



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA GESTACIÓN Y LACTANCIA SOBRE LA
MORFOMETRÍA DE LOS ISLOTES PANCREÁTICOS EN EL RATÓN

“T E S I S”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

pQFB KAREN LINARES ALVARADO

DIRECTOR INTERNO DE TESIS:

D. C SAMUEL TREVIÑO MORA

DIRECTOR EXTERNO DE TESIS:

D.C MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA

PUEBLA, PUE. MARZO, 2016

AGRADECIMIENTOS

Nuestra vida está llena de etapas a través de las cuales podemos descubrir nuevas habilidades y capacidades en nosotros mismos, pero también podemos identificar aquellas flaquezas, miedos y creencias que llegan hacer sombra en nuestra vida cotidiana y que depende de nosotros superarlas. Este trabajo me permitió crecer a nivel profesional y también a nivel personal; dejándome grandes enseñanzas y valiosas personas. Sé que lo mejor que puedo hacer es amar lo que hago, dando lo mejor de mí en cada una de mis acciones, y que no importa las veces que llegue a claudicar, siempre habrá alguien que me recuerde lo que soy capaz de generar.

Agradezco a la D.C Ma Cristina Fernández Mejía por permitirme ser parte de su laboratorio y participar en uno de sus proyectos.

Al M.C Gustavo Eduardo Canul Medina por aceptarme en su equipo de trabajo e instruirme en cada una de las técnicas empleadas.

A la M.C Wilma Inés Tixi Verdugo por brindarme consejos, enseñanzas y esclarecer mis dudas, a la vez agradezco su gran apoyo y amistad.

A la Licenciada en Biología Brianda Berenice López Aviña quien trabajó codo a codo conmigo y fue parte esencial en este trabajo, además de brindarme apoyo y consejos, me ofreció su amistad haciendo de mi estancia una grata experiencia.

A mi tutor interno de tesis, cD. C Samuel Treviño Mora por su paciencia, su gran compromiso, el tiempo que me brindo para aclarar mis dudas y compartir conmigo su conocimiento; al igual que los consejos a nivel profesional y personal. Fue un gran privilegio contar con su guía.

A cada uno de mis amigos que ahora forman parte de mi vida, Lupita, Vero, Nic, Mariana, Naye, Karen Aurora, Gis, Lalu, Omar, Oscar, Isa, Víctor y José David; a cada uno de ellos les agradezco por escucharme, por brindarme palabras de aliento y siempre creer en mí.

A mi familia, que son mi pilar y fuente de inspiración, siempre a mi lado, apoyándome, alentándome a seguir.

Por último quiero agradecer y reconocerme, a pesar de los obstáculos y problemas diversos que se presentaron a lo largo de este camino me dí cuenta que nunca estuve sola, que siempre hubo gente empoderandome, recordando la capacidad con la que cuento.

Sé que el éxito es consecuencia de ser responsable, comprometido, constante, que pertenece a las personas que han superado sus miedos y limitaciones, que están dispuestas ir más allá, de aventarse al vacío, creer en si mismas, y esperar lo mejor de cada decisión.

Stay hungry, stay foolish!

ÍNDICE

1. Introducción	4
1.2. Páncreas	4
1.2.1. Páncreas exocrino	4
1.2.2. Páncreas endocrino	4
1.3. Células β	6
1.3.1. Importancia de las células β	7
1.3.2. Secreción de insulina	7
1.4. Plasticidad celular	9
1.4.1. Gestación	10
1.4.1.1. Resistencia a la insulina	13
1.4.1.2. Resistencia periférica a insulina durante el embarazo	14
1.4.2. Lactancia	15
2. Planteamiento del problema	17
3. Justificación	18
4. Objetivos	19
4.2. Objetivo general	19
4.3. Objetivo particular	19
5. Hipótesis	20
6. Diagrama de trabajo	21
7. Metodología	22
7.2. Modelo animal	22
7.3. Dieta	23

7.4.	Curvas de tolerancia a la glucosa	24
7.5.	Inclusión y cortes histológicos	24
7.6.	Tinción Hematoxilina-eosina	25
7.6.1.	Análisis de islotes pancreáticos	25
7.7.	Inmunofluorescencia	26
7.7.1.	Análisis de área de células α y β	27
7.7.2.	Análisis de tejidos pancreáticos	27
7.8.	Viabilidad celular	28
7.8.1.	Análisis de viabilidad	28
7.9.	Análisis estadístico	29
8.	Resultados	30
9.	Discusión de resultados	49
10.	Conclusión	66
11.	Anexos	67
12.	Bibliografía	78

1. Introducción

1.2 Páncreas

El páncreas es un órgano mixto formado por dos tipos de glándulas; la exocrina que secreta enzimas digestivas en el intestino, y la endocrina que secreta hormonas en el torrente sanguíneo . Se divide en tres regiones, cabeza, cuerpo y cola. La primera región es la más ancha y se encuentra ubicada del lado derecho del abdomen, en la curvatura del duodeno. El cuerpo y la cola se extienden hasta el lado izquierdo del abdomen, cerca del bazo; esta última región es más estrecha [2]. Posee dos conductos, uno atraviesa por todo el órgano, inicia a nivel de la cola y desemboca junto con el colédoco a través de la ámpula de Vater en el duodeno, conocido como conducto de Wirsung; el segundo es el conducto excretorio, conducto de Santorini, que se origina en el conducto pancreático principal, se extiende desde la cabeza del páncreas hasta el duodeno [1].

1.2.1 Páncreas exocrino

La glándula exocrina o tejido acinar, representa cerca del 98% del volumen total del páncreas; las células acinares tienen morfología poligonal o piramidal, con el vértice dirigido hacia la luz central del acino, núcleo basal y una gran cantidad de gránulos secretores (zimógenos) [1].

Dentro de sus funciones está participar en la digestión de los alimentos a través de la síntesis, almacenamiento y secreción de diversas enzimas digestivas al lumen intestinal. Existen 2 tipos de secreciones, la enzimática y la hidroeléctrica. La enzimática es la causante de la hidrólisis de las sustancias nutritivas de los alimentos, mientras que la hidroelectrolítica actúa como vehículo de la enzimática y proporciona un medio alcalino, necesario para la inactivación de las enzimas [3].

1.2.2 Páncreas endocrino

La glándula endócrina o islotes de Langerhans, corresponde al 1-2% del volumen total del páncreas. Los islotes de Langerhans se encuentran inmersos entre el tejido acinar, y participan en el control de la homeostasis energética a través de la secreción de diversas hormonas (Figura 1) [4, 5].

Los islotes de Langerhans fueron descubiertos en 1869 por Paul Langerhans. La distribución y densidad de los islotes es similar en las regiones de la cabeza y el cuerpo, pero es mucho mayor en la región de la cola [2]. Está compuesto por distintas células que producen y secretan diferentes hormonas: las células-beta (β) secretan insulina, las células-alfa (α) secretan glucagón, las células-delta (δ) secretan somatostatina, las células FF secretan polipéptido pancreático, y las células-épsilon (ϵ) que secretan ghrelina [6] (Figura 1).

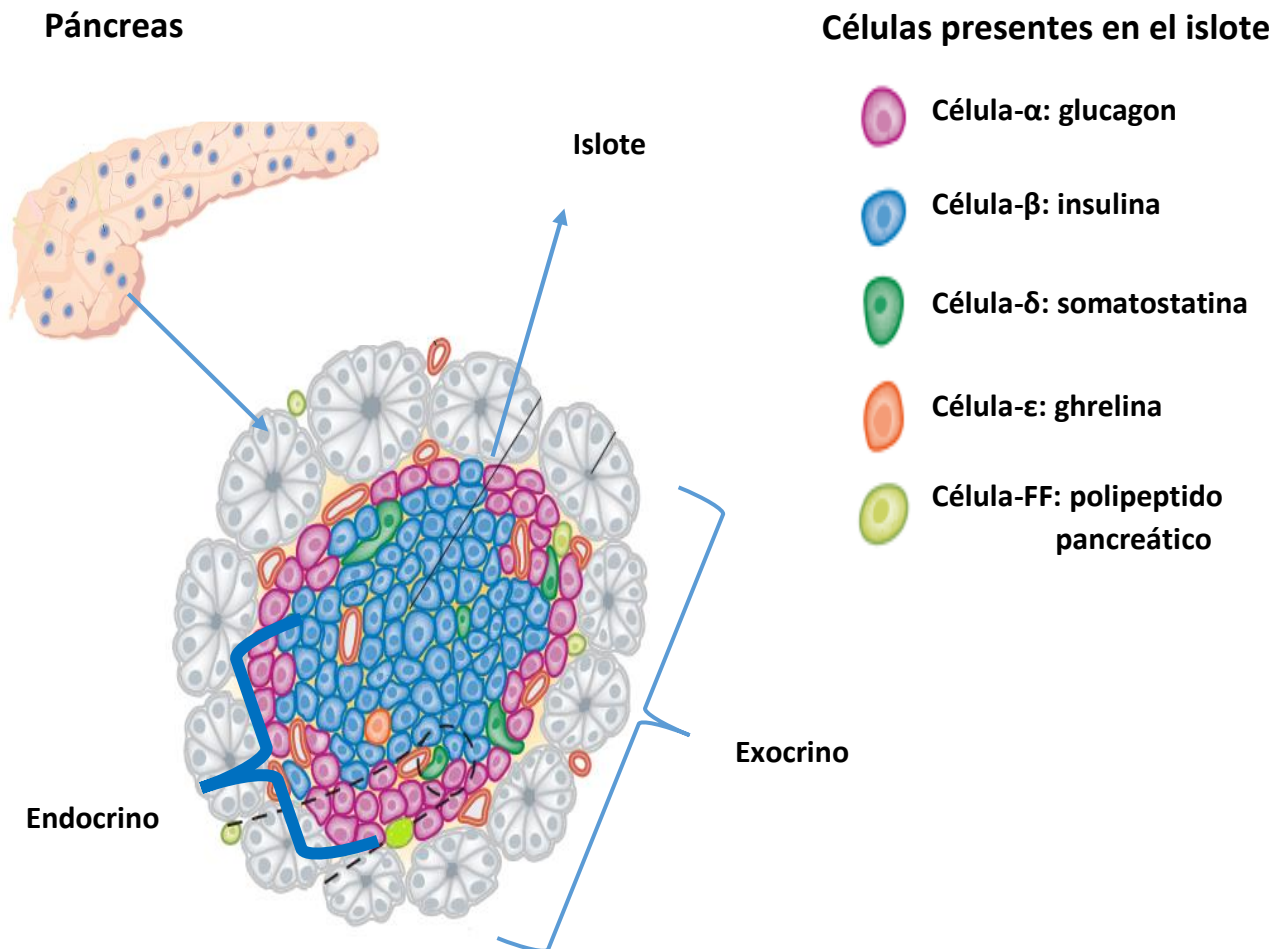


Figura 1. Estructura del páncreas exocrino y endocrino. Representación de los diferentes tipos celulares que conforman la parte endocrina del páncreas [7].

1.3 Células-β

La célula-β representa un 80% del volumen total del islote mientras que las células-α un 20%; en roedores las células-β se ubican principalmente en el centro, mientras que las células-α se encuentran en la periferia, en contraste con los humanos donde las células-α se entremezclan con las células-β [2, 4, 5].

La célula-β es una unidad de gran capacidad para la producción de insulina [8]; contiene gránulos que sirven de almacén y ocupan más del 10% del volumen total de la célula. En roedores hay alrededor de 13,000 gránulos, cada uno de ellos puede almacenar aproximadamente 200,000 moléculas de insulina [9].

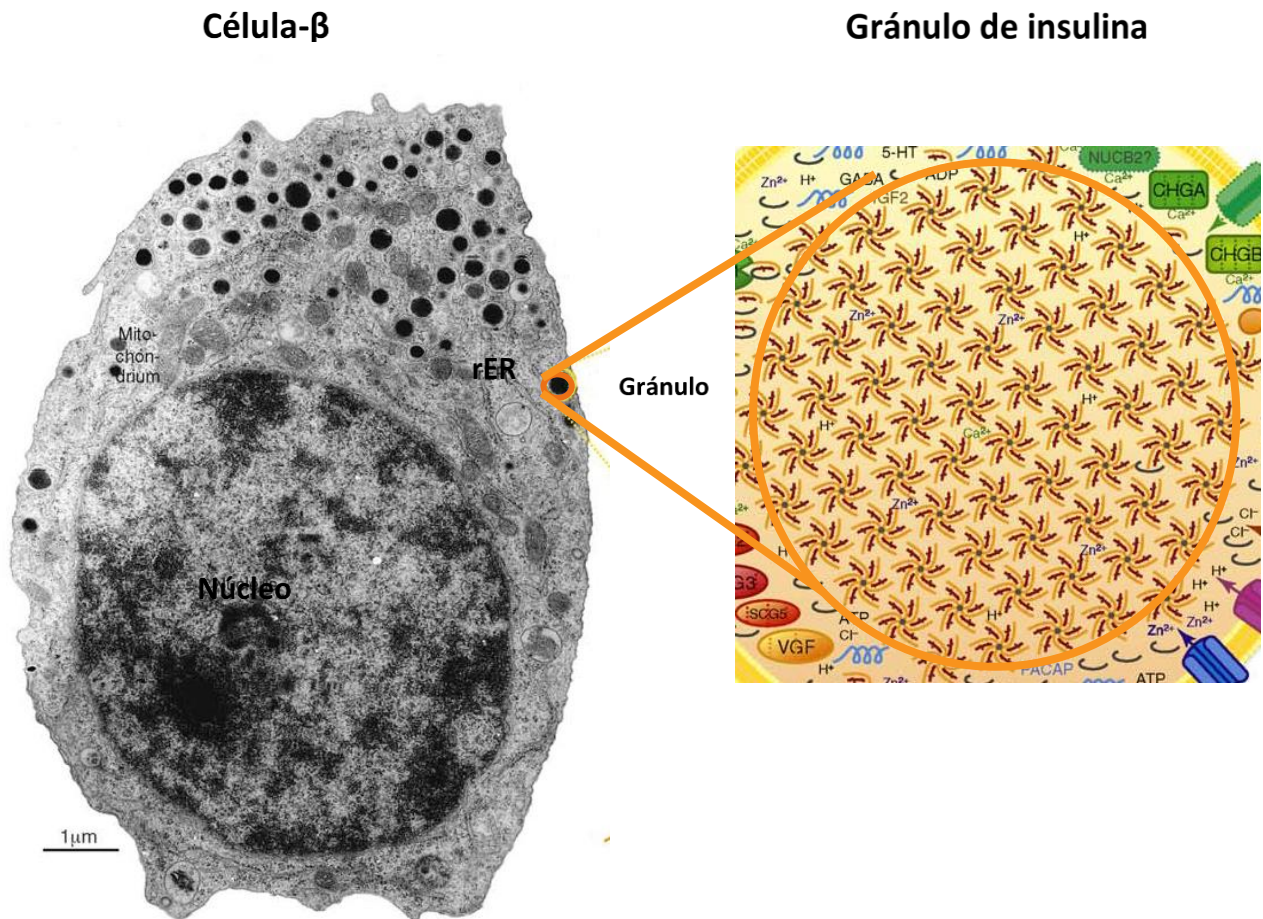


Figura 2. Célula-β pancreática. (Lado izquierdo) microscopía de barrido electrónico de una célula-β pancreática. (Lado derecho) representación de un gránulo de insulina, que contiene hexámeros de resguardo asociados con Zn²⁺ [8].

