paulatina a lo observado en el día del destete, hasta el día catorce de poslactancia (PL7= 0.58 ± 0.066 %, PL14= 0.44 ± 0.046 %) (**Figura 11B**).

Masa de los islotes pancreáticos materno

Al final de la lactancia la masa del islote tampoco presentó diferencias significativas comparada con lo observado en el grupo control (control= 1.47 ± 0.185 mg; PL0= 1.64 ± 0.101 mg). Al día uno y tres de poslactancia se incrementó de manera significativa la masa del islote ($p < 0.05$) (PL1= 2.58 ± 0.329 mg; PL3= 2.62 ± 0.236 mg), y subsecuentemente se presentó una disminución (PL7= 2.18 ± 0.257 mg) hasta alcanzar al día catorce de poslactancia la masa encontrada al día del destete (PL14= 1.75 ± 0.160 mg) (**Figura 11C**).

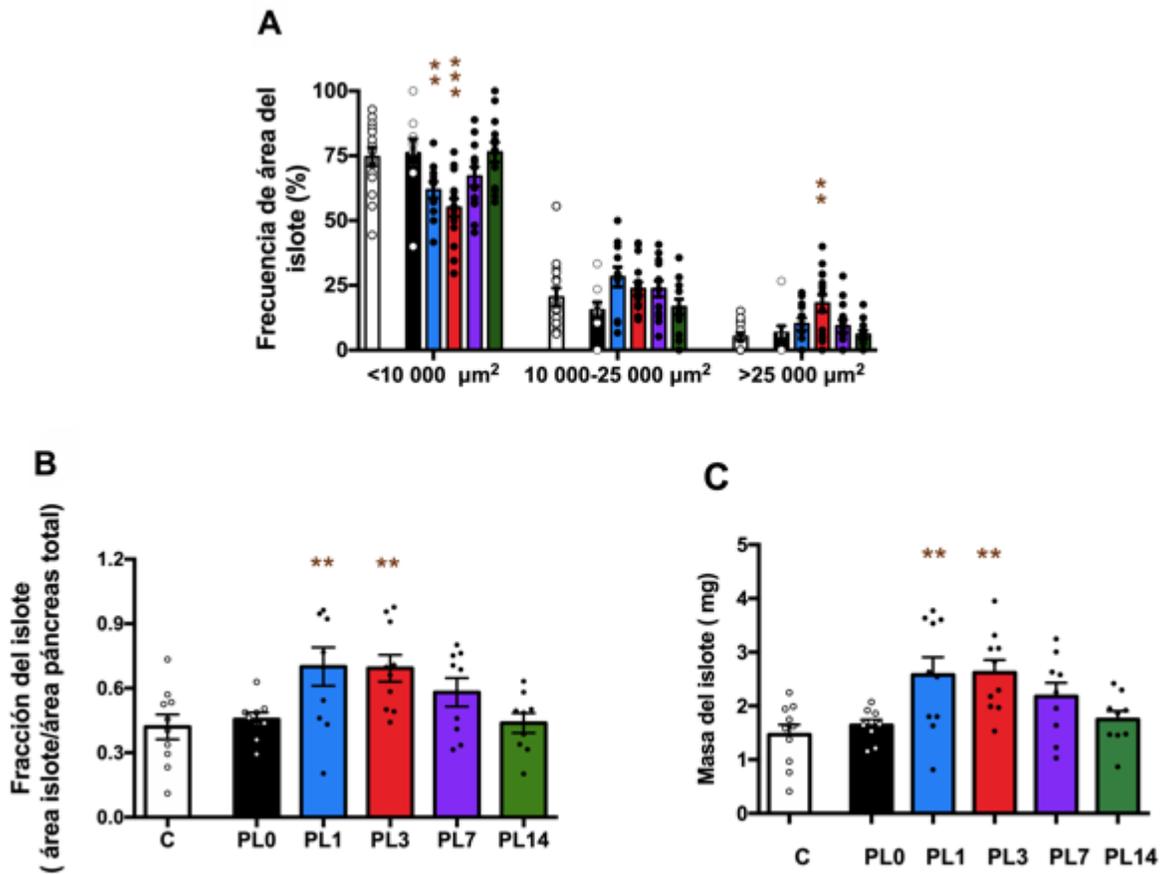


Figure 11. Morfometría de los islotes pancreáticos. *Panel A:* Los puntos individuales en cada barra representan la distribución de frecuencia (porcentaje) de los islotes en cada laminilla (corte) de páncreas. Las barras representan la media \pm ES de 9–15 cortes de páncreas por grupo experimental del total del número de islotes analizados. Control (barra blanca), día del destete (barra negra) y días de poslactancia: día uno (azul), tres (rojo), siete (morado) y catorce (verde). *Panel B:* Los puntos individuales en cada barra representan la fracción del islote en cada laminilla (corte) de páncreas en el grupo control (C), al día del destete (PL0) y al día uno (PL1), tres (PL3), siete (PL7) y catorce (PL14) de poslactancia. Las barras representan la media \pm ES de 9–15 cortes de páncreas por grupo experimental. *Panel C:* Los puntos individuales en cada barra representan la masa del islote por cada ratón en el grupo control (C), al día del destete (PL0) y al día uno (PL1), tres (PL3), siete (PL7) y catorce (PL14) después de finalizada la lactancia. Las barras representan la media \pm ES de 9–10 ratones por grupo experimental. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$ comparado con el control.

Cambios en la composición de células alfa y células beta en los islotes maternos durante la poslactancia

Número de células beta en los islotes maternos

Nuestros datos revelaron que, a partir del primer día de poslactancia, el número de células beta se incrementó paulatinamente (PL1=100 ± 8.52 células beta /islote; $P<0.005$) hasta alcanzar su número máximo al tercer día de poslactancia (PL3=118 ± 10.9 células beta /islote; $P<0.0005$). Al día siete de poslactancia (PL7=83.6 ± 8.56 células beta/islote), se inició una disminución en el número de células beta, hasta alcanzar al día catorce de poslactancia los valores observados al día del destete (PL14=62 ± 6.91 células beta /islote; PL0=64.4 ± 6.45 células beta /islote). No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo al día del destete (Control = 66.4 ± 5.68 células beta /islote) (**Figura 12A**).

Tamaño individual de las células beta en los islotes maternos

A partir del día del destete se observó un incremento significativo en el tamaño de las células beta comparado con el grupo control-edad (control=86.6 ± 2.61 μm^2 ; PL0=100 ± 2.2 μm^2). La expansión máxima en el tamaño de las células beta se alcanzó al día tres de poslactancia (PL3=120 ± 2.9 μm^2). Contrario a la mayoría de los datos examinados, los cuales regresan a los niveles observados en el grupo control, el incremento en el tamaño de las células beta persistió hasta el día catorce de poslactancia (PL7= 114 ± 2.92 μm^2 ; PL14=113 ± 3.01 μm^2) (**Figura 12B**).

Número de células alfa en los islotes maternos

La comparación en el número de células alfa en el islote entre el grupo control y los diferentes grupos de poslactancia, mostraron una disminución de manera significativa ($P<0.0005$) desde el día del destete, y permaneció de esta manera a lo largo de los catorce días de poslactancia (control=14.6 ± 1.26; PL0=7.40 ± 0.69; PL1=10.9 ± 1.05; PL3=9.35 ± 0.95; PL7=10.7 ± 1.40; PL14=8.05 ± 1.14 células alfa/islote) (**Figura 12C**).

Tamaño individual de las células alfa en los islotes maternos

El tamaño individual promedio de las células alfa entre los grupos control virgen, el grupo al día del destete (control=77.3± 3.86 μm^2 ; PL0= 79.9 ± 3.79 μm^2) y a lo largo de catorce días de

poslactancia, no presentaron diferencias significativas (PL1= 80 ± 2.86 ; PL3= 84.7 ± 3.77 ; PL7= $84.4 \pm 3.3 \mu\text{m}^2$, PL14= $72.6 \pm 3.6 \mu\text{m}^2$) (Figura 12D).

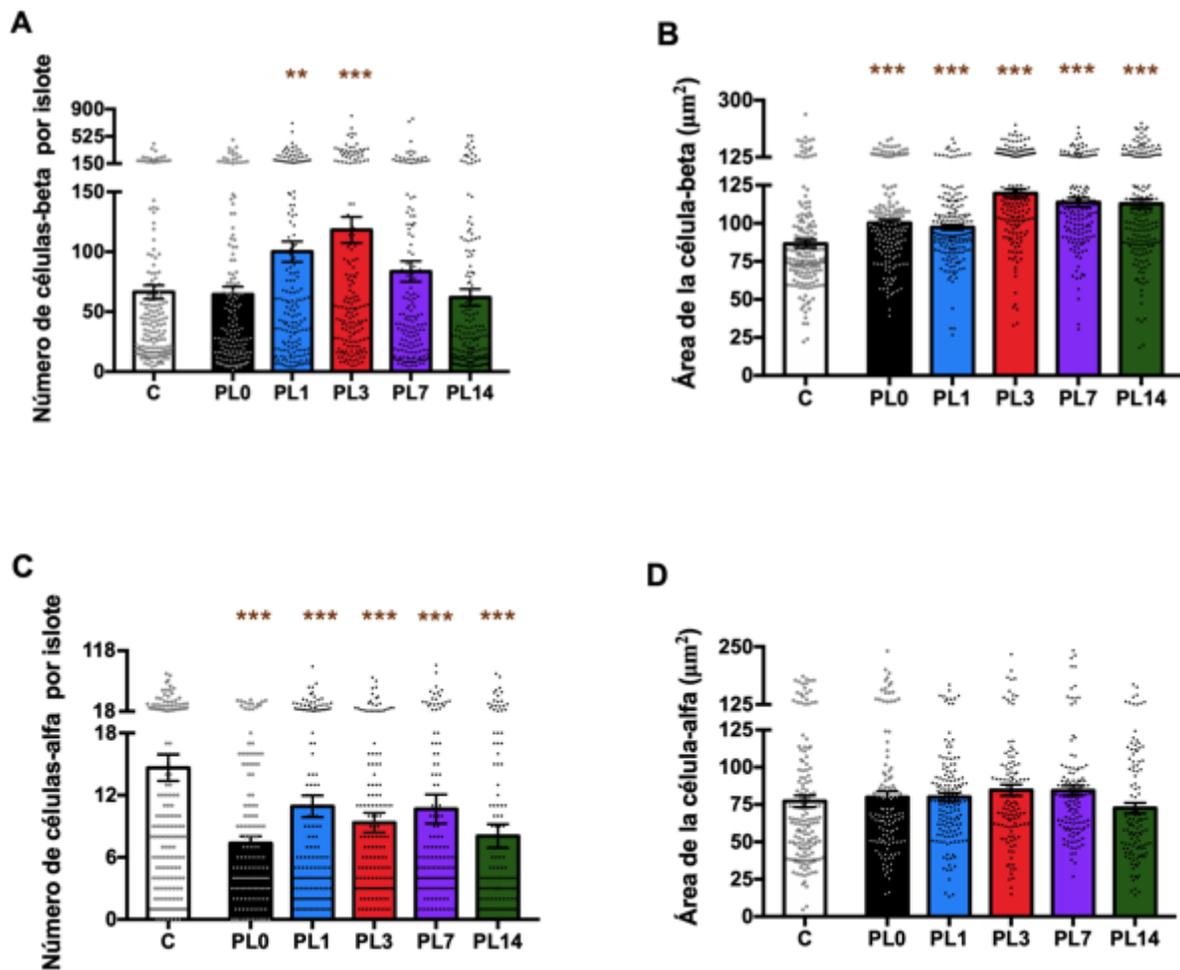


Figura 12. Composición de los islotes pancreáticos. *Panel A y B:* Los puntos individuales en cada barra representan el número de células beta por islote y el área de las células beta individual por islote respectivamente. *Panel C y D:* Los puntos individuales en cada barra representan el número de células alfa por islote y el área de células alfa individual por islote respectivamente. Las barras representan la media \pm ES de 150–200 islotes tomados de manera aleatoria, provenientes de 2–3 laminillas por animal de 4–6 ratones por cada grupo experimental. Grupo control virgen parado en edad (barra blanca), día del destete (PL0), y día uno (PL1), tres (PL3), siete (PL7), y catorce (PL14) de poslactancia. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$ comparado con el control.

Cambios en la proliferación de los islotes maternos durante la poslactancia

Como se muestra en las figuras 13A y 13B, nuestro estudio reveló que el porcentaje de proliferación celular, analizado a través del conteo de células positivas a Ki67, fue

significativamente mayor ($P < 0.005$) desde el día del destete ($PL0 = 1.48 \pm 0.18 \%$) comparado con el grupo control ($control = 0.66 \pm 0.091 \%$). Este incremento en el porcentaje de proliferación se mantuvo elevado al día uno y tres de poslactancia ($PL1 = 1.35 \pm 0.24\%$; $PL3 = 1.23 \pm 0.18 \%$). En el día siete y catorce de poslactancia, el porcentaje de proliferación decayó súbitamente a valores inferiores a los observados en el grupo control ($PL7 = 0.47 \pm 0.088 \%$, $p > 0.05$) ($PL14 = 0.33 \pm 0.083 \%$; $P < 0.05$). Al observar que la proliferación celular se encontraba incrementada desde el día del destete, y debido de que los cambios en el islote se observan a los pocos días de poslactancia (entre el día 1 y 3 de poslactancia), decidimos analizar también el porcentaje de proliferación pocos días antes de iniciar el destete. Para este trabajo decidimos analizar la proliferación del islote dos días antes del destete (día 19 de lactancia). Nuestro estudio reveló que la proliferación se encontraba también incrementada al día 19 de lactancia ($L19 = 1.50 \pm 0.18\%$), y que estos valores fueron similares a los encontrados al día del destete, así como al día uno y tres de poslactancia.

