



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL
ISLOTE PANCREÁTICO Y HOMEOSTASIS DE
LA GLUCOSA A LOS DÍAS 15 Y 17 DE
LACTANCIA EN RATONES DE LA CEPA
C57BL/6**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANDREA PAULINA MORALES CASTILLO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA CRISITNA REGINA FERNÁNDEZ
MEJÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. , 2021**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

Andrea Paulina Morales Castillo

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

312016131

2. Datos del tutor

Dra. María Cristina Regina Fernández Mejía

3. Datos del sinodal 1

Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

4. Datos del sinodal 2

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

5. Datos del sinodal 3

Dra. Karina Pastén Hidalgo

6. Datos del sinodal 4

M. en C. Alain de Jesús Hernández Vázquez

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización morfológica del islote pancreático y homeostasis de la glucosa a los días 15 y 17 de lactancia en ratones de la cepa C57BL6

44 pp.

2021

AGRADECIMIENTOS

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".

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

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

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

Proyecto de CONACyT Ciencia Básica A1-S-10101.

AGRADECIMIENTOS:

A mi madre, Maricela Castillo Román *Q. E. P. D* gracias por todo el amor, por la felicidad y las enseñanzas. Con toda mi admiración, amor y respeto. Te extrañaré siempre.

A mi hermano Memo, con todo mi amor.

A mi tía Yolanda y a mi tío Guadalupe, a mis primos David, Francisco y Moisés. Gracias a todos por ser mi familia, por todo el apoyo y el cariño.

A Alí Mancilla Gaytán, gracias por todo el amor, por el apoyo incondicional, por todo lo que me has enseñado y por creer en mí.

A mis amigos: Alejandro, Christian y Santiago, gracias por estar siempre, por el cariño, por las risas y los consejos.

A la Dra. Cristina Fernández Mejía, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de él. Gracias por todo el apoyo brindado, mi admiración, respeto y agradecimiento.

Al M en C Francisco García Vázquez y al laboratorio de Inmunología y Alergia, Departamento de Análisis Clínicos y Estudios Especiales, Instituto Nacional de Pediatría.

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

Un especial agradecimiento a las siguientes personas por todo su apoyo en el ámbito académico y personal, por su tiempo y todas sus enseñanzas:

Dra. Leticia Riverón Negrete

Dr. Gustavo Canul Medina

Dra. Karina Pasten Hidalgo

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	3
PÁNCREAS	3
ISLOTES PANCREÁTICOS	4
Célula beta	5
Insulina	6
Cambios en la célula beta durante la gestación	9
Cambios en la célula beta durante la lactancia	10
Cambios en la célula beta durante la poslactancia	11
Cambios en la homeostasis de glucosa durante la gestación	12
Cambios en la homeostasis de glucosa durante la lactancia	13
Cambios en la homeostasis de glucosa durante la poslactancia	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	15
General	15
Particulares	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Modelo biológico	16
Animales de estudio	16
Grupo experimental lactante	16
Grupo control	16
Histología del páncreas	16
Obtención del tejido pancreático	16
Inmunohistoquímica	17
Inmunofluorescencia	17
Microscopía y obtención de micrografías	17
Análisis morfométricos	18
Tamaño del islote	18
Distribución de tamaño de los islotes	18
Área porcentual de la célula beta en el islote pancreático.	18
Porcentaje de proliferación	18
Homeostasis de la glucosa	18
Curvas de tolerancia a la insulina	18
Curvas de tolerancia a la glucosa	19
Análisis estadísticos	19
RESULTADOS	20

Análisis morfométricos	20
Tamaño del islote	20
Distribución de tamaño de los islotes	22
Tamaño individual de las células alfa y beta	22
Proporción de células alfa y células beta	24
Proliferación	24
Homeostasis de la glucosa	26
Glucosa en ayuno y no ayuno	26
Curvas de sensibilidad a la insulina	27
Curvas de tolerancia a la glucosa	28
<i>DISCUSIÓN</i>	29
<i>CONCLUSIONES</i>	31
<i>REFERENCIAS</i>	32

FIGURA 1 COMPARACIÓN DE LA ANATOMÍA DE PÁNCREAS HUMANO Y RATÓN.	3
FIGURA 2 COMPOSICIÓN CELULAR DEL PÁNCREAS	4
FIGURA 3. COMPOSICIÓN CELULAR DEL ISLOTE (5
FIGURA 4 SECRECIÓN DE INSULINA	7
FIGURA 5 FIGURA 5. REGULADORES DE LA HOMEOSTASIS DE LA MASA DE LA CÉLULA BETA	9
FIGURA 6. ADAPTACIONES EN EL ISLOTE MATERNO DURANTE LA GESTACIÓN.	11
FIGURA 7. MICROGRAFÍAS DE INMUNOFLUORESCENCIA	20
FIGURA 8 ÁREA Y NÚMERO DE CÉLULAS POR ISLOTE	21
FIGURA 9. FRECUENCIA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LOS ISLOTES.	22
FIGURA 10 ÁREA Y NÚMERO PROMEDIO DE CÉLULAS ALFA Y BETA	23
FIGURA 11 PORCENTAJE DE CÉLULAS ALFA Y BETA EN LOS ISLOTES PANCREÁTICOS	24
FIGURA 12 PROLIFERACIÓN CELULAR	26
FIGURA 13 NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE	27
FIGURA 14 SENSIBILIDAD A LA INSULINA	27
FIGURA 15 TOLERANCIA A LA GLUCOSA	28

RESUMEN

La lactancia, al igual que la gestación, corresponde a uno de los retos metabólicos más importantes en la fisiología de las hembras. Durante la gestación existen cambios morfológicos en los islotes pancreáticos como parte de la adaptación a las demandas energéticas del feto características de este período. Las adaptaciones morfológicas descritas en el páncreas endócrino de roedores gestantes muestran incremento en el tamaño de los islotes y en la secreción de insulina, aumento en la proliferación y masa de la célula beta; sin embargo, existen pocas observaciones describiendo lo que ocurre en el páncreas endócrino durante la lactancia tardía.

En el presente estudio se realizaron análisis morfométricos del islote pancreático materno durante los días 15 y 17 de lactancia, días que corresponden a la mayor actividad lactante y los días de máxima demanda energética en la fisiología materna durante este periodo. Los resultados obtenidos muestran que el área del islote no se modifica durante este periodo. La cuantificación del porcentaje de células alfa y beta de los islotes no arrojaron diferencias entre los grupos. De manera sorprendente, se observó un incremento cercano al doble en el porcentaje de proliferación de las células del islote en el día 17 de lactancia respecto al control.

Por otro lado, durante los días 15 y 17 de lactancia existe una disminución en la concentración de glucosa posprandial y se observó una mayor tolerancia a la glucosa en el día 17 de lactancia.

INTRODUCCIÓN

Los islotes pancreáticos tienen la facultad de adaptar la masa de las células beta y la secreción de insulina al enfrentarse a estados metabólicos como la resistencia a la insulina y cambios hormonales (Ernst, Demirci, Shelley, Velazquez-Garcia, & Garcia-Ocaña, 2011). El mejor ejemplo de esta plasticidad se da durante la gestación, la cual se caracteriza por la resistencia a la insulina que se desarrolla para favorecer la llegada de glucosa al feto (R. Sorenson & Brelje, 1997). El incremento de prolactina y lactógeno placentario inducen el aumento en la masa de las células beta lo que resulta en incremento en el tamaño del islote y en la secreción de insulina; factores como la progesterona y la serotonina también participan en este evento (Kim et al., 2010; Parsons, 1992).

Después del parto los cambios producidos en el islote se revierten (Teixeira et al., 2019). Se ha descrito que un incremento en la apoptosis y una reducción en la proliferación son los mecanismos celulares que permiten disminuir la masa de las células beta en los primeros 4 días después del parto (Genevay, Pontes, & Meda, 2010b; Marynissen, G., Aerts, L., Van Assche, 1983; Marynissen, Malaisse, & Van Assche, 1987; Nielsen, 2016; Scaglia Luisa, Smith F, 1995; Teixeira et al., 2019). Se ha reportado que durante la lactancia diversas especies presentan baja concentración de glucosa e insulina en sangre, mayores tasas de producción de glucosa por incremento en la glucogenólisis (Jones, Ilic, & Williamson, 1984). Otros estudios señalan que la disminución en la síntesis de insulina se relaciona con bajas concentraciones de calcio en los depósitos intracelulares de las células beta (Malaisse & Hubinont, 1987).

Estudios sugieren que en los roedores existen cambios en el tamaño del islote durante la lactancia. Durante la lactancia temprana se ha observado una disminución en el área del islote y en el tamaño de las células beta. Además, se ha reportado una disminución significativa del área del islote al día 10 de lactancia cuya área es menor a la reportada en hembras no-gestantes y del área observada al final del de lactancia (Scaglia Luisa, Smith F, 1995).

Hasta la fecha no se han documentado los cambios en el islote pancreático materno durante la actividad máxima de la lactancia, la cual ocurre durante la lactancia tardía entre los días 15 y 17 que corresponde al período de mayor producción de leche y demanda energética materna (Ino, Yoshikawa, Yamauchi, & Sakuma, 1969).

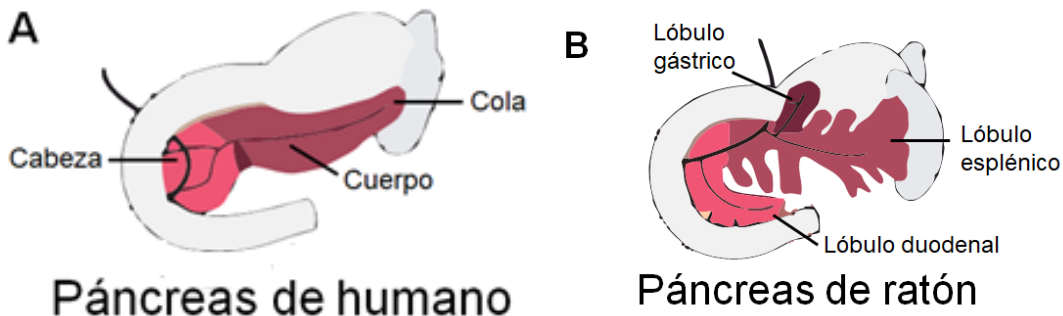
ANTECEDENTES

PÁNCREAS

El páncreas es un órgano que difiere anatómicamente de una especie a otra. En murinos el páncreas se caracteriza como un órgano difuso en comparación con el de humano que presenta una anatomía definida. El tejido pancreático de los ratones se distribuye mediante ramificaciones junto con el mesenterio del intestino delgado (Dolenšek, Rupnik, & Stožer, 2015).

Se distinguen tres áreas del páncreas: el lóbulo duodenal, el esplénico y el gástrico (*Fig. 1.*) (Dolenšek, Rupnik, & Stožer, 2015: 1) El lóbulo de mayor tamaño, el lóbulo esplénico, se extiende de manera horizontal entre el duodeno y el bazo, este es homólogo al cuerpo y cauda del páncreas humano. 2) El lóbulo duodenal se encuentra inmerso en el mesenterio que rodea al duodeno y corresponde a la cabeza del páncreas en humanos. 3) El tercer lóbulo, el lóbulo gástrico, es el de menor tamaño y se distingue como una parte alargada y delgada que se encuentra adherida cerca del canal pilórico (Dolenšek et al., 2015).

Figura 1 Comparación de la anatomía de páncreas humano y ratón. Modificado de Dolenšek, Rupnik &



Stožer, 2015.

Tanto en humanos como en roedores, el páncreas es una glándula mixta (*Fig. 2*) constituida por tejido endocrino y exocrino (Mastracci & Sussel, 2012). Junto con él mesénquima, el páncreas exocrino representa alrededor del 95% del volumen total del páncreas. La porción exocrina se compone de células acinares que sintetizan y secretan jugos pancreáticos con un alto contenido de enzimas que catalizan la ruptura de proteínas, carbohidratos y lípidos. Estas secreciones son transportadas hacia el lumen del duodeno por medio del sistema ductal acinar (Shih, Wang, & Sander, 2013).

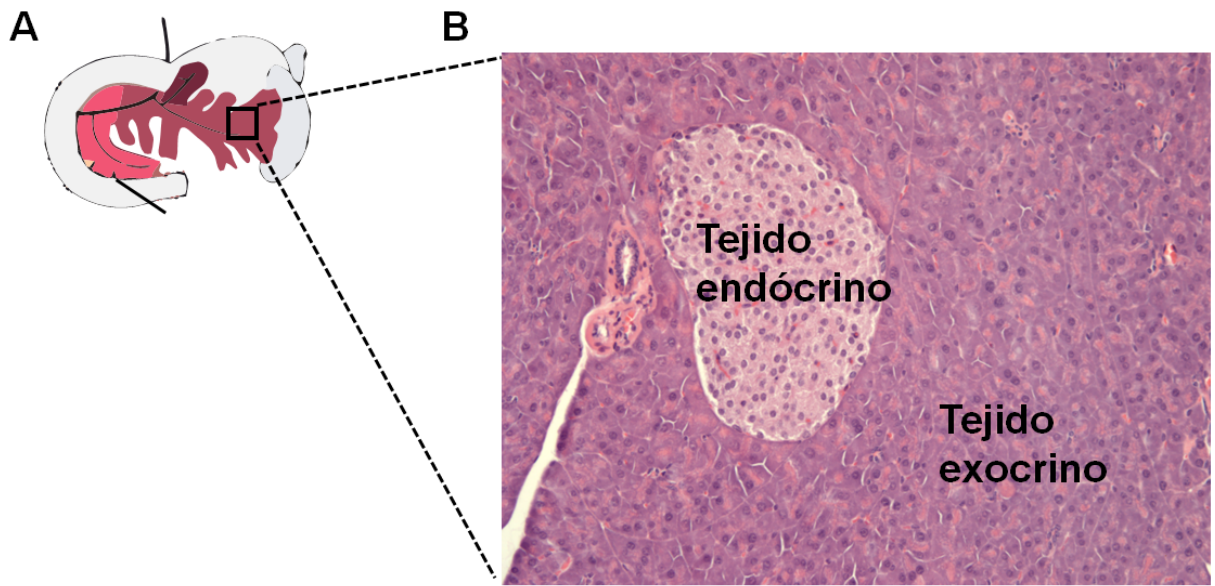


Figura 2 Composición celular del páncreas Células ductales, acinares y células del islote de Langerhans. Modificado de Mastracci & Sussel, 2012.