1.3.1 Importancia de las células- β

La homeostasis de la glucosa es controlada por las células endocrinas, principalmente por la célula- β , la cual se encarga de sintetizar y secretar la cantidad de insulina necesaria para un óptimo control de la homeostasis. Las células- β responden de manera dinámica frente a un incremento en la demanda de insulina [4]. La insulina tiene como tejidos efectores principales al músculo, hígado y el tejido adiposo, durante el post-prandio, la secreción de insulina desencadena en dichos tejidos, una serie de respuestas que permiten la captación y manejo en rutas de obtención energética y resguardo a la glucosa [10].

1.3.2 Secreción de insulina

La secreción de insulina en respuesta a glucosa requiere una serie de pasos en los que participan la entrada de glucosa a las células- β , la oxidación de glucosa, cambios electro-fisiológicos, fusión de los gránulos que contiene insulina con la membrana plasmática y finalmente su secreción al medio extracelular [8].

La secreción de insulina por las células- β está modulada tanto por controles hormonales y neuronales vía activación de receptores membranales [11]. Las células- β responden a muchos nutrientes en la circulación sanguínea, incluyendo glucosa, otros monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos. La glucosa es el primer estímulo para la liberación de insulina, ya que es el componente principal de la comida. La membrana de la célula- β está equipada con los transportadores de glucosa 2 (GLUT2), que son sensores de la cantidad de glucosa circulante. Después de entrar a la célula, la glucosa es fosforilada por la enzima glucocinasa. Al final de la glucólisis se obtiene piruvato que se oxida para producir ATP; los canales sensibles a potasio (K_{ATP}) se cierran, generando una despolarización de la membrana; se abren los canales dependientes de voltaje Ca^{2+} [9]. En dicho control, la proteína de unión a guanosinatrifosfato (GTP) también interviene al regular la actividad de la adenilato-ciclasa, fosfolipasa C, canales iónicos y diferentes eventos que permitan incrementar los niveles de Ca^{+2} del citoplasma [12].

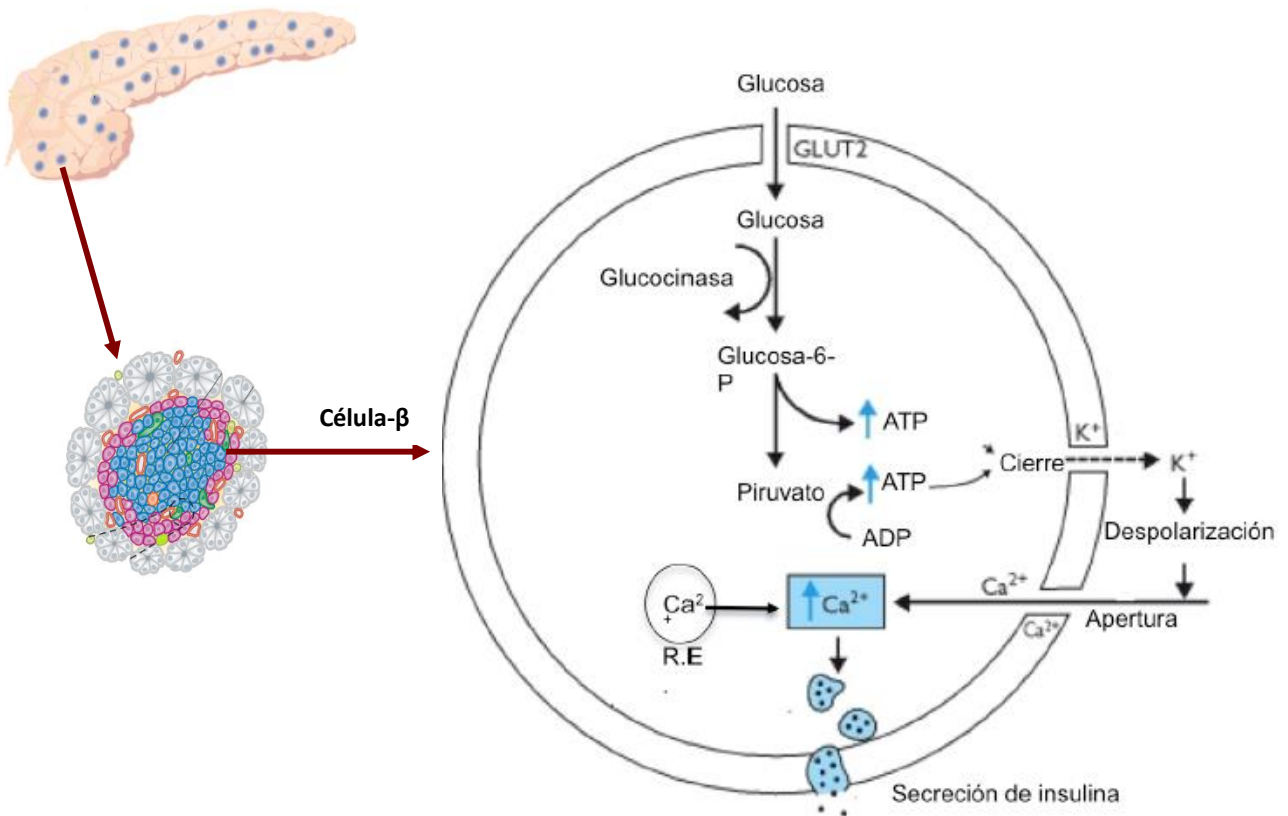


Figura 3. Modelo de secreción de insulina estimulada por glucosa en las células-β. La entrada de glucosa en la célula ocasiona aumento del ATP, cierre de los canales de K^+ , despolarización de la membrana plasmática y entrada de Ca^{2+} del medio externo. El retículo endoplasmático también participa en el aumento de Ca^{2+} . Esto incrementa los niveles de Ca^{2+} en el citoplasma, fusión de los gránulos que contienen insulina con la membrana plasmática y la secreción de ésta a la circulación [13-18].

Un óptimo control en el nivel de glucosa depende de la síntesis y secreción de insulina por parte de la célula-β pancreática. Si existe alguna falla para adaptarse a los cambios que acontecen en el cuerpo [5], puede resultar en una hiperglicemia con múltiples complicaciones en órganos e incluso desarrollar diabetes[19]. Además de una función apropiada de las células-β, existe otro aspecto importante a considerar, la masa total de células-β, la cual está dada por el número y tamaño de células, y se incrementa progresivamente durante los periodos fetal y neonatal, alcanzando una meseta durante la etapa adulta, y decayendo gradualmente con la edad [12].

Ante las diferentes demandas metabólicas y cambios fisiológicos, la masa de los islotes pancreáticos no permanece constante a lo largo de la vida. Estudios en roedores adultos reportan la capacidad de las células- β de adaptarse ante incrementos en la demanda de insulina, mediante aumento en su masa y la secreción de esta hormona. Este proceso también se presenta en la obesidad y pancreatocromía. Estos cambios adaptativos en la masa de los islotes por otra parte también son controlados por ajustes en la muerte, proliferación y tamaño celular [4, 20, 21].

La disminución parcial o total de la masa de células- β es el común denominador en la aparición de los diferentes tipos de diabetes. La masa de los islotes pancreáticos se regula por un estricto balance entre la replicación celular, hipertrofia y neogénesis; y la muerte celular, atrofia y autofagia [5].

1.4 Plasticidad celular

Estudios recientes mencionan que durante la etapa adulta la principal fuente de la que derivan nuevas células- β en roedores es a partir de células preexistentes [22].

La plasticidad celular es definida por la capacidad que tienen células especializadas para convertirse en otro tipo de célula, para poder compensar la pérdida celular o función sistémica [19, 23].

Los mecanismos involucrados en la modulación de la masa de las células- β son los siguientes: replicación de células a partir de células- β preexistentes, diferenciación de células del epitelio ductal, diferenciación de células madre pancreáticas de células acinares y del ducto; y transdiferenciación de células acinares [12, 21]. En dichos mecanismos participan factores de transcripción como neurogenina 3 (NGN3), pancreático y duodenal homeobox 1 (PDX1) y músculo aponeurótica fibrosarcoma A (MAFA) [19].

Existen diversas razones que hacen importante el estudio de los mecanismos relacionados con la expansión e hiperfunción de la célula- β . Múltiples investigaciones indican que las células- β tienen la capacidad de experimentar cambios para compensar alteraciones metabólicas ya sean patológicas, como la diabetes o fisiológicas, como lo es el embarazo.

1.4.1 Gestación

Uno de los estímulos fisiológicos más demandantes, es la gestación; en este periodo hay cambios endocrinos y metabólicos resultado de la actual relación entre madre y feto, conocida como unidad feto-placentaria. Esta unidad funcional es la responsable de la producción y secreción de proteínas y hormonas durante el embarazo.

Al inicio del embarazo, la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina son normales. Sin embargo, conforme los requerimientos energéticos del feto aumentan, existe un incremento en la resistencia a la insulina en tejidos periféricos que favorece el suplemento de glucosa hacia el feto [24, 25]. Además cambia la producción de energía a partir de carbohidratos a lípidos en el metabolismo materno, lo que también favorece la disponibilidad de la glucosa para el feto [26]. Lo anterior conduce a cambios morfológicos y funcionales en las células- β , donde hay un aumento en su masa y en la secreción de insulina (figura 4).

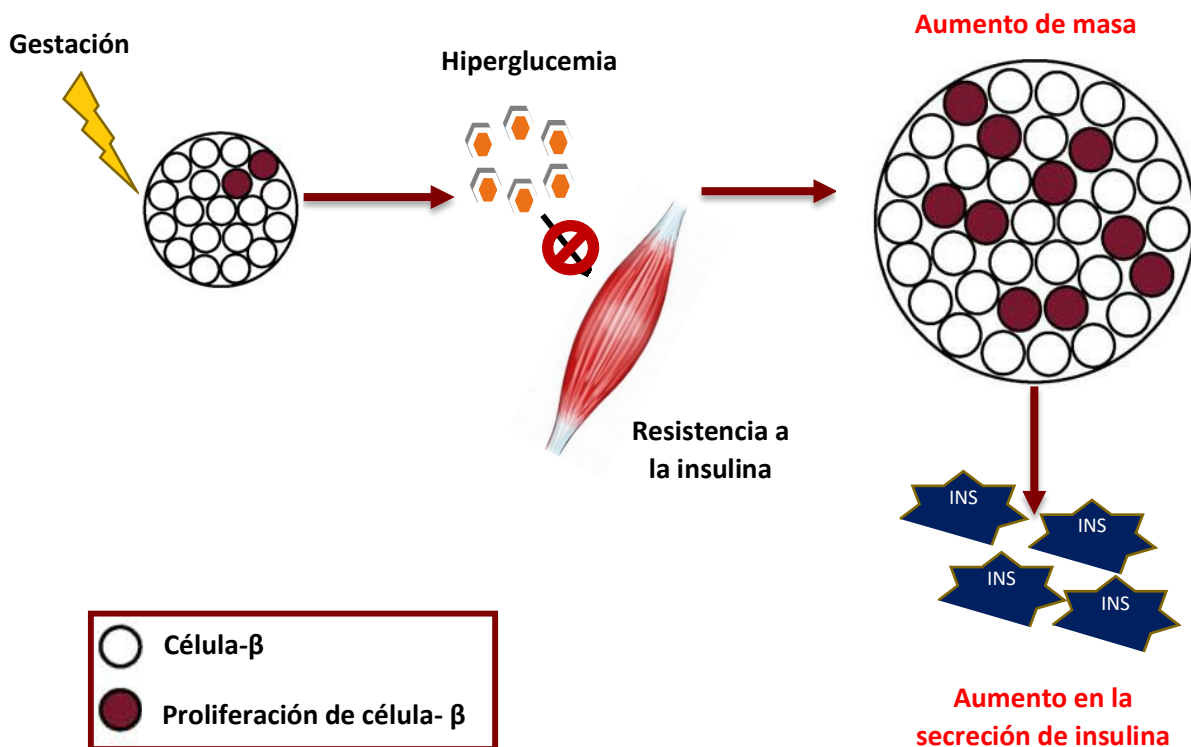


Figura 4. Mecanismo de compensación de la célula- β durante la gestación. Se genera un aumento en la masa del islote pancreático que conlleva a una mayor secreción de insulina para poder compensar la resistencia a la insulina y la hiperglucemia [4].

Este hiperinsulinismo es el resultado adaptativo de las células- β maternas, a través de la hiperplasia, hipertrofia e hiperfunción (figura 6) [27-38].

En la siguiente figura se muestra un esquema realizado a partir de los resultados obtenidos por el equipo de Parsons, J.A. et al. (1992), realizado en ratas Sprague-Dawley; el cual muestra el comportamiento de las células- β durante la gestación y lactancia [4].

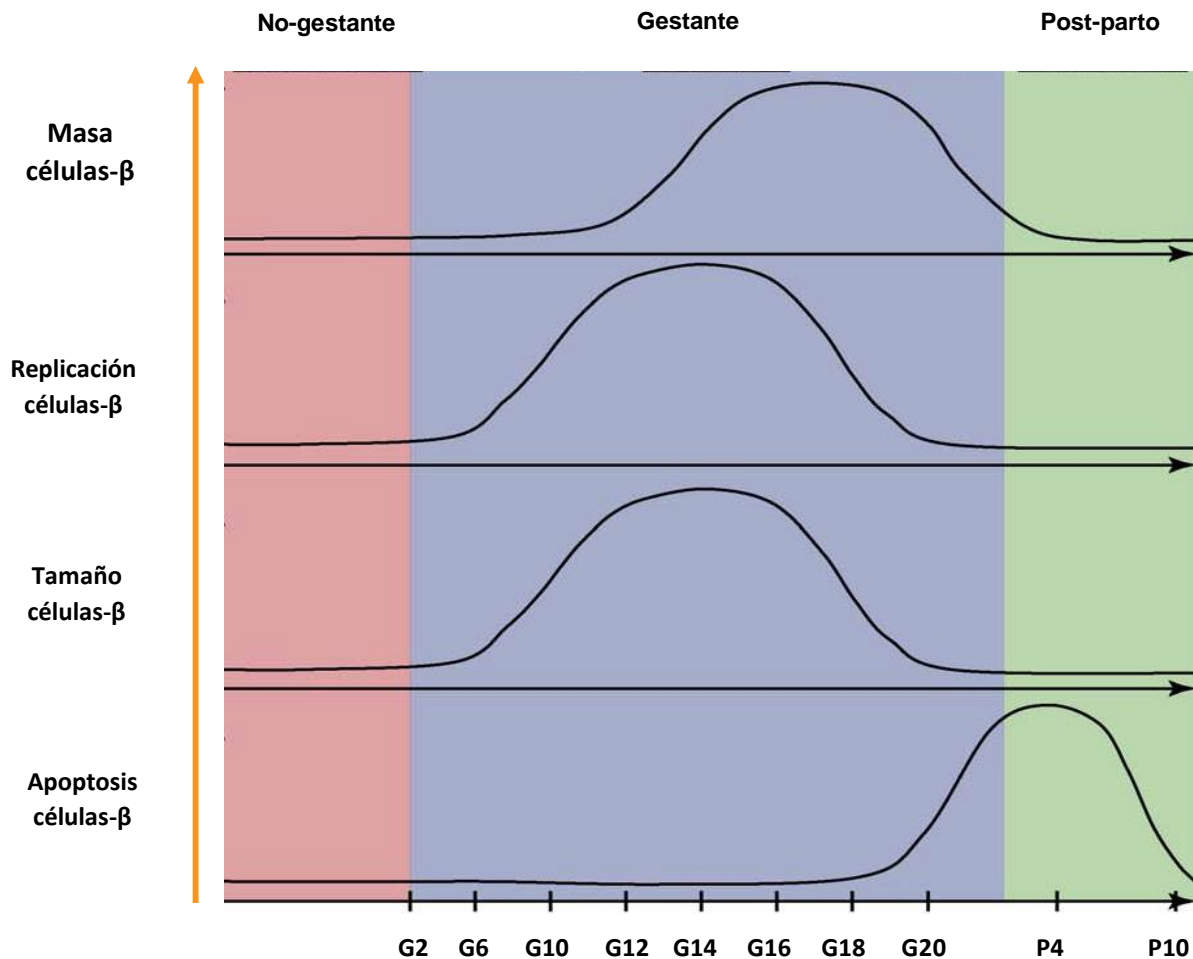


Figura 5. Cambio en la masa de las células- β durante la gestación y el post-parto. Durante la gestación existe un aumento en la replicación y el tamaño de las células- β que alcanzan su punto máximo al día 14 de gestación en roedores (G14). Al final de la gestación y durante la lactancia aumenta la apoptosis de las células- β lo que contribuye a la disminución en la masa de las células- β . Esquema propuesto a partir de los resultados de Parsons, J.A. et al. (1992) [4].