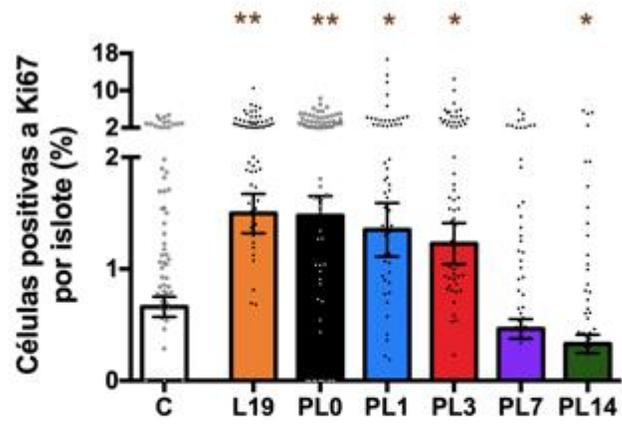
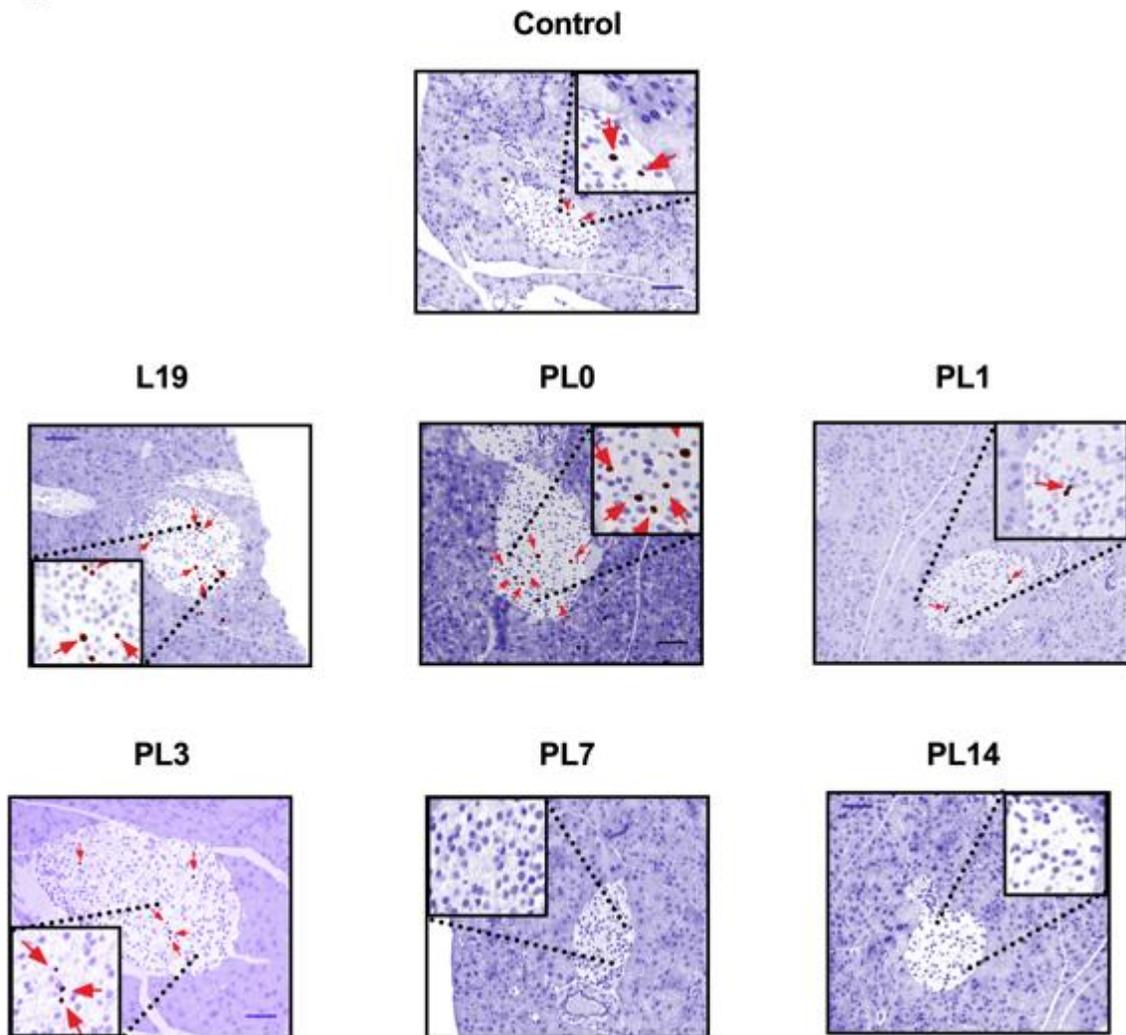
A**B**

Figura 13. Proliferación celular en los islotes pancreáticos. *Panel A:* Los puntos individuales en cada barra representa el porcentaje de células positivas a Ki67 por cada islote analizado. Las barras representan la media \pm ES de 4-5 ratones por cada grupo experimental. Grupo control virgen parado en edad (barra blanca), día diecinueve de lactancia (L19), día del destete (PL0), y día uno (PL1), tres (PL3), siete (PL7), y catorce (PL14) de poslactancia. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$ comparado con el control. *Panel B:* Imágenes representativas de células positiva a Ki67 en el núcleo del islote pancreático. La flecha roja indica núcleos positivos a Ki67 (color marrón). La escala equivale a 50 μ m.

Cambios en la homeostasis de la glucosa materna durante la poslactancia

Concentración de glucosa en sangre

Debido a que el incremento en el tamaño de los islotes pancreáticos está relacionado con cambios en la homeostasis de la glucosa (Baeyens et al., 2016), se analizó la homeostasis de la glucosa durante la poslactancia. Las concentraciones de glucosa en ayuno no difirieron entre los ratones control, al día del destete, y al día uno, siete y catorce de poslactancia. Sin embargo, al día tres de poslactancia se observó un incremento significativo ($P < 0.05$) de la glucosa en ayuno comparado con el grupo control (**Figura 14A**). No encontramos diferencias significativas en los niveles de glucosa sanguínea en ratones no-ayunados entre los diferentes grupos experimentales (**Figura 14B**).

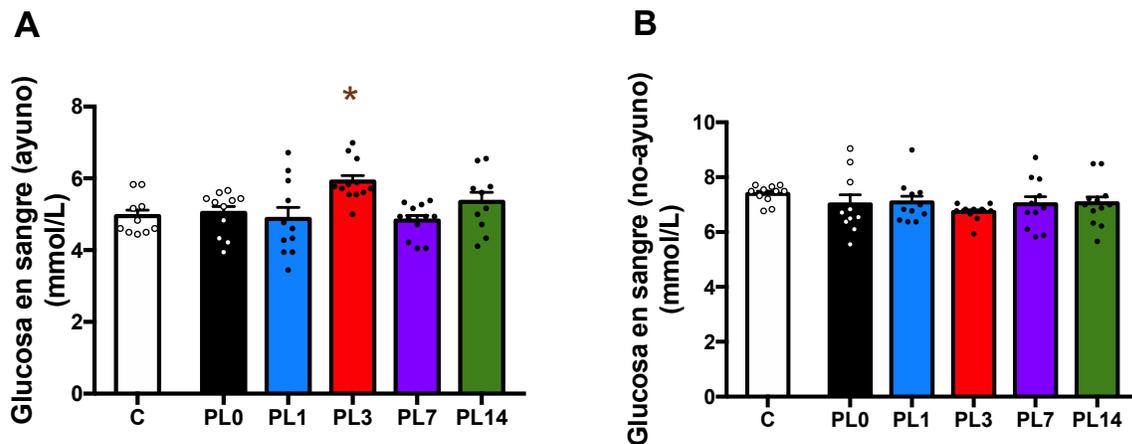


Figura 14. Concentraciones de glucosa en sangre en condiciones de ayuno y no-ayuno. *Panel A:* Los puntos individuales en cada barra representan la concentración de glucosa en sangre en condición de ayuno por cada ratón. Las barras representan la media \pm ES de 10-12 ratones por cada grupo experimental. *Panel B:* Los puntos individuales en cada barra representa la concentración de glucosa en sangre en condición de no-ayuno por cada ratón. Las barras representan la media \pm ES de 10-12 ratones por cada grupo experimental. Grupo control virgen parado en edad (barra blanca), día del destete (PL0), y día uno

(PL1), tres (PL3), siete (PL7), y catorce (PL14) de poslactancia * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$ comparado con el control.

Tolerancia a la glucosa

El análisis de las curvas de glucosa reveló un incremento en la tolerancia a la glucosa en el grupo de ratonas al día del destete, así como los grupos del día uno, tres y siete de poslactancia, comparados con el grupo control. Al día catorce de poslactancia, se presentó una recuperación en la tolerancia a la glucosa a valores similares a los encontrados en el grupo control (**Figura 15A**). Los promedios del área bajo la curva en los diferentes grupos experimentales fueron: control=184.9 \pm 6.34; PL0=193 \pm 17.8; PL1=209 \pm 4.57; PL3=223 \pm 5.2; PL7=182 \pm 5.6; PL14=199 \pm 5.4 unidades arbitrarias (**Figura 15B**).

Curva de tolerancia a la insulina

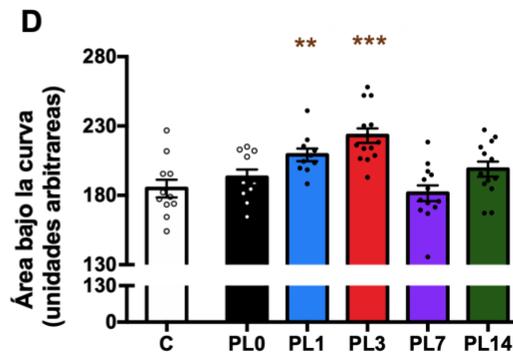
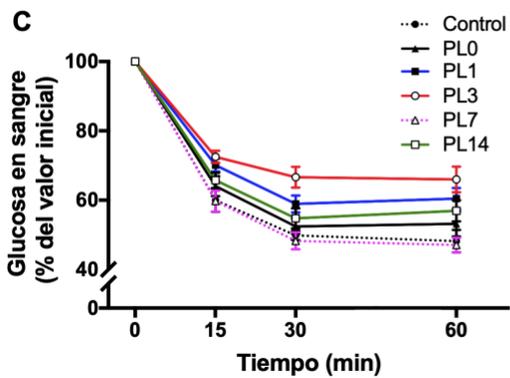
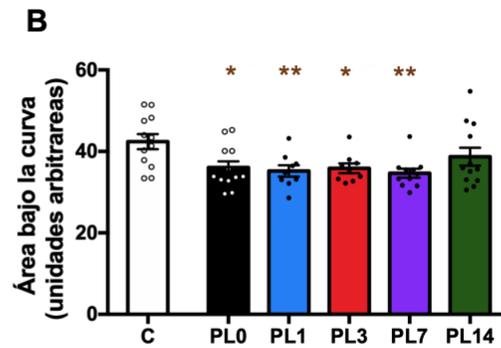
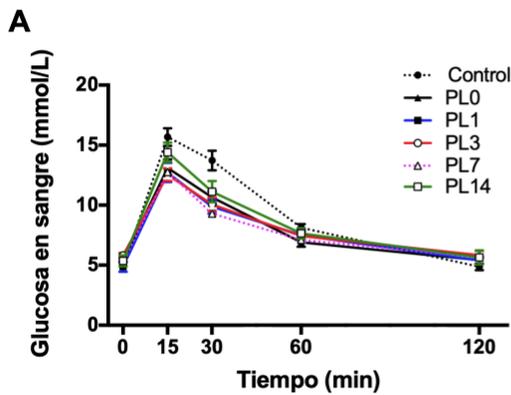
El análisis del área bajo la curva en las pruebas de tolerancia a la insulina no reveló diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de ratonas al día del destete (Control=185 \pm 6.34 unidades arbitrarias; PL0=193 \pm 5.64 unidades arbitrarias; $p > 0.05$). Sin embargo, a partir del día uno de poslactancia, se observó una disminución gradual en la sensibilidad a la insulina hasta alcanzar su valor máximo a los tres días de poslactancia (PL1=209 \pm 4.58; PL3=223 \pm 5.20 unidades arbitrarias). A partir del día siete de poslactancia, los valores de las curvas de tolerancia a la insulina retornaron a los valores observados en el grupo control (PL7=182 \pm 5.68; PL14=199 \pm 5.43 unidades arbitrarias) (**Figura 15C y 15D**).

Cambios en la insulina basal y secreción in-vivo de insulina materna durante la poslactancia

Con el fin de determinar cómo el entorno fisiológico de la poslactancia modifica la secreción de la insulina, analizamos la secreción de insulina *in vivo* durante la curva de tolerancia a la glucosa. Los datos revelaron un incremento en la concentración de la insulina en suero en respuesta a la glucosa al día tres de poslactancia (**Figura 15E y 15F**). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos control, al día del destete y al día uno y catorce de poslactancia. Al día siete de poslactancia, se encontró una reducción en la secreción de insulina estimulada por

glucosa, y el cual coincide con la mayor sensibilidad de insulina observada durante la prueba de tolerancia a la insulina (**Figura 15F**).

El análisis de la concentración de insulina en suero en condiciones de ayuno, reveló un incremento del 27% al día tres de poslactancia comparado con el grupo control (Control= 49.34 ± 2.72 pmol/L, PL3= 62.87 ± 5.33 pmol/L; $p < 0.05$) (**Figura 15 G**).



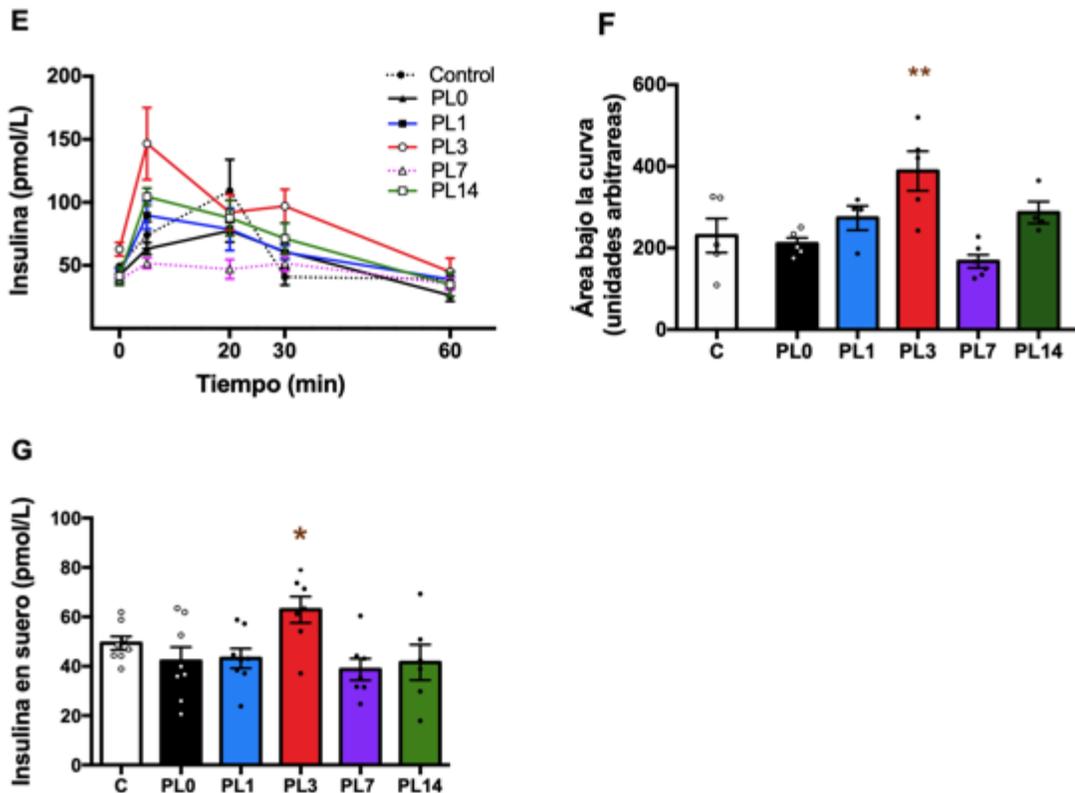


Figura 15. Pruebas de tolerancia a la glucosa e insulina, y secreción in-vivo de insulina. *Panel A:* Concentración de glucosa en sangre durante la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal. *Panel B:* Los puntos individuales en cada barra representa el área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en cada ratón. Las barras representan la media \pm ES de 9-12 ratones por cada grupo experimental. *Panel C:* Porcentaje de glucosa respecto al basal (minuto 0) durante la curva de tolerancia a la insulina. *Panel D:* Los puntos individuales en cada barra representa el área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la insulina en cada ratón. Las barras representan la media \pm ES de 10-14 ratones por cada grupo experimental. *Panel E:* Concentración de insulina durante la prueba de tolerancia a la glucosa. *Panel F:* Los puntos individuales en cada barra representa el área bajo la curva de la de la concentración de insulina durante la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal por ratón. Las barras representan la media \pm ES de 4-6 ratones por cada grupo experimental. *Panel G:* Los puntos individuales en cada barra representa la insulina en ayuno en cada ratón. Las barras representan la media \pm ES de 6-8 ratones por cada grupo experimental. Grupo control virgen parado en edad (barra blanca), día del destete (PL0), y día uno (PL1), tres (PL3), siete (PL7), y catorce (PL14) de poslactancia. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$ comparado con el control.