El sistema ductal en el páncreas de los ratones, a diferencia del observado en humanos, posee un gran ducto interlobular que drena cada uno de los tres lóbulos principales. El ducto gástrico y el esplénico están fusionados y se unen con el ducto biliar común antes de que el conducto biliar-pancreático se una con la pared del duodeno, a este conducto se le conoce como árbol (Dolenšek et al., 2015).

La parte endocrina está organizada en islotes pancreáticos. Estas estructuras se componen de cinco tipos celulares que sintetizan y secretan diferentes tipos de hormonas: insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático, ghrelina Silva Xavier, 2018.

ISLOTES PANCREÁTICOS

Los islotes pancreáticos también conocidos como islotes de Langerhans, son agrupaciones de distintos tipos celulares que se encuentran embebidos en el tejido acinar (Yagihashi, 2015). En los ratones el número de islotes del páncreas oscila entre los 1000 y 5000, poseen forma de circular-ovalada a irregular y están constituidos por diferente número de células desde unas cuantas a miles de ellas. También se pueden encontrar células endocrinas aisladas inmersas en el tejido exocrino que se denominan “acúmulos de células beta” (Dolenšek et al., 2015).

El islote se conforma de: células alfa secretoras de glucagón, células beta encargadas de la secreción de insulina, células delta de somatostatina, células epsilon secretoras de ghrelina y células PP que sintetizan polipéptidos pancreáticos (*Fig. 3*) (Da Silva Xavier, 2018).

En los roedores se observa una organización celular característica en la cual las células beta se encuentran al centro, las células alfa, delta, epsilon y PP se ubican en la periferia del islote rodeando el conjunto celular beta (Mastracci & Sussel, 2012). Las células beta conforman aproximadamente el 80% de la masa del islote, las células alfa abarcan alrededor del 19 por ciento y los tipos celulares restantes representan al menos el 1% (Pfeifer et al., 2015).

Los islotes pancreáticos tienen como función el control y mantenimiento de la homeostasis de la glucosa mediante la secreción de hormonas (Da Silva Xavier, 2018) .

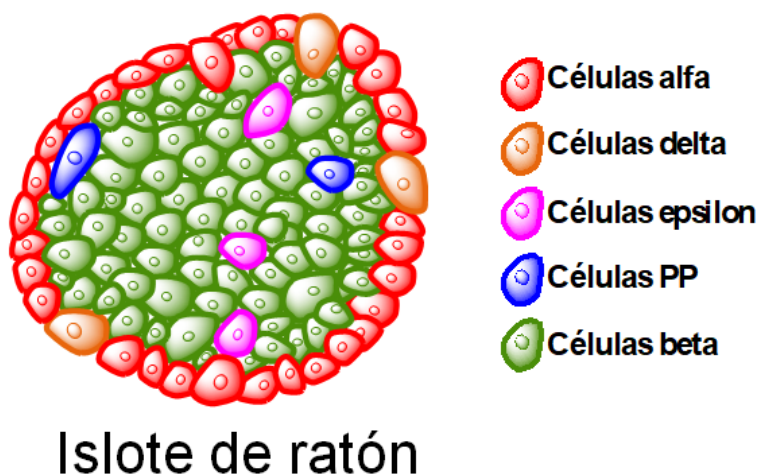


Figura 3. Composición celular del islote Células alfa, beta, delta, epsilon y PP). Modificado de Da Silva Xavier, 2018

Célula beta

La célula beta es uno de los tipos celulares que conforman el islote, representan alrededor del 80% de la población celular del mismo en roedores y su principal función es la síntesis y secreción de la hormona insulina (Pfeifer et al., 2015). La célula beta también produce amilina, conocida como IAPP (polipéptido amiloide de los islotes pancreáticos), y GABA (ácido γ -aminobutírico) los cuales participan de manera sinérgica junto con la insulina en el control glucémico suprimiendo la secreción de glucagón posprandial (Scherbaum, 1998; Zhang, Pan, Huang, & Zhao, 2016).

Tanto la insulina como la amilina estimulan la absorción y almacenamiento de glucosa en el músculo esquelético y el tejido adiposo, por otro lado, estas moléculas inhiben la producción endógena de glucosa del hígado (Bansal et al., 2011; Franklin & Wollheim, 2004; Scherbaum, 1998; Zhang et al., 2016).

Insulina

La insulina es una hormona peptídica formada por 51 aminoácidos, con un peso molecular de 5.8 kDa, es sintetizada y secretada por las células beta de los islotes pancreáticos. Esta hormona participa en el mantenimiento de los niveles normales de glucosa al facilitar el transporte y absorción celular de este carbohidrato regulando el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Fu, R. Gilbert, & Liu, 2012).

Síntesis de insulina

La insulina se sintetiza como preproinsulina en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER) dentro de las células beta. La pre-proinsulina viaja a través de la membrana del retículo hacia el lumen, este proceso ocurre a través del canal conductor de péptidos donde el péptido señal de la pre-proinsulina es escindido produciendo proinsulina. La proinsulina es transportada hacia el aparato de Golgi donde es empaquetada en gránulos secretores inmaduros donde se escinde para producir insulina y péptido C, ambos se almacenan junto con el IAPP y otros productos de secreción de la célula beta (Fu et al., 2012; Röder, Wu, Liu, & Han, 2016).

Diversos factores participan en el control de la biosíntesis de insulina, sin embargo, el metabolismo de la glucosa es el evento fisiológico más importante que estimula la transcripción del gen de insulina y la traducción de su ARNm (Fu et al., 2012).

La insulina es una hormona de gran importancia que permite mantener el funcionamiento normal del metabolismo, en sujetos sanos la secreción de insulina está perfectamente ajustada a las demandas metabólicas. De manera específica, las células beta censan los cambios en los niveles de glucosa en plasma y responden a ella secretando insulina. Las células beta se encuentran localizadas estratégicamente cerca de los vasos sanguíneos y están rodeadas de capilares fenestrados, de manera que los islotes reciben 10 veces más flujo de sangre que las células exocrinas. Esta estructura altamente permeable, sin restricción al acceso de nutrientes, le permite a la célula beta censar el estado nutricional rápidamente además de facilitar la difusión de insulina al sistema sanguíneo (Fu et al., 2012).

Secreción de insulina

La secreción de insulina es potenciada por estimulación de señales emitidas por la presencia de alimento. Las células beta censan los estados de ayuno y no ayuno y son capaces de secretar insulina en respuesta a diversos nutrientes como glucosa, otros monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos; sin embargo, la glucosa es el único nutriente que es necesario y suficiente para estimular la secreción (Wortham & Sander, 2016). Cabe destacar que tanto en roedores como en humanos la amplitud de secreción inducida por glucosa es mucho mayor en comparación con la estimulada por proteínas o grasas (Fu et al., 2012).

El proceso de secreción de insulina es un evento bifásico, la primera fase o vía de disparo posee un pico alrededor de los primeros cinco minutos después del estímulo de glucosa, gran parte de la insulina que va a ser secretada es liberada durante este primer período. La segunda fase, conocida como vía de amplificación, es lenta a comparación de la primera, en esta se secretan los gránulos de insulina remanentes que se encuentran más alejados de la membrana y se lleva a cabo mediante un mecanismo independiente de los canales de potasio acoplados a ATP (Fernández-Mejía; 2018).

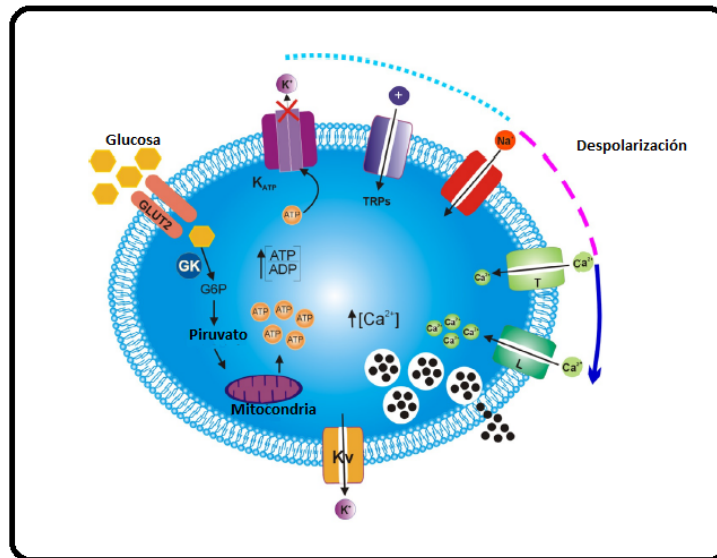


Figura 4 Secreción de insulina Comportamiento bifásico de la secreción.
Modificado de Hiriart et al, 2014.

En los roedores, las células beta poseen un transportador de glucosa, el transportador de glucosa 2 (GLUT2), un transportador de difusión facilitada que es el único transportador de glucosa expresado en estas células (Fu et al., 2012). La secreción de insulina estimulada por glucosa requiere del transporte de glucosa al interior de la célula beta, posteriormente se lleva a cabo la fosforilación de glucosa mediada por la enzima glucocinasa que determina el inicio de la glucólisis. El producto final de la glucólisis es la obtención de piruvato, el cual se oxida a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en la mitocondria de las células beta produciendo incrementos en la relación ATP/ADP. El incremento en la disponibilidad de ATP respecto a ADP conduce a cierre de los canales de potasio sensible a ATP (KATP) – una molécula hetero-octámera formada por cuatro subunidades de receptor a sulfonilurea 1 (SUR1) y cuatro unidades del canal rectificador de entrada de K⁺ Kir6.2 24. El cierre de estos canales altera el balance de las acciones del KATP y los receptores de potencial transiente (TRP). Estos dos eventos inician la depolarización de la membrana, la cual cuando alcanza valores alrededor de -40 mV, incrementa la apertura de los canales de calcio (Ca²⁺) tipo T dependientes de voltaje y de los canales de sodio (Na⁺). La entrada de los iones sodio y calcio a su vez incrementan la depolarización; cuando se alcanzan aproximadamente los -20 mV, se genera la apertura de los canales tipo L y, posiblemente otros canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC), lo desencadena potenciales de acción que incrementan el calcio intracelular ([Ca²⁺]_i) (Hiriart y Aguilar-Bryan 2008 ; Hiriart et al, 2014.9). Este calcio, junto con el movilizado de las reservas intracelulares, lleva a la fusión de los gránulos secretores que contienen insulina con la membrana plasmática y a la liberación de la insulina hacia la circulación.

Cabe mencionar que la secreción de insulina puede modificarse con la presencia de hormonas incretinas como el GLP-1, que la aumentan, y la somatostatina, epinefrina, galanina, ghrelina, leptina y zinc, los son capaces de inhibir la secreción de insulina (Da Silva Xavier, 2018).

La insulina juega un papel clave en la regulación de los niveles de glucosa sanguínea en respuesta al estado nutricional, las células beta son capaces de adaptar la tasa de secreción de esta hormona a las condiciones fisiológicas. La demanda de insulina varía dependiendo del estado nutricional, el ejercicio, edad y estado reproductivo (Wortham & Sander, 2016).

La secreción y la síntesis de insulina se ajustan a la demanda metabólica, modificando la actividad enzimática y en la transcripción y traducción. En este sentido, todos los estímulos endocrinos, neuronales y fuentes nutricionales influyen en la función de las células beta (Wortham & Sander, 2016). Este párrafo es muy vago, habla de adaptaciones para... lo cual no es correcto, la cosas no son para nada, simplemente se produce más o menos de algo y la célula

Para estimar de manera indirecta la función de la célula beta y la sensibilidad de los tejidos a esta hormona se pueden realizar una serie de pruebas que permiten clasificar el estatus de la tolerancia a la glucosa y estimar la sensibilidad a la insulina de los tejidos periféricos que participan en la homeostasis de la glucosa. Los resultados de las pruebas están determinados por la secreción de insulina, la acción de la insulina y la eficacia de la glucosa, es decir, el transporte exitoso de este nutriente hacia las células en los cuales la disminución de las concentraciones de glucosa son un indicativo de la acción de la insulina en el organismo (Ayala et al., 2010).

Plasticidad y masa de la célula beta

Además de los cambios en la secreción de insulina, diversos estudios han demostrado la plasticidad de las células beta para modificar su masa en respuesta a una variedad de situaciones hormonales y fisiológicas (Ernst et al., 2011).

La masa de la célula beta está determinada por el número y tamaño de estas células y se encuentra regulada por mecanismos celulares como (*Fig. 5*): la replicación, la muerte celular, la hipertrofia, la atrofia, la transdiferenciación, autofagia y la neogénesis celular.

Algunos nutrientes, como la glucosa y los ácidos grasos libres, factores de crecimiento, en especial hormonas somato lactogénicas como la hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), y la prolactina (PRL) son capaces de influir en el crecimiento, supervivencia, diferenciación y secreción de insulina de la célula beta (Rieck & Kaestner, 2010).