El crecimiento del islote pancreático materno y el cambio en su función está correlacionado también con el incremento en los niveles de lactógeno placentario, prolactina y hormona del crecimiento humana en el suero que estimulan la proliferación de células- β y reducen el umbral de glucosa. Otras de las hormonas que participan son: progesterona, estradiol, estrógenos, cuyos niveles varían con respecto al tiempo y se pueden ver esquematizados en la figura 7 [30, 39].

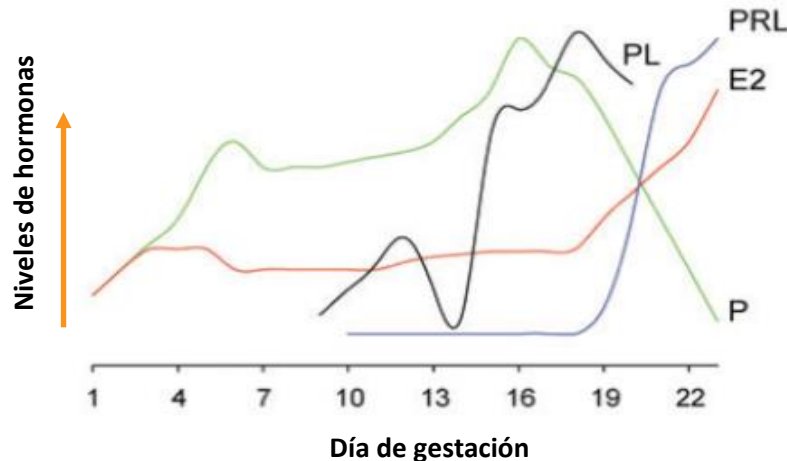


Figura 6. Esquema de los cambios hormonales durante la gestación en roedores. En los primeros días de gestación hay un incremento de 17β -estradiol (E2) y progesterona (P). A la mitad de la gestación aumenta el lactógeno placentario (PL). Durante los días finales de la gestación se incrementa prolactina (PRL), hay un segundo incremento de E2 y PL; y disminuye P [40].

La prolactina al igual que el lactógeno placentario, reconocen en común al receptor de prolactina (PRLP) expresado en los islotes; tras la unión de las hormonas con el receptor, envían una señal de transducción al páncreas, activando la vía de la Janus quinasa 2/ transductor de señales y activador transcripcional 5 (complejo proteico Jak2/Stat5); también se sabe que activan las vías PI3K/AKT, ERK1/2, Adenilciclase /AMPc y la proteincinasa/ calcio intracelular. A través de dichas vías de señalización se promueve la proliferación y la actividad antiapoptótica, interviniendo en la regulación de la masa de células- β [34, 39, 41-43].

El lactógeno placentario, es la primera hormona en ser secretada, y junto con prolactina llegan a su pico máximo el día 14 de gestación, permaneciendo elevadas

hasta el final de este periodo. El nivel de prolactina regresa a valores normales en presencia de concentraciones altas de lactógeno placentario. La masa de las células- β alcanza su pico máximo a la mitad de la gestación [44, 45].

1.4.1.1 Resistencia a la insulina

Como ya se mencionó anteriormente, la gestación está asociada a un incremento en la resistencia a insulina la cual se hace más marcada conforme el embarazo avanza. Esta resistencia es similar a la que ocurre en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2. La resistencia a la insulina se define como la inhabilidad de una concentración determinada de insulina de desencadenar una respuesta biológica frente al metabolismo de nutrimentos a nivel de tejidos diana referencia. Esto resulta en una disminución en el consumo de glucosa por parte del tejido muscular, tejido adiposo e hígado, de igual manera disminuye la supresión de la lipólisis y de la producción de glucosa endógena [46].

La sensibilidad a la insulina disminuye hasta un 50%, como resultado de alteraciones postreceptor que implica el transporte de glucosa y el metabolismo intracelular en los tejidos sensibles a la insulina [47, 48].

La producción de hormonas como estrógenos, progesterona, prolactina, lactógeno placentario, cortisol y hormona del crecimiento; inducen resistencia a la insulina según estudios in vivo e in vitro [49]. Existen también adipocitocinas que tienen una estrecha relación con la sensibilidad de la insulina. Una de ellas es la adiponectina, la cual es un mediador de la resistencia a la insulina y que durante la gestación se encuentra disminuida [48]. Por otra parte, el TNF- α , el cual es sintetizado y secretado tanto por placenta como el tejido adiposo, es un predictor significativo para la resistencia a la insulina. Al inicio de la gestación muestra una tendencia baja, pero en el tercer trimestre hay un aumento en sus niveles. Esta citosina inhibe la señalización de insulina en adipocitos, hepatocitos y en tejido muscular. Se propone que la TNF- α influye aún más en la acción de la insulina durante la gestación que las mismas hormonas placentarias [50].

En la tabla 7 aparecen algunas moléculas relacionadas con la resistencia a la insulina.

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

Tabla 7. Efectos de las algunas moléculas que modifican sus niveles durante la gestación [27-29].

1.4.1.2 Resistencia periférica a insulina durante el embarazo

A nivel de tejidos periféricos, la resistencia a la insulina afecta el metabolismo materno de la siguiente manera. En el hígado la gluconeogénesis aumenta en un 30%; al mismo tiempo la resistencia a la insulina en músculo limita su consumo de glucosa. En el tejido adiposo la lipólisis aumenta de manera dramática, siendo los ácidos grasos una alternativa de combustible para la madre y el glicerol un sustrato gluconeogénico para el hígado. El aumento en los niveles de lípidos en la sangre debido al incremento en la lipólisis, ocasiona también que los ácidos grasos viajen hacia el hígado donde son oxidados o empaquetados en partículas de VLDL. El alto

flujo de ácidos grasos en el hígado hace a la mujer embarazada propensa a una cetosis, probablemente como una respuesta adaptativa para preservar proteínas para el final de la gestación, ya que los ácidos grasos continúan siendo la fuente principal de combustible [51].

1.4.2 Lactancia

La lactancia es esencial para la sobrevivencia de los mamíferos, este periodo es el resultado de una alta demanda de energía asociado con el proceso de síntesis de leche [52].

Tanto la gestación como lactancia generan múltiples cambios fisiológicos y metabólicos en el organismo materno; la duración de la gestación (18 días) es relativamente corta en comparación a la duración de la lactancia. La lactación induce la movilización de las reservas energéticas de la madre y un aumento en la ingesta de alimentos, dependiendo del tamaño de la camada; para favorecer la producción de leche en la glándula mamaria. En contraste con la gestación, que induce un aumento en el almacenamiento de grasa y modera el consumo de alimento [53, 54].

En un estudio desarrollado en tres cepas diferentes de ratones, se examinó su comportamiento durante la lactación, evaluando parámetros tales como: la cantidad de tiempo que dura la lactación y la ingesta de alimento. Dentro de los resultados obtenidos se encontró que los datos arrojados por la cepa C57BL/6 son más marcados; si bien es cierto que hay un aumento en la ingesta de nutrimentos de forma general, es en esta cepa donde el incremento es bastante notable, así como la ganancia de peso [55].

Durante la transición entre la etapa de gestación y lactancia, acontecen también cambios de renovación en las células- β . El páncreas materno regresa a las condiciones normales no-gestante, justo después de haber dado a luz a sus crías [56, 57]. También hay una reversión rápida de la resistencia a la insulina, este hecho

es atribuido a la disminución de los niveles de TNF- α , posteriormente a la expulsión de la placenta [50].

La pérdida de masa de células- β no se debe a un proceso autoinmune, se especula que son hormonas las que participan en la remodelación del islote. Ciertas investigaciones reportan que los glucocorticoides podrían tener una participación importante en las modificaciones del islote después del parto [58].

Los glucocorticoides reajustan el páncreas endocrino durante los primeros días de la lactación, a través de contrarrestar las acciones de prolactina y lactógeno placentario. Modifican los mecanismos de proliferación, favorecen la apoptosis que contribuye a la involución del islote en el periodo de post-parto. Se desconocen los detalles involucrados con este mecanismo [59].

Diversas investigaciones reportan la importancia de la lactancia en mejorar la homeostasis de la glucosa y proteger ante el desarrollo de Diabetes Mellitus 2. En un estudio analizando la incidencia de diabetes tipo 2 en un cohorte de mujeres entre 40–78 años, se encontró que aquellas que amamantaron a sus hijos al menos un mes presentaron menos índice de diabetes que aquellas que no pasaron por un periodo de lactancia [60, 61]. Un efecto protector similar se ha encontrado en la incidencia de infarto al miocardio, la prevalencia del síndrome metabólico, hipertensión, e hiperlipidemias [62]. La lactancia revierte más rápida y eficientemente la acumulación de grasa visceral, los niveles elevados de lípidos sanguíneos y la resistencia a la insulina que se presenta durante la gestación [61].

2. Planteamiento del problema

Durante la gestación los requerimientos de energía del feto provocan cambios en el metabolismo materno que permiten la expansión de la masa de células- β y aumento en la secreción de insulina. En el periodo de lactancia; se reduce la proliferación de células- β y aumenta la apoptosis celular lo que reduce la masa de dichas célula. A pesar de dicha información, se desconoce si el islote regresa al tamaño original de las hembras que no han sido gestantes o que no dieron de lactar, o si esos procesos tienen como consecuencia un aumento de la masa de los islotes, los cuales repercuten en alteraciones metabólicas tales como resistencia a la insulina, que puede considerarse, como factor de riesgo para el desarrollo de patologías más graves como diabetes mellitus.

3. Justificación

Diversas investigaciones reportan la importancia de la lactancia en mejorar la homeostasis de la glucosa y protección del desarrollo de Diabetes Mellitus 2. Como se señaló anteriormente, durante la gestación y la lactancia suceden cambios en la masa del islote pancreático; sin embargo se desconoce si el islote regresa a su tamaño normal no-gestante al terminar la lactancia o bien si los islotes pancreáticos adquieren mayor masa de células- β como consecuencia de estos procesos de reproducción. Los resultados que se obtengan, ayudarán a la comprensión de como la lactancia podría estar involucrada en el proceso de recuperación de insulino resistencia y por ende coadyuvaría en la protección en el desarrollo de Diabetes Mellitus tipo 2.

4. Objetivos

4.2 Objetivo general

Caracterizar los cambios morfométricos por los que atraviesan los islotes pancreáticos maternos durante la gestación y lactancia.

4.3 Objetivos particulares

Analizar durante la gestación y lactancia, los cambios maternos que se producen sobre:

- 1.- La morfología y viabilidad de los islotes de Langerhans.
- 2.- La respuesta insulínica en estados de ayuno y post-prandio.
- 3.- El manejo de la glucemia en estados de ayuno y post-prandio.
- 4.- Estados de insensibilidad y resistencia a insulina, en respuesta a la función beta pancreática.

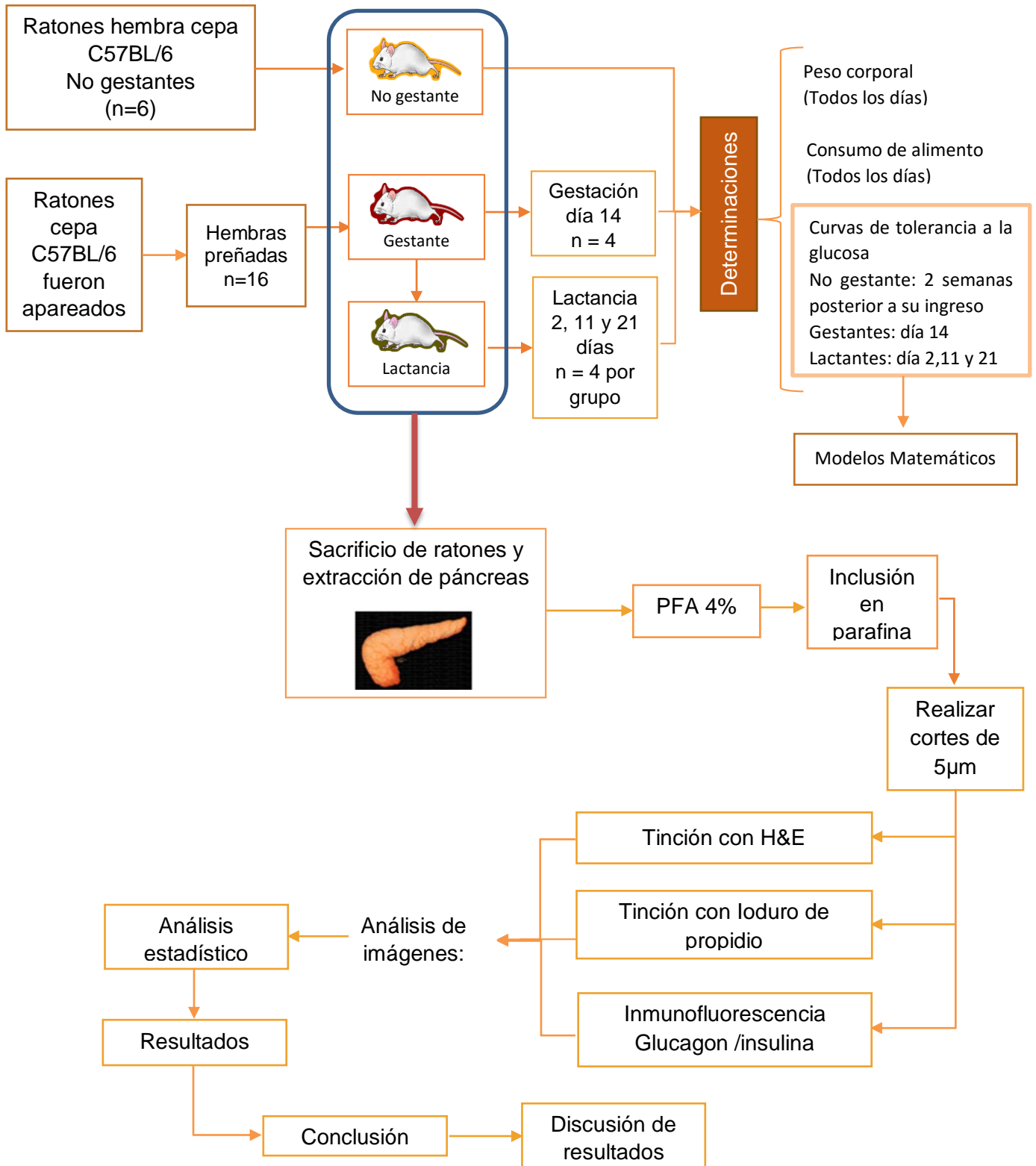
5. Hipótesis nula

La gestación y lactancia no propician cambios morfológicos y funcionales de los islotes de Langerhans.