Cambios en la concentración de osteocalcina descarboxilada en suero materno durante la poslactancia

El efecto fisiológico de la remineralización ósea después de la lactancia, y el reconocimiento de una comunicación hormonal entre las células beta y el hueso a través de la osteocalcina descarboxilada, nos dieron la pauta para investigar los niveles de esta hormona a lo largo de los catorce días de poslactancia. Comparado con el grupo control (control=1.97 ± 0.16 µg/L), no se observó diferencia significativa ($P>0.05$) en la concentración de la hormona al día del destete (PL0=2.82 ± 0.25 µg/L). Sin embargo, observamos un incremento significativo en la concentración de osteocalcina descarboxilada a partir del día uno de poslactancia, alcanzando su nivel máximo al tercer día de poslactancia (PL3=4.47 ± 0.68 µg/L; $p<0.0005$). Después del día tres de poslactancia, se observó un descenso en la concentración de osteocalcina hasta alcanzar al día siete y catorce de poslactancia las concentraciones encontradas en el grupo control (PL7=2.38 ± 0.36 µg/L; PL14=2.32 ± 0.27 µg/L). Debido a que: 1) la osteocalcina descarboxilada incrementa la proliferación de las células beta y 2) que nuestro estudio reveló un incremento en la proliferación del islote tiempo antes del destete; se cuantificaron los niveles de osteocalcina descarboxilada dos días antes de finalizada la lactancia. Los datos revelaron que al día diecinueve de lactancia, los niveles de osteocalcina descarboxilada (L19=1.63 ± 0.14 µg/ml) no presentan diferencias significativas comparado con el grupo control (**Figura 16A**).

Cambios en la concentración de calcio en suero materno durante la poslactancia

Debido a que el destete está asociado con una hipercalcemia transitoria (Ardeshirpour et al., 2007; Kovacs, 2016), investigamos la concentración de calcio en suero al día diecinueve de lactancia, al día del destete, y durante los catorce días de poslactancia. Comparado con el grupo control, se observó un incremento moderado en la concentración de calcio circulante a partir del día diecinueve de lactancia y hasta al día uno de poslactancia (control = 2.21 ± 0.03 mmol/L; L19 = 2.63 ± 0.12; PL0 = 2.63 ± 0.09; PL1 = 2.53 ± 0.10 mmol/L; $p < 0.05$). Al día tres y siete de poslactancia, se observó un descenso en la concentración de calcio (PL3 = 2.33 ± 0.07; PL7 = 2.29 ± 0.07); y un posterior incremento al día catorce de poslactancia (PL14 = 2.52 ± 0.08 mmol/L; $p < 0.05$) (**Figura 16B**).

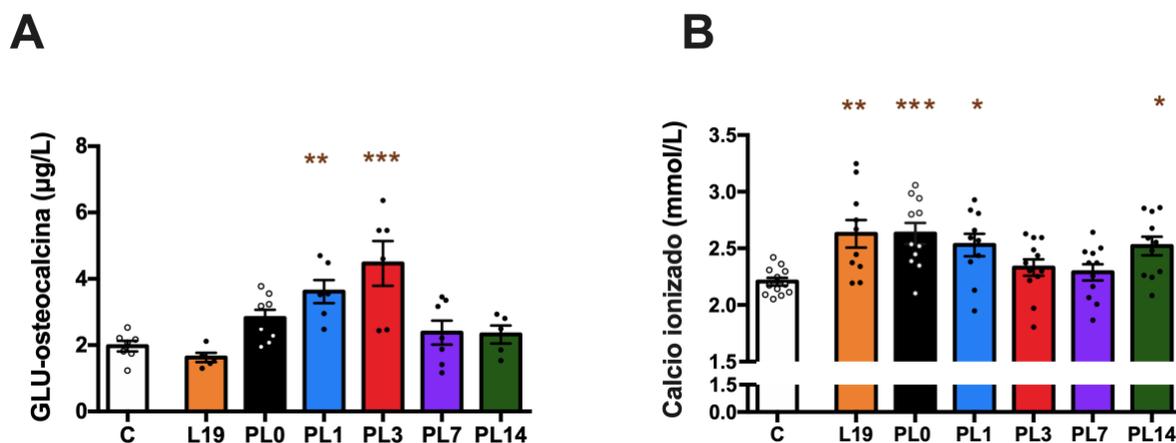


Figura 16. Concentración de osteocalcina descarboxilada y calcio ionizado en suero. *Panel A:* Los puntos individuales en cada barra representa la concentración de osteocalcina en cada ratón. Las barras representan la media \pm ES de 5-8 ratones por cada grupo experimental. *Panel B:* Los puntos individuales en cada barra representa la concentración de calcio ionizado en suero en cada ratón. Las barras representan la media \pm ES de 10-12 ratones por cada grupo experimental. Grupo control virgen parado en edad (barra blanca), día diecinueve de lactancia (L19), día del destete (PL0), y día uno (PL1), tres (PL3), siete (PL7), y catorce (PL14) de poslactancia. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$ comparado con el control.

Cambios en el contenido de serotonina en las células beta materna durante la poslactancia

La serotonina es una molécula producida localmente en los islotes pancreáticos, y participa en la proliferación de las células beta y la secreción de insulina durante la gestación (Kim et al., 2010). Por lo anterior, se analizó el contenido de serotonina en los islotes durante los catorce días de poslactancia. Adicionalmente, como control positivo se incluyó un grupo de ratonas que tenían catorce días de gestación, así como un grupo del día diecinueve de lactancia, este último debido a que en este día la proliferación del islote se encontró incrementada también. Como se muestra en la **Figura 17A y B**, los islotes en el grupo control no presentaron células positivas a serotonina, en contraste con el grupo de ratonas gestantes los cuales presentaron un abundante contenido de serotonina. El porcentaje de células positivas a serotonina en el islote disminuyó notablemente a partir del día diecinueve de lactancia (L19 = $8.04 \pm 0.64\%$; $p < 0.0005$), y aún más a partir del día del destete (PL0 = 3.11 ± 0.45 ; PL1 = 1.10 ± 0.37 ; PL3 = 0.80 ± 0.26 ; PL7 = 0.11 ± 0.076 ; PL14 = 0.035 ± 0.035 ; $p < 0.0005$).

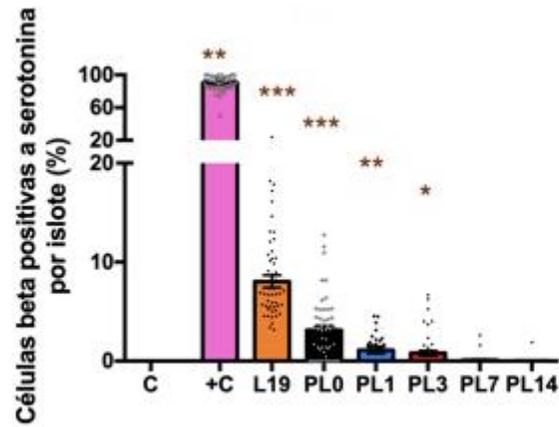
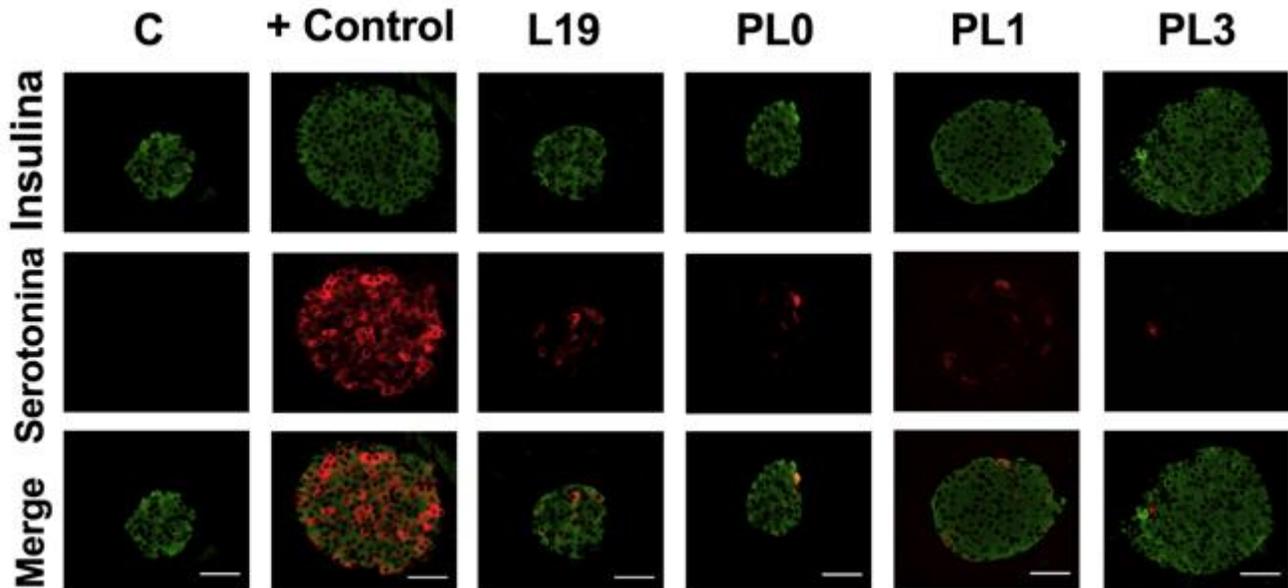
A**B**

Figura 17. Contenido de serotonina en el islote pancreático. *Panel A:* Los puntos individuales en cada barra representa el porcentaje de células beta positivas a serotonina por islote. Las barras representan la media \pm ES de 46-60 islotes provenientes de 3 ratonas por cada grupo experimental. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$ comparado con el grupo control. *Panel B:* Imágenes representativas del contenido de serotonina en los islotes pancreáticos teñidos para insulina (verde) y serotonina (rojo) de ratones control (C), día catorce de gestación (+Control), día diecinueve de lactancia (L19), día del destete (PL0), día 1 (PL1) y día tres (PL3) de poslactancia. La escala equivale a 50 μm .

16. DISCUSIÓN

Durante la gestación y lactancia, las modificaciones hormonales maternas participan en los cambios metabólicos y morfológicos acontecidos en diversos tejidos para favorecer el desarrollo y el crecimiento del infante. Estos cambios se revierten durante la poslactancia, periodo en el cual se presentan nuevos cambios hormonales y metabólicos que favorecen una rápida remineralización ósea e involución de las glándulas mamarias (Canul y Fernandez, 2019; Jena et al., 2019; Kovacs, 2016). De igual manera, durante la gestación y lactancia, se presentan modificaciones en la homeostasis de la glucosa y masa de las células beta (Baaziz y Curry, 1993; Baeyens et al., 2016; Burnol et al., 1986, 1987; Marynissen et al., 1983, 1985; Nielsen, 2016; Rieck y Kaestner, 2010). Sin embargo, hasta la fecha se desconocía la existencia de cambios en la morfología de los islotes pancreáticos maternos y la homeostasis de la glucosa durante la poslactancia.

Para resolver esta incógnita, el presente estudio reporta por primera vez que los islotes pancreáticos maternos y la homeostasis de la glucosa, atraviesan por cambios en el periodo de poslactancia.

Nuestros datos demostraron un rápido crecimiento en los islotes materno, a partir del primer día de poslactancia y alcanzando su máximo tamaño al tercer día de poslactancia, para después regresar a sus valores iniciales. Al día del destete, no se observaron cambios significativos en el tamaño de los islotes comparado con el control. Este resultado corrobora un estudio realizado en ratas a lo largo de 21 días de lactancia, en el cual tampoco observaron cambios en el área de los islotes maternos al final de la lactancia comparado con el grupo control (Marynissen et al., 1983). Al cabo de un día de poslactancia, nuestro estudio reveló que: el área del islote, la fracción y masa del islote, y el número de células beta, se incrementaron aproximadamente en un 50%. Al tercer día de poslactancia, observamos un aumento en el área del islote materno producido por un incremento en el número y tamaño de las células beta. El área de las células alfa también presentó un ligero incremento (6%), pero el número de estas células se vio disminuido.

El incremento en el tamaño del islote materno durante la poslactancia, es comparable con el aumento que ocurre en el islote materno durante la gestación (Huang et al., 2009). Tal como sucede durante la gestación, tanto la hiperplasia como la hipertrofia participan en la expansión del

islote materno durante la poslactancia (Dirice et al., 2019; Huang et al., 2009; Quesada et al., 2020; Xu et al., 2015a).

Después del tercer día de poslactancia, encontramos que el área del islote, fracción, masa, distribución del tamaño de los islotes y el número de células beta regresaron progresivamente a los valores observados en el grupo control. Sin embargo, dos de los parámetros que no retornaron a sus niveles basales fueron: el tamaño de las células beta el cual permaneció incrementado por sobre el control, y el número de células alfa por islote, que permanecieron por debajo del grupo control. Es interesante resaltar que, tanto el tamaño de las células beta y el número de células alfa, se observaron modificados desde el día del destete, lo cual indica que estos dos parámetros fueron modificados desde la lactancia y/o gestación. En apoyo a esta posibilidad, se encuentra el hecho de que el tamaño de las células beta también está incrementado durante la lactancia (Drynda et al., 2015). Además, de manera normal el tamaño de las células beta atraviesa por un constante y paulatino incremento (hipertrofia) a lo largo del ciclo de vida en roedores (Montanya et al., 2000). Por otro lado, reducción en el tamaño de las células beta (atrofia), se asocia con efectos negativos en la secreción de insulina, (Giordano et al., 1993), tal como ocurre en la diabetes tipo 2 o en animales tratados con estreptozotocina (Pirmoradi et al., 2016). Por lo anterior, era poco probable encontrar una reducción en el tamaño de las células beta (atrofia) durante la poslactancia. No tenemos una explicación sencilla respecto al menor número de células alfa encontrado durante la poslactancia, incluso durante la gestación aun existen controversias sobre modificaciones tanto en el número como en el tamaño de las células alfa (Huang et al., 2009; Quesada et al., 2020; Xu et al., 2015b). Podemos mencionar que este menor número de células alfa durante la poslactancia, probablemente no se debe a un incremento en la apoptosis de las células alfa, ya que su tasa de apoptosis es muy baja gracias a su alta resistencia al estrés metabólico (Nielsen et al., 2016; Quesada et al., 2020). Otra posibilidad podría ser que la disminución en el número de células-alf se deba a que estas células contribuyen en la expansión de las células beta por un proceso de transdiferenciación. Aunque el principal mecanismo que incrementa la masa de las células beta es la proliferación celular, algunos estudios sugieren que cerca del 10-25% de las células beta podrían surgir de otras células diferentes a las células beta (Abouna et al., 2010; Banerjee, 2018). De lo que sí estamos seguros, es que las modificaciones observadas en células alfa durante la poslactancia, son el resultado de una remodelación ocurrida

durante la lactancia. Por todo lo anterior, sería interesante analizar los posibles cambios morfológicos y de composición celular que podrían estar ocurriendo en los islotes maternos durante la lactancia, en especial durante la segunda mitad de lactancia. Además, será necesario estudios en días posteriores a las dos semanas de poslactancia, para determinar si el incremento en el tamaño de las células beta y la disminución en el número de células alfa durante las primeras dos poslactancia, son modificaciones permanentes o regresan a su estado basal. Aunque por lo mencionado anteriormente, al menos en lo que respecta al tamaño de las células beta, es poco probable que este regrese a su estado basal.