Algunos estudios han demostrado la adaptación dinámica de la célula beta en eventos fisiológicos como la gestación, período en el cual la proliferación y masa de estas células se modifica para suplir la demanda metabólica (Ernst et al., 2011).

Por otro lado, la masa del islote puede disminuir como resultado del incremento en la muerte de la célula beta frente a diversas situaciones fisiológicas y patológicas como la citotoxicidad,

hipoxia, privación de alimento e hiperglucemia (glucotoxicidad). Se ha demostrado que durante el postparto la tasa de apoptosis se encuentra aumentada en las células beta maternas (Ernst et al., 2011).

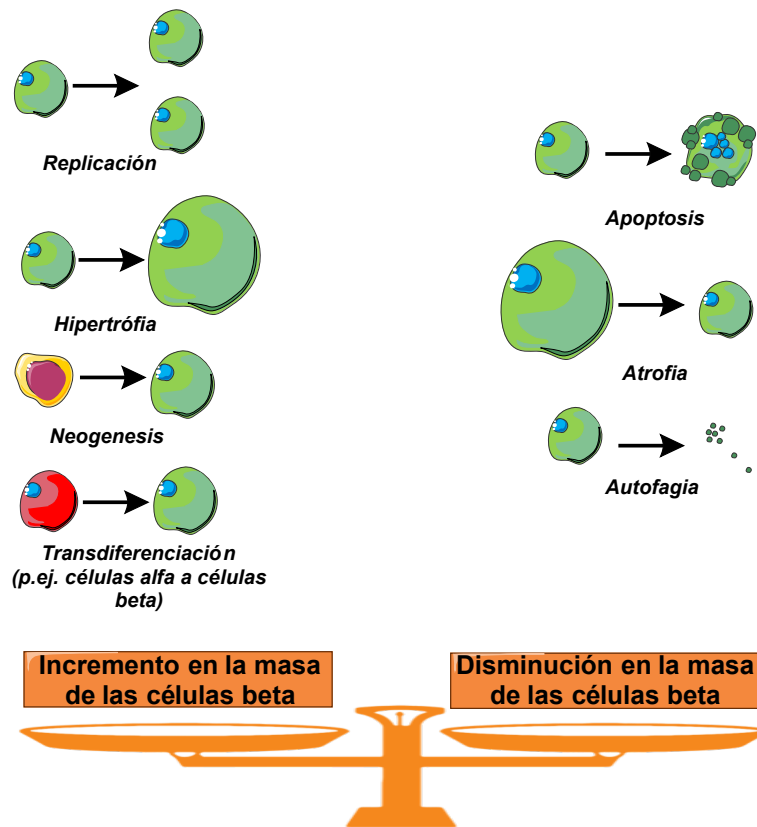


Figura 5. Reguladores de la homeostasis de la masa de la célula beta

Modificado de Rieck & Kaestner, 2010.

Cambios en la célula beta durante la gestación

Durante el embarazo se observa un aumento en el consumo de alimento en las hembras, que permite satisfacer la demanda nutricional del feto. El aumento en las concentraciones plasmáticas de glucosa, permiten establecer un gradiente de glucosa en la circulación materno fetal para facilitar el transporte de glucosa hacia el feto (Baeyens et al., 2016). Durante la gestación temprana incrementa la demanda de insulina, esta demanda creciente insulina es compensada por expansión en la masa celular-beta; si esto no ocurre adecuadamente la madre puede desarrollar diabetes gestacional (Genevay, Pontes, & Meda, 2010a; Nielsen, 2016).

En la gestación tardía, las hembras desarrollan resistencia a la insulina e hiperinsulinemia producto de un incremento en la producción de insulina (~8 veces más) y aumento en la

secreción de insulina estimulada por glucosa lo que genera una concentración de insulina sérica 75% mayor en ratonas gestantes (Genevay et al., 2010a). Lo anterior es resultado de la adaptación de las células beta pancreáticas maternas en las que se observa incremento en la síntesis de glucocinasa y GLUT2; esto sugiere que la creciente demanda de insulina es compensada por incremento en el metabolismo de glucosa de la célula beta que resulta en aumento de la tasa de replicación (hiperplasia) y en el tamaño individual de la célula (hipertrofia) lo que se traduce en un aumento de cinco veces su masa (Ernst et al., 2011; Genevay et al., 2010b; Nielsen, 2016). Los cambios en la célula beta durante la gestación son inducidos por hormonas como la prolactina, los lactógenos placentarios y la hormona del crecimiento (Genevay et al., 2010a)

Claes Hellerström y colaboradores determinaron que al día 20 de la gestación en roedores el volumen del islote aumenta cerca de un 25% en comparación con hembras nulíparas, y aunque la distribución del tamaño de los islotes es asimétrica tanto en hembras vírgenes como en gestantes, observaron que durante la gestación existe un mayor número de islotes de área mayor a los 25 000 μm^2 . Por otro lado, al evaluar la relación entre el área de células alfa/beta encontraron que, durante la gestación se presenta un alza en el número de células beta, por lo que se puede concluir que el mayor tamaño del islote está dado por incremento en la proliferación de las células beta (Hellerstrom, 2006). Evidencia reciente reporta crecimiento en el tamaño del núcleo al día 14 de gestación, sugiriendo una mayor actividad de síntesis de insulina, que no se observa al día 20 del período gestante, esto podría estar relacionado con una reducción en la carga de glucosa hacia el día del parto o con incremento en el número de células beta que permite mantener la euglucemia (Nielsen, 2016).

La capacidad dinámica de adaptación de las células beta en su tamaño, número y función en respuesta a diversas condiciones fisiológicas que se caracterizan por un incremento en la demanda energética, permiten mantener y regular la homeostasis de glucosa, la caracterización de estos cambios bajo condiciones fisiológicas no es completamente clara con excepción de la gestación, período que ha sido objeto de investigaciones profundas (Genevay et al., 2010a).

Cambios en la célula beta durante la lactancia

Se considera que después del parto e iniciada la lactancia, la masa celular-beta regresa al tamaño típico observado antes de la gestación (Genevay et al., 2010b; Marynissen, G., Aerts, L., Van Assche, 1983; Marynissen et al., 1987; Nielsen, 2016; Scaglia Luisa, Smith F, 1995). Sin embargo, algunos estudios sugieren que en los roedores existen cambios en el tamaño del islote materno durante la lactancia: en el cuarto día de lactancia la tasa de replicación celular disminuye reduciendo significativamente el área del islote al día 10 de lactancia comparando con el control edad (Scaglia Luisa, Smith F, 1995).

La disminución de la masa de la célula beta después del parto coincide con los cambios en las concentraciones de lactógenos placentarios-1 y 2, así como los niveles del receptor de prolactina (PRLR), del receptor de la hormona del crecimiento (GHR) y con un aumento en los niveles de progesterona y glucocorticoides (Nielsen, 2016). La disminución en la masa de la célula beta en este período se relaciona con la activación de vías apoptóticas en respuesta a las altas concentraciones de progesterona y glucocorticoides y de la inhibición de los efectos

pro-proliferativos de la prolactina y otros lactógenos por interacción de hormonas esteroideas como la progesterona y el estradiol (R. L. Sorenson, Brelje, & Roth, 1993).

Estudios previos demuestran que en roedores lactantes las células beta presentan disminución en la actividad secretora, además de una mejora en la eficiencia de la secreción de insulina estimulada por glucosa (Malaisse, Hubinont, & Marynissen, 1989).

Hasta la fecha no se han documentado los cambios en el islote pancreático materno después de la primera mitad de la lactancia.

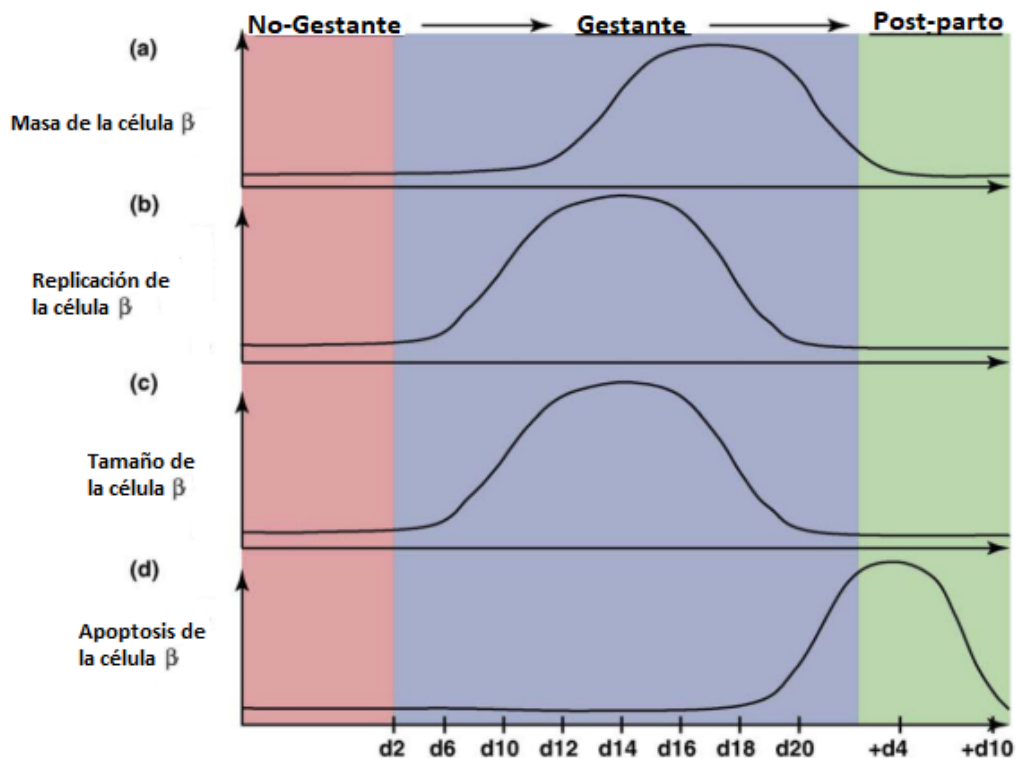


Figura 6. Adaptaciones en el islote materno durante la gestación.

Cambios en a) la masa de la célula beta, b) replicación de la célula beta, c) hipertrofia de la célula beta y d) apoptosis de la célula beta, previos la gestación (rosado), durante la gestación (púrpura) y en el posparto (verde). Modificado de Rieck & Kaestner, 2010.

Cambios en la célula beta durante la poslactancia

Existe poca información que detalle la morfología del islote durante la poslactancia, período en el cual se han descrito cambios importantes en diversos tejidos como la glándula mamaria, el hueso e intestino, por mencionar algunos (Canul-Medina & Fernández-Mejía, 2019).

Investigaciones recientes en nuestro laboratorio han observado cambios en el islote pancreático materno después de finalizada la lactancia. Canul *et al*, 2021 observaron que después del destete, los islotes maternos atraviesan por cambios entre los que destacan:

incremento en su área, principalmente debido a un aumento en el número de células beta y en, en menor medida, por crecimiento en el tamaño de la célula beta (Canul-Medina et al, 2021).

El aumento del número de células beta está relacionado con un aumento en la proliferación celular, la cual se encontró aumentada el día 19 de lactancia, día en donde se observa un incremento en la proliferación, éste aumento que se mantiene hasta el día 3 después del destete, para decaer posteriormente (Canul-Medina et al, 2021); en tanto que, el aumento en el tamaño de las células beta, se observan desde el día del destete. Estos cambios sugieren que una serie de eventos ocurren durante la lactancia como preámbulo de las modificaciones que se observan en el islote en la poslactancia (Canul-Medina et al, 2021).

El análisis de la secreción de insulina in vivo en respuesta a la glucosa (Canul-Medina et al, 2021), encontró un incremento en la concentración de la insulina en suero en respuesta a la glucosa al tercer día después del destete, pero no días previos o posteriores a éste; igualmente, las concentraciones séricas de la insulina en ayuno se aumentaron significativamente al tercer día de la poslactancia, pero no en los otros días analizados.

Cambios en la homeostasis de glucosa durante la gestación

La gestación en mamíferos se caracteriza por poseer distintas fases de adaptación metabólicas que permiten satisfacer las necesidades nutricionales cambiantes de la madre y el feto. La gestación temprana corresponde a una fase anabólica durante la cual se almacena energía en forma de lípidos, a través de una elevada tasa de consumo de alimento y un incremento en la lipogénesis *de novo* hepática. Por otro lado, durante la lactancia tardía, caracterizada por ser una fase catabólica, estos depósitos de lípidos son utilizados para obtener glucosa y energía (Moyce & Dolinsky, 2018).

En roedores se presenta un estado de resistencia a la insulina a partir del día 16 de gestación, acompañada de hiperinsulinemia durante el ayuno y posprandio, e hiperglucemia (Moyce & Dolinsky, 2018; Sferruzzi-perri & Fowden, 2016).

Los análisis de abundancia de proteínas relacionadas en las vías de señalización de la insulina en hígado muestran disminución en la expresión del receptor de insulina (IR) e incremento en la expresión de p85a (regulador de la resistencia a la insulina) en músculo esquelético, consistente con la reducción de sensibilidad a la insulina en el cuerpo materno durante la gestación (Sferruzzi-perri & Fowden, 2016).

Se ha observado que existe una mejora en la sensibilidad a la insulina y una restauración de los niveles de insulina sanguíneos al final de la gestación, estos se asemejan a lo evaluado en hembras nulíparas (Sferruzzi-perri & Fowden, 2016).