Hipótesis alternativa

La gestación y lactancia propician cambios morfológicos y funcionales de los islotes de Langerhans.

6. Diagrama de trabajo



7. Metodología

7.2 Modelo animal

Ratones de la cepa C57BL/6 de 7-8 semanas (Harlan Laboratories S.A. de C.V.); se mantuvieron en las instalaciones de la sede antigua de Biomédicas, con un ciclo de 12 horas luz 12 horas oscuridad, con libre acceso a comida y agua. Se mantuvieron las hembras y machos en cajas separadas.

La primera semana de estancia fue para que los animales se adaptarán al ambiente; la siguiente semana se colocaron las cajas de hembras y machos intercaladas con el objetivo de estimular el estro en la hembra a través de las feromonas masculinas que se encuentran en la orina. Los ratones hembra no requieren contacto directo con la orina ya que dicha sustancia al ser volátil la absorben a través de su sistema olfativo, afectando los procesos hormonales de las hembras que controlan su estado reproductivo.

Una semana posterior, 16 animales fueron apareados; por cada caja de bioterio se colocaron dos ratones, una hembra y un macho de la misma cepa. Las hembras fueron monitoreadas hasta la aparición del tapón vaginal, el cual está constituido por las secreciones de las glándulas accesorias del macho, principalmente las glándulas coagulantes. Este tapón distiende la vagina pudiéndose asomar por la vulva hasta 24 horas posteriores al apareamiento.

Considerando esta fecha como el día 0 de gestación. Las hembras preñadas se reubicaron en una caja de manera individual; fueron alimentadas con la dieta posteriormente mencionada y agua ad libitum. A partir de estos animales preñados, se formaron dos grupos, gestantes (día 14) y lactantes (día 2, 11 y 21). Los 6 animales restantes, conformaron el grupo de no gestantes (Figura 8).

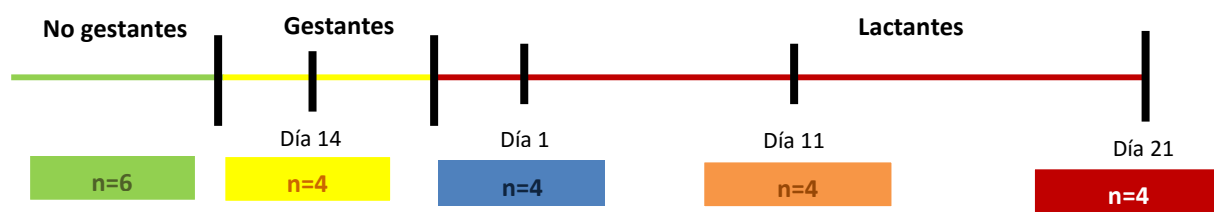


Figura 8. Esquema de distribución de animales por grupo.

Durante el periodo de experimentación, los grupos de gestantes y lactantes fueron monitoreados en cuanto a su peso corporal y consumo de alimento; se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa. Al término de los días 14 (gestantes); 2, 11 y 21 (lactantes), las madres se sacrificaron previa anestesia con Sevofluorane; se extrajeron los páncreas dejándolos por 48 horas en paraformaldehído, posteriormente se procesaron para efectuar los estudios de histología e inmunohistoquímica.

Todos los procedimientos se llevaran a cabo de acuerdo con el Reglamento para el Cuidado y Manejo de los Animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

7.3 Dieta

Los ratones hembra fueron alimentados con una dieta que contiene los requerimientos necesarios, mencionados en la tabla 9 (2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Diet Harlan Laboratories S.A. de C.V.).

Macronutrientes	
Proteína cruda	18.6 %
Grasa (extracto Eter)	6.2%
Carbohidratos (disponibles)	44.2%
Fibra cruda	3.5%
Fibra detergente neutra	14.7%
Ceniza	5.3%
Densidad de energía	3.1 kcal/g
Calorías de proteína	24%
Calorías de grasa	18%
Calorías de carbohidratos	58%

Tabla 9. Ingredientes de la dieta Teklad Global 18% Protein Rodent.

7.4 Curvas de tolerancia a la glucosa

Para la curva de tolerancia a la glucosa, los ratones se sometieron a un ayuno de 14-16h antes de la prueba. A cada ratón se le administró glucosa (2g/kg peso corporal) por vía intraperitoneal; la glucosa en la sangre se cuantificó antes de la administración de esta, así como a los minutos 15, 30, 60, y 120 después de la administración. Para tomar la muestra de sangre, se hizo un pequeño corte en la punta de la cola del ratón. La glucosa en sangre fue cuantificada con el kit de glucosa oxidasa peroxidasa (Precision QID, MediSense, Inc., Abbott Laboratories Company).

7.5 Inclusión y cortes histológicos

Una vez extraídos los tejidos (páncreas), se fijaron en paraformaldehído al 4% por 48 horas, de esta manera se detiene la autólisis y putrefacción de nuestro tejido, conservando la estructura y composición lo más similar a la original. Posterior a estas 48 horas, se cambió el tejido a PBS al 1X, evitando así, que los tejidos se endurezcan demasiado o que ciertos componentes del fijador introduzcan modificaciones en los tejidos e impidan una adecuada obtención de secciones delgadas o la coloración correcta de sus componentes celulares.

Una vez finalizado el proceso de fijación, continuamos con la inclusión en parafina. Para esta etapa se realizó primero la deshidratación del tejido, ya que al ser hidrófoba la parafina no puede penetrar las estructuras del páncreas, las cuales tienen formol. Tanto la deshidratación como la inclusión se realizaron en el Histoquinete; para el primer proceso se realizaron diferentes baños con diferentes soluciones de etanol en concentraciones crecientes, cada lavado se realizó por una hora. Los dos primeros lavados se realizaron en etanol al 60%; los siguientes dos en etanol al 70%; dos lavados en etanol al 96%, y por último uno en etanol al 100%. A continuación se realizó el aclaramiento, con un lavado de etanol – xilol, y dos con xilol, por una hora cada uno. Esta sustancia es miscible tanto con alcohol como con el medio de inclusión a utilizar, en este caso parafina. Por último se realizó la inclusión, este es un método común para endurecer el tejido, consiste en colocar el

tejido en una base de metal y orientarlo en la dirección deseada, se rellena con parafina, colocando en la parte superior una parte del cassette; por último se coloca sobre una placa fría a 4°C para que solidifique el bloque. Con esto se consigue obtener cortes del orden de μm sin que el tejido se rompa o se deteriore. Además preserva las muestras durante largos periodos de tiempo.

Se realizaron cortes de 5 μm en micrótomo y se colocaron en laminillas pretratadas con polilisina. Posteriormente los cortes se desparafinaron, rehidrataron y fueron designados para las diferentes tinciones propuestas.

La desparafinación se realizó con dos lavados de xilol por 3 minutos, este agente aclarante facilita la salida de la parafina y permite al mismo tiempo la penetración del alcohol. La rehidratación se realizó con diferentes lavados de alcohol en concentraciones decrecientes todos por 4 minutos, iniciando con etanol al 100%, 95%, 70%, y 50%; el alcohol remueve el xilol que aún se encuentra en el tejido, es importante realizar la hidratación ya que la mayoría de los colorantes son de base acuosa. Por último se hace un lavado con PBS 1X el cual tiene una osmolaridad y concentración de iones muy similar a la del líquido extracelular.

7.6 Tinción hematoxilina-eosina

Para el estudio histológico, se tiñeron laminillas con Hematoxilina – Eosina, la técnica empleada fue la de Harris. La tinción se inició con la desparafinación de las laminillas; posteriormente se tiñó con hematoxilina, este colorante tiene una afinidad por las estructuras con cargas negativas, como lo es el núcleo y ribosomas. Se prosiguió con lavados en agua, y en seguida con carbonato de litio se realizó el viraje de la hematoxilina. A continuación se tiñó con eosina, al ser un colorante aniónico tiñó estructuras básicas como el citoplasma. Para finalizar se enjuagaron las laminillas en agua y se procedió a deshidratar los cortes. Se colocó resina sobre los tejidos para posteriormente cubrir con el cubreobjetos.

7.6.1 Análisis de islotes pancreáticos

Las imágenes de los islotes pancreáticos se observaron con el microscopio compuesto Leica DM 2500 (Leica, Switzerland) acoplado a una lámpara digital Leica

DFC 290 HD, adquiriendo a través de ella las imágenes en la escala de 20x. Se observaron 4 laminillas de cada grupo.

Con las imágenes fotografiadas se procedió al análisis en el programa de **Image J 1.40** (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

Con este programa se cuantificó:

- Área de islote
- Número de células

Se consideró como islote aquella figura que tuviese una forma circular u ovalada, cuyo citoplasma fuese rosa y núcleos púrpura, descartando islotes rotos o menores a 4 células [63].

7.7 Inmunofluorescencia

Tras la desparafinación y rehidratación, se llevó a cabo la recuperación del antígeno, mediante un baño de buffer de citrato, cuya función es romper los enlaces entre las proteínas y la formaleína. Posteriormente se permeabiliza la membrana con buffer de perforación, el cual contiene el 0.3% Triton X-100 (Calbiochem, Darmstadt, Germany), este se encarga de solubilizar las proteínas presentes en la membrana celular; tras una incubación se agregaron los anticuerpos primarios específicos para Insulina (1:150, Sigma) y Glucagón (1:4500, Sigma). Las laminillas se incubaron toda la noche, en una cámara húmeda para evitar que se secan. Al día siguiente se realizaron lavados con suero normal de cabra al 1% (NGS 1%, Microlab, Aguascalientes, México), a fin de bloquear sitios probables de unión inespecífica que pudo generarse con el anticuerpo primario. A continuación se agregan los anticuerpos secundarios, estos deben ser añadidos en un lugar oscuro, con la menor cantidad posible de luz, ya que al estar unidos al fluorocromo, pueden perder su fluorescencia; también se debe tener especial cuidado que en la información que viene en los anticuerpos secundarios especifique contra que especies reacciona, para tener la certeza que puedan reconocer a los anticuerpos primarios. Se emplearon anticuerpos secundarios acoplados a FITC (1:200, Jackson) y Cy3 (1:800, Jackson). Por último se tiñeron los núcleos con DAPI (DAPI Sigma).

Finalmente se agregó medio de montaje para fluorescencia (Dako) sobre la laminilla, colocando por último el cubreobjeto y sellando las laminillas con barniz.

7.7.1 Análisis de área de células α y β

Las imágenes de los islotes pancreáticos se observaron con un sistema de microscopía de campo amplio Axioskop 2 plus (Zeiss, Thornwood, NY) acoplado a una lámpara de fluorescencia de mercurio (FluoArc), las imágenes se adquirieron con una cámara AxioCam Rm. Se observaron 4 laminillas de cada ratón, de cada grupo. Por cada islote, tomamos tres fotos, una perteneciente a insulina (células- β), otra a glucagón (células- α) y otra a DAPI.

Con las imágenes fotografiadas se procedió al análisis en el programa de **Image J 1.40** (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

Con este programa se cuantificó:

- Porcentaje de células- α
- Porcentaje de células- β
- Número de núcleos en área α
- Número de núcleos en área β
- Contenido de insulina en islotes pancreáticos

Consideramos a un islote aquel grupo de 4 o más células [63].

7.7.2 Análisis de tejidos pancreáticos

En cuanto la imagen del tejido se observaron utilizando un microscopio Olympus 1X70 (Tokyo, Japón) acoplado a una lámpara de halógeno y se adquirieron las imágenes del corte con una cámara Hammamatsu (Hammamatsu City, Japan) los parámetros de configuración fueron similares para todas las laminillas.

Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa de **Image J 1.40** (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

Cuantificando:

- Área de tejido

7.8 Viabilidad celular

Los islotes son agregados de células, las cuales pueden ser viables o no; dicha condición es evaluada a través de la tinción con ioduro de propidio. El objetivo de este análisis es cuantificar el porcentaje de células viables dentro de un islote [64].

Está basado en el principio de que las células apoptóticas son caracterizadas por presentar DNA fragmentado y, consecuentemente, la pérdida del contenido nuclear. El ioduro de propidio (PI) es un fluorocromo que tiene la capacidad de unirse a la doble cadena de DNA y obtener una evaluación rápida y precisa del contenido celular del DNA. El PI no puede atravesar la membrana plasmática intacta, solo atraviesa aquella que es permeable o que este comprometida. Se intercala entre las pares de bases que tengan poca o nada de secuencia. Al observarse en microscopio emite una fluorescencia roja, que nos indica muerte celular; su excitación máxima es de 535nm y la emisión de 617nm [65].

Partimos de la desparafinación y rehidratación de las laminillas, y se procedió de la misma manera tal como en la inmunofluorescencia; recuperación del antígeno, se dibujó la zona hidrófoba alrededor del tejido; permeabilización con buffer de perforación, y la incubación del anticuerpo primario, en este caso solo se empleó el anticuerpo de Insulina (1:150, Sigma). Las laminillas se incubaron a 4°C por toda la noche, en una cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron lavados con suero normal de cabra al 1% (Microlab, Aguascalientes, México), y se incubó por 1 hora el anticuerpo secundario FITC (1:200, Jackson), se lavaron las laminillas con PBS 1X. Posteriormente los núcleos se tiñeron con DAPI (DAPI Sigma) y enseguida se agregó el PI (Vectashield) que se encontraba en medio de montaje, por último se cubrieron con el cubreobjetos y se sellaron las laminillas con barniz.

7.8.1 Análisis de viabilidad

Las imágenes de viabilidad celular se observaron con un sistema de microscopía de campo amplio Axioskop 2 plus (Zeiss, Thornwood, NY) acoplado a una lámpara de fluorescencia de mercurio (FluoArc), las imágenes se adquirieron con una cámara AxioCam Rm. Se observaron 4 laminillas de cada ratón, de cada grupo.

Capturando por cada islote tres fotos, una perteneciente a insulina (células- β), otra a yoduro de propidio y otra a DAPI.

Con las imágenes fotografiadas se procedió al análisis en el programa de **Image J 1.40** (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

Con este programa se cuantificó:

- Número de núcleos teñidos con DAPI
- Número de núcleos teñidos con PI

7.9 Análisis estadístico

Los datos representan la media \pm ES. **n** es el número de muestras o sujetos evaluados. El análisis estadístico se realizó utilizando del software GraphPadPrism (AbacusConcepts, Berkeley, CA, USA). Los datos se analizaron por medio de una prueba de ANOVA. Los valores de *p* menores a 0.05 son considerados como estadísticamente significativos.

8. Resultados

Peso corporal y fagia

A lo largo del experimento se realizó un registro del peso y consumo de alimento de los animales en los diferentes grupos anteriormente mencionados. El grupo NG (no gestante) fue el control, con respecto a este grupo se compararon los restantes para conocer si la diferencia existente entre ellos era estadísticamente significativa.