Nuestros datos revelaron un incremento en la proliferación del islote dos días antes de finalizada la lactancia. Este efecto, sumado a las modificaciones en el número de las células alfa y el tamaño de las células beta desde el día destete sugieren que, durante la lactancia, acontecen una serie de eventos que preparan o condicionan al islote materno para enfrentar los cambios de la poslactancia. Este hecho asemeja al incremento que ocurre en la replicación e hipertrofia de las células beta durante los primeros dos-tercios de la gestación (Baeyens et al., 2016; Rieck y Kaestner, 2010), los cuales anteceden al incremento metabólico y de expansión en la masa del islote que ocurre en el último tercio de la gestación (Baeyens et al., 2016; Rieck y Kaestner, 2010). De manera similar a lo observado en ratas, durante la involución de la masa del islote materno durante los primeros días de la lactancia (Scaglia et al., 1995), nuestros resultados revelan que después de que el islote alcanza su máxima expansión en la poslactancia, la proliferación del islote disminuye por debajo de los valores observados en el grupo control. Esto demuestra las similitudes que existen entre los cambios ocurridos durante la gestación y en el periodo de poslactancia.

Los cambios observados en los islotes maternos durante los primeros tres días de poslactancia, están acompañados por un decremento gradual en la sensibilidad a la insulina y un incremento en la secreción de insulina estimulada por glucosa, lo cual indica que, durante los primeros tres días de poslactancia, se presenta un periodo de resistencia a la insulina materna. Es importante mencionar que, de manera normal, los tejidos que contribuyen a la mayor captación de glucosa después de un incremento en su concentración en sangre son: entre un 30-35% el musculo esquelético, 5-10% por el tejidos adiposo y un 9% el hígado (Curtis-Pcior et al., 1969).

Por lo anterior, es probable que uno, o varios de estos tejidos puedan estar participando en la resistencia a la insulina ocurrida durante los primeros días de poslactancia. Sin embargo, a pesar de estos cambios, los niveles de glucosa durante la prueba de tolerancia a la glucosa se mantuvieron por debajo del grupo control a lo largo de la poslactancia. La coexistencia de resistencia a la insulina e incremento en la tolerancia a la glucosa, es un suceso que también ha sido documentado durante la etapa final de la gestación (20 días) en ratas, como un mecanismo que permite mantener niveles óptimos de glucosa en sangre para poder ser utilizada de manera intensa por el feto (Carrara et al., 2012). Nuestros resultados sugieren que durante la poslactancia, también se lleva a cabo una intensa utilización de glucosa a pesar de la resistencia a la insulina. Es muy probable que la disminución en la concentración de glucosa, observada en nuestras pruebas de tolerancia a la glucosa durante la poslactancia, se deban a una abundante captación de glucosa por parte del hueso. En apoyo a esta posibilidad, se ha reportado que a partir del día de destete, se inicia una rápida e intensa fase anabólica en el hueso caracterizada por un incremento en cantidad de osteoblastos (Miller et al., 2005). Además, se tiene documentado que la glucosa es una importante fuente de energía para la remineralización del hueso, y es esencial para la diferenciación de los osteoblastos y formación de colágeno (Esen et al., 2013; Lecka-Czernik y Rosen, 2015; Miller et al., 2005; Nichols y Neuman, 1987; Wei et al., 2015). Así mismo, se ha reportado que la glucosa es captada ávidamente por los osteoblastos independientemente de la insulina a través del transportador GLUT1 (Wei et al., 2015), y que a su vez, también favorece la expresión de la hormona osteocalcina en el hueso (Takeno et al., 2018; Wei et al., 2015); hormona que en su forma descarboxilada promueve la proliferación de las células beta pancreáticas (Ferron et al., 2008b, 2010b; Lacombe et al., 2013; Zoch et al., 2016).

El análisis de la concentración de osteocalcina descarboxilada en suero, reveló que al día diecinueve de lactancia, esta hormona se encuentra en niveles similares a los observado en ratonas del grupo control. Pero, a partir del día del destete, la concentración de osteocalcina se incrementa alcanzando su pico máximo al tercer día de la poslactancia, para posteriormente disminuir a los niveles basales. Incrementos de la osteocalcina al tercer día de poslactancia se observaron también en los estudios realizados por Ardeshirpour et al (Ardeshirpour et al., 2007) y Kirby et al. (Kirby et al., 2011). Estos dos reportes coinciden en la presencia de una intensa remineralización ósea durante los primeros tres días de poslactancia (Ardeshirpour et al., 2007).

Se ha reportado que la osteocalcina incrementa la sensibilidad a la insulina (Ferron et al., 2008b; Lee et al., 2007), contrastando con nuestro estudio en donde observamos un descenso en la respuesta a la insulina. Adicionalmente, el incremento en la proliferación del islote, previo al aumento en los niveles de osteocalcina, sugiere que esta hormona no es el responsable del inicio en la proliferación de las células beta en los islotes maternos (**ver Figura 18**). Sin embargo, no se descarta que a partir del destete y dado los nuevos cambios metabólico y hormonales que el destete conlleva, la osteocalcina participe en conjunto con otra (s) moléculas hasta ahora desconocidas, en la continuación de la proliferación en el islote. Además, el incremento en la osteocalcina descarboxilada, coincide con el incremento en la masa y tamaño de los islotes e incremento en el número de células beta. Conjuntamente, el incremento en la concentración de osteocalcina en nuestro estudio, sugiere que la osteocalcina podría estar participando en el incremento de la secreción de insulina durante la poslactancia. Interesantemente, en los últimos años nuevas funciones para la osteocalcina han estado emergiendo, como por ejemplo, favorecer el metabolismo de la glucosa, participar en la reproducción, entre otros (Berger et al., 2019). En conjunto, las funciones precisas de la osteocalcina descarboxilada sobre las modificaciones metabólicas, y en particular sobre el islote materno durante la poslactancia son aún desconocidas. Pero no descartamos que la osteocalcina tenga una, o varias funciones, hasta ahora desconocidas, sobre el islote y el metabolismo materno durante la poslactancia. Serán necesarios estudios dirigidos que revelen las nuevas funciones de la osteocalcina, o estudios que revelan las consecuencias de su ausencia sobre los islotes y metabolismo materno durante la poslactancia. Por otro lado, dada la importancia fisiológica de la remineralización del hueso durante la poslactancia, es posible que otros factores óseos puedan estar participando en los cambios en este periodo (Dirckx et al., 2018; Gillespie et al., 2013; Yao et al., 2017; Yoshikawa et al., 2011). Así mismo, considerando que en el control de la masa de los diferentes tejidos del cuerpo participan diversos factores circulantes (Porat et al., 2011), tampoco se descarta que sean factores provenientes de otros tejidos, los que estén involucrados en las modificaciones observadas en los islotes y en el metabolismo materno durante poslactancia (Canul y Fernandez, 2019).

Nuestros resultados sugieren que los cambios observados durante la poslactancia, probablemente inicien con cambios hormonales y/o metabólicos iniciados durante la lactancia. Un candidato podría ser el estradiol. Se conoce que el estradiol promueve la hipertrofia, hiperplasia y secreción

de insulina en las células beta (Alonso-Magdalena et al., 2008; Costrini y Kalkhoff, 1971; Jacovetti et al., 2012; Liu y Mauvais-Jarvis, 2010; Le May et al., 2006). Por otro lado, altas concentraciones de estradiol disminuyen la sensibilidad a la insulina (Gonzalez et al., 2000). Es probable de que el estradiol participe en los cambios observados en los primeros días de poslactancia sobre los islotes maternos y metabolismo de la glucosa (Miller y Bowman, 2007). Otros candidatos podrían ser los glucocorticoides y progesterona. Así mismo, es posible que la ausencia de la prolactina (la cual disminuye a partir del destete), pueda estar generando los efectos que se observan durante la poslactancia, y los cuales tal vez se encontraban bloqueados por la misma prolactina durante la lactancia por mecanismos aún desconocidos.

La serotonina es una molécula producida de manera local en tejidos periféricos (Martin et al., 2017). La síntesis y liberación de serotonina en los islotes pancreáticos, ha sido reconocida como un factor determinante en el incremento de la secreción de insulina y la proliferación del islote materno durante la gestación (Bennet et al., 2016; Kim et al., 2010, 2015; Schraenen et al., 2010). A diferencia de lo encontrado en la gestación, nuestros resultados revelan poca abundancia de serotonina en el islote materno durante la poslactancia, esto ocasionando probablemente por una disminución en la prolactina, principal hormona que estimula la síntesis de serotonina en el islote (Kim et al., 2010). Por lo tanto, es improbable que la serotonina en el islote participe en los cambios que acontecen sobre los islotes maternos en la poslactancia. Sin embargo, trabajos no publicados en nuestro laboratorio, han demostrado que la serotonina es abundante en el islote materno durante la lactancia, periodo en el que sabe que la prolactina se encuentra también incrementada. Estudios futuros serán necesarios para dilucidar las señales que participan en la expansión del islote y cambios en el metabolismo de la glucosa durante la poslactancia, así como estudios que analicen la función de la serotonina durante la lactancia.

Como se mencionó anteriormente, durante la poslactancia se inicia una rápida e intensa remineralización en el hueso, y en durante este proceso es fundamental la glucosa. La utilización de la glucosa es esencial para los osteoblastos, siendo un determinante para la homeostasis global de la glucosa (Dirckx et al., 2018). Lo anterior sugiere que los osteoblastos pueden modificar el metabolismo energético materno durante la poslactancia (por mecanismo hasta ahora no comprendidos) debido al flujo continuo de glucosa hacia el hueso. Entonces, probablemente sea

el hueso el causante de las modificaciones en el metabolismo materno observado durante las primeras semanas de poslactancia. No se descarta que otros tejidos que también atraviesen por cambios durante la poslactancia participen en las modificaciones maternas observadas en este mismo periodo. Si bien, parte los cambios acontecidos en los islotes maternos durante la poslactancia son el resultado de la resistencia a la insulina transitoria durante los primeros días de poslactancia, también es probablemente que la poslactancia represente un periodo de renovación para los islotes y/o el metabolismo materno, dado los intensos cambios fisiológicos, hormonales, morfológicos y metabólicos por los que atraviesa la madre durante la gestación y lactancia. La lactancia es un periodo que requiere un alta demanda energética e intensas modificaciones en tejidos como el hueso, hígado, músculo esquelético, tejido adiposo y glándulas mamarias; involucrados en la producción de leche materna. Al término de la lactancia, muchos de los cambios en estos tejidos son revertidos, y otros tejidos son fortalecidos para prepararlos ante futuros eventos reproductivos (por ejemplo el hueso) (Bornstein et al., 2014; Canul y Fernandez, 2019). Probablemente los cambios ocurridos durante la poslactancia también representen un periodo en el que se refuerzan las funciones y/o estructuras de los islotes maternos y prepararlos para posteriores eventos reproductivos, tal y como ocurre con el hueso. Sin embargo, serán necesarios estudios futuros que demuestren este hecho.

El curso temporal de los cambios observados en nuestro estudio durante la poslactancia, se resume en la **FIGURA 18**. Después del destete se presenta una rápida expansión en el área de los islotes maternos, y el cual coincide con el incremento en el número de células beta. Estos cambios alcanzan su máximo valor al tercer día de pos-lactancia, cuando también se produce un incremento tanto en la secreción de insulina estimulada por glucosa como en la concentración de osteocalcina descarboxilada, así como un decremento de la sensibilidad a la insulina. La proliferación del islote se encuentra incrementada dos días antes del destete (día 19 de lactancia), lo que no se relaciona con el incremento en la osteocalcina descarboxilada o el contenido de serotonina en el islote. Un ligero aumento en el tamaño de las células beta e incremento en la tolerancia a la glucosa, se presenta desde el día posterior al destete. Catorce días después del cese de la lactancia, el tamaño del islote, el número de células beta, la secreción de insulina, la tolerancia a la glucosa e insulina, así como los niveles de osteocalcina descarboxilada, regresan a los niveles observados en el grupo de ratones control, a excepción del tamaño de las células beta.

Adicionalmente, la proliferación del islote, el cual se encuentra incrementada días antes del destete, presenta una disminución al día siete y catorce de poslactancia.