Por otro lado, la producción de glucosa basal es mayor durante la gestación tardía en comparación con hembras no gestantes. Lo anterior está relacionado con el incremento en la glucogenólisis hepática, aumento de tamaño del hígado y aumento en la capacidad gluconeogénica hepática que permiten mantener las demandas de glucosa del feto y la creciente demanda de nutrientes para el desarrollo de la glándula mamaria (Sferruzzi-perri & Fowden, 2016).

Aunque las causas de los cambios en la sensibilidad a la insulina y producción de glucosa durante la gestación tardía aún son desconocidos, podrían estar relacionados con la disminución en las concentraciones de corticosterona, un antagonista de la insulina, que tiene sus valores máximos en el día 16 de la gestación y decae progresivamente hacia el término del embarazo (Sferruzzi-perri & Fowden, 2016).

Cambios en la homeostasis de glucosa durante la lactancia

En la lactancia existen diferentes etapas en las que el tipo de leche y su tasa de producción varían dependiendo de los requerimientos de las crías, lo mismo ocurre con las concentraciones de hormonas, las cuáles varían a lo largo del período lactante. En los roedores la producción de leche incrementa desde los primeros días de lactancia y alcanza su valor máximo entre el día 15 y 17; este último considerado el pico de máxima producción de leche (Bing et al., 2002; Bronson, Dagg, & Snell, 1966; Zhao, Chi, & Cao, 2010).

Durante la lactancia hay alta demanda energética para permitir suplir los requerimientos nutricionales para la producción de leche en la glándula mamaria. Para satisfacer esta demanda, el consumo de alimento y utilización de las reservas energéticas incrementan mediante la modulación del transporte de nutrientes a la célula (Williamson, 1986). Además, se desarrollan múltiples adaptaciones metabólicas para conservar la energía y los sustratos requeridos por la glándula mamaria para la producción de leche (Gutgesell et al., 2009).

La lactancia induce una gran cantidad de adaptaciones metabólicas y de cambios en el flujo de nutrientes, incluyendo la pérdida del 70% del tejido adiposo. En ratas lactantes la concentración de insulina disminuye como consecuencia del incremento en la demanda de esta hormona por la glándula mamaria, aunado a esto, los adipocitos presentan resistencia a la insulina facilitando la lipólisis y disminuyendo la síntesis de lípidos (Bing et al., 2002; Canul-Medina & Fernandez-Mejia, 2019; Millican, Vernont, & Pain, 1987).

Por otro lado, la concentración de glucosa se mantiene baja durante lactancia. Durante la segunda y tercera semana de lactancia la tasa de recambio de glucosa incrementa un ~80%, acompañado de una disminución en la concentración de glucosa (A. F. Burnol, Leturque, Ferre, & Girard, 1983).

En roedores, las pruebas de tolerancia a la glucosa durante la lactancia muestran niveles de glucosa basal disminuidos; los niveles de insulina en plasma arterial en estado basal son muy bajos a comparación de los no lactantes. Durante la prueba de tolerancia a la insulina el decaimiento en los niveles de glucosa plasmática son muy rápidos en lactantes comparando

con animales no lactantes. Esto sugiere que la resistencia a la insulina de los tejidos es contrarrestada por la captura incrementada de glucosa en la glándula mamaria, por lo que la prueba de tolerancia a la insulina no parece comprometerse dado que gran parte la glucosa circulante es captada por la glándula mamaria (A. F. Burnol et al., 1983).

En roedores la producción y utilización de glucosa están aumentadas durante el pico de lactancia, período que representa la máxima tasa de producción de leche durante toda la etapa lactante. El hígado es uno de los órganos que contribuyen en el incremento en la producción de glucosa (80%); muchos factores contribuyen al aumento en la producción hepática de glucosa: 1) el aumento en el peso del hígado (20% más en lactantes) resultado de hipertrofia en los hepatocitos, y 2) las bajas concentraciones de glucosa e insulina en la vena porta (A. F. Burnol et al., 1983).

Diversos estudios demuestran que la respuesta y sensibilidad a la insulina de varios tejidos se modifica durante la lactancia, estos cambios son tejido-específicos y los cambios son resultado de alteraciones en la transducción de señales posteriores a la unión de la insulina con su receptor. El efecto de estas adaptaciones busca minimizar la utilización de glucosa y otros nutrientes en los tejidos periféricos, en tanto que la glándula mamaria en la lactancia es mucho más sensible a la insulina en comparación con el músculo y tejido adiposo, esta glándula presenta un incremento en los receptores a la insulina, además de disminución en la respuesta a antagonistas de la insulina, ejemplo de esto es la pérdida de los receptores de glucagón en este tejido (Vernon, 1989).

Cambios en la homeostasis de glucosa durante la poslactancia

El análisis de la tolerancia a la glucosa encontró un aumento de ésta, que se observa desde el día del destete. Esta mayor tolerancia no puede explicarse por el aumento en la secreción de la insulina, ya que ésta se produjo hasta el tercer día del destete. La discordancia podría deberse a mayor sensibilidad a esta hormona; pero, nuestros estudios revelaron menor sensibilidad a la insulina en este periodo (Canul-Medina et al, 2021). La coexistencia de incremento en la tolerancia en la glucosa y la disminución de la sensibilidad a la insulina también se ha visto en la etapa final de la gestación (Carrara, M. A., Batista, M. R., Saruhashi, T. R., et al. (2012) Coexistence of insulin resistance and increased glucose tolerance in pregnant rats: A physiological mechanism for glucose maintenance. *Life Sciences* 90, 831–837) como resultado fisiológico del ávido suministro de glucosa hacia el feto. En el caso de la poslactancia, esta coexistencia podría ser el resultado de un abundante suministro de la glucosa hacia el hueso, ya que la glucosa se capta ávidamente por los osteoblastos durante la mineralización de éste (Wei, J., Shimazu, J., Makinistoglu, M. P., et al. (2015) Glucose Uptake and Runx2 Synergize to Orchestrate Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 161, 1576–1591), y este proceso se encuentra altamente activo después de la lactancia para repletar el calcio perdido por el tejido óseo durante la lactancia (Kovacs et al . 2016).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La demanda metabólica y los cambios hormonales en la gestación y la lactancia producen cambios en los tejidos para favorecer el desarrollo del producto. Se han documentado ampliamente los cambios que se producen en el islote materno y en la homeostasis de glucosa durante la gestación; sin embargo, se conoce poco sobre las modificaciones que acontecen en los islotes pancreáticos durante la lactancia.

Dado que en la lactancia de los roedores, la demanda metabólica para la producción de leche alcanza su valor máximo alrededor del día 15 y 17; aunado a que, estudios recientes en nuestro laboratorio en la etapa fisiológica de la poslactancia, encontraron que los cambios en la proliferación y el tamaño de las células beta; así como en la homeostasis de la glucosa que acontecen en este periodo se inician antes del cese de la lactancia, especulamos que en la lactancia tardía podrían existir cambios en la homeostasis a la glucosa y en el islote pancreático.

No existen hasta el momento estudios sobre los cambios en el islote pancreático y en la homeostasis de la glucosa en la segunda mitad de la lactancia; por lo que en este trabajo se propone analizar la morfometría del islote y la homeostasis de la glucosa en el día 15 y 17 de la lactancia.

HIPÓTESIS

El entorno hormonal y el incremento en la demanda energética en la lactancia tardía podrían producir un aumento en la proliferación y tamaño de las células beta; así como en la tolerancia a la glucosa.

OBJETIVOS

General

Analizar la morfología del islote pancreático y la homeostasis de la glucosa en ratonas en la lactancia tardía.

Particulares

Analizar los cambios que se producen durante la lactancia al día 15 y 17 de lactancia en:

1. El tamaño y composición celular del islote
2. La proliferación celular del islote.
3. Tolerancia a la glucosa.
4. La sensibilidad a la insulina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo biológico

Animales de estudio

Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 10 semanas de edad, a partir de los cuales se obtuvo el grupo experimental y el grupo control. Estos animales fueron mantenidos en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM con alimento y agua *ad libitum* en periodos 12/12 horas de luz-obscuridad. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en conformidad con los protocolos establecidos por el Comité de Ética para la Experimentación de Bioterio del IIB apegado a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que dicta las especificaciones técnicas para producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y bajo los principios de bienestar animal en el mantenimiento de roedores.

Grupo experimental lactante

Para la obtención de ratonas lactantes se realizaron cruza de la cepa C57BL/6 en edad reproductiva (8 semanas de edad) utilizando la modalidad de harém colocando 2 hembras en etapa estral y un macho. Para corroborar el éxito de la crusa se observó la presencia de tapón vaginal y el peso fue monitoreado diariamente. Las hembras preñadas fueron separadas y colocadas de manera individual en una caja, posterior al parto se realizó un ajuste de las camadas con un rango de 4 a 6 crías.

El día del parto se consideró como el día 1 de lactancia, se realizó el destete en los días 15 y 17 de lactancia, posteriormente se llevaron a cabo los procedimientos correspondientes.

Grupo control

Como grupo control se utilizaron hembras nulíparas pareadas por edad correspondiente a los grupos experimentales, con una edad de 14 a 16 semanas.

Histología del páncreas

Obtención del tejido pancreático

Después de 15 o 17 días del inicio de la lactancia, se obtuvo el páncreas que fue procesado para la obtención de cortes histológicos.

Se administraron 85 mg de pentobarbital por kilogramo de peso vía intraperitoneal a cada ratón. Una vez sedados se realizó disección y extracción del páncreas. Posteriormente los tejidos se colocaron en formalina al 10%.

Inclusión

Después de ser fijado, el páncreas se deshidrató en un tren de alcoholes que van del 50, 70 y 100% alcohol, Xilol-Etanol y Xilol 100% y finalmente embebido en parafina para la obtención de bloques.

Cortes histológicos

Se realizaron cortes histológicos de un grosor de 0,5 y 0,2 μm y se montaron sobre laminillas electro cargadas.

Inmunohistoquímica

Se realizó una tinción inmunohistoquímica cromogénica con peroxidasa para el anticuerpo Ki67 (dilución 1:100 clona Sp6, Biocare) en los cortes de 0.2 μm de grosor y posteriormente se llevó a cabo un contraste con hematoxilina de Gill.

Inmunofluorescencia

Para el ensayo inmunohistoquímico de fluorescencia se realizó un tren de rehidratación a los cortes con un grosor de 0,5 μm con distintas concentraciones de Xilol y Etanol, seguido de la recuperación del antígeno con una solución amortiguada por citratos (citrato de sodio 0.01M, pH 6) y un amortiguador de perforación Tritón 1% (Calbiochem, Darmstadt, Alemania), SNC 0.3%, PBS 1X. Se llevó a cabo una tinción inmunohistoquímica de fluorescencia con los siguientes anticuerpos primarios:

- Para la identificación de células alfa: anticuerpo monoclonal anti-glucagón montado en ratón (Sigma, Clone K79bB10 # G 2654) a una dilución 1:4500.
- Para la identificación de células beta: anticuerpo policlonal anti-insulina montado en cobayo (Thermo Fisher #CAT PA1-26938) a una dilución 1:100.

Posteriormente se realizaron lavados con solución salina amortiguada por fosfatos (PBS 1X) y suero normal de cabra (SNC) al 1% para retirar el excedente de anticuerpo primario y bloquear reacciones inespecíficas. Los anticuerpos secundarios empleados se describen a continuación:

- Anti-ratón conjugado a CY3 (anti-mouse IgG, Jackson Inmuno Research Laboratories West Grove, PA, USA AB_2315777), a una dilución 1:800.
- Anti-cobayo conjugado a Alexa Flúor 488 (Donkey anti-GP IgG, Jackson Inmuno Research Laboratories) a una dilución 1:200.

Transcurrido el tiempo de incubación se añadió solución DAPI 1:1000 a cada corte. Las laminillas fueron fijadas con medio de montaje DAKO, se colocó un cubreobjetos y se sellaron con resina.

Microscopía y obtención de micrografías

A partir de las pruebas de inmunohistoquímica las laminillas se observaron mediante microscopía de campo claro con un Microscopio Olympus BX51-WI (Tokio, Japón) acoplado a una unidad de disco giratorio (DSU).

En el caso de las pruebas de inmunofluorescencia, se obtuvieron imágenes utilizando el Microscopio Olympus IX-71(Tokio, Japón) Invertido.

Las imágenes fueron capturadas utilizando el programa QCapture Pro-6.0® a un aumento de 20x.

Análisis morfométricos

Tamaño del islote

A partir de las imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia se realizaron los análisis morfométricos utilizando el programa ImageJ 1. 52^a.

Al unir los canales de las imágenes de DAPI, glucagón e insulina, se logró apreciar el islote completo identificando los tipos celulares -alfa (rojo), -beta (verde) y sus respectivos núcleos (azul).

Mediante la herramienta de delimitación poligonal, se seleccionó el contorno del islote y se obtuvo el área de este.

Distribución de tamaño de los islotes

Dependiendo del área obtenida se realizó una categorización de los islotes por tamaño de la siguiente manera:

- Pequeños: islotes con un área menor a $10\ 000\ \mu\text{m}^2$
- Medianos: islotes con un área entre los $10\ 000$ y $25\ 000\ \mu\text{m}^2$
- Grandes: islotes con área total mayor a los $25\ 000\ \mu\text{m}^2$

Área porcentual de la célula beta en el islote pancreático.

Con las imágenes que correspondían a células positivas a insulina y glucagón, se realizó la delimitación que indicaba únicamente las células alfa (rojo) o beta (verde). Finalmente se obtuvo la fracción que correspondía a células alfa y beta respecto al área total del islote.

Porcentaje de proliferación

Para el porcentaje de proliferación, a partir de las imágenes de inmunohistoquímica se realizó el conteo de células positivas a Ki67 de los islotes utilizando la herramienta de conteo de puntos individuales del software ImageJ 1. 52^a (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA).