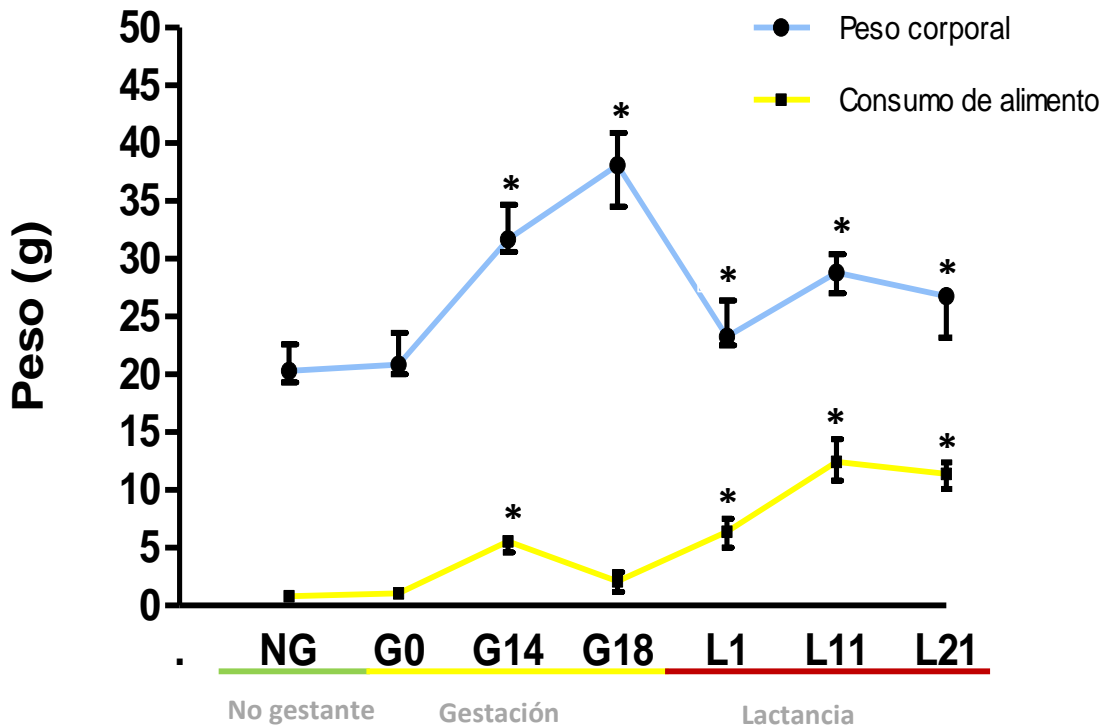
La gráfica siguiente muestra los resultados obtenidos durante una etapa normal (no gestante), al inicio de la gestación (G0), pico máximo (G14) y al final de esta (G18); y durante la lactancia, al inicio (L1), mitad (L11) y final (L21).

Los animales no gestantes tuvieron un peso entre 20 y 21g y su consumo de alimento llegó a ser de 1g por día.

Al día 14 de gestación tanto en el peso como en el consumo de alimento hubo un incremento estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$). El peso fue de 31.7 y el consumo llegó a ser de 5g por día, dicha cantidad de alimento fue la máxima consumida durante la gestación por las hembras, esto es atribuido al aumento de la demanda energética por parte de los fetos.

Al día 18 de gestación los animales continúan con un incremento estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) únicamente en el peso corporal, en este día los animales llegan a pesar 38.1g, siendo casi el doble del peso de un no gestante.

Durante la lactancia la diferencia en el peso y el consumo de alimento de los animales es significativa; tras haber parido, el animal pierde peso, llegando a tener medidas similares a un no gestante. Al día 11 el peso del animal aumenta a 28.8g, así como su ingesta de alimento la cual es de hasta 12g por día; al final de la lactancia día 21, el animal pierde entre 1 y 2g de peso y su consumo de alimento comienza a disminuir. A partir de lo anterior, podemos pensar que durante la lactancia hay una mayor demanda de energía por parte del organismo de la madre, por lo cual requiere una mayor ingesta de alimento, esto no significa que su peso será similar al que presentan durante la gestación.



Gráfica 10. **Peso corporal y consumo de alimento en gramos.** Gráfico azul representa el peso corporal; gráfico amarillo pertenece al consumo de alimento. Ambos aspectos se monitorearon todos los días por la mañana. Los datos representan la media \pm ES. * $p < 0.05$ comparado con el control, no gestante.

Curva de tolerancia a la glucosa

Para poder conocer la glucemia en estado de ayuno y post-prandio se realizaron curvas de glucosa. En la siguiente gráfica se muestran los resultados obtenidos tras la administración de glucosa a los minutos 15, 30, 60 y 120 en animales no gestantes (NG), gestantes (día 14) y lactantes (día 1, 11 y 21).

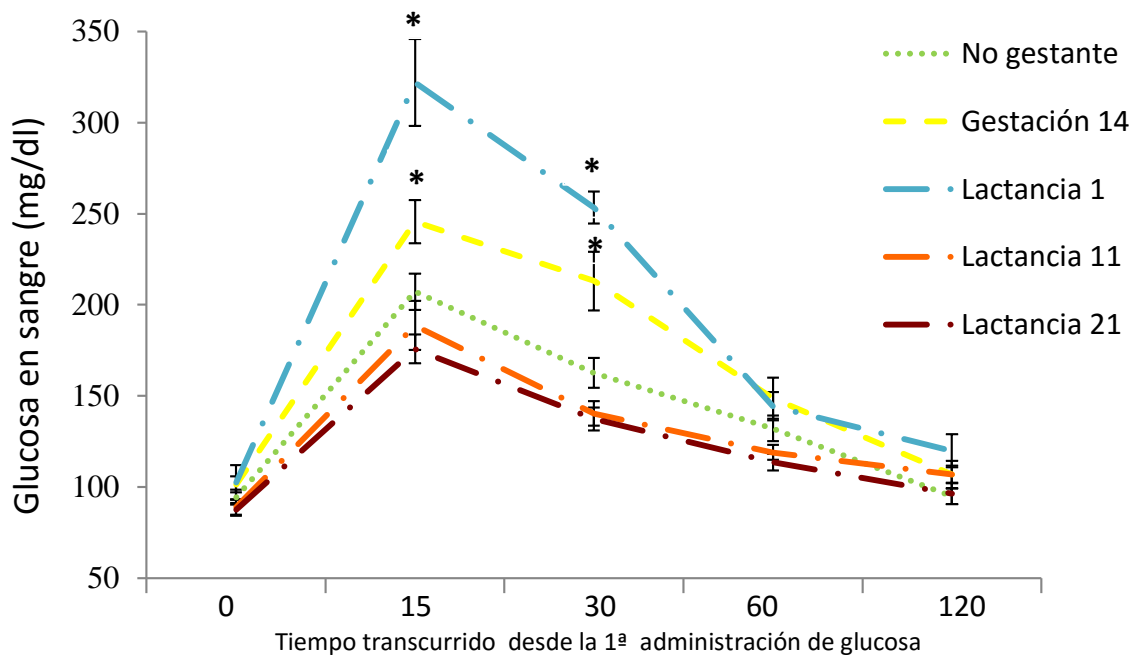
La curva perteneciente a los no gestantes presenta un comportamiento normal, su concentración inicial es de 94 mg/dl; al minuto 15 muestra la máxima concentración que es de 207.1 mg/dl; al minuto 30 empieza a disminuir por efecto de la insulina a una concentración de 162.6 mg/dl; al minuto 60 la concentración es de 132.11 mg/dl y al 120 la concentración vuelve a ser similar a la del tiempo 0.

La curva de los gestantes al día 14 presenta en general un aumento en la concentración a los diferentes tiempos. La concentración inicial de glucosa aumenta

un 7% en comparación a los valores de un animal no gestante; al minuto 15 la concentración aumenta un 18% manteniéndose hasta el minuto 30 como consecuencia de la resistencia a la insulina presente en esta etapa, a partir del minuto 60 la concentración de glucosa empieza a descender llegando a tener una concentración promedio de 107mg/dl.

Al día 1 de lactancia los animales registran las mayores concentraciones de glucosa; al minuto 0 la concentración está elevada un 8%, al minuto 15 y 30 se puede apreciar el máximo incremento, la concentración en ambos tiempos se eleva hasta un 55%, al igual que en el grupo gestante a partir del minuto 60 la concentración de glucosa empieza a disminuir.

Al día 11 y 21 los animales empiezan a tener concentraciones similares a las que tienen los animales no gestantes.

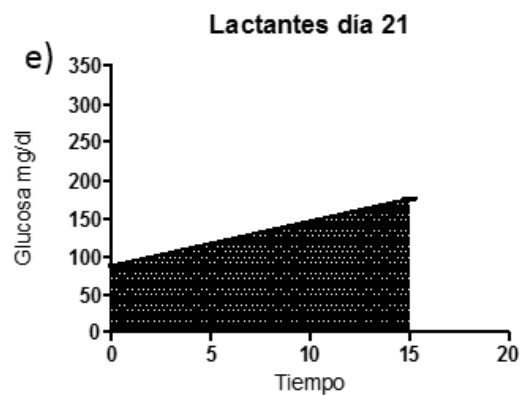
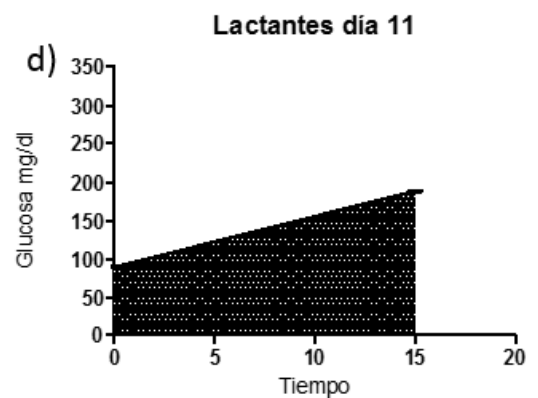
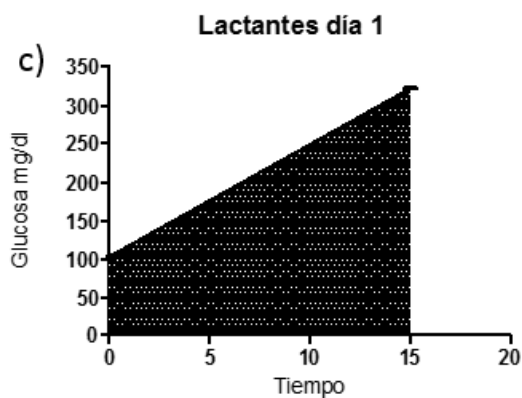
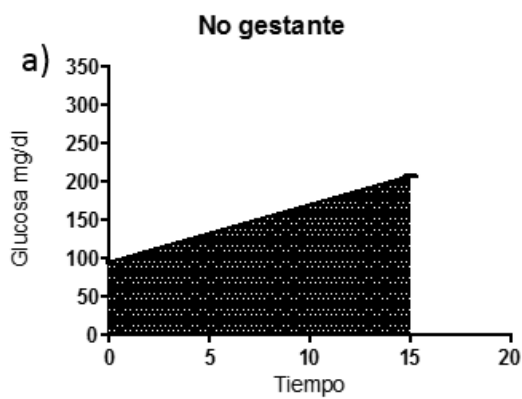


Gráfica 11. **Curva de glucosa.** Grafica verde corresponde al grupo control, no gestante. Gráfica amarilla corresponde al grupo gestación al día 14. Gráfica azul pertenece al grupo de lactancia día 1. Gráfica naranja pertenece al grupo de lactantes al día 11. Gráfica guinda corresponde al grupo de lactancia día 21. Las mediciones se realizaron tiempo 0, a los 15, 30, 60 y 120 minutos. Los datos representan la media ± ES. *p<0.05 comparado con el control, no gestante.

Área bajo la curva

A través de la determinación del área bajo la curva se logró conocer el comportamiento tanto de los tejidos insulino dependientes como de no dependientes, este tipo de análisis permite inferir e identificar la pérdida de sensibilidad y resistencia a insulina, respecto de la velocidad de absorción de glucosa por los tejidos.

Tejido no dependiente de insulina



f)

	No gestantes	Gestantes día 14	Lactantes día 1	Lactantes día 11	Lactantes día 21
AUC	2262	2602	3184	2083	1975

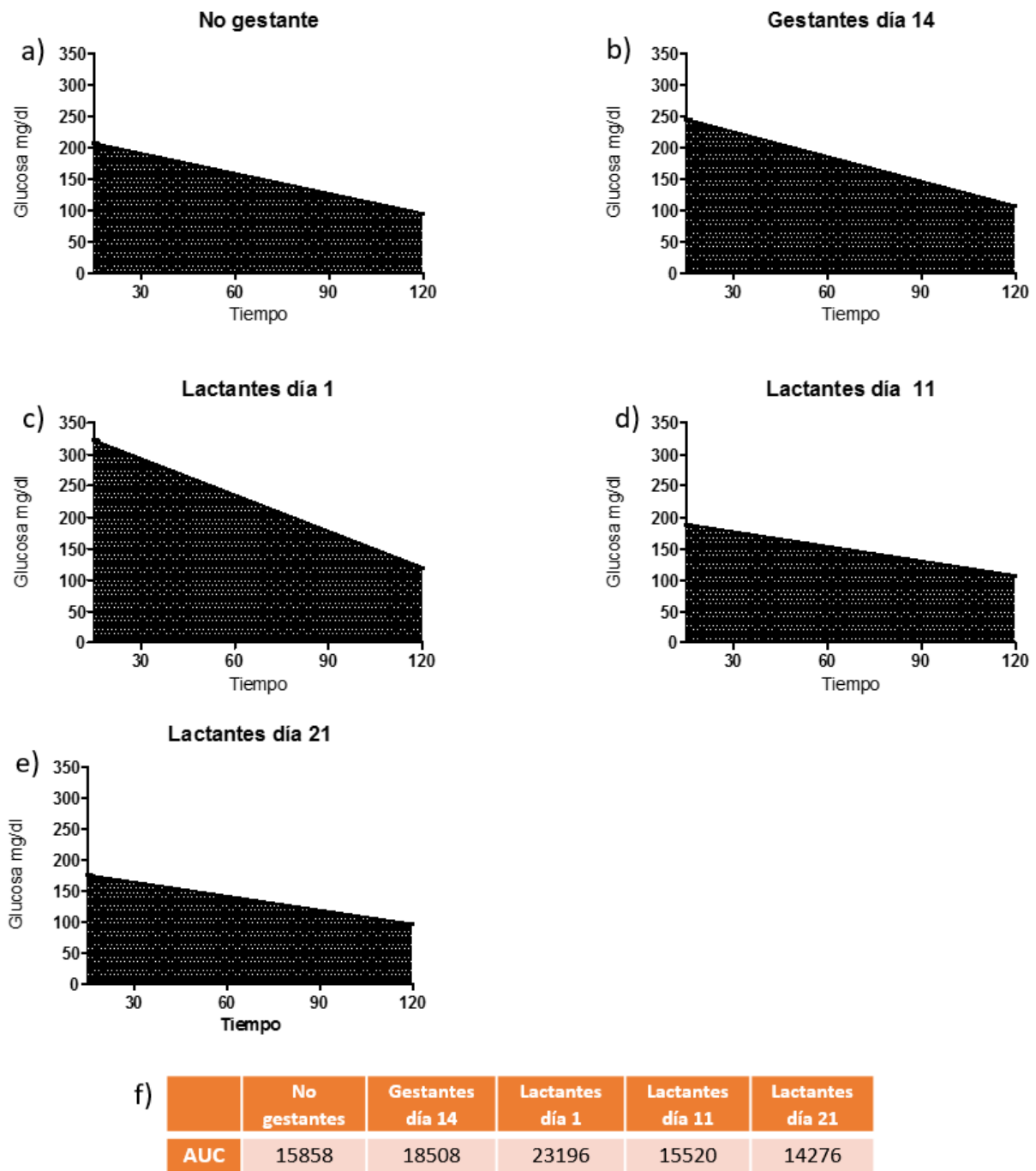
Gráfica 12. **Área bajo la curva de tejidos no dependientes de insulina.** a) Glucosa AUC no gestantes. b) Glucosa AUC gestantes día 14. c) Glucosa AUC lactantes día 1. d) Glucosa AUC lactantes día 11. e) Glucosa AUC lactantes día 21. f) Tabla del área bajo la curva de cada grupo. Cada una de las curvas se obtuvo en el programa GraphPad Prism 5.