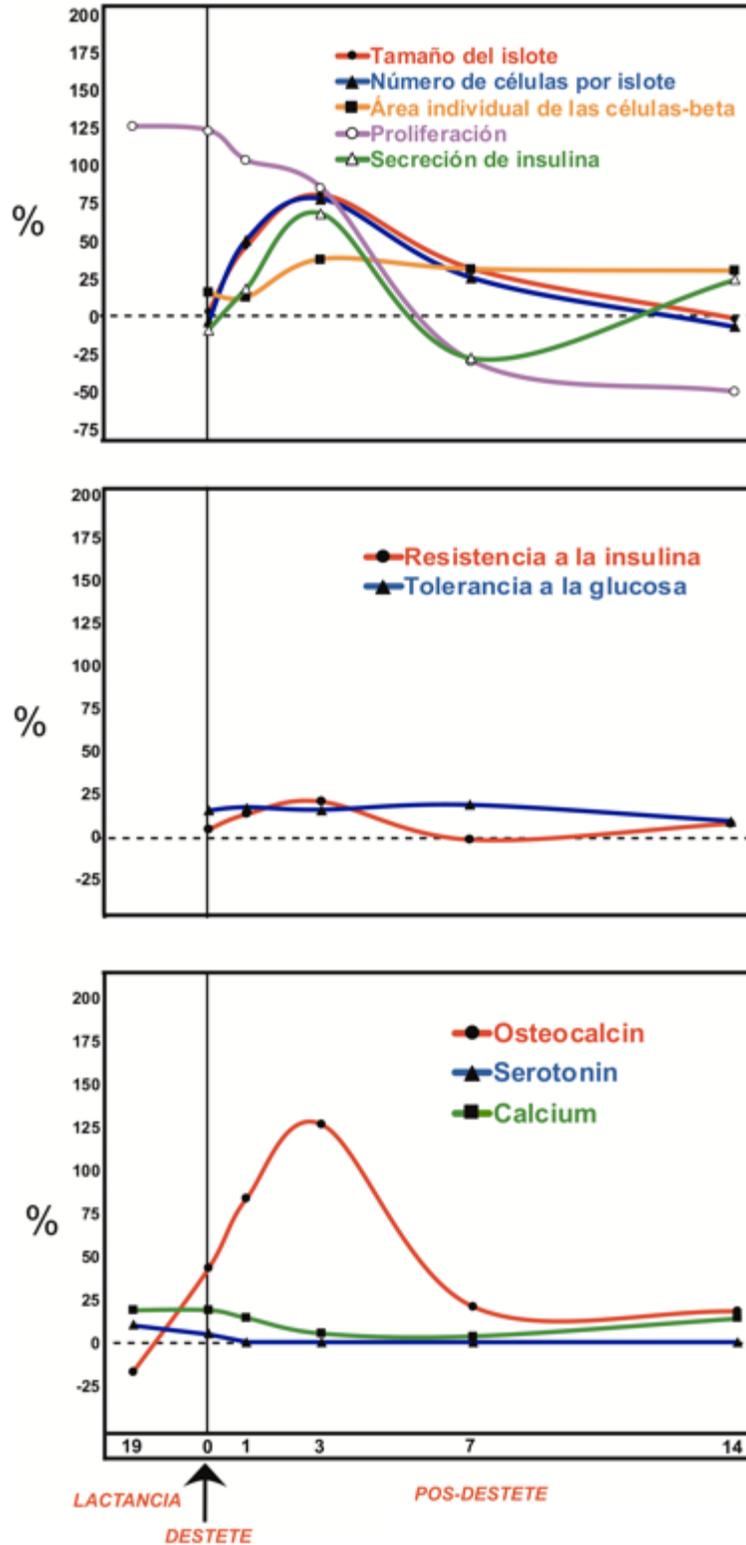


Figura 18. Cambio temporal en la morfología del islote, metabolismo de la glucosa, concentración de calcio, osteocalcina y serotonina. El esquema muestra el porcentaje de variación en la morfometría del islote, proliferación del islote, secreción de insulina, homeostasis de la glucosa, osteocalcina descarboxilada, calcio ionizado en suero y serotonina entre el grupo control comparado con el grupo al día del destete y durante 14 días pos-destete. Después del destete, se incrementa el tamaño de los islotes, que concuerda con el incremento en el número de células beta; y el cual alcanza su máximo valor al día tres de pos-lactancia. En conjunto, al día 3 de pos-lactancia también se incrementa la secreción de insulina y la concentración de osteocalcina en suero, pero disminuye la sensibilidad a la insulina y concentración de calcio. La proliferación del islote se encontró incrementada dos días antes del destete (día 19 de lactancia). También se observó un incremento en el tamaño de las células beta y la tolerancia a la glucosa desde el día del destete. Catorce días después del destete, el tamaño de los islotes, el número de las células beta en el islote, la secreción de insulina, tolerancia a la glucosa e insulina, así como la concentración de osteocalcina regresaron a los niveles observados en el grupo control; sin embargo, el tamaño individual de las células beta permaneció incrementado, y también se observó un incremento en la concentración de calcio. Además, la proliferación del islote, la cual ya estaba incrementado antes del destete, disminuyó de manera significativa al día 14 de poslactancia.

17. CONCLUSIÓN

El presente trabajo demuestra por primera vez que, durante la poslactancia, los islotes pancreáticos maternos atraviesan por cambios morfológicos y en la homeostasis de la glucosa. Estas modificaciones están acompañadas por un aumento en los niveles séricos de osteocalcina descarboxilada; no obstante, este cambio hormonal no explica el inicio de la proliferación del islote materno o la disminución en la sensibilidad a la insulina, lo que indica que otros factores podrían estar participando en estos cambios.

En las últimas décadas, los pacientes con diabetes han ido en aumento de manera crítica alrededor del mundo; de modo que intervenciones para prevenir y controlar esta enfermedad son de suma importancia. Cuantiosa evidencia indica que, la disminución tanto en la masa de los islotes y en la secreción de insulina, son factores que participan en el desarrollo de la diabetes tipo-1 y tipo-2 (Hudish et al., 2019; Meier y Bonadonna, 2013; Weir et al., 2001). Los hallazgos encontrados en nuestro trabajo, aportan evidencia inédita de un nuevo periodo fisiológico en el cual se presenta una intensa expansión de las células beta y secreción de insulina, lo que abre una amplia ventana de oportunidad para la identificación de nuevas moléculas y mecanismos que participen en estos procesos. Los conocimientos que se deriven de estos estudios brindarán apoyo para el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos para la prevención y tratamiento de la diabetes, y el cual representa un importante problema de salud mundial.

18. PERSPECTIVAS

- Para dilucidar las señales que participan en la expansión del islote y cambios en el metabolismo de la glucosa durante la poslactancia, sería interesante explorar los cambios dinámicos sobre la expresión de genes por lo que atraviesa el islote utilizando secuenciación de RNA.
- Investigar el efecto de otras hormonas que podrían estar participando en los cambios maternos ocurridos durante la poslactancia. Por ejemplo, el estradiol o glucocorticoides.

- Analizar la contribución de otros mecanismos que podrían estar participando en el incremento de la masa de los islotes maternos durante la poslactancia, por ejemplo, la neogénesis y transdiferenciación.
- Realizar estudios de secreción *in-vitro* de insulina en islotes aislados.
- Analizar a tiempos prologando después del destete (más allá de las 2 semanas poslactancia), si el incremento que observamos en el número de células beta y la disminución en las células alfa regresan a su estado basal, o si estas modificaciones son permanentes.
- Resultaría interesante investigar el efecto de la ausencia de la lactancia sobre la morfología, composición de los islotes pancreáticos y la homeostasis de la glucosa materna.
- Caracterizar las adaptaciones del post-destete sobre la salud metabólica materna y el riesgo de diabetes utilizando estreptozotocina o una dieta alta en grasa o fructosa.
- Explorar los cambios morfológicos y de composición celular, que se producen en los islotes pancreáticos maternosprevio al día 19 de lactancia. En especial analizar lo que acontece durante la segunda mitad de la lactancia.
- Analizar el porcentaje de proliferación de los islotes durante la lactancia para determinar el día exacto en el cual inicia el incremento en la proliferación.
- Analizar los cambios morfológicos en el islote, de composición celular y homeostasis de la glucosa, después de ser sometidas a otro (s) evento (s) reproductivo de gestación y lactancia para determinar el efecto de los cambios ocurridos durante la poslactancia.

19. REFERENCIAS

- Abouna, S., Old, R.W., Pelengaris, S., Epstein, D., Ifandi, V., Sweeney, I., y Khan, M. (2010). Non- β -cell progenitors of β -cells in pregnant mice. *Organogenesis*.
- Alexander, S.P.H., Mathie, A., y Peters, J.A. (2011). *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 5th edition. British journal of pharmacology.
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Carrera, M.P., Cederroth, C.R., Baquié, M., Gauthier, B.R., Nef, S., Stefani, E., y Nadal, A. (2008). Pancreatic insulin content regulation by the Estrogen receptor ER α . *PLoS ONE*.
- Anhe, G.F., Nogueira, T.C., Nicoletti-Carvalho, J.E., Lellis-Santos, C., Barbosa, H.C., Cipolla-Neto, J., Bosqueiro, J.R., Boschero, A.C., y Bordin, S. (2007). Signal transducer and activator of transcription 3-regulated sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 expression by prolactin and glucocorticoids is involved in the adaptation of insulin secretory response during the peripartum period. *J Endocrinol* 195, 17–27.
- Arab, H., Alharbi, A.J., Oraif, A., Sagr, E., Al Madani, H., Abduljabbar, H., Bajouh, O.S., Faden, Y., y Sabr, Y. (2019). The role of progestogens in threatened and idiopathic recurrent miscarriage. *International Journal of Women's Health* 11, 589–596.
- Ardeshirpour, L., Dann, P., Adams, D.J., Nelson, T., Vanhouten, J., Horowitz, M.C., y Wysolmerski, J.J. (2007). Weaning triggers a decrease in receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression, widespread osteoclast apoptosis, and rapid recovery of bone mass after lactation in mice. *Endocrinology* 148, 3875–3886.
- Ardeshirpour, L., Brian, S., Dann, P., VanHouten, J., y Wysolmerski, J. (2010). Increased PTHrP and decreased estrogens alter bone turnover but do not reproduce the full effects of lactation on the skeleton. *Endocrinology* 151, 5591–5601.
- Artner, I., y Stein, R. (2008). Transcriptional regulation of insulin gene expression. In *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*, p.
- Ashcroft, F.M., Proks, P., Smith, P.A., Ammala, C., Bokvist, K., y Rorsman, P. (1994). Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem* 55 *Suppl*, 54–65.
- Baaziz, N., y Curry, D.L. (1993). Synthesis-secretion coupling of insulin: effect of pregnancy and lactation. *Pancreas* 8, 316–324.
- Baeyens, L., Hindi, S., Sorenson, R.L., y German, M.S. (2016). β -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 18, 63–70.
- Banerjee, R.R. (2018). Piecing together the puzzle of pancreatic islet adaptation in pregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- Barber, M.C., Clegg, R.A., Finley, E., Vernon, R.G., y Flint, D.J. (1992). The role of growth

hormone, prolactin and insulin-like growth factors in the regulation of rat mammary gland and adipose tissue metabolism during lactation. *Journal of Endocrinology* 135, 195–202.

Baron, R. (2008). *Anatomy and ultrastructure of bone - histogenesis, growth and remodelling* (South Dartmouth (MA): Endotext).

Beamish, C.A., Zhang, L., Szlapinski, S.K., Strutt, B.J., y Hill, D.J. (2017). An increase in immature β -cells lacking Glut2 precedes the expansion of β -cell mass in the pregnant mouse. *PLoS ONE* 12, e0182256.

Bennet, H., Mollet, I.G., Balhuizen, A., Medina, A., Nagorny, C., Bagge, A., Fadista, J., Ottosson-Laakso, E., Vikman, P., Dekker-Nitert, M., et al. (2016). Serotonin (5-HT) receptor 2b activation augments glucose-stimulated insulin secretion in human and mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* 59, 744–754.

Berger, J.M., Singh, P., Khrimian, L., Morgan, D.A., Chowdhury, S., Arteaga-Solis, E., Horvath, T.L., Domingos, A.I., Marsland, A.L., Yadav, V.K., et al. (2019). Mediation of the Acute Stress Response by the Skeleton. *Cell Metabolism*.

Bergsten, P., Grapengiesser, E., Gylfe, E., Tengholm, A., y Hellman, B. (1994). Synchronous oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets. *J Biol Chem* 269, 8749–8753.

Bernard-Kargar, C., y Ktorza, A. (2001). Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions. *Diabetes* 50 *Suppl 1*, S30-5.

Bird, J.L., Wright, E.E., y Feldman, J.M. (1980). Pancreatic islets: a tissue rich in serotonin. *Diabetes* 29, 304–308.

Böck, P., Abdel-Moneim, M., y Egerbacher, M. (1997). Development of pancreas. *Microsc Res Tech* 37, 374–383.

Boonyaratanakornkit, V., Bi, Y., Rudd, M., y Edwards, D.P. (2008). The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* 73, 922–928.

Bornstein, S., Brown, S.A., Le, P.T., Wang, X., DeMambro, V., Horowitz, M.C., MacDougald, O., Baron, R., Lotinun, S., Karsenty, G., et al. (2014). FGF-21 and skeletal remodeling during and after lactation in C57BL/6J mice. *Endocrinology* 155, 3516–3526.

Bouwens, L., y Rooman, I. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev.* 85, 1255–1270.

Braganza, J.M. (1994). *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*. *Gut* 40, 400.

Brissova, M., y Powers, A.C. (2008). Architecture of Pancreatic Islets. In *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*, S. Seino, y G.I. Bell, eds. (Tokyo: Springer Japan), pp. 3–11.

- Brown, E.M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M.A., Lytton, J., y Hebert, S.C. (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366, 575.
- Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R., y Recker, R. (1995). Bone biology. Part I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *J Bone Joint Surg Am* 77, 1256–1275.
- Burnol, A.F., Leturque, A., Ferre, P., Kande, J., y Girard, J. (1986). Increased insulin sensitivity and responsiveness during lactation in rats. *The American Journal of Physiology* 251, E537-41.
- Burnol, A.F., Ferre, P., Leturque, A., y Girard, J. (1987). Effect of insulin on in vivo glucose utilization in individual tissues of anesthetized lactating rats. *The American Journal of Physiology* 252, E183-8.
- Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., Jiménez-Arellano, C., Morimoto, S., Galván-Rosas, A., Gómora-Arrati, P., García-Juárez, M., y González-Flores, O. (2018). Sex hormone levels and expression of their receptors in lactating and lactating pregnant rats. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 178, 213–220.
- Canul-Medina, G., Riverón-Negrete, L., Pastén-Hidalgo, K., Morales-Castillo, P., García-Vázquez, F., y Fernandez-Mejia, C. (2021). Maternal adaptations of pancreatic islets and glucose metabolism after lactation. *Journal of Endocrinology* 248, 1–15.
- Canul, G., y Fernandez, C. (2019). Morphological, hormonal, and molecular changes in different maternal tissues during lactation and post-lactation. *The Journal of Physiological Sciences* 69, 825–835.
- Carr, B.R., Parker, C.R., Madden, J.D., MacDonald, P.C., y Porter, J.C. (1981). Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationships throughout human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 139, 416–422.
- Carrara, M.A., Batista, M.R., Saruhashi, T.R., Felisberto-Junior, A.M.H., Guilhermetti, M., y Bazotte, R.B. (2012). Coexistence of insulin resistance and increased glucose tolerance in pregnant rats: A physiological mechanism for glucose maintenance. *Life Sciences* 90, 831–837.
- Chiba, T., Maeda, T., y Kudo, K. (2018). Endogenous serotonin and milk production regulation in the mammary gland. *Yakugaku Zasshi* 138, 829–836.
- Chida, D., Miyoshi, K., Sato, T., Yoda, T., Kikusui, T., y Iwakura, Y. (2011). The role of glucocorticoids in pregnancy, parturition, lactation, and nurturing in melanocortin receptor 2-deficient mice. *Endocrinology* 152, 1652–1660.
- Chintinne, M., Stangé, G., Denys, B., Ling, Z., In 't Veld, P., y Pipeleers, D. (2012). Beta Cell Count Instead of Beta Cell Mass to Assess and Localize Growth in Beta Cell Population following Pancreatic Duct Ligation in Mice. *PLoS ONE* 7, e43959.
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 *Suppl*, S131-9.

Clemmensen, C., Smajilovic, S., Wellendorph, P., y Bräuner-Osborne, H. (2014). The GPCR, class C, group 6, subtype A (GPRC6A) receptor: From cloning to physiological function. *British Journal of Pharmacology* *171*, 1129–1141.

Cohen, A. (1976). Adrenal and plasma corticosterone levels in the pregnant, foetal and neonatal rat, in the perinatal period. *Horm Metab Res* *8*, 474–478.

Colin, E.M., Van Den Bemd, G.J.C.M., Van Aken, M., Christakos, S., De Jonge, H.R., Deluca, H.F., Prahl, J.M., Birkenhäger, J.C., Buurman, C.J., Pols, H.A.P., et al. (1999). Evidence for involvement of 17 β -estradiol in intestinal calcium absorption independent of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ level in the rat. *Journal of Bone and Mineral Research* *14*, 57– 64.