Homeostasis de la glucosa

Al día 15 y 17 de lactancia se llevó a cabo el destete, separando a las crías de la madre y se realizaron las curvas de sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa.

Curvas de tolerancia a la insulina

Para las curvas de tolerancia a la insulina se tomó una muestra de sangre de la punta de la cola previa a la inyección (tiempo 0). Posteriormente se midió el peso de los ratones y se administró solución de insulina (Eli Lilly, CDMX, México) 1U/kg de peso vía intraperitoneal.

Finalmente se monitoreó la concentración de glucosa sanguínea a los 15,30,60 y 90 minutos posteriores a la administración recolectando una gota de sangre de la punta de la cola.

Curvas de tolerancia a la glucosa

En el caso de las curvas de tolerancia a la glucosa los animales se mantuvieron en ayuno de alimento sin restricción de agua durante 16 horas. El día del ensayo se obtuvo una muestra de sangre al cortar la punta de la cola de los ratones para conocer la concentración de glucosa, esta primera muestra se consideró como tiempo 0. Después los ratones fueron pesados y se les administró solución de glucosa 2g/kg de peso vía intraperitoneal.

Se cuantificaron los niveles de glucosa los 15,30,60 y 120 minutos posteriores a la administración de glucosa recolectando una gota de sangre de la punta de la cola.

Las mediciones de los niveles de glucosa se realizaron utilizando un glucómetro (Abbot Freestyle Optium Neo TM).

Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPadPrism (abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).

Los datos fueron analizados mediante una prueba ANOVA de una o dos vías dependiendo de la distribución de los datos obtenidos.

Los valores de $p > 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Los datos incluidos en las gráficas representan la media \pm el error estándar (ES), la letra ***n*** indica el número de muestras analizadas o el de sujetos experimentales evaluados.

RESULTADOS

Análisis morfométricos

Tamaño del islote

Como se muestra en la **Figura 7**, los estudios de microscopía revelaron que el área de los islotes al día 15 y 17 de lactancia no difiere ($p>0.05$) del observado en el grupo control pareado por edad de ratonas nulíparas (*Control*: $8315\pm682 \mu\text{m}^2$), L15 ($8670\pm520 \mu\text{m}^2$) y L17 ($8378\pm 567 \mu\text{m}^2$).

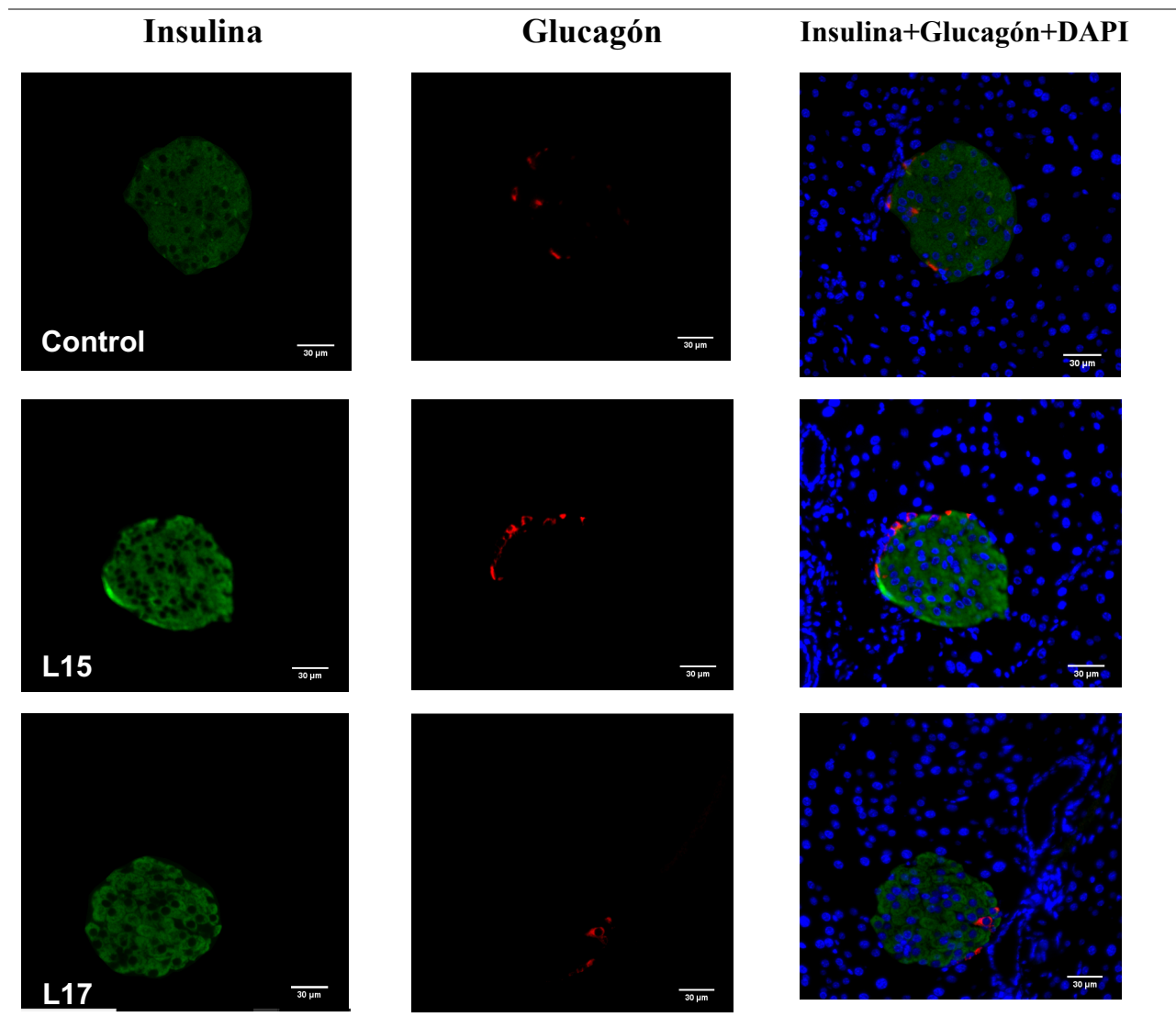


Figura 7. Micrografías de inmunofluorescencia

Día 15 (L15) y 17 de lactancia (L17) y grupo control de ratonas nulíparas pareadas por edad (control). Señal positiva a insulina (verde), glucagón (rojo) y sobrelapamiento (Insulina+Glucagón+DAPI) de canales con señal positiva a DAPI para la tinción de núcleo (azul).

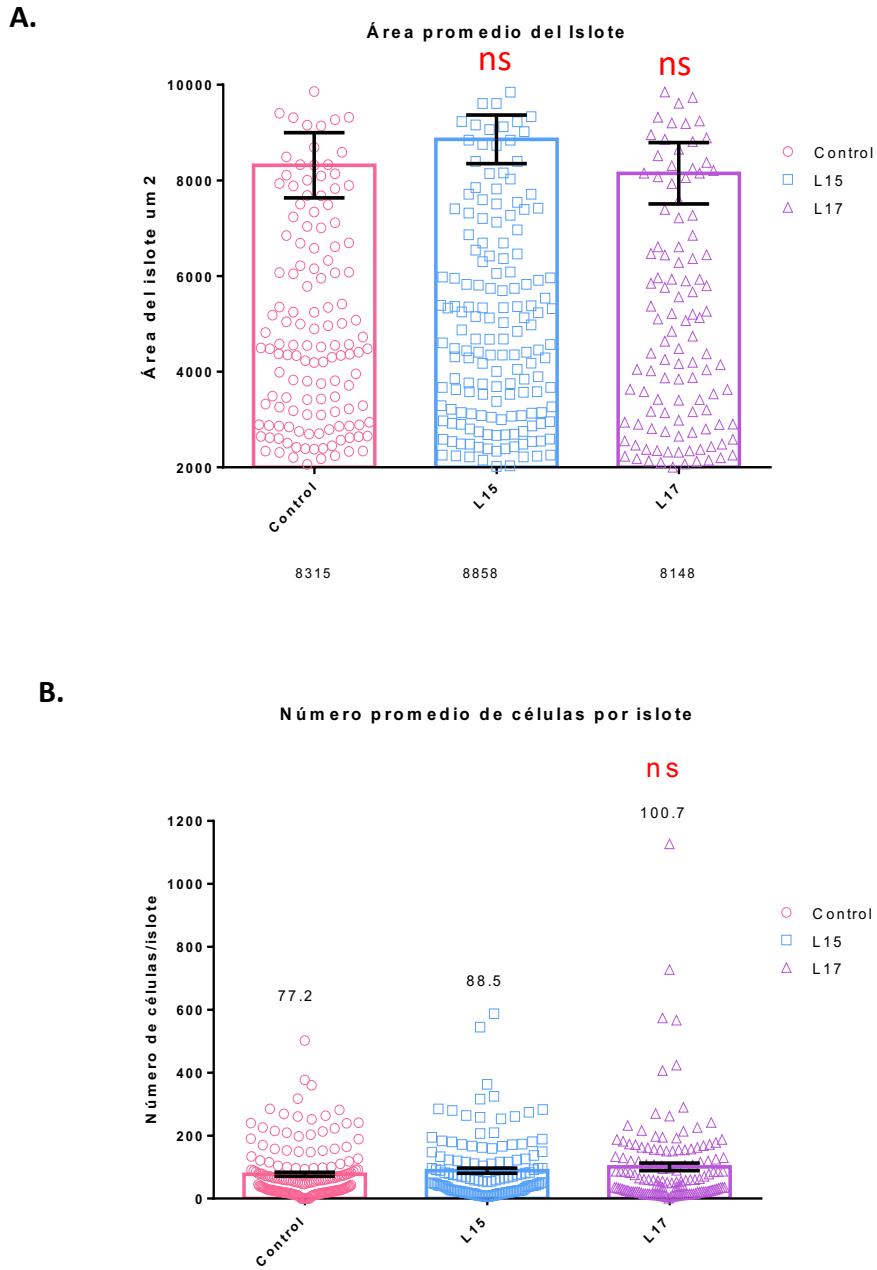


Figura 8 Área y número de células por islote

A. Área promedio del islote. B. Número promedio de célula por islote. ± SEM. (n= 4) *P<0.05. ns diferencia no significativa entre los valores evaluados.

Distribución de tamaño de los islotes

En todos los grupos analizados los islotes presentaban heterogeneidad en el tamaño. Por lo que los islotes se categorizaron en cohortes dependiendo del rango de área al que pertenecían: islotes pequeños que corresponden a un área menor de $10,000 \mu\text{m}^2$, islotes medianos que comprenden de los $10,001$ a los $25,000 \mu\text{m}^2$ e islotes grandes con áreas mayores a los $25,001 \mu\text{m}^2$.

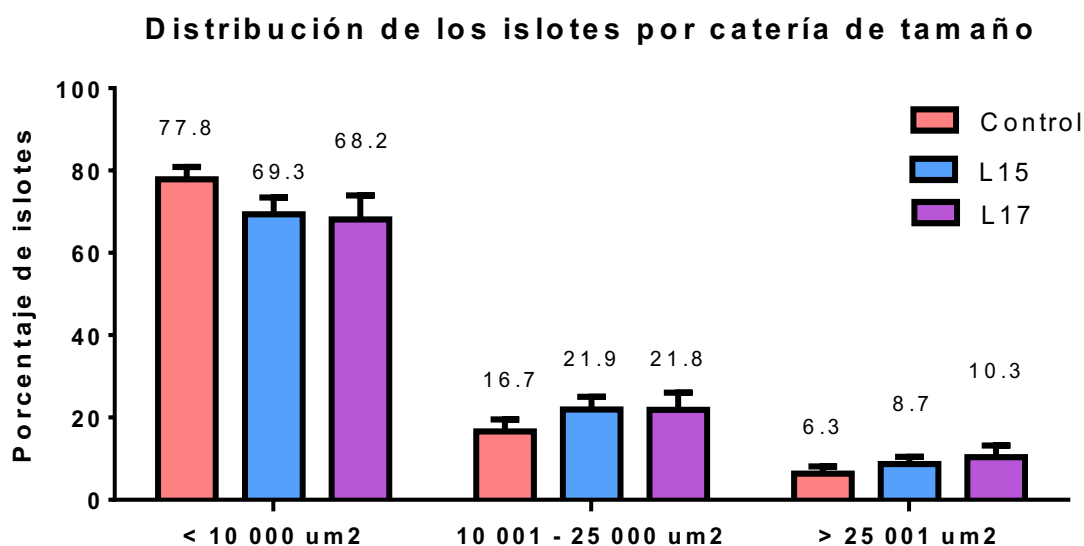


Figura 9. Frecuencia de distribución de tamaño de los islotes.

Se muestra el porcentaje de los islotes que pertenecen a las categorías de tamaño (n=4 por grupo). ns diferencia no significativa entre los valores evaluados.

Tamaño individual de las células alfa y beta

Al analizar el área individual promedio de las células alfa y beta, se encontró que el área de las células alfa no difiere estadísticamente en los días 15 ($61.8 \pm 15.2 \mu\text{m}^2$) y 17 de lactancia ($67.3 \pm 13.4 \mu\text{m}^2$) al comparar con el control edad ($58.3 \pm 18.8 \mu\text{m}^2$); lo mismo ocurre con el número promedio de células alfa no es diferente durante los días 15 ($14.5 \pm 1.8 \mu\text{m}^2$) y 17 ($19.4 \pm 2.2 \mu\text{m}^2$) de lactancia en comparación con el control edad ($14.6 \pm 1.3 \mu\text{m}^2$). Revisa tus números, a veces los separas con comas en lugar de puntos.