La primera área bajo la curva (a) corresponde al grupo de ratones no gestantes; donde podemos observar el comportamiento normal en tejidos no dependientes de insulina. Este tipo de determinantes matemáticas puede ser calculada mediante la integral definida de **a** hasta **b** de $f(x) dx$, ya que f es una función continua, positiva y la región R está limitada por los puntos **a** y **b**.

El área de los animales control correspondió a un valor de 2262. La siguiente área bajo la curva (b) corresponde al grupo gestante al día 14, donde se observa un cambio en la pendiente, por lo que se puede suponer un cambio en el área bajo la curva, el cual correspondió a un incremento del 15% respecto del control. Esto sugiere un descenso en la velocidad de recaptura por los tejidos no dependientes, la cual es característica de la presencia de resistencia insulina. En el primer día de lactancia (c), el área bajo la curva incremento a un valor de 3184, es decir 41%. Sin embargo, a partir del día 11 (d) comienza a disminuir el área bajo la curva (2083), lo que indica que hay un mejor metabolismo de la glucosa, asociado al requerimiento de los lactantes. Finalmente, el grupo lactante de 21 días presentó un área bajo la curva de 1975, confirmando el comportamiento del grupo lactante a largo plazo.

Área bajo la curva

Tejidos dependientes de insulina



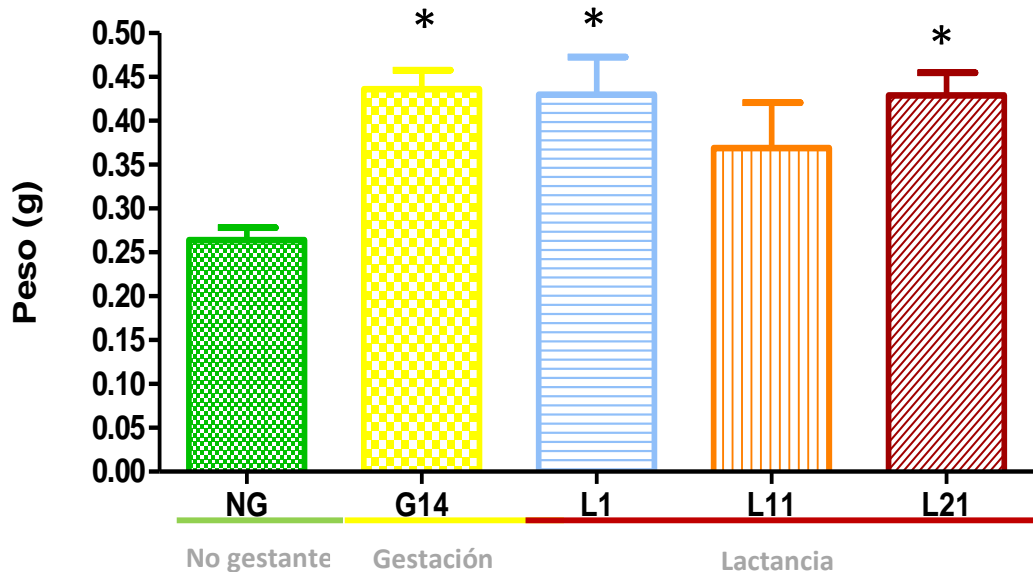
Gráfica 13. Tejidos dependientes de insulina. a) Glucosa AUC no gestantes. b) Glucosa AUC gestantes día 14. c) Glucosa AUC lactantes día 1. d) Glucosa AUC lactantes día 11. e) Glucosa AUC lactantes día 21. f) Tabla del área bajo la curva de cada grupo. Cada una de las curvas se obtuvo en el programa GraphPad Prism 5.

La primera gráfica (a) representa el comportamiento normal de los tejidos dependientes de insulina del grupo control, donde el área bajo la curva corresponde al valor de 15858. En el día 14 de gestación (b) hay un cambio en la pendiente implicando un cambio en el área donde ocurrió un incremento del 16%; lo anterior sugiere una disminución en la velocidad de captura por los tejidos dependientes. En la siguiente gráfica (c) tenemos los valores de lactancia al día 1 donde hubo un incremento del área bajo la curva del 46% correspondiente a un valor de 23196. A partir del día 11 (d) el área bajo la curva comienza a disminuir (15520), lo que indica que hay una mejor respuesta por parte de los tejidos hacia la glucosa, como resultado de la lactancia. La última gráfica (e) corresponde al grupo lactante de 21 días, donde se aprecia un cambio en la pendiente lo cual implica un cambio en el área bajo la curva, cuyo valor es de 14276.

Peso de páncreas

El peso del páncreas en un animal normal, no gestante, es de 0.26 g. Al día 14 de gestación hay un aumento significativo ($p \leq 0.05$), el peso incrementa un 65% con respecto de lo normal. Durante la lactancia al día 1 y 21, también existe un aumento significativo ($p \leq 0.05$), ambos grupos tienen un incremento del 62% con respecto de nuestro grupo control, no gestante. Si bien el grupo de lactancia al día 11 no presenta diferencia significativa respecto al control, tampoco lo hace con respecto a los grupos de lactancia al día 1 y 11.

El aumento de peso del páncreas está relacionado tanto con la proliferación de células del islote de Langerhans como de las células acinares, principalmente con estas últimas ya que el páncreas exocrino representa un 98% del volumen total; durante la gestación y lactancia, la vascularización se ve modificada por las diferentes necesidades del organismo.



Gráfica 14. **Peso de páncreas**, el gráfico en verde corresponde al grupo no gestante; gráfico amarillo corresponde al grupo de gestación al día 14; gráfico azul pertenece al grupo de lactantes al día 1; gráfico naranja pertenece al grupo de lactantes al día 11; gráfico guinda corresponde al grupo de lactancia día 21. Los datos representan la media \pm ES. * $p < 0.05$ comparado con el control, no gestante.

Valoración anatomopatológica por tinción de H&E

Como se pudo observar en la gráfica anterior, el peso del tejido total cambio como consecuencia de las modificaciones en el páncreas exocrino y endocrino; nuestro trabajo está enfocado a los cambios acontecidos en los islotes de Langerhans, por tal motivo se decidió realizar una valoración anatomopatológica por tinción de hematoxilina-eosina.

En la tinción de los cortes histológicos, observamos que el citoplasma de las células acinares tiene una coloración rosa intensa, debido al carácter eosinófilo conferido por la presencia de RER, dicha eosinofilia disminuye desde la zona central hasta la parte apical; en la periferia las células son menos eosinófilas y por ende su coloración tiene una tonalidad más tenue. En cuanto a los islotes de Langerhans, son estructuras circulares u ovaladas, se encuentran delimitados por las células acinares; su citoplasma tiene una tinción más pálida comparada con la del tejido exocrino. Los núcleos de las células son púrpura por la tinción de la hematoxilina, la cual tiñe estructuras ácidas (figura 15).

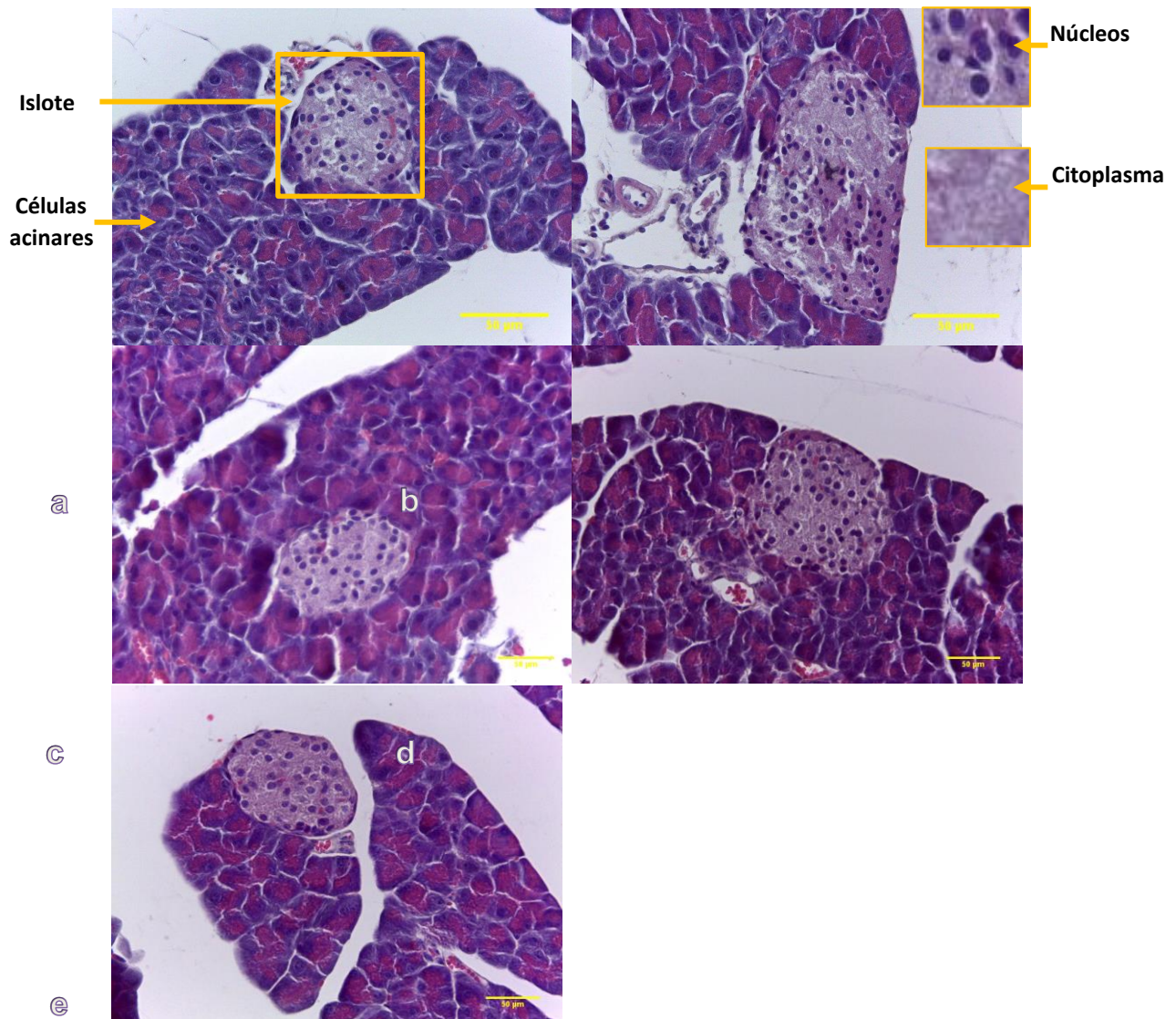


Figura 15. **Anatomopatología de páncreas.** a) islote del grupo no gestante, la flecha amarilla señala a las células acinares, mientras que en el cuadro amarillo se encuentra el islote pancreático; n=200 islotes. b) islote del grupo gestación día 14, el cuadro superior derecho muestra núcleos de las células que conforman al islote; el segundo cuadro es un acercamiento del citoplasma del islote; n=200 islotes. c) islote del grupo lactancia día 1; n=200 islotes. d) islote del grupo lactancia día 11; n=200 islotes. e) islote del grupo lactancia día 21; n=200 islotes. Todas las imágenes fueron observadas a 20x, teñidas con H&E. Barra de escala 50 μ .

Tamaño promedio de islotes

Dentro del análisis que se realizó con respecto a los tamaños de los islotes pancreáticos, se obtuvieron los siguientes resultados.

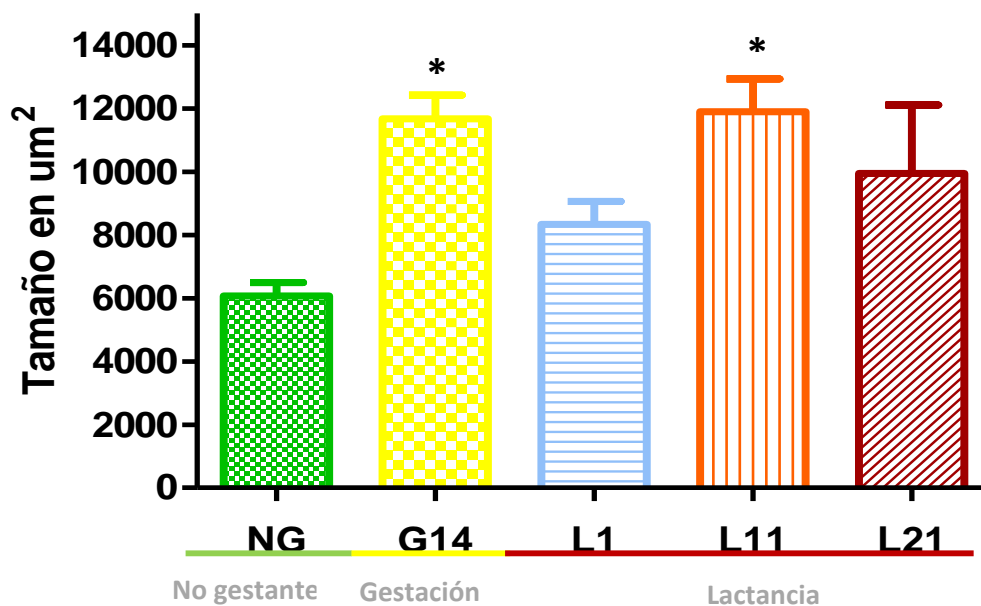
En nuestro grupo control, no gestante; la medida promedio de los islotes fue de 6,072 μ^2 .

Al día 14 de gestación (G14), los islotes pancreáticos alcanzan su tamaño máximo; en este día se observa un aumento significativo ($p \leq 0.05$) correspondiente a un 92% con respecto al tamaño promedio del control, no gestante; este aumento es la respuesta ante la resistencia a la insulina que permite mantener la homeostasis de la glucosa.

Tras terminar el estímulo fisiológico de la gestación, lactancia día 1, los islotes pancreáticos experimentan una disminución en su tamaño promedio en donde la mayoría de ellos miden menos de $10,000 \mu^2$.

En el día 11 de lactancia los islotes vuelven a experimentar un aumento significativo de tamaño ($p \leq 0.05$), el tamaño promedio de los islotes es de $11,800 \mu^2$ correspondiente a un incremento del 96% comparado con nuestro grupo control.

Al final de la lactancia el tamaño de los islotes disminuye, llegando a encontrar islotes con dimensiones similares a las de nuestro grupo control.



Gráfica 16. **Tamaño promedio de islotes**, el gráfico en verde corresponde al grupo no gestante; gráfico amarillo corresponde al grupo de gestación al día 14; gráfico azul pertenece al grupo de lactantes al día 1; gráfico naranja pertenece al grupo de lactantes al día 11; gráfico guinda corresponde al grupo de lactancia día 21. Los datos representan la media \pm ES. * $p < 0.05$ comparado con el control, no gestante.