Collet, C., Schiltz, C., Geoffroy, V., Maroteaux, L., Launay, J.M., y de Vernejoul, M.C. (2008). The serotonin 5-HT_{2B} receptor controls bone mass via osteoblast recruitment and proliferation. *FASEB J* *22*, 418–427.

Collins, J.N., Kirby, B.J., Woodrow, J.P., Gagel, R.F., Rosen, C.J., Sims, N.A., y Kovacs, C.S. (2013). Lactating Ctggrp nulls lose twice the normal bone mineral content due to fewer osteoblasts and more osteoclasts, whereas bone mass is fully restored after weaning in association with up-regulation of Wnt signaling and other novel genes. *Endocrinology* *154*, 1400–1413.

Costrini, N. V., y Kalkhoff, R.K. (1971). Relative effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion. *The Journal of clinical investigation*.

Van Cromphaut, S.J., Rummens, K., Stockmans, I., Van Herck, E., Dijcks, F.A., Ederveen, A.G.H., Carmeliet, P., Verhaeghe, J., Bouillon, R., y Carmeliet, G. (2003). Intestinal Calcium Transporter Genes Are Upregulated by Estrogens and the Reproductive Cycle Through Vitamin D Receptor-Independent Mechanisms. *Journal of Bone and Mineral Research* *18*, 1725–1736.

Curry, D.L., Bennett, L.L., y Grodsky, G.M. (1968). Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* *83*, 572–584.

Curtis-Pcior, P.B., Trethewey, J., Stewart, G.A., y Hanley, T. (1969). The contribution of different organs and tissues of the rat to assimilation of glucose. *Diabetologia*.

Davani, B., Khan, A., Hult, M., Mårtensson, E., Okret, S., Efendic, S., Jörnvall, H., y Oppermann, U.C. (2000). Type 1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase mediates glucocorticoid activation and insulin release in pancreatic islets. *J Biol Chem*. *275*, 34841–34844.

DiGirolamo, D.J., Clemens, T.L., y Kousteni, S. (2012). The skeleton as an endocrine organ. *Nat Rev Rheumatol* *8*, 674–683.

Dirckx, N., Tower, R.J., Mercken, E.M., Vangoitsenhoven, R., Moreau-Triby, C., Breugelmans, T., Nefyodova, E., Cardoen, R., Mathieu, C., Van Der Schueren, B., et al. (2018). Vhl deletion in osteoblasts boosts cellular glycolysis and improves global glucose metabolism. *Journal of Clinical Investigation* *128*, 1087–1105.

Dirice, E., De Jesus, D.F., Kahraman, S., Basile, G., Ng, R.W., El Ouaamari, A., Teo, A.K.K., Bhatt, S., Hu, J., y Kulkarni, R.N. (2019). Human duct cells contribute to β cell compensation in insulin resistance. *JCI Insight*. 4, pii: 99576.

Dolenšek, J., Rupnik, M.S., y Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* 7, e1024405.

Drynda, R., Peters, C.J., Jones, P.M., y Bowe, J.E. (2015). The role of non-placental signals in the adaptation of islets to pregnancy. *Hormone and Metabolic Research*.

Ducy, P., y Karsenty, G. (2010). The two faces of serotonin in bone biology. *J Cell Biol* 191, 7–13.

Dupouy, J.P., Coffigny, H., y Magre, S. (1975). Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *J Endocrinol* 65, 347–352.

Eriksen, E.F. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 11, 219–227.

Escobar, J.C., Patel, S.S., Beshay, V.E., Suzuki, T., y Carr, B.R. (2011). The human placenta expresses CYP17 and generates androgens de novo. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96, 1385–1392.

Esen, E., Chen, J., Karner, C.M., Okunade, A.L., Patterson, B.W., y Long, F. (2013). WNT-LRP5 signaling induces warburg effect through mTORC2 activation during osteoblast differentiation. *Cell Metabolism* 17, 745–755.

Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G., y Ducy, P. (2008a). Osteocalcin differentially regulates β cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 5266–5270.

Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G., y Ducy, P. (2008b). Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5266–5270.

Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Ducy, P., y Karsenty, G. (2010a). An ELISA-based method to quantify osteocalcin carboxylation in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397, 691–696.

Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Del Fattore, A., DePinho, R.A., Teti, A., Ducy, P., y Karsenty, G. (2010b). Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism. *Cell* 142, 296–308.

Florencio-Silva, R., Sasso, G.R.D.S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., y Cerri, P.S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015, 421746.

- Fu, Z., R. Gilbert, E., y Liu, D. (2013). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 9, 25–53.
- Fulzele, K., Riddle, R.C., DiGirolamo, D.J., Cao, X., Wan, C., Chen, D., Faugere, M.C., Aja, S., Hussain, M.A., Brüning, J.C., et al. (2010). Insulin Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Postnatal Bone Acquisition and Body Composition. *Cell* 142, 309–319.
- Gillespie, J.R., Bush, J.R., Bell, G.I., Aubrey, L.A., Dupuis, H., Ferron, M., Kream, B., DiMattia, G., Patel, S., Woodgett, J.R., et al. (2013). GSK-3 β function in bone regulates skeletal development, whole-body metabolism, and male life span. *Endocrinology* 154, 3702–3718.
- Giordano, E., Cirulli, V., Bosco, D., Rouiller, D., Halban, P., y Meda, P. (1993). B-cell size influences glucose-stimulated insulin secretion. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 265, C358-64.
- Goldstein, D. (1990). Serum calcium. In *Clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations*, H.J. Walker HK, Hall WD, ed. (Boston: Butterworths), p.
- Goletiani, N. V., Keith, D.R., y Gorsky, S.J. (2007). Progesterone: Review of Safety for Clinical Studies. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 15, 427–444.
- Gonzalez, C., Alonso, A., Alvarez, N., Diaz, F., Martinez, M., Fernandez, S., y Patterson, A.M. (2000). Role of 17 β -estradiol and/or progesterone on insulin sensitivity in the rat: Implications during pregnancy. *Journal of Endocrinology*.
- Gorai, I., Hosoda, K., Chaki, O., Taguchi, Y., Nakayama, M., Yoh, K., Yamaji, T., y Minaguchi, H. (1998). A heterogeneity in serum osteocalcin N-terminal fragments in Paget's disease: A comparison with other biochemical indices in pre-and postmenopause. *Calcif Tissue Int* 63, 459–465.
- Gray, E., Muller, D., Squires, P.E., Asare-Anane, H., Huang, G.C., Amiel, S., Persaud, S.J., y Jones, P.M. (2006). Activation of the extracellular calcium-sensing receptor initiates insulin secretion from human islets of Langerhans: involvement of protein kinases. *Journal of Endocrinology* 190, 703–710.
- Green, I.C., y Taylor, K.W. (1972). Effects of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of the islets of langerhans. *J Endocrinol* 54, 317–325.
- Green, S., Walter, P., Greene, G., Krust, A., Goffin, C., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., y Chambon, P. (1986). Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *Journal of Steroid Biochemistry* 24, 77–83.
- Gregerson, K.A. (2006). Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, p.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J.Å., y Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 950–64.

- Gropper SS, S.J. (2013). Advanced nutrition and human metabolism.
- Gross, K.L., y Cidlowski, J.A. (2008). Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 19, 331–9.
- Grota, L.J., y Eik-Nes, K.B. (1967). Plasma progesterone concentrations during pregnancy and lactation in the rat. *Journal of reproduction and fertility* 13, 83–91.
- H., G., J.-A., G., y V., L. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 950–964.
- Hall, J.E., y Guyton, A.C. (2000). *Textbook of medical physiology* (Philadelphia: Saunders Elsevier).
- Hennighausen, L., y Robinson, G.W. (2005). Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 715–725.
- Herrera, E. (2000). Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr* 54 *Suppl* 1, S47-51.
- Hilton, B.P., y Cumings, J.N. (1971). An assessment of platelet aggregation induced by 5-hydroxytryptamine. *J Clin Pathol* 24, 250–258.
- Hollanders, J.J., Heijboer, A.C., van der Voorn, B., Rotteveel, J., y Finken, M.J.J. (2017). Nutritional programming by glucocorticoids in breast milk: targets, mechanisms and possible implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 31, 397–408.
- Horseman, N.D., y Gregerson, K.A. (2013). Prolactin actions. *J Mol Endocrinol.* 52, R95-106.
- Hoyer, D., Hannon, J.P., y Martin, G.R. (2002). Molecular , pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Receptor* 71, 533–554.
- Huang, C., Snider, F., y Cross, J.C. (2009). Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology* 150, 1618–1626.
- Hubinont, C.J., Dufrane, S.P., Garcia-Morales, P., Valverde, I., Sener, A., y Malaisse, W.J. (1986). Influence of lactation upon pancreatic islet function. *Endocrinology* 118, 687–694.
- Hubinont CJ, M.W. (1887). Lactation-induced changes in calcium handling by rat pancreatic islets. *J Dev Physiol* 9, 31–39.
- Hudish, L.I., Reusch, J.E.B., y Sussel, L. (2019). β Cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 129, 4001–4008.
- Ishiguro, H., Yamamoto, A., Nakakuki, M., Yi, L., Ishiguro, M., Yamaguchi, M., Kondo, S., y Mochimaru, Y. (2012). Physiology and pathophysiology of bicarbonate secretion by pancreatic duct epithelium. *Nagoya J Med Sci* 74, 1–18.
- Jacovetti, C., Abderrahmani, A., Parnaud, G., Jonas, J.C., Peyot, M.L., Cornu, M., Laybutt, R.,

Meugnier, E., Rome, S., Thorens, B., et al. (2012). MicroRNAs contribute to compensatory β cell expansion during pregnancy and obesity. *Journal of Clinical Investigation* 122, 3541–3551.

Jena, M.K., Jaswal, S., Kumar, S., y Mohanty, A.K. (2019). Molecular mechanism of mammary gland involution: An update. *Developmental Biology* 445, 145–155.

Jones, P., Kitsou-Mylona, I., Gray, E., Squires, P., y Persaud, S. (2007). Expression and function of the extracellular calcium-sensing receptor in pancreatic β -cells.

Kadmiel, M., y Cidlowski, J.A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 34, 518–530.

Kalkwarf, H.J., Specker, B.L., Bianchi, D.C., Ranz, J., y Ho, M. (1997). The Effect of Calcium Supplementation on Bone Density during Lactation and after Weaning. *N Engl J Med.* 335, 523–528.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., y Jessell, T.M. (2001). Disorders of mood: depression, mania, and anxiety disorders. In *Principles of Neural Science*, (New York: McGraw-Hill), p.

Kar, S., y Ray, D.S. (2005). Sustained simultaneous glycolytic and insulin oscillations in β -cells. *J Theor Biol.* 237, 58–66.

Karsenty, G., y Ducy, P. (2006). The hypothalamic control of bone mass, implication for the treatment of osteoporosis. *Ann Endocrinol (Paris)* 67, 123.

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., y Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO Journal* 9, 1603–1614.

Keung, L., y Perwad, F. (2018). Vitamin D and kidney disease. *Bone Reports* 126, 1159S-64S.

Kim, S.K., y Hebrok, M. (2001). Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev.* 15, 111–127.

Kim, H., Toyofuku, Y., Lynn, F.C., Chak, E., Uchida, T., Mizukami, H., Fujitani, Y., Kawamori, R., Miyatsuka, T., Kosaka, Y., et al. (2010). Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nature Medicine* 16, 804–808.

Kim, K., Oh, C.M., Ohara-Imaizumi, M., Park, S., Namkung, J., Yadav, V.K., Tamarina, N.A., Roe, M.W., Philipson, L.H., Karsenty, G., et al. (2015). Functional role of serotonin in insulin secretion in a diet-induced insulin-resistant state. *Endocrinology* 156, 444–452.

Kini, U., y Nandeesh, B.N. (2012). Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. In *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*, H. Fogelman I, Gnanasegaran G, van der Wall H. Berlin, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 29–57.

Kirby, B.J., Ardeshirpour, L., Woodrow, J.P., Wysolmerski, J.J., Sims, N.A., Karaplis, A.C., y Kovacs, C.S. (2011). Skeletal recovery after weaning does not require PTHrP. *The Journal of*

Bone and Mineral Research 26, 1242–1251.

Kovacs, C.S. (2011). Calcium and bone metabolism disorders during pregnancy and lactation. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 40, 795–826.

Kovacs, C.S. (2016). Maternal mineral and bone metabolism during pregnancy, lactation, and post-weaning recovery. *Physiological Reviews* 96, 449–547.

Kovacs, C.S., y Kronenberg, H.M. (1997). Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocrine Reviews* 18, 832–872.

Kuiper, G.G.J.M., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., y Gustafsson, J.Å. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5925–5930.

Lacombe, J., Karsenty, G., y Ferron, M. (2013). In vivo analysis of the contribution of bone resorption to the control of glucose metabolism in mice. *Molecular Metabolism* 2, 498–504.

Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L., y Fernández-Mejía, C. (2009). Factores transcripcionales en la célula β adulta. *Revista de Investigacion Clinica*.

Lazo-De-La-Vega-Monroy, M.-L. (2011). Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes. C. Fernandez-Mejia, y D. Wagner, eds. (Rijeka: InTech), p. Ch. 5.

Lazo de la Vega, M.L., Larrieta, E., German, M.S., Baez-Saldana, A., y Fernandez-Mejia, C. (2013). Effects of biotin supplementation in the diet on insulin secretion, islet gene expression, glucose homeostasis and beta-cell proportion. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24, 169–177.

Lazo de la Vega Monroy, M.L. (2012). Efectos de la suplementación con biotina sobre el islote pancreático. Universidad Nacional Autónoma de México.

Lechner, J., Welte, T., Tomasi, J.K., Bruno, P., Cairns, C., Gustafsson, J.Å., y Doppler, W. (1997). Promoter-dependent synergy between glucocorticoid receptor and Stat5 in the activation of β -casein gene transcription. *J Biol Chem* 272, 20954–20960.

Lecka-Czernik, B., y Rosen, C.J. (2015). Energy Excess, Glucose Utilization, and Skeletal Remodeling: New Insights. *Journal of Bone and Mineral Research* 30, 1356–1361.

Lee, A.J., Hodges, S., y Eastell, R. (2000). Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 37, 432–446.

Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., et al. (2007). Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell* 130, 456–469.

Lellis-Santos, C., Sakamoto, L.H., Bromati, C.R., Nogueira, T.C. a, Leite, A.R., Yamanaka, T.S., Kinote, A., Anhô, G.F., y Bordin, S. (2012). The regulation of Rasd1 expression by glucocorticoids and prolactin controls peripartum maternal insulin secretion. *Endocrinology* 153,

3668–3678.

Lephart, E.D., Simpson, E.R., y McPhaul, M.J. (1992). Ovarian aromatase cytochrome P-450 mRNA levels correlate with enzyme activity and serum estradiol levels in anestrus, pregnant and lactating rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 85, 205–214.

Liu, S., y Mauvais-Jarvis, F. (2010). Minireview: Estrogenic protection of β -cell failure in metabolic diseases. *Endocrinology*.