Mientras que en el tamaño de las células beta se observa, con respecto al control ($72.9 \pm 9.9 \mu\text{m}^2$), un aumento significativo en el área promedio de las células beta a partir del día 15 ($103 \pm 16.7 \mu\text{m}^2$) y se mantiene elevada en el día 17 ($109.3 \pm 14.9 \mu\text{m}^2$); sin observarse una diferencia significativa entre el número promedio de células beta por islote en los días de lactancia evaluados y el control (Control = $66.4 \pm 5.7 \mu\text{m}^2$ vs L17 = $87.1 \pm 9.7 \mu\text{m}^2$; L15 = $103 \pm 16.7 \mu\text{m}^2$).

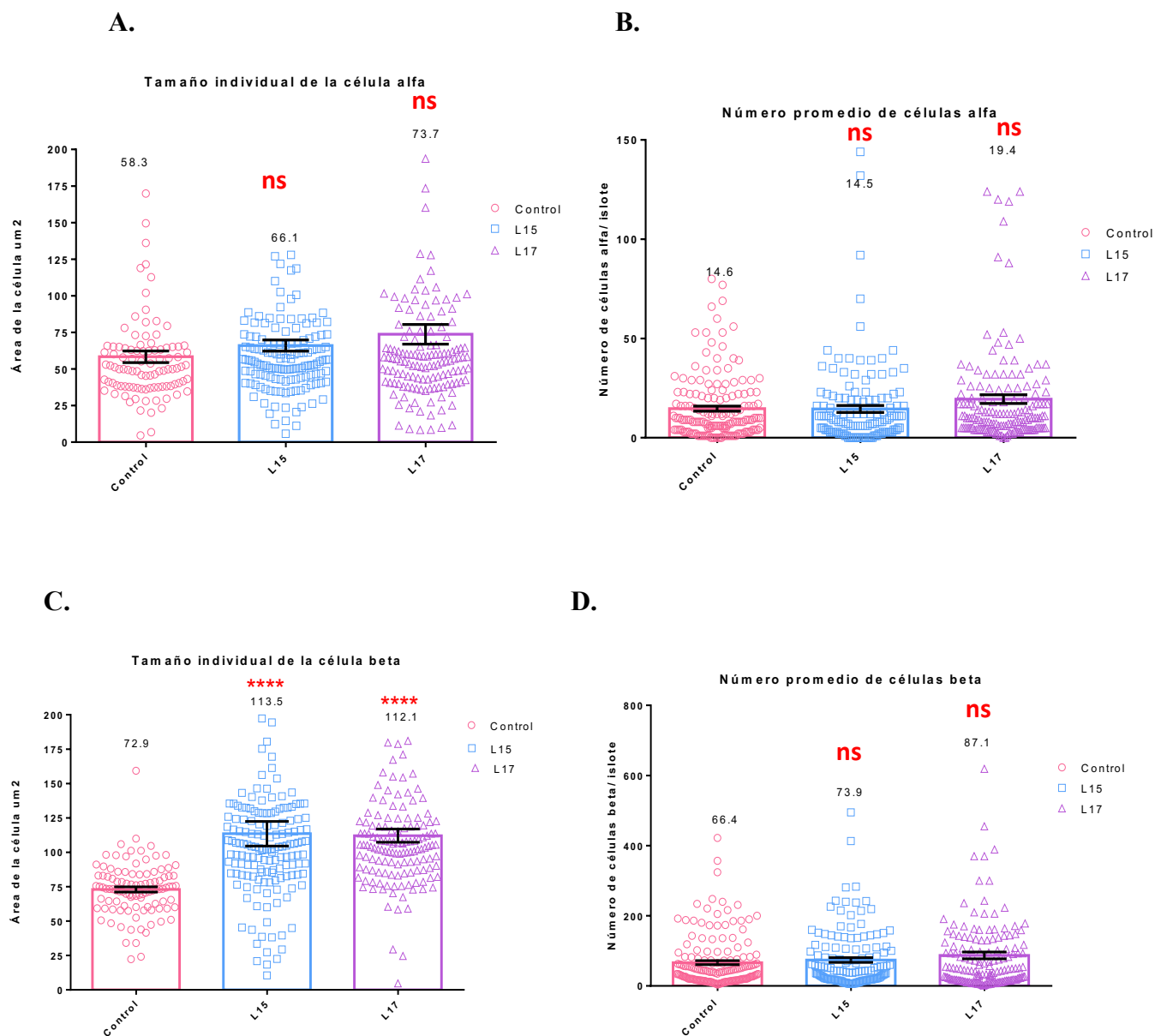


Figura 10 Área y número promedio de células alfa y beta

A. Área promedio de las células alfa. B. Número promedio de células alfa por islote. C- Área promedio de las células beta C. Número promedio de células beta por islote. (n=4 por grupo). ns diferencia no significativa entre los valores evaluados.***P < 0.005

Proporción de células alfa y células beta

También se analizó si en la lactancia se producen cambios en la proporción de células alfa y beta, cuantificándose el área positiva a insulina y glucagón respecto al área total del islote en cada uno de los tiempos analizados.

En los resultados de porcentaje de células alfa y células beta de los islotes, se observó que el área porcentual que representan los tipos celulares evaluados durante los días de lactancia es el siguiente: día 15 células alfa= $12.4\pm 21\%$, células beta= $87.6\pm 19\%$; día 17 células alfa= $20.6\pm 19.1\%$ y células beta= $79.4\pm 19.1\%$. Estos resultados no son diferentes significativamente respecto al grupo control células alfa= $16.3\pm 19.1\%$ y células beta= $83.7\pm 19.1\%$.

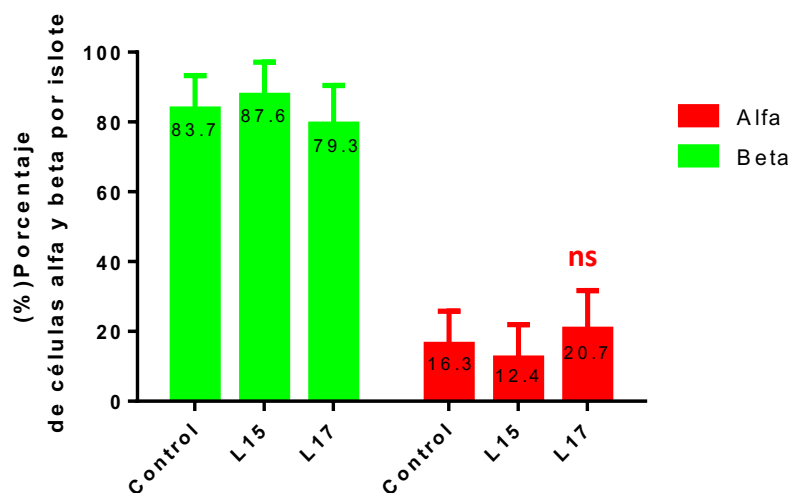


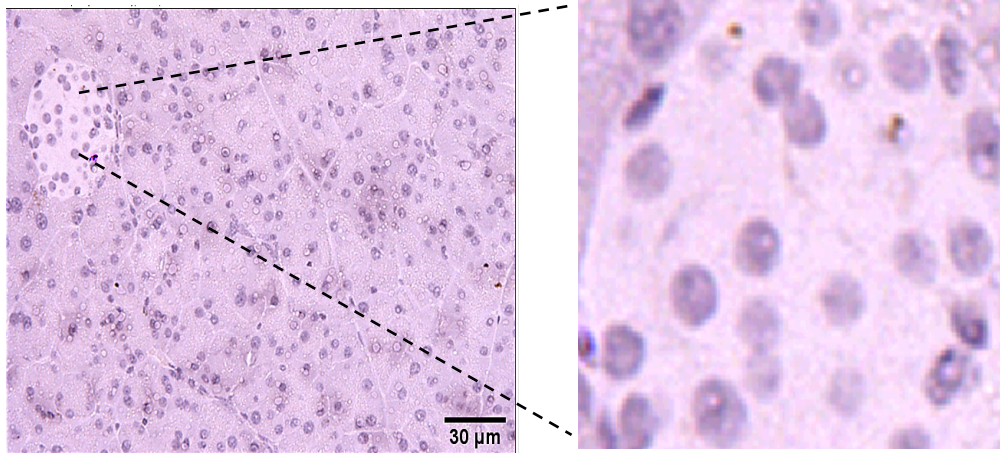
Figura 11 Porcentaje de células alfa y beta en los islotes pancreáticos (n=4 por grupo), ANOVA de una vía. ns diferencia no significativa entre los valores evaluados.

Proliferación

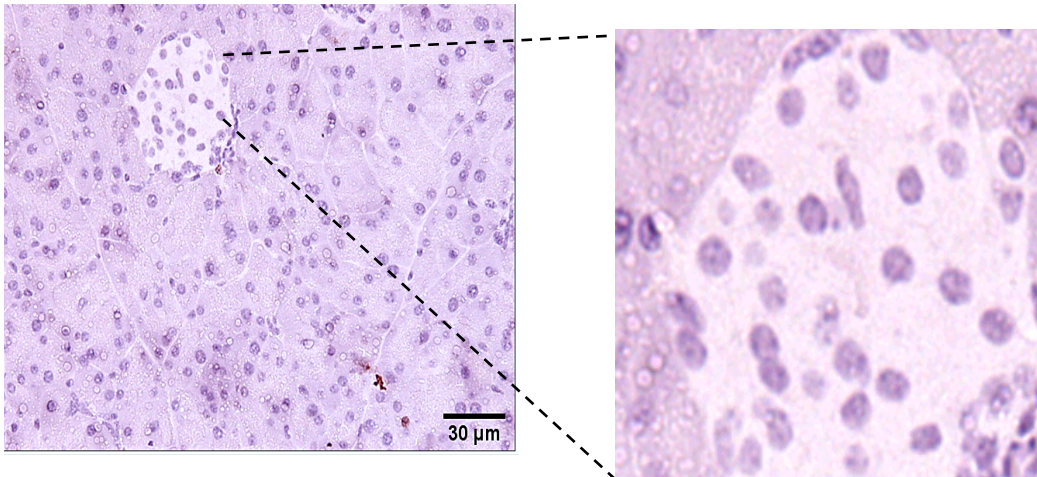
Los resultados de porcentaje de núcleos positivos al marcador de proliferación celular Ki67 revelaron que en el día 17 de lactancia el porcentaje de proliferación es de $1.18\pm 0.28\%$, casi el doble que el observado en el grupo control ($0.64\pm 0.079\%$), mientras que día 15 de lactancia presenta un porcentaje de $0.70\pm 0.12\%$.

A.

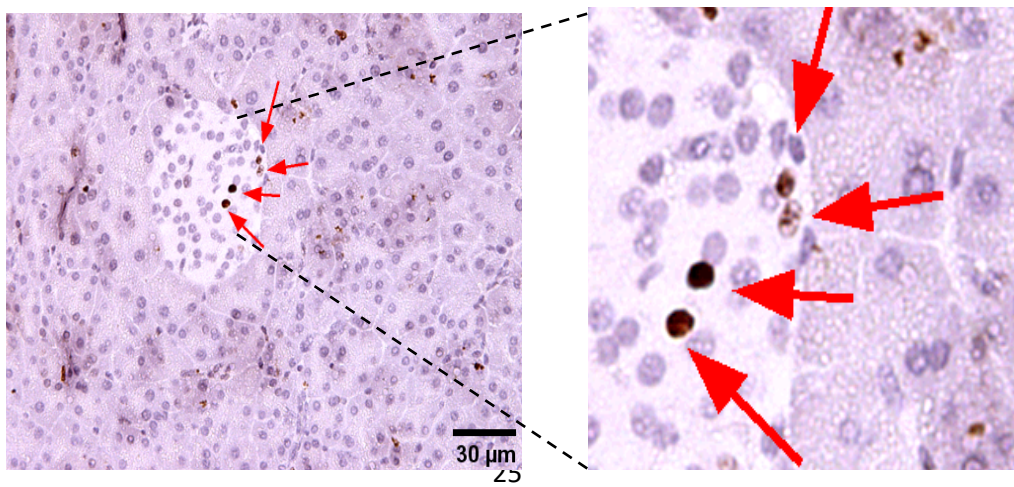
CONTROL



L15



L17



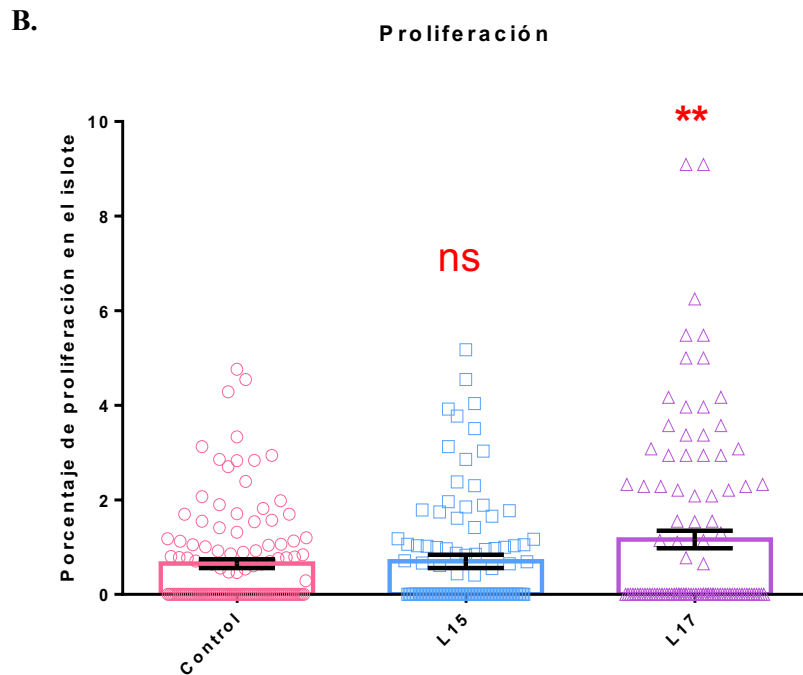


Figura 12 Proliferación celular

Micrografías con células positivas a Ki67 señaladas con una flecha ↑ dentro del islote: grupo control de ratonas nulíparas pareadas por edad (Control, superior), día 15 (L15, medio) y 17 de lactancia (L17, abajo). B. Porcentaje de células positivas a Ki67. ± SEM. ANOVA de una vía. ns diferencia no significativa entre los valores evaluados. * $P < 0.05$. ** $P > 0.005$