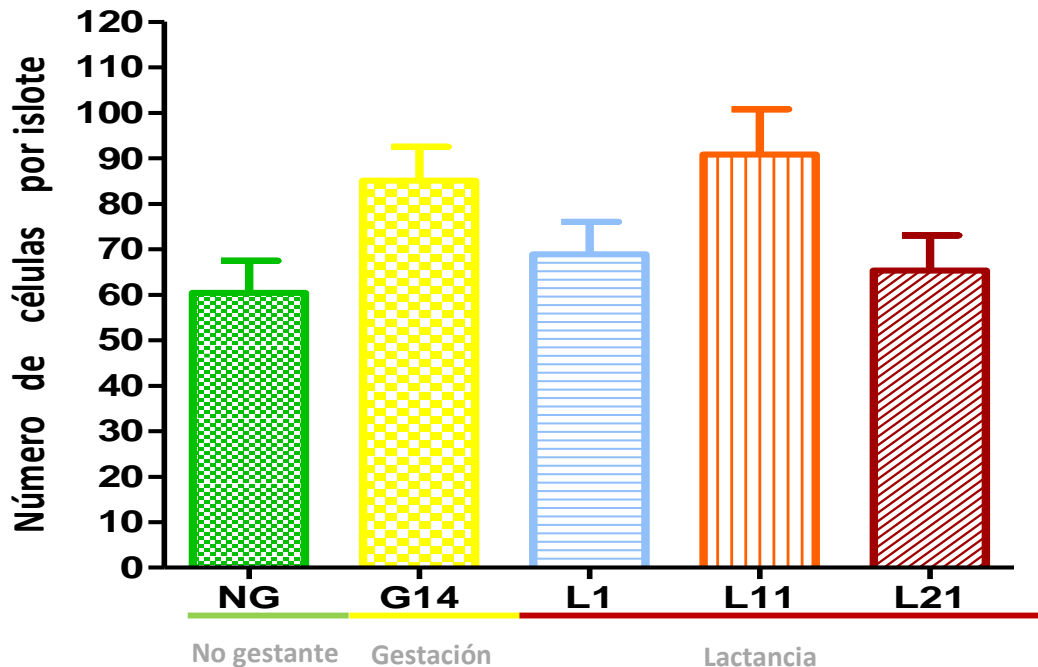
Número de células por islote

Los islotes de animales no gestantes (NG) llegan a presentar alrededor de 60 células/islote.

En el día 14 de gestación en donde se encontró un incremento del tamaño total, se pudo observar que los islotes promedian 85 células/islote, correspondiente a un incremento del 41% en comparación con nuestro control, no gestante; sin embargo dicho aumento no es estadísticamente significativo.

De forma similar al día 11 de lactancia, se registra un aumento donde los islotes presentan en promedio 91 células/islote, equivalente a un incremento del 50% con respecto al control.

A pesar que dichos cambios no son significativos, a nivel fisiológico nos permiten conocer si el aumento en el tamaño de los islotes está relacionado con el incremento en el número de células/islote, es decir por hiperplasia; o en contraste, por un aumento en el tamaño de las células, es decir, por hipertrofia.



Gráfica 17. **Número de células por islote**, el gráfico en verde corresponde al grupo no gestante; gráfico amarillo corresponde al grupo de gestación al día 14; gráfico azul pertenece al grupo de lactantes al día 1; gráfico naranja pertenece al grupo de lactantes al día 11; gráfico guinda corresponde al grupo de lactancia día 21. Los datos representan la media \pm ES.

Parámetros histomorfométricos del islote pancreático

En dichos parámetros se consideró el área del tejido, la densidad numérica del islote (islotos/páncreas), y el área individual de célula- β .

Parámetros histomorfométricos	No gestantes	Gestantes día 14	Lactantes día 1	Lactantes día 11	Lactantes día 21
Área del tejido (mm ²)	1.03	2.33	1.65	1.34	2.33
Número de islotos/páncreas (N/mm ²)	21	9	15	16	13

Tabla 18. **Parámetros histomorfométricos del islote pancreático**, en animales no gestantes, gestantes al día 14; y lactantes al día 1,11 y 21. Celdas blancas corresponden al área del tejido en mm²; celdas azules corresponden a la densidad numérica del islote (número de islotos/páncreas).

Los resultados de la tabla anterior nos indican que el grupo de los animales control, no gestantes, tienen un área de tejido de 1.03 mm². Al día 14 de gestación (G14) y 21 de lactancia (L21) presentan un aumento significativo ($p \leq 0.05$), correspondiente al 26% respecto del control.

Con el dato del área y tras haber contabilizado los islotos en cada tejido, se calculó la densidad del islote, la cual se refiere al número de islotos/mm². Los resultados fueron los siguientes; en el grupo de los no gestantes (NG), se encuentran 21 islotos/mm². Los resultados de los demás grupos presentaron diferencias estadísticamente significativas. El grupo de los gestantes tuvo una disminución del 48% respecto al control. En cuanto a la etapa de lactancia, al inicio hubo una disminución del 39%; al día 11 fue de 29%; y al final de esta etapa de 24%, respecto al control.

Relacionando el área de tejido con el número de islotos/ mm²; tenemos que el grupo de los gestantes tiene en total 21 islotos en toda su área; lactantes día 1 tiene 25

islotos en toda el área; lactantes día 11 tienen 21 islotos en toda el área; y al día 21 tienen 30 islotos en toda el área.

Parámetros histomorfométricos	No gestantes	Gestantes día 14	Lactantes día 1	Lactantes día 11	Lactantes día 21
Área individual de célula-β (μ ²)	5.65	8.38	7.40	7.66	7.45

Tabla 19. **Parámetros histomorfométricos del islote pancreático**, en animales no gestantes, gestantes al día 14; y lactantes al día 1,11 y 21. Celdas café corresponden al área individual de célula-β.

En la anterior tabla se muestra el área individual de célula-β. En el grupo control, no gestante, el área de la célula es de 5.65 μ².

Durante la gestación al día 14 y lactancia al día 1, 11 y 21, hubo cambios estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$).

En la gestación el tamaño del área incremento a 8.38 μ² correspondiente a un 48% con respecto al grupo control. Mientras que en la lactancia al día 1 y 21 el incremento fue de 30%, y al día 11 el aumento correspondió a un 34% con respecto al control.

Dichos resultados demuestran que tanto en la gestación como en la lactancia las células son hipertróficas.

Inmunofluorescencia

Tras conocer el área del tejido y el tamaño del islote, decidimos analizar cortes histológicos a través de la técnica de inmunofluorescencia para saber cuál era el área correspondiente a las células-α y de las células-β; dado que éstas conforman principalmente el islote pancreático.

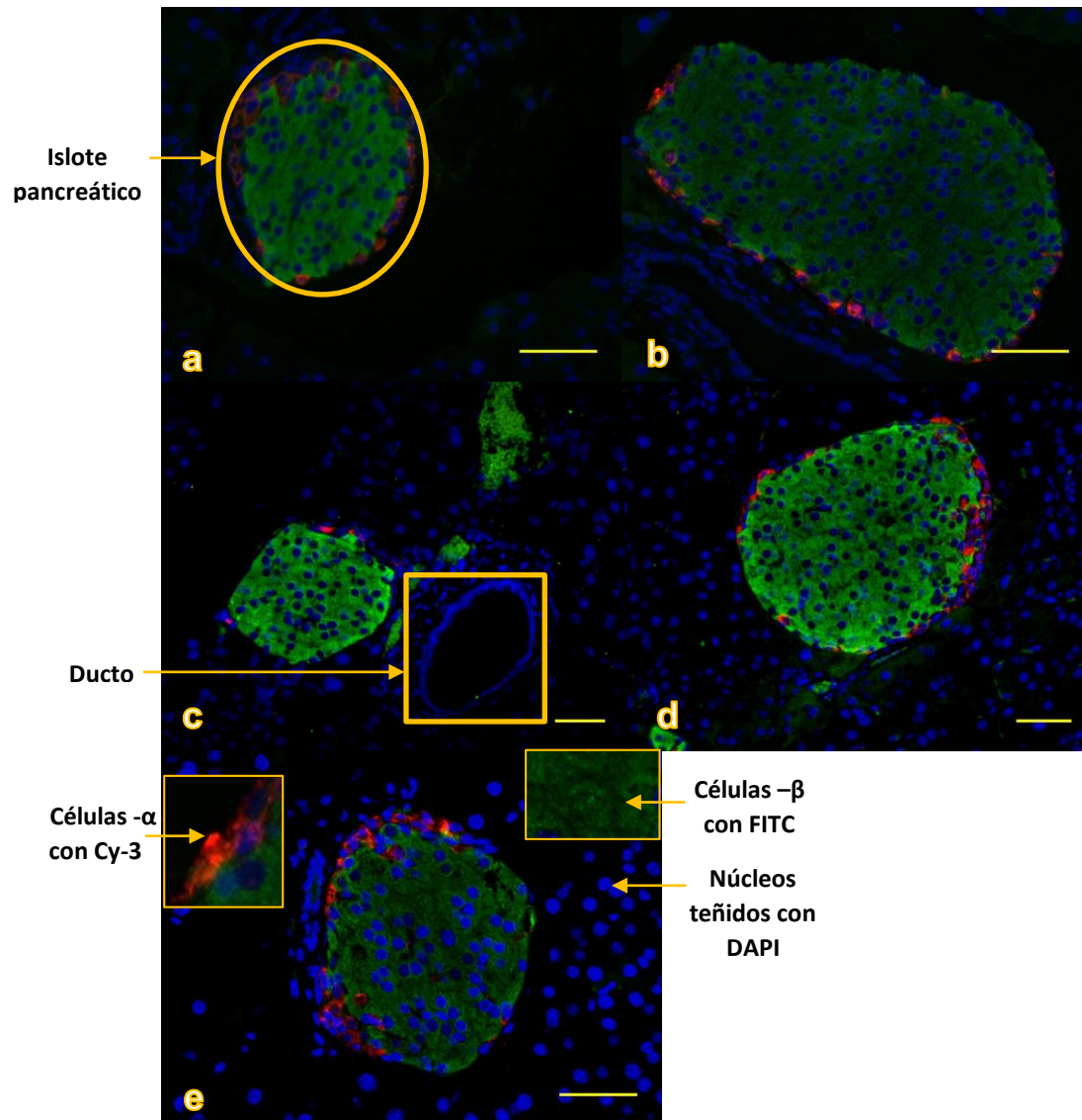


Figura 20. **Células- α y células- β en los islotes pancreáticos.** a) islote del grupo no gestante, el ovalo amarillo delimita al islote pancreático; n=250 islotes. b) islote del grupo gestación día 14, n=250. c) islote del grupo lactancia día 1, dentro del cuadro amarillo se encuentra un ducto pancreático; n=250 islotes. d) islote del grupo lactancia día 11; n=250 islotes. e) islote del grupo lactancia día 21, en el cuadro superior izquierdo hay un acercamiento a las células- α (color rojo), mientras que en el cuadro superior derecho hay un acercamiento a las células- β (color verde); n=250 islotes. Todas las imágenes fueron observadas a 20x, tejidos teñidos con insulina (verde), glucagon (rojo) y DAPI (azul). Las barras equivalen a 50 μ .

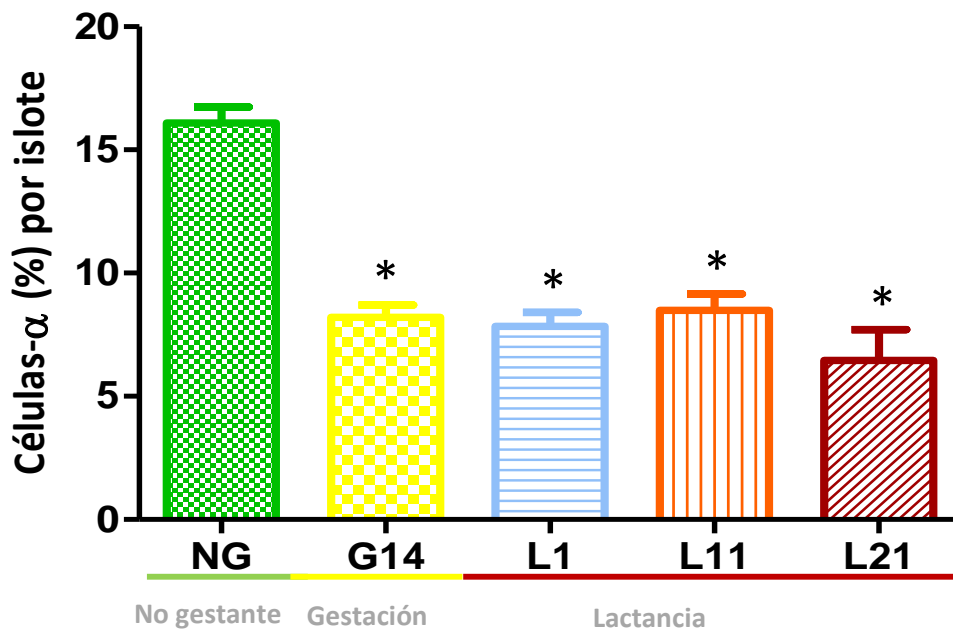
Porcentaje de células- α

Los islotes pertenecientes al grupo control, no gestante; tienen el porcentaje más alto de células- α en comparación con el resto de los grupos, presentando un 16.08% de estas células, que se encuentran distribuidas en la periferia del islote.

Durante la gestación al día 14 y la lactancia al día 1, 11 y 21; hay una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en el porcentaje de células presente en los islotes.

En el grupo de gestación (G14) y lactancia día 11 (L11), el porcentaje de células disminuye un 48% con respecto al grupo control. La mayoría de las células- α del grupo gestación (G14), se encuentran polarizadas en el islote; sin embargo en aquellos islotes de mayor tamaño se puede observar cómo estas células lo atraviesan por la mitad.

Al inicio de la lactancia (L1) las células- α se encuentran polarizadas, su decremento corresponde a un 42%; para el final de esta etapa (L21) las células- α disminuyen un 60% respecto al grupo control.



Gráfica 21. **Células- α (%) por islote de Langerhans.** el gráfico en verde corresponde al grupo no gestante; gráfico amarillo corresponde al grupo de gestación al día 14; gráfico azul pertenece al grupo de lactantes al día 1; gráfico naranja pertenece al grupo de lactantes al día 11; gráfico guinda corresponde al grupo de lactancia día 21. Los datos representan la media \pm ES. * $p < 0.05$ comparado con el control, no gestante.

Porcentaje de células- β

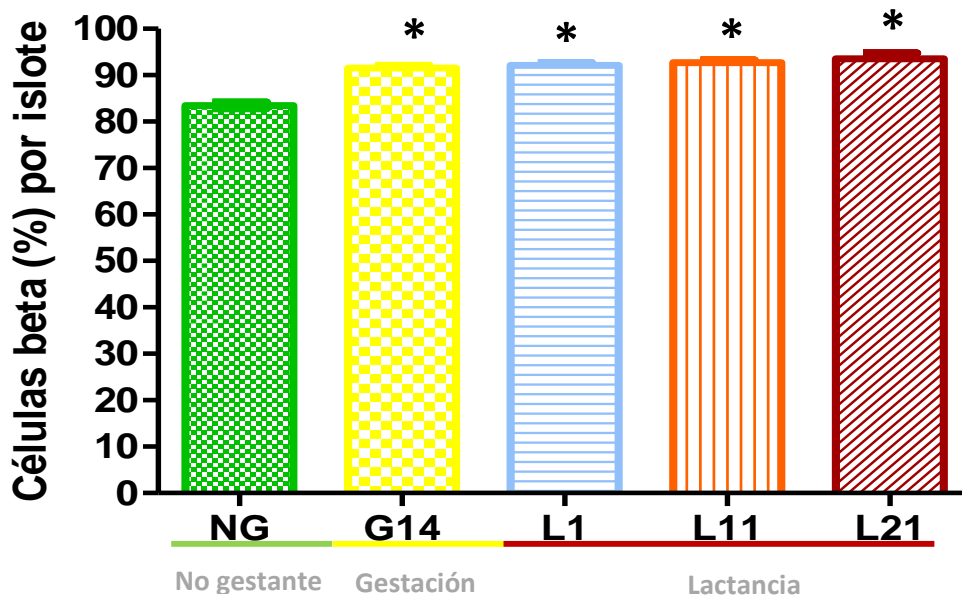
Por otra lado, el porcentaje de células- β de los islotes del grupo control, no gestante (NG), fue de 83.43%.