Liu, X.S., Ardeshirpour, L., VanHouten, J.N., Shane, E., y Wysolmerski, J.J. (2012). Site-specific changes in bone microarchitecture, mineralization, and stiffness during lactation and after weaning in mice. *J Bone Miner Res* 27, 865–875.

Macotela, Y., Triebel, J., y Clapp, C. (2020). Time for a New Perspective on Prolactin in Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 31, 276–286.

Magon, N., y Kumar, P. (2012). Hormones in pregnancy. *Nigerian Medical Journal* 53, 179–183.

Marshall, A.M., Hernandez, L.L., y Horseman, N.D. (2014). Serotonin and serotonin transport in the regulation of lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 19, 139–146.

Martin, A.M., Young, R.L., Leong, L., Rogers, G.B., Spencer, N.J., Jessup, C.F., y Keating, D.J. (2017). The diverse metabolic roles of peripheral serotonin. *Endocrinology* 158, 1049–1063.

Marynissen, G., Aerts, L., y Van Assche, F. (1983). The endocrine pancreas during pregnancy and lactation in the rat. *Journal of Developmental Physiology* 5, 373–381.

Marynissen, G., Malaisse, W.J., y Van Assche, F.A. (1985). Ultrastructural changes of the pancreatic β -cell and the insulin secretion by islets from lactating and non-lactating rats. *Journal of Developmental Physiology* 7, 17–23.

Mastracci, T.L., y Sussel, L. (2012). The endocrine pancreas: Insights into development, differentiation, and diabetes. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*. 1, 609–628.

Matschinsky, F.M. (1996). Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45, 223–241.

Matsuda, M., Imaoka, T., Vomachka, A.J., Gudelsky, G. a, Hou, Z., Mistry, M., Bailey, J.P., Nieport, K.M., Walther, D.J., Bader, M., et al. (2004). Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Developmental cell* 6, 193–203.

Matveyenko, A. V, Veldhuis, J.D., y Butler, P.C. (2008). Adaptations in pulsatile insulin secretion, hepatic insulin clearance, and beta-cell mass to age-related insulin resistance in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E832–E841.

Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D.J., y Hevener, A.L. (2013). The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocrine Reviews* 34, 309–338.

Mawe, G.M., y Hoffman, J.M. (2013). Serotonin signalling in the gut-functions, dysfunctions and

therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 473–486.

Le May, C., Chu, K., Hu, M., Ortega, C.S., Simpson, E.R., Korach, K.S., Tsai, M.J., y Mauvais-Jarvis, F. (2006). Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9232–9237.

Meier, J.J., y Bonadonna, R.C. (2013). Role of reduced β -cell mass versus impaired β -cell function in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 36 Suppl 2, S113-9.

Miller, S.C., y Bowman, B.M. (2007). Rapid inactivation and apoptosis of osteoclasts in the maternal skeleton during the bone remodeling reversal at the end of lactation. *Anat Rec (Hoboken)* 290, 65–73.

Miller, S.C., Anderson, B.L., y Bowman, B.M. (2005). Weaning initiates a rapid and powerful anabolic phase in the rat maternal skeleton. *Biology of Reproduction* 73, 156–162.

Mizoguchi, J., y Imamichi, T. (1987). Decrease in amylase (EC 3.4.21.4) synthesis in lactating rats. *Br J Nutr.* 57, 291–299.

Mohammad-Zadeh, L.F., Moses, L., y Gwaltney-Brant, S.M. (2008). Serotonin: A review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 31, 187–199.

Montanya, E., y Téllez, N. (2009). Pancreatic remodeling: Beta-cell apoptosis, proliferation and neogenesis, and the measurement of beta-cell mass and of individual beta-cell size. *Methods in Molecular Biology* 560, 137–158.

Montanya, E., Nacher, V., Biarnes, M., y Soler, J. (2000). Linear correlation between β -cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats. Role of β -cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 48, 1341–1346.

Moran, T.J., Gray, S., Mikosz, C.A., y Conzen, S.D. (2000). The glucocorticoid receptor mediates a survival signal in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 60, 867–872.

Motyl, K.J., McCabe, L.R., y Schwartz, A. V. (2010a). Bone and glucose metabolism: A two-way street. *Arch Biochem Biophys* 503, 2–10.

Motyl, K.J., McCabe, L.R., y Schwartz, A. V (2010b). Bone and glucose metabolism: a two-way street. *Arch Biochem Biophys* 503, 2–10.

Munoz, F., y Hu, H. (2016). The Role of Store-operated Calcium Channels in Pain. *Advances in Pharmacology* 75, 139–151.

Naef, L., y Woodside, B. (2007). Prolactin/leptin interactions in the control of food intake in rats. *Endocrinology* 148, 5977–5983.

Nemeth, E.F. (2004). Calcimimetic and calcilytic drugs: Just for parathyroid cells? *Cell Calcium* 35, 283–289.

Neville, M.C., McFadden, T.B., y Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary

differentiation and milk secretion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7, 49–66.

Ng, K.W. (2011). Regulation of glucose metabolism and the skeleton. *Clin Endocrinol (Oxf)* 75, 147–155.

Nichols, F.C., y Neuman, W.F. (1987). Lactic acid production in mouse calvaria in vitro with and without parathyroid hormone stimulation: Lack of acetazolamide effects. *Bone* 8, 105–109.

Nicoletti-Carvalho, J.E., Lellis-Santos, C., Yamanaka, T.S., Nogueira, T.C., Caperuto, L.C., Leite, A.R., Anhê, G.F., y Bordin, S. (2010). MKP-1 mediates glucocorticoid-induced ERK1/2 dephosphorylation and reduction in pancreatic β -cell proliferation in islets from early lactating mothers. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299, E1006-15.

Nielsen, J.H. (2016). Beta cell adaptation in pregnancy: a tribute to Claes Hellerström. *Upsala Journal of Medical Sciences* 121, 151–154.

Nielsen, S.S., Christensen, G.L., Holst, J.J., y Billestrup, N. (2016). Regulation of pancreatic α -cell function and proliferation by bone morphogenetic protein 4 (BMP4) in vitro. *Endocrinology*.

Obrant, K.J., Käkönen, S.M., Astermark, J., Lilja, H., Lövgren, T., Åkesson, K., y Pettersson, K. (1999). The proportion of carboxylated to total or intact osteocalcin in serum discriminates warfarin-treated patients from control subjects. *J Bone Miner Res.* 14, 555–560.

Ohara, M., Kim, H., Yoshida, M., Fujiwara, T., Aoyagi, K., Toyofuku, Y., Nakamichi, Y., Nishiwaki, C., Okamura, T., Uchida, T., et al. (2013). Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic cells during pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 19420–19425.

Oyer, P.E., Cho, S., Peterson, J.D., y Steiner, D.F. (1971). Studies on human proinsulin. Isolation and amino acid sequence of the human pancreatic C-peptide. *Journal of Biological Chemistry* 246, 1375–1386.

Pai, V.P., y Horseman, N.D. (2008). Biphasic regulation of mammary epithelial resistance by serotonin through activation of multiple pathways. *J Biol Chem* 283, 30901–30910.

Parsons, J.A., Brelje, T.C., y Sorenson, R.L. (1992). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130, 1459–1466.

Pastén-Hidalgo, K., Riverón-Negrete, L., Sicilia-Argumedo, G., Canul-Medina, G., Salazar-Anzures, T., Tapia-Rodríguez, M., Hernández-González, E.O., Roa-Espitia, A.L., Cedillo-Peláez, C., y Fernandez-Mejia, C. (2020). Dietary Biotin Supplementation Impairs Testis Morphology and Sperm Quality. *Journal of Medicinal Food* 23, 535–544.

Pi, M., Wu, Y., y Quarles, L.D. (2011). GPRC6A mediates responses to osteocalcin in beta-cells in vitro and pancreas in vivo. *J Bone Miner Res* 26, 1680–1683.

Pi, M., Kapoor, K., Wu, Y., Ye, R., Senogles, S.E., Nishimoto, S.K., Hwang, D.J., Miller, D.D.,

- Narayanan, R., Smith, J.C., et al. (2015). Structural and functional evidence for testosterone activation of GPRC6A in peripheral tissues. *Molecular Endocrinology* 29, 1759–1773.
- Pi, M., Kapoor, K., Ye, R., Nishimoto, S.K., Smith, J.C., Baudry, J., y Quarles, L.D. (2016). Evidence for osteocalcin binding and activation of GPRC6A in β -cells. *Endocrinology* 157, 1866–1880.
- Pirmoradi, L., Noorafshan, A., Safaee, A., y Dehghani, G.A. (2016). Quantitative assessment of proliferative effects of oral vanadium on pancreatic islet volumes and beta cell numbers of diabetic rats. *Iranian Biomedical Journal* 20, 18–25.
- Porat, S., Weinberg-Corem, N., Tornovsky-Babaey, S., Schyr-Ben-Haroush, R., Hija, A., Stolovich-Rain, M., Dadon, D., Granot, Z., Ben-Hur, V., White, P., et al. (2011). Control of pancreatic β cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metabolism*.
- Prior, J.C. (2018). Progesterone for the prevention and treatment of osteoporosis in women. *Climacteric* 21, 366–374.
- Quesada, C., Tudurí, E., Marroquí, L., Alonso, P., Quesada, I., y Nadal, Á. (2020). Morphological and functional adaptations of pancreatic alpha-cells during late pregnancy in the mouse. *Metabolism* 69, 825–835.
- Rabbani, S.A., Khalili, P., Arakelian, A., Pizzi, H., Chen, G., y Goltzman, D. (2005). Regulation of parathyroid hormone-related peptide by estradiol: effect on tumor growth and metastasis in vitro and in vivo. *Endocrinology* 146, 2885–2894.
- Radhakrishnan, A., Raju, R., Tuladhar, N., Subbannayya, T., Thomas, J.K., Goel, R., Telikicherla, D., Palapetta, S.M., Rahiman, B.A., Venkatesh, D.D., et al. (2012). A pathway map of prolactin signaling. *J Cell Commun Signal.* 6, 169–173.
- Raggatt, L.J., y Partridge, N.C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 285, 25103–25108.
- Rahier, J., Wallon, J., y Henquin, J.C. (1981). Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. *Diabetologia* 20, 540–546.
- Raisz, L.G., y Kream, B.E. (1983). Regulation of Bone Formation. *N Engl J Med.* 309, 29–35.
- Rakopoulos, M., Vargas, S.J., Gillespie, M.T., Ho, P.W., Diefenbach-Jagger, H., Leaver, D.D., Grill, V., Moseley, J.M., Danks, J.A., y Martin, T.J. (2006). Production of parathyroid hormone-related protein by the rat mammary gland in pregnancy and lactation. *Am J Physiol* 263, E1077–E1085.
- Ramos-Romn, M.A. (2011). Prolactin and lactation as modifiers of diabetes risk in gestational diabetes. *Hormone and Metabolic Research* 43, 593–600.
- Riccardi, D., y Brown, E.M. (2010). Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 298, F485-99.

- Riccardi, D., y Kemp, P.J. (2012). The calcium-sensing receptor beyond extracellular calcium homeostasis: Conception, development, adult physiology, and disease. *Annual Review of Physiology* 74, 271–297.
- Riddle, O., Bates, R.W., y Dykshorn, S.W. (1933). The preparation, identification and assay of prolactin—a hormone of the anterior pituitary. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 105, 191–216.
- Rieck, S., y Kaestner, K.H. (2010). Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21, 151–158.
- Röder, P. V, Wu, B., Liu, Y., y Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine* 48, e219–e219.
- Rolls, B.A., Henschel, M.J., y Palmer, M.F. (1979). The effects of pregnancy and lactation on the activities of trypsin and α -chymotrypsin in the rat pancreas. *Br J Nutr.* 41, 573–578.
- Rorsman, P., y Renstrom, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1029–1045.
- Ruiz-Herrera, X., De Los Ríos, E.A., Díaz, J.M., Lerma-Alvarado, R.M., De La Escalera, L.M., López-Barrera, F., Lemini, M., Arnold, E., De La Escalera, G.M., Clapp, C., et al. (2017). Prolactin promotes adipose tissue fitness and insulin sensitivity in obese males. *Endocrinology*.
- Saito, K., Iwama, N., y Takahashi, T. (1978). Morphometrical Analysis on Topographical Difference in Size Distribution, Number and Volume of Islets in the Human Pancreas. *Tohoku J Exp Med.* 124, 177–186.
- Scaglia, L., Smith, F.E., y Bonner-Weir, S. (1995). Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* 136, 5461–5468.
- Schraenen, a, Lemaire, K., de Faudeur, G., Hendrickx, N., Granvik, M., Van Lommel, L., Mallet, J., Vodjdani, G., Gilon, P., Binart, N., et al. (2010). Placental lactogens induce serotonin biosynthesis in a subset of mouse beta cells during pregnancy. *Diabetologia* 53, 2589–2599.
- Schwalm, J.W., y Tucker, A. (1978). Glucocorticoids in mammary secretions and blood serum during reproduction and lactation and distributions of glucocorticoids, progesterone, and estrogens in fractions of milk. *J Dairy Sci* 61, 550–560.
- Schwetz, V., Pieber, T., y Obermayer-Pietsch, B. (2012). The endocrine role of the skeleton: background and clinical evidence. *Eur J Endocrinol* 166, 959–967.
- Seibel, M.J. (2003). Biochemical markers of bone remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 32, 83–113.
- Shepherd, J.J. (1963). Serotonin and Gut Motility. *Br Med J* 2, 1589.
- Shirakawa, J., De Jesus, D.F., y Kulkarni, R.N. (2017). Exploring inter-organ crosstalk to

- uncover mechanisms that regulate β -cell function and mass. *European Journal of Clinical Nutrition* 71, 896–903.
- Shiu, R.P., y Iwasio, B.M. (1985). Prolactin-inducible proteins in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 260, 11307–11313.
- Silver, J., y Naveh-Many, T. (1993). Calcitonin gene regulation in vivo. *Hormone and Metabolic Research* 25, 470 – 472.
- Simpson, E.R. (2003). Sources of estrogen and their importance. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 86, 225–230.
- Sokoll, L.J., y Sadowski, J.A. (1996). Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population. *Am J Clin Nutr.* 63, 566–573.
- Solano, M.E., y Arck, P.C. (2020). Steroids, Pregnancy and Fetal Development. *Frontiers in Immunology* 10, 3017.
- Soma-Pillay, P., Nelson-Piercy, C., Tolppanen, H., y Mebazaa, A. (2016). Physiological changes in pregnancy. *Cardiovascular Journal of Africa* 27, 89–94.
- Sorenson, R.L., y Brelje, T.C. (1997). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: β -cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Hormone and Metabolic Research* 29, 301–307.
- Squires, P.E. (2000). Non- Ca^{2+} -homeostatic functions of the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor (CaR) in endocrine tissues. *Journal of Endocrinology* 165, 173–177.
- Stagner, J.I., Samols, E., y Weir, G.C. (1980). Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. *J Clin Invest* 65, 939–942.
- Suckale, J., y Solimena, M. (2008). Pancreas islets in metabolic signaling - focus on the beta-cell. *Front Biosci* 13, 7156–7171.
- Sullivan, T.R., Duque, G., Keech, A.C., y Herrmann, M. (2013). An old friend in a new light: the role of osteocalcin in energy metabolism. *Cardiovascular Therapeutics* 31, 65–75.
- Suntornsaratoon, P., Wongdee, K., Krishnamra, N., y Charoenphandhu, N. (2009). Femoral bone mineral density and bone mineral content in bromocriptine-treated pregnant and lactating rats. *J Physiol Sci* 60, 1–8.
- Swali, A., Walker, E.A., Lavery, G.G., Tomlinson, J.W., y Stewart, P.M. (2008). 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulates insulin and glucagon secretion in pancreatic islets. *Diabetologia* 51, 2003–2011.
- Taichman, R.S. (2005). Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 105, 2631–2639.