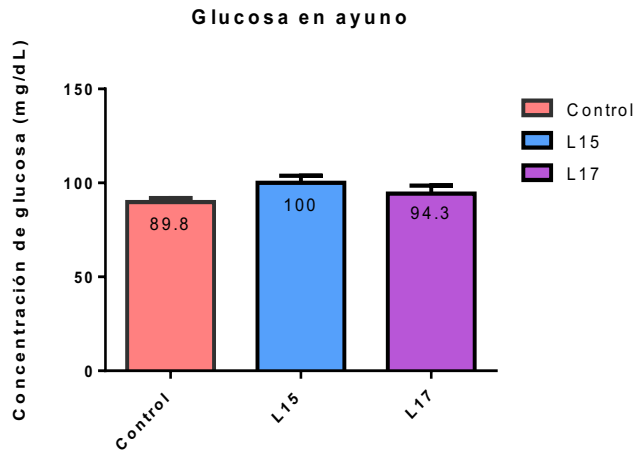
Homeostasis de la glucosa

Glucosa en ayuno y no ayuno

Hasta la fecha no existen reportes de cambios en la homeostasis de la glucosa durante la tercera fase de la lactancia. Como parte de la evaluación de este evento se midieron las concentraciones de glucosa en ayuno y no ayuno al día 15 y 17 de la lactancia.

Los resultados permiten observar que no hubo diferencia significativa entre las concentraciones de glucosa en ayuno en el día 15 de lactancia ($100 \pm 3.87 \text{ mg/dl}$) y el día 17 ($94.3 \pm 4.35 \text{ mg/dl}$) y el grupo control ($89.7 \pm 2.15 \text{ mg/dl}$). Sin embargo, al evaluar las concentraciones de glucosa en condiciones de no ayuno, los resultados muestran que durante la lactancia existe una disminución significativa en el día diecisiete ($113 \pm 4.2 \text{ mg/dl}$; $P = 0.00304$) y el día quince y L17 ($119 \pm 1.62 \text{ mg/dl}$; $P = 0.0016$) con respecto al control ($132 \pm 3.08 \text{ mg/dl}$).

A.



B.

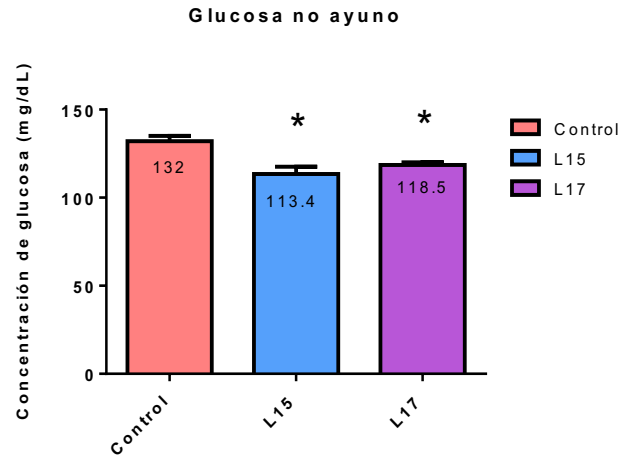
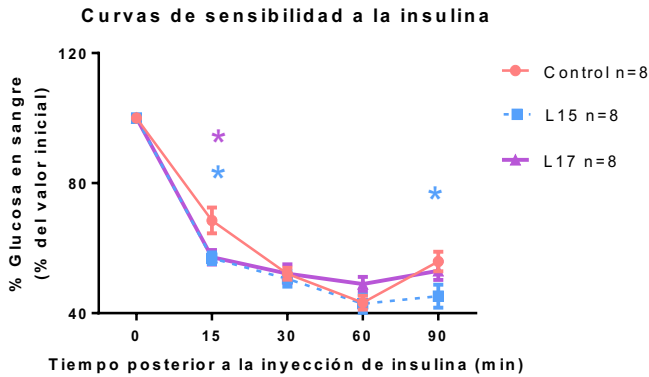


Figura 13 Niveles de glucosa en sangre. A. Glucosa en ayuno . B. Concentración de glucosa sin ayuno. n=8 por grupo. Análisis de diferencia mediante ANOVA de una vía. * P< 0.01

Curvas de sensibilidad a la insulina

En cuanto a la sensibilidad a la insulina se observa un aumento ésta durante la prueba de tolerancia a la hormona al minuto 15 en los días de lactancia 15 y 17 ($L15=56.9\pm 1.82$ mg/dl); $L17=57.2\pm 2.23$ mg/dl) vs $Control=68.5\pm 3.97$ mg/dl; $P < 0.005$). Sin embargo, el área bajo la curva no muestra diferencias.

A.



B.

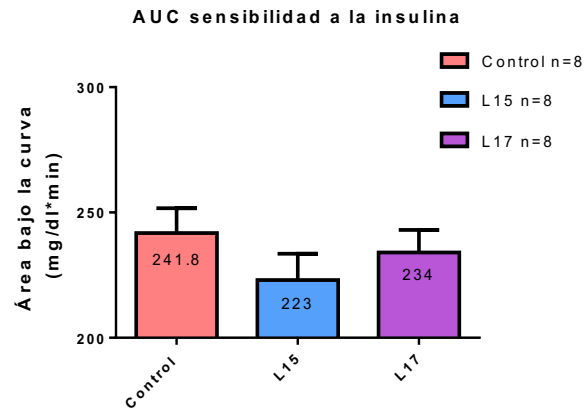


Figura 14 Sensibilidad a la insulina. A Curva de sensibilidad a la insulina. B. Área bajo la curva de tolerancia a la insulina. Promedio ± SEM del total del área bajo la curva de insulina por grupo (n=8 por grupo, Análisis de diferencia mediante ANOVA de una vía). ** P>0.05 ns diferencia no significativa entre los valores evaluados.

Curvas de tolerancia a la glucosa

Las curvas de tolerancia a la glucosa revelaron que durante L15 y L17 las ratonas presentan una mejor tolerancia respecto al control durante los primeros 15 ($L15=255\pm14.5$ mg/dl; $L17=218\pm17.5$ mg/dl vs. $Control=298\pm12.3$ mg/dl) y 30 minutos de la prueba ($L15=196\pm16.5$ mg/dl; $L17=139\pm6.70$ mg/dl vs. $Control=258\pm10.3$ mg/dl), y al final de esta ($L15=117\pm4.9$ mg/dl; $L17=120\pm4.428$ mg/dl vs. $Control=78.5\pm6.3$ mg/dl).

Al comparar el área bajo la curva de cada uno de los tiempos evaluados se observa que al día 17 de lactancia el área es menor al compararla con el control ($L17= 582.5\pm21.2$ vs. $Control=789\pm44.4$; $P= 0.00087$) esta mejora en la tolerancia se observa desde el día 15 donde se puede observar una disminución en el área bajo la curva ($L15=707\pm28.3$ mg/dl vs $Control=789\pm44.4$ mg/dl).

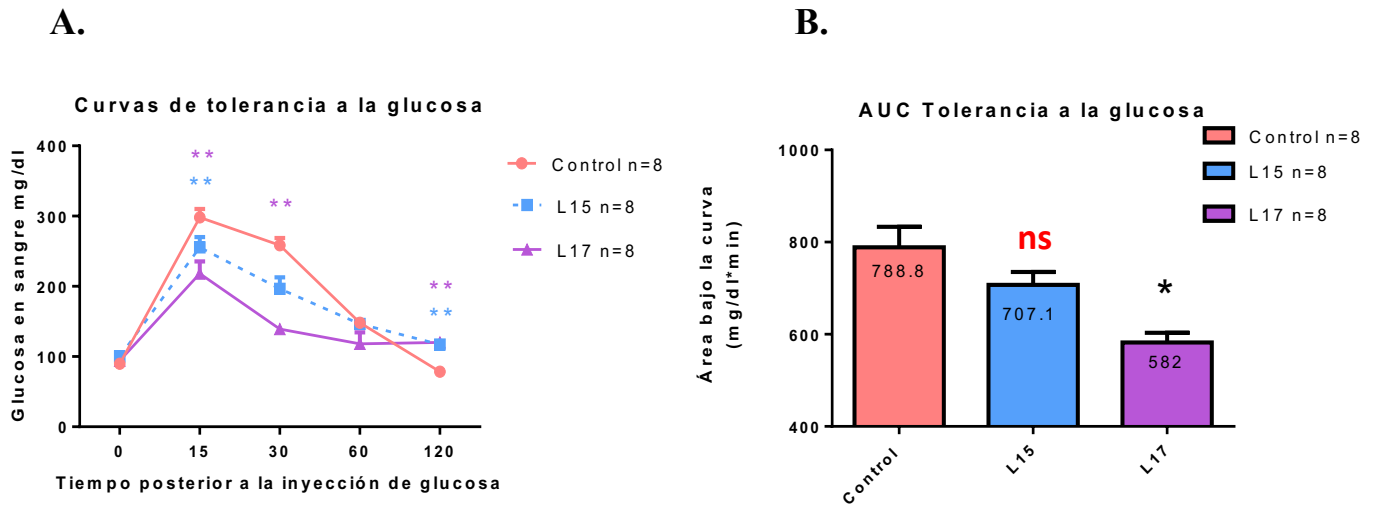


Figura 15 Tolerancia a la glucosa Curva de tolerancia a la glucosa. B. Área bajo la curva de tolerancia a la glucosa. Promedio \pm SEM (n=8 por grupo, Análisis de diferencia mediante ANOVA de una vía). * $P>0.05$. ** $P>0.01$. ns diferencia no significativa entre los valores evaluados.

DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que el páncreas endocrino tiene la capacidad de modificar su masa y función secretora en respuesta a una variedad de situaciones hormonales y fisiológicas. La gestación es uno de los eventos fisiológicos más estudiados en el cual se han descrito diversas adaptaciones del páncreas endocrino como aumento del tamaño del islote, hiperplasia, hipertrofia e incremento en la secreción de insulina de la célula beta, estas modificaciones participan en los cambios en la homeostasis de la glucosa que suceden en este periodo (Baeyens, Hindi, Sorenson, & German, 2016; Ernst, Demirci, Shelley, Velazquez-Garcia, & Garcia- Ocaña, 2011; Genevay, Pontes, & Meda, 2010; Parsons, Brelje, & Sorenson, n.d.; Rieck & Kaestner, 2010; Zielińska-maciulewska, Krętowski, & Szelachowska, n.d.).

Existen pocos estudios documentando los cambios del islote en la lactancia, un periodo donde también existen cambios hormonales (Canul-Medina & Fernandez-Mejia, 2019). La mayoría de los estudios se ha enfocado a los eventos en los primeros doce días del período lactante (A. F. Burnol, Leturque, Ferre, & Girard, 1983; A. Burnol et al., 1986; Jones, Ilic, & Williamson, 1984). Hasta la fecha no se han documentado los cambios en el islote materno en la etapa tardía de la lactancia. Por lo anterior este proyecto se planteó describir la morfometría del islote, y la homeostasis a la glucosa durante el día 15 y 17 de lactancia, que pertenecen al periodo en el cual se observa la mayor síntesis de leche.

Nuestros análisis morfométricos en los días de lactancia 15 y 17 revelaron que no existen cambios significativos en el área del islote al comparar con el grupo control. Sin embargo, en el día 17 de lactancia se observó un aumento en la proliferación de las células del islote, el cual es casi del doble que el encontrado en el control. Estos resultados demuestran por primera vez que existen cambios en el islote durante la lactancia tardía. El aumento en la proliferación celular encontrado podría explicar los resultados obtenidos en nuestro laboratorio los cuales encuentran que en los primeros días del destete el tamaño del islote aumenta debido principalmente a un aumento del número de células beta (López-Aviña 2019, Canul-Medina et al 2020), indicando que el cambio en el tamaño del islote durante la poslactancia podría ser resultado de un incremento en la proliferación del islote pancreático a partir del día 17 de lactancia. Las señales que producen los cambios en la proliferación del islote materno podría deberse a factores circulantes derivados de otros órganos que se sabe se modifican en la lactancia como el intestino, el tejido adiposo, el hueso, la glándula mamario y el riñón (Canul-Medina & Fernandez-Mejia, 2019; Zhong & Jiang, 2019).

En estudios previos se observa que la proliferación del islote se produce antes del crecimiento del área del islote concuerdan con lo observado por Parsons et al (1992) quienes describen que el aumento en el tamaño del islote en la gestación (14 día) se produce por un incremento en la proliferación de las células beta, que comienza a partir del día 10 de gestación (Parsons et al.,1992).

Dado que para el mantenimiento de la producción de leche se requieren grandes cantidades de glucosa, es de esperarse que existan cambios en la homeostasis de este carbohidrato durante el pico de producción de la lactancia.