En la gestación (G14) y lactancia (L1, L11, L21) hay un aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$).

En el grupo de los gestantes el incremento de las células- β corresponde a un 9%; al día 1 y 11 de lactancia el aumento es de 11% con respecto al control; una característica de los islotes pancreáticos al inicio de la lactancia (L1) es que se encuentran próximos a ductos pancreáticos.

Al final de la lactancia (L21) las células- β incrementa un 12%, respecto al grupo control.

Este aumento en las células- β genera que los islotes tengan un mayor tamaño por hipertrofia, y ocupen una mayor área dentro del tejido [6].



Gráfica 22. **Células- β (%) por islote de Langerhans.** Gráfico en verde corresponde al grupo no gestante; gráfico amarillo corresponde al grupo de gestación al día 14; gráfico azul pertenece al grupo de lactantes al día 1; gráfico naranja pertenece al grupo de lactantes al día 11; gráfico guinda corresponde al grupo de lactancia día 21. Los datos representan la media \pm ES. * $p < 0.05$ comparado con el control, no gestante.

Viabilidad

A través del análisis anterior obtuvimos el porcentaje de células- α y β presente en los islotes de cada grupo, no obstante hasta este punto se desconocía la dinámica celular respecto a su viabilidad, por tal motivo se realizó otro análisis donde se empleó yoduro de propidio como marcador de muerte celular, ya que es un intercalante que se une únicamente a pares de bases que tengan poca o nada de secuencia, como se encuentran en células muertas.

Se consideró a una célula no viable, a aquella que tuviera una coloración morada o roja; esta coloración es generada por el empalme del color azul (DAPI) y rojo (ioduro de propidio). En algunos de nuestros islotes los eritrocitos fueron teñidos por el ioduro de propidio, dando un marcaje naranja como se aprecia en la imagen 24.b.

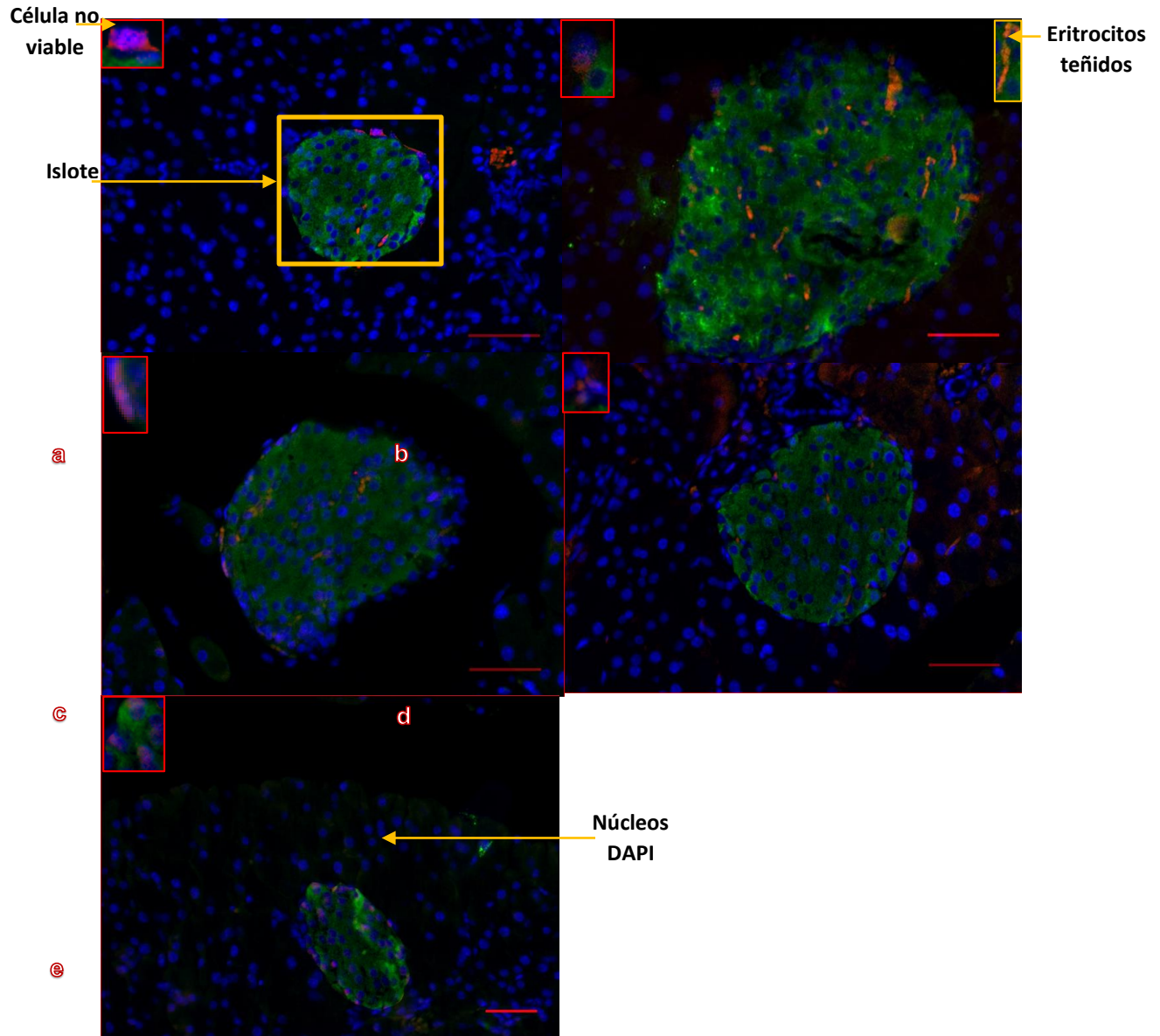
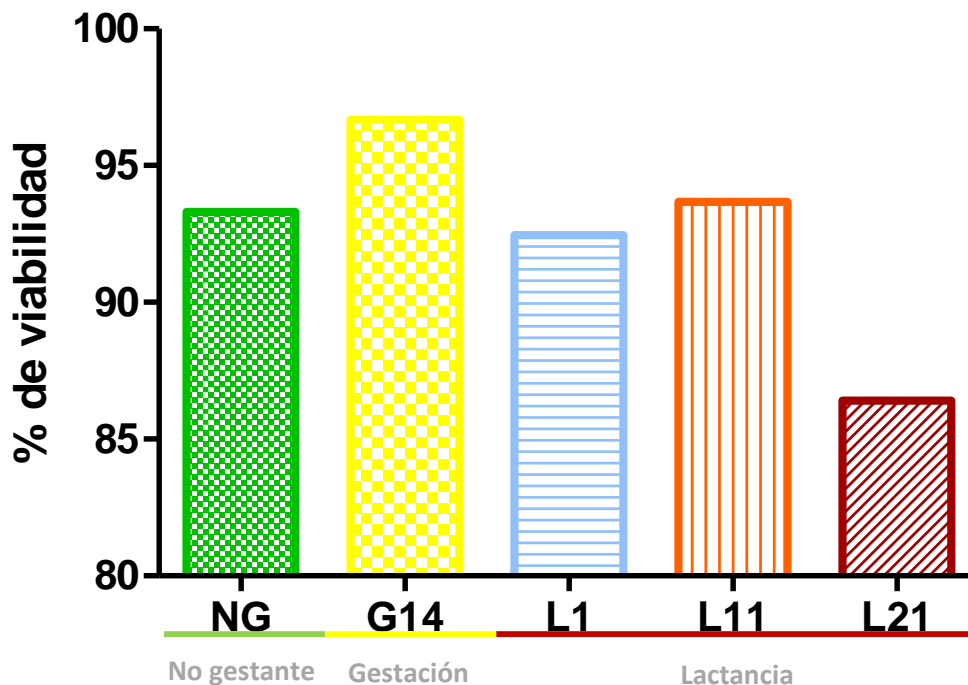


Figura 24. **Viabilidad celular con ioduro de propidio.** a) islote del grupo no gestante, dentro del cuadro amarillo se encuentra el islote pancreático; cuadro rojo muestra célula no viable, cuya coloración es morada; n=86 islotes. b) islote del grupo gestación día 14; cuadro rojo muestra célula no viable, cuadro amarillo muestra eritrocitos teñidos con ioduro de propidio; n= 120 islotes. c) islote del grupo lactancia día 1; cuadro rojo muestra célula no viable; n=120 islotes. d) islote del grupo lactancia día 11; cuadro rojo muestra célula no viable, n=120 islotes. e) islote del grupo lactancia día 21; cuadro rojo muestra célula no viable; n=120 islotes. Todas las imágenes fueron observadas a 20x, tejidos teñidos con ioduro de propidio (rojo), insulina (verde) y DAPI (azul). Las barras equivalen a 50 μ .

Porcentaje de viabilidad

El siguiente gráfico nos muestra los resultados de viabilidad. Los islotes pertenecientes a los animales no gestantes presentan un 93.3% de viabilidad. Al día 14 de la gestación la viabilidad tiene un aumento relevante a nivel fisiológico correspondiente a un 3.3% respecto al control, no gestante. Al día 1 de lactancia hay una disminución en la viabilidad de las células, el páncreas materno empieza a regresar a condiciones normales, no-gestante. A mitad de la lactancia dichos cambios continúan reajustando la modelación de las células- β ; al final de esta etapa la viabilidad disminuye un 7% con respecto al grupo control.



Gráfica 25. **Porcentaje de viabilidad celular.** Gráfico verde corresponde al grupo no gestante; gráfico amarillo corresponde al grupo de gestación al día 14; gráfico azul pertenece al grupo de lactantes al día 1; gráfico naranja pertenece al grupo de lactantes al día 11; gráfico guinda corresponde al grupo de lactancia día 21.

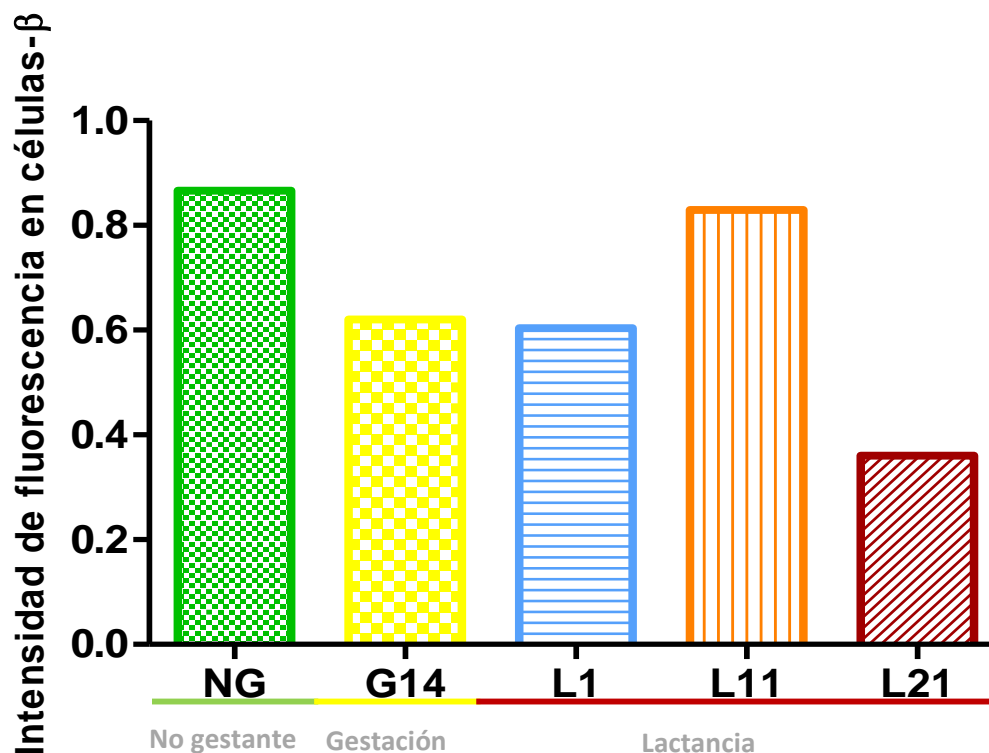
Contenido de insulina en células- β

Por último, se realizó un análisis para determinar de manera indirecta el contenido de insulina en las células- β . En este análisis se midió la densidad óptica a través del programa Image J; se eligió una imagen representativa y se pasó a escala de grises;

a través de estas imágenes se cuantificó la intensidad de fluorescencia a través de una regresión lineal. Entre mayor fluorescencia en la imagen, mayor cantidad de insulina almacenada en las células- β .

En la siguiente gráfica se puede observar el contenido de insulina en células- β de cada grupo. En nuestro grupo control, no gestante (NG); la intensidad fue de 0.86 UA; durante la gestación (G14) y lactancia al día 1 y 21 (L1 y L21) la intensidad de la fluorescencia disminuyó con respecto a nuestro grupo control.

En el grupo gestante la intensidad disminuyó un 28% respecto al control; al inicio de la lactancia un 31% y al final de esta un 59%.



Gráfica 26. **Contenido de insulina en células- β** , el gráfico en verde corresponde al grupo no gestante; gráfico amarillo corresponde al grupo de gestación al día 14; gráfico azul pertenece al grupo de lactantes al día 1; gráfico naranja pertenece al grupo de lactantes al día 11; gráfico guinda corresponde al grupo de lactancia día 21. Los datos representan la media \pm ES.

9. Discusión de resultados

En el presente trabajo se investigó el papel regulador sobre el metabolismo de la glucosa de las células- β pancreáticas durante la gestación y lactancia en el ratón. Durante la etapa de gestación, un conjunto muy coordinado de adaptaciones metabólicas permite a la madre manejar tanto sus necesidades energéticas no sólo para sí misma, también las de los fetos al alimentarlos continuamente durante el periodo de gestación [66]. En el presente estudio pudimos observar cambios relevantes en el peso de los ratones gestantes, así como, modificaciones en el manejo sérico de la glucosa en los que existen cambios estadísticamente significativos en relación a la tolerancia del carbohidrato en el periodo evaluado correspondiente al día 14 de gestación, y que adicionalmente mostraron cambios de mayor relevancia al inicio de la lactancia, regresando paulatinamente a sus condiciones “basales” conforme esta avanzó, como muestra la evidencia al día 11 y 21 de la misma. Durante el periodo de gestación, la alimentación, resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria progresiva parecen promover el almacenamiento de nutrientes y grasa materna, lo cual coadyuva a disponer posteriormente de estos en los momentos de mayor necesidad para el desarrollo de los fetos. Este tipo de fisiología materna y comportamiento bioquímico se ven acompañados de una limitada absorción en la última etapa de la gestación, en la cual los tejidos maternos son limitados a una mínima disposición de nutrientes para sí misma y un mayor flujo de nutrientes a los fetos, así como un mayor resguardo de macromoléculas altamente energéticas [66].

Son dos las etapas que se presentan en la gestación; en la primera la madre tiene un metabolismo anabólico, favorecido por un aumento en la lipogénesis; a nivel