Takeo, A., Kanazawa, I., Notsu, M., Tanaka, K.I., y Sugimoto, T. (2018). Glucose uptake inhibition decreases expressions of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and osteocalcin in osteocytic MLO-Y4-A2 cells. *The American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* 314, E115–E123.

Taraborrelli, S. (2015). Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 161, 8–16.

Taya, K. (1992). Studies on Regulatory Mechanisms for Gonadotropins Secretion in Lactating Rats. *Journal of Reproduction and Development* 38, j91–j107.

Taya, K., y Greenwald, G.S. (1982). Peripheral Blood and Ovarian Levels of Sex Steroids in the Lactating Rat. *Endocrinologia Japonica* 29, 453–459.

Teti, A., y Zallone, A. (2009). Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone* 44, 11–16.

Thomas, M.P., y Potter, B.V.L. (2013). The structural biology of oestrogen metabolism. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 137, 27–49.

Thonshote, K., Charoenphandhu, N., y Krishnamra, N. (2008). High physiological prolactin induced by pituitary transplantation decreases BMD and BMC in the femoral metaphysis, but not in the diaphysis of adult female rats. *J Physiol Sci* 58, 39–45.

Tojo, Y., Kurabayashi, T., Honda, A., Yamamoto, Y., Yahata, T., Takakuwa, K., y Tanaka, K. (1998). Bone structural and metabolic changes at the end of pregnancy and lactation in rats. *Am J Obstet Gynecol* 178, 180–185.

Toselli, C., Hyslop, C.M., Hughes, M., Natale, D.R., Santamaria, P., y Huang, C.T.L. (2014). Contribution of a non- β -cell source to β -cell mass during pregnancy. *PLoS ONE* 9, e100398.

Trott, J.F., Schennink, A., Petrie, W.K., Manjarin, R., van Klompenberg, M.K., y Hovey, R.C. (2012). Triennial lactation symposium: Prolactin: The multifaceted potentiator of mammary growth and function. *Journal of Animal Science* 90, 1674–1686.

Valadez-Cosmes, P., Vázquez-Martínez, E.R., Cerbón, M., y Camacho-Arroyo, I. (2016). Membrane progesterone receptors in reproduction and cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology* 434, 166–175.

Vanhouten, J.N., y Wysolmerski, J.J. (2003). Low Estrogen and High Parathyroid Hormone-Related Peptide Levels Contribute to Accelerated Bone Resorption and Bone Loss in Lactating Mice. *Endocrinology*.

VanHouten, J., Dann, P., McGeoch, G., Brown, E.M., Krapcho, K., Neville, M., y Wysolmerski, J.J. (2004). The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone-related protein production and calcium transport. *J Clin Invest* 113, 598–608.

Vasu, S., Moffett, R.C., Thorens, B., y Flatt, P.R. (2014). Role of endogenous GLP-1 and GIP in

beta cell compensatory responses to insulin resistance and cellular stress. *PLoS ONE* 9, e101005.

Villasenor, A., Chong, D.C., Henkemeyer, M., y Cleaver, O. (2010). Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. *Development* 137, 4295–4305.

Wagner, C.K., y Quadros-Mennella, P. (2017). Progesterone from maternal circulation binds to progesterin receptors in fetal brain. *Developmental Neurobiology* 77, 767–774.

Walker, C.D., Lightman, S.L., Steele, M.K., y Dallman, M.F. (1992). Suckling is a persistent stimulus to the adrenocortical system of the rat. *Endocrinology* 130, 115–25.

Watson, C.J. (2006). Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res* 8, 203.

Wei, J., Hanna, T., Suda, N., Karsenty, G., y Ducy, P. (2014). Osteocalcin promotes β -cell proliferation during development and adulthood through *Gprc6a*. *Diabetes* 63, 1021–1031.

Wei, J., Shimazu, J., Makinistoglu, M.P., Maurizi, A., Kajimura, D., Zong, H., Takarada, T., Lezaki, T., Pessin, J.E., Hinoi, E., et al. (2015). Glucose Uptake and *Runx2* Synergize to Orchestrate Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 161, 1576–1591.

Weinhaus, A.J., Bhagroo, N. V., Brelje, T.C., y Sorenson, R.L. (2000). Dexamethasone Counteracts the Effect of Prolactin on Islet Function: Implications for Islet Regulation in Late Pregnancy. *Endocrinology* 141, 1384–1393.

Weir, G.C., Laybutt, D.R., Kaneto, H., Bonner-Weir, S., y Sharma, A. (2001). β -cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 50 *Suppl 1*, S154-9.

Wetendorf, M., y DeMayo, F.J. (2014). Progesterone receptor signaling in the initiation of pregnancy and preservation of a healthy uterus. *International Journal of Developmental Biology* 58, 95–106.

Whirledge, S., y Cidlowski, J.A. (2017). Glucocorticoids and Reproduction: Traffic Control on the Road to Reproduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*.

Wieczorek, A., Perani, C. V., Nixon, M., Constancia, M., Sandovici, I., Zazara, D.E., Leone, G., Zhang, M.Z., Arck, P.C., y Solano, M.E. (2019). Sex-specific regulation of stress-induced fetal glucocorticoid surge by the mouse placenta. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 317, E109–E120.

Windle, R., Wood, S., y Kershaw, Y. (2013). Adaptive Changes in Basal and Stress-Induced HPA Activity in Lactating and Post-Lactating Female Rats. *Endocrinology* 154, 749–761.

Wolf, G. (2009). Function of the Bone Protein Osteocalcin: Definitive Evidence. *Nutr Rev.* 54, 332–333.

Wollheim, C.B., y Sharp, G.W. (1981). Regulation of insulin release by calcium. *Physiological reviews* 76, 1089–1107.

Wongdee, K., Teerapornpantakit, J., Sripong, C., Longkunan, A., Chankamngoen, W., Keadsai, C., Kraidith, K., Krishnamra, N., y Charoenphandhu, N. (2016). Intestinal mucosal changes and upregulated calcium transporter and FGF-23 expression during lactation: contribution of lactogenic hormone prolactin. *Arch Biochem Biophys* 590, 109–117.

Wongdee, K., Rodrat, M., Teerapornpantakit, J., Krishnamra, N., y Charoenphandhu, N. (2019). Factors inhibiting intestinal calcium absorption: hormones and luminal factors that prevent excessive calcium uptake. *J Physiol Sci* 11, 1–14.

Xu, H., Abuhatzira, L., Carmona, G.N., Vadrevu, S., Satin, L.S., y Notkins, A.L. (2015a). The Ia-2 β intronic miRNA, miR-153, is a negative regulator of insulin and dopamine secretion through its effect on the *Cacna1c* gene in mice. *Diabetologia* 58, 2298–2306.

Xu, Y., Wang, X., Gao, L., Zhu, J., Zhang, H., Shi, H., Woo, M., y Wu, X. (2015b). Prolactin-stimulated survivin induction is required for beta cell mass expansion during pregnancy in mice. *Diabetologia*.

Yao, Q., Yu, C., Zhang, X., Zhang, K., Guo, J., y Song, L. (2017). Wnt/ β -catenin signaling in osteoblasts regulates global energy metabolism. *Bone* 97, 175–183.

Yoshikawa, Y., Kode, A., Xu, L., Mosialou, I., Silva, B.C., Ferron, M., Clemens, T.L., Economides, A.N., y Kousteni, S. (2011). Genetic evidence points to an osteocalcin-independent influence of osteoblasts on energy metabolism. *The Journal of Bone and Mineral Research* 26, 2012–2025.

Yu, E., y Sharma, S. (2019). *Physiology, Calcium* (Treasure Island: StatPearls).

Zhang, D., Guo, Q., Bian, C., Zhang, J., Cai, W., y Su, B. (2011). Expression of steroid receptor coactivator-1 was regulated by postnatal development but not ovariectomy in the hippocampus of rats. *Developmental Neuroscience* 33, 57–63.

Zoch, M.L., Clemens, T.L., y Riddle, R.C. (2016). New insights into the biology of osteocalcin. *Bone* 82, 42–49.

20. ANEXO

ANEXO 1

Canul-Medina, G., Riverón-Negrete, L., Pastén-Hidalgo, K., Morales-Castillo, P., García-Vázquez, F., and Fernandez-Mejia, C. (2021). Maternal adaptations of pancreatic islets and glucose metabolism after lactation. *Journal of Endocrinology* 248, 1–15.

Maternal adaptations of pancreatic islets and glucose metabolism after lactation

Gustavo Canul-Medina¹, Leticia Riverón-Negrete¹, Karina Pastén-Hidalgo², Paulina Morales-Castillo¹, Francisco García-Vázquez³ and Cristina Fernandez-Mejia¹

¹Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

²Cátedra CONACYT, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

³Laboratorio de Inmunología y Alergia, Departamento de Análisis Clínicos y Estudios Especiales, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

Correspondence should be addressed to C Fernandez-Mejia: crisfern@biomedicas.unam.mx

Abstract

Pancreatic islets adapt to metabolic requirements and the hormonal milieu by modifying their size and hormone secretions. Maternal glucose demands and hormonal changes occur after weaning, to rapidly re-establish bone mineralization. Minimal information exists about glucose metabolism and pancreatic islets after lactation. This study investigated islet morphology and glucose homeostasis for 14 days after lactation in C57BL/6NHHsd mice. Compared to the day of weaning, rapid increases in the islets' area and number of beta cells were found from the first day post-lactation, attaining maximum values on the third day post-weaning. These changes were accompanied by modifications in glucose-induced insulin secretion, glucose tolerance and insulin sensitivity. Islet-cell proliferation was already augmented before lactation ceased. Serum undercarboxylated osteocalcin concentrations increased significantly post-lactation; however, it is unlikely that this enhancement participates in earlier cell proliferation augmentation or in decreasing insulin sensitivity. Islet serotonin content was barely expressed, and serum calcium concentrations decreased. By the 14th day post-weaning, islets' area and glucose homeostasis returned to age-matched virgin mice levels. These findings recognize for the first time that increases in islet area and insulin secretion occur during physiological post-weaning conditions. These results open up new opportunities to identify molecules and mechanisms participating in these processes, which will help in developing strategies to combat diabetes.

Key Words

- ▶ insulin secretion
- ▶ post-weaning
- ▶ glucose tolerance
- ▶ undercarboxylated osteocalcin

Journal of Endocrinology
(2020) **247**, 1–15

(Canul-Medina et al., 2021)

Anexo 2

Canul, G., and Fernandez, C. (2019). Morphological, hormonal, and molecular changes in different maternal tissues during lactation and post-lactation. *The Journal of Physiological Sciences* 69, 825–835.

The Journal of Physiological Sciences
<https://doi.org/10.1007/s12576-019-00714-4>

REVIEW



Morphological, hormonal, and molecular changes in different maternal tissues during lactation and post-lactation

Gustavo Canul-Medina¹ · Cristina Fernandez-Mejia¹ 

Received: 2 May 2019 / Accepted: 13 September 2019
© The Physiological Society of Japan and Springer Japan KK, part of Springer Nature 2019

Abstract

Milk supply and quality during lactation are critical for progeny survival. Maternal tissues and metabolism, influenced by hormonal changes, undergo modification during lactation to sustain breastfeeding. Two organs that suffer essential adjustment are the mammary glands and the bone; however, renal calcium conservation and calcium absorption from the intestine are also modified. Lactation leads to a transient loss of bone minerals to provide adequate amounts of minerals, including calcium for milk production. Physiological, metabolic, and molecular changes in different tissues participate in providing nutrients for milk production. After weaning, the histological, metabolic, and hormonal modifications that take place in lactation are reverted, and bone remineralization is a central function at this time. This study focuses on the hormonal, metabolic, molecular, and tissue modifications that occur in mammary glands, bone, intestine, and kidneys in the mother during lactation and post-weaning periods.

Keywords Lactation · Mammary gland · Bone · Intestine

(Canul y Fernandez, 2019)

ANEXO 3

Pastén-Hidalgo, K., Riverón-Negrete, L., Sicilia-Argumedo, G., **Canul-Medina, G.**, Salazar-Anzures, T., Tapia-Rodríguez, M., Hernández-González, E.O., Roa-Espitia, A.L., Cedillo-Peláez, C., and Fernandez-Mejia, C. (2020). Dietary Biotin Supplementation Impairs Testis Morphology and Sperm Quality. *Journal of Medicinal Food* 23, 535–544.

JOURNAL OF MEDICINAL FOOD

J Med Food 00 (0) 2019, 1–10

© Mary Ann Liebert, Inc., and Korean Society of Food Science and Nutrition

DOI: 10.1089/jmf.2019.0137

Dietary Biotin Supplementation Impairs Testis Morphology and Sperm Quality

Karina Pastén-Hidalgo,¹ Leticia Riverón-Negrete,² Gloria Sicilia-Argumedo,² Gustavo Canul-Medina,² Tonatiuh Salazar-Anzures,² Miguel Tapia-Rodríguez,³ Enrique O. Hernández-González,⁴ Ana Lilia Roa-Espitia,⁴ Carlos Cedillo-Peláez,⁵ and Cristina Fernandez-Mejia²

¹*Cátedra CONACYT, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico.*

²*Unidad de Genética de la Nutrición, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México/Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico.*

³*Unidad de Microscopía, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico.*

⁴*Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, San Pedro Zacatenco, Mexico City, Mexico.*

⁵*Departamento de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico.*

ABSTRACT Supplements containing pharmacological concentrations of biotin are commercially available over the counter. Classical toxicity studies have considered biotin administration as harmless; however, recent investigations have shown that biotin supplementation modifies tissue morphology without changes in toxicity markers, raising concerns about the consequences of morphological changes on tissues' functions and the safety of pharmacological concentrations of the vitamin. Testes are very sensitive to toxicants, and testicular histology is a reliable method to study its function. In this work, we investigated the effects of dietary biotin supplementation on testis morphology and spermatogenesis function using an experimental model, in which we have not observed unfavorable effects on other tissue functions or toxicity markers. Male BALB/cAnNHsd mice were fed a control or a biotin-supplemented diet (1.76 or 97.7 mg biotin/kg diet) for 8 weeks. Compared to the control group, the biotin-supplemented mice presented remarkable testis morphology changes, including increased spermatogonia layers; the cellular mechanism involved is related to increased proliferation. Sperm count and serum testosterone levels were not affected, but spermatozoa motility and morphology were significantly impaired in the biotin-supplemented mice. These results caution against the use of supplements with high concentrations of biotin and indicate that biotin's pharmacological effects on morphology need to be considered in toxicological studies.

(Pastén-Hidalgo et al., 2020)