El análisis de las concentraciones de glucosa en la en condiciones de no ayuno, encontró disminuciones en el día 15 y 17 de lactancia en las concentraciones de glucosa sanguínea en los ratones no ayunados, lo cual es acorde con el conocimiento de que la glándula mamaria utiliza preferentemente sustratos proporcionados por la dieta (Burnol et al. 1986; Jones et al., 1984).

Por otro lado, en la evaluación de las concentraciones de glucosa en ayuno encontramos que no existen diferencias entre los grupos experimentales y el control edad. Debido a la alta tasa de utilización de glucosa en la glándula mamaria durante la lactancia el mantenimiento de los niveles de glucosa podría ser resultado de un incremento en la glucogenólisis hepática y gluconeogénesis, o bien de la disminución de los niveles de insulina circulante, que favorecería la lipólisis en el tejido adiposo la cual derivaría en el uso de ácidos grasos como fuente de energía en otros tejidos ayudando así a mantener la concentración de glucosa en ayuno (Jones et al, 1984).

Las concentraciones de glucosa sanguínea durante la prueba de tolerancia a la glucosa se encontraron por debajo de las concentraciones del azúcar en el grupo control. Estos resultados son semejantes a los hallazgos de Burnol et al. (1986) quienes encontraron en ratas una disminución en la glucosa sanguínea en la curva de tolerancia a la glucosa al día 12 de lactancia. Asimismo, indican que el aumento en la tolerancia a la glucosa observada en la poslactancia se encuentra presente desde antes del destete.

Por otro lado, en nuestros estudios analizando la sensibilidad a la insulina se observa un incremento en la sensibilidad a la hormona en los primeros minutos de la prueba, resultado que concuerda con observaciones por Williamson (1984) y Burnol (1986) quienes encuentran que existe un aumento en la sensibilidad a la insulina que favorece la síntesis de leche en la glándula mamaria debido a la alta tasa de utilización de glucosa y a la lipogénesis *de novo* por este tejido (A. Burnol et al., 1986; Jones et al., 1984).

En resumen, nuestros estudios demuestran por primera vez que, en la lactancia tardía se producen cambios en la homeostasis de la glucosa. También se encontró que se aumenta la proliferación de las células del islote y el tamaño de las células beta, lo que sustenta las observaciones en las cuales existe incremento de tamaño el islote en el periodo del posdestete.

Estudios futuros serán necesarios para determinar las señales que producen los cambios observados en este estudio.

CONCLUSIONES

Durante el final de la lactancia:

1. El área del islote pancreático no se modifica en los días 15 y 17 de lactancia con respecto al control.
2. La proliferación celular del islote incrementa casi el doble el día 17 de lactancia con respecto al control.
3. Existe una disminución de la glucosa sérica en las pruebas de tolerancia a la glucosa en los días 15 y 17 de lactancia.
4. Se observa un aumento en la sensibilidad a la insulina al día 15 y 17 de lactancia.

REFERENCIAS

- Ayala, J. E., Samuel, V. T., Morton, G. J., Obici, S., Croniger, C. M., Shulman, G. I., ... McGuinness, O. P. (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Disease Models & Mechanisms*, 3(9–10), 525–534. <https://doi.org/10.1242/dmm.006239>
- Baeyens, L., Hindi, S., Sorenson, R. L., & German, M. S. (2016). β -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 18, 63–70. <https://doi.org/10.1111/dom.12716>
- Baeyens, L., Hindi, S., Sorenson, R. L., & German, M. S. (2016). β -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 18(Suppl 1), 63–70. <https://doi.org/10.1111/dom.12716>
- Bansal, P., Wang, S., Liu, S., Xiang, Y. Y., Lu, W. Y., & Wang, Q. (2011). GABA coordinates with insulin in regulating secretory function in pancreatic INS-1 β -Cells. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026225>
- Bing, C., Gomez-ambrosi, J., Zabalegui, N., Williams, G., & Trayhurn, P. (2002). Adipose Tissue of Lactating Mice, 296, 458–462.
- Bronson, F., Dagg, Charles, & Snell, G. (1966). Biology of the Laboratory Mouse. In M. Coleman, Douglas, Kalis, Nathan, Dagg, Charles, Rusell, Elizabeth, Fuller, Jonh, Staats, Joan, Green (Ed.), *Biology of the Laboratory Mouse* (Second Edition). New York: Dover Publications. Retrieved from <http://www.informatics.jax.org/greenbook/>
- Burnol, A. F., Leturque, A., Ferre, P., & Girard, J. (1983). Glucose metabolism during lactation in the rat: Quantitative and regulatory aspects. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 8(4).
- Burnol, A., Leturque, A., FERRk, P., Kande, J., Girard, J., Ferre, P., & Girard, A. J. (1986). *Increased insulin sensitivity and responsiveness during lactation in rats*.
- Canul-Medina, G., & Fernandez-Mejia, C. (2019). Morphological, hormonal, and molecular changes in different maternal tissues during lactation and post-lactation. *Journal of Physiological Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s12576-019-00714-4>
- Da Silva Xavier, G. (2018). The Cells of the Islets of Langerhans. *Journal of Clinical Medicine*, 7(3), 54. <https://doi.org/10.3390/jcm7030054>
- Dolenšek, J., Rupnik, M. S., & Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, 7(1), 2–9. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>
- Ernst, S., Demirci, C., Shelley, V., Velazquez-Garcia, S., & Garcia- Ocaña, A. (2011). Mechanisms in the adaptation of maternal β -cells during pregnancy. *Diabetes Management*, 1(2), 239–248. <https://doi.org/10.2217/dmt.10.24.Mechanisms>. *Diabetes mellitus y síndrome metabólico. Bioquímica de Laguna. 8ª edición. 2018. Capítulo 34. Diabetes Mellitus y Síndrome Metabólico. Pags 664-660. Fernández-Mejía C. capítulo 34 . Bioquímica de Laguna y Piña. El Manual Moderno 2018 . Editores. Federico Martínez, Juan Pablo Pardo, Héctor Riveros. El manual moderno. ISBN: 9786074487060*

- Franklin, I. K., & Wollheim, C. B. (2004). GABA in the Endocrine Pancreas: Its Putative Role as an Islet Cell Paracrine-signalling Molecule. *Journal of General Physiology*, *123*(3), 185–190. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409016>
- Fu, Z., R. Gilbert, E., & Liu, D. (2012). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, *9*(1), 25–53. <https://doi.org/10.2174/15733998130104>
- Genevay, M., Pontes, H., & Meda, P. (2010a). Beta cell adaptation in pregnancy: a major difference between humans and rodents? *Diabetologia*, *53*(10), 2089–2092. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1848-z>
- Genevay, M., Pontes, H., & Meda, P. (2010b). Beta cell adaptation in pregnancy: A major difference between humans and rodents? *Diabetologia*, *53*(10), 2089–2092. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1848-z>
- Gutgesell, A., Ringseis, R., Brandsch, C., Stangl, G. I., Hirche, F., & Eder, K. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor α and enzymes of carnitine biosynthesis in the liver are down-regulated during lactation in rats. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *58*(2), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.09.018>
- Hellerstrom, C. (2006). The influence of pregnancy and lactation on calcium metabolism. *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Vyziva*, *9*(4), 194–198. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed10&NEWS=N&AN=47214689>
- Ino, T., Yoshikawa, S., Yamauchi, M., & Sakuma, Y. (1969). Milk-Production Curves of Four Strains in Mice. *Experimental Animals*, *18*(4), 159–164. https://doi.org/10.1538/expanim1957.18.4_159
- Jackson Inmuno Research Laboratories West Grove, PA, USA. <https://www.jacksoninmuno.com/catalog/products/715-165-151>
- Jones, R. G., Ilic, V., & Williamson, D. H. (1984). Physiological significance of altered insulin metabolism in the conscious rat during lactation. *Biochemical Journal*, *220*(2), 455–460. <https://doi.org/10.1042/bj2200455>
- Kim, H., Toyofuku, Y., Lynn, F. C., Chak, E., Uchida, T., Mizukami, H., ... German, M. S. (2010). Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nature Medicine*, *16*(7), 804–808. <https://doi.org/10.1038/nm.2173>
- Knight, C. H., & Peaker, M. (1982). *Mammary cell proliferation in mice during pregnancy and lactation in relation to milk yield. Quarterly Journal of Experimental Physiology* (Vol. 67).
- Lazo de la Vega Monroy, M. L. (2012). *Efectos de la suplementación con biotina sobre el islote pancreático.*
- López Aviña, B. B. (2019). *Caracterización del efecto de la post lactancia sobre la morfometría de los islotes pancreáticos maternos en el ratón.*

- Malaisse, W. J., Hubinont, C. J., & Marynissen, G. (1989). Gynecology i GROWTH I--, 125–132.
- Marynissen, G., Aerts, L., Van Assche, F. A. (1983). The endocrine pancreas during pregnancy and lactation in the rat. *Developmental Physiology*, 5, 373–381.
- Marynissen, G., Malaisse, W. J., & Van Assche, F. A. (1987). Influence of lactation on morphometric and secretory variables in pancreatic B-cell of mildly diabetic rats. *Diabetes*, 36(8), 883–891.
- Mastracci, T. L., & Sussel, L. (2012). The endocrine pancreas: insights into development, differentiation, and diabetes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(5), 609–628. <https://doi.org/10.1002/wdev.44>
- Millican, P. E., Vernont, R., & Pain, V. M. (1987). during pregnancy and lactation, 248, 251–257.
- Moyce, B. L., & Dolinsky, V. W. (2018). Maternal β -Cell Adaptations in Pregnancy and Placental Signalling: Implications for Gestational Diabetes. <https://doi.org/10.3390/ijms19113467>
- Nielsen, J. H. (2016). Beta cell adaptation in pregnancy: a tribute to Claes Hellerström. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 121(2), 151–154. <https://doi.org/10.3109/03009734.2016.1165776>
- Parsons, J. A. (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(3), 1459–1466. <https://doi.org/10.1210/en.130.3.1459>
- Pfeifer, C. R., Shomorony, A., Aronova, M. A., Zhang, G., Cai, T., Xu, H., ... Leapman, R. D. (2015). Quantitative analysis of mouse pancreatic islet architecture by serial block-face SEM. *Journal of Structural Biology*, 189(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.10.013>
- Rieck, S., & Kaestner, K. H. (2010). Expansion of β -cell mass in response to pregnancy. *Trends Endocrinol Metab*, 21(3), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.11.001>
- Röder, P. V, Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(3), e219–e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
- Scaglia Luisa, Smith F, B.-W. S. (1995). Apoptosis Contributes to the Involution of B cell mass in Post Partum Rat Pancreas. *Endocrinology*, 136(12), 5461–5469.
- Scherbaum, W. A. (1998). *Endocrinology*, 106, 97–102.
- Sferruzzi-perri, A. N., & Fowden, A. L. (2016). Europe PMC Funders Group PROXIMITY TO DELIVERY ALTERS INSULIN SENSITIVITY AND GLUCOSE METABOLISM IN PREGNANT MICE, 65(4), 851–860. <https://doi.org/10.2337/db15-1531.PROXIMITY>
- Shih, H. P., Wang, A., & Sander, M. (2013). Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29(1), 81–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122405>

- Shipman, L. J., Docherty, A. N. N. H., Knight, C. H., & Wilde, C. J. (2010). Gland During a Normal Lactation Cycle and in Extended Lactation. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, (1987), 303–311.
- Sigma, Clone K79bB10 # G 2654.
https://sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g2654?lang=es®ion=MX&cm_sp=Insite_-_rvRecBlock
- Sorenson, R., & Brelje, T. (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(06), 301–307. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979040>
- Sorenson, R. L., Brelje, T. C., & Roth, C. (1993). Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of langerhans: A new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology*, 133(5), 2227–2234. <https://doi.org/10.1210/endo.133.5.8404674>
- Teixeira, C. J., Santos-Silva, J. C., de Souza, D. N., Rafacho, A., Anhe, G. F., & Bordin, S. (2019). Dexamethasone during pregnancy impairs maternal pancreatic β -cell renewal during lactation. *Endocrine Connections*, 8(2), 120–131. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0505>
- Vernon, R. G. (1989). Endocrine control of metabolic adaptation during lactation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 48(1), 23–32. <https://doi.org/10.1079/PNS19890006>
- Williamson, D. H. (1986). Regulation of metabolism during lactation in the rat. *Reproduction Nutrition Developpement*, 26(2 B), 597–603. <https://doi.org/10.1051/rnd:19860409>
- Wortham, M., & Sander, M. (2016). Mechanisms of β -cell functional adaptation to changes in workload. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 18, 78–86. <https://doi.org/10.1111/dom.12729>
- Yagihashi, S. (2015). Advances in pathology of diabetes from pancreatic islets to neuropathy—a tribute to Paul Langerhans. <https://doi.org/10.1111/pin.12263>
- Zhang, X.-X., Pan, Y.-H., Huang, Y.-M., & Zhao, H.-L. (2016). Neuroendocrine hormone amylin in diabetes. *World Journal of Diabetes*, 7(9), 189. <https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i9.189>
- Zhao, Z. J., Chi, Q. S., & Cao, J. (2010). Milk energy output during peak lactation in shaved Swiss mice. *Physiology and Behavior*, 101(1), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.017>
- Zhong, F., & Jiang, Y. (2019). Endogenous Pancreatic β Cell Regeneration: A Potential Strategy for the Recovery of β Cell Deficiency in Diabetes, 10(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00101>
- Zielińska-Maciulewska, A., Krętowski, A., & Szelachowska, M. (2018). Insulin resistance and adaptation of pancreatic beta cells during pregnancy. *Clinical Diabetology*, 7(5), 222–229. <https://doi.org/10.5603/DK.2018.0022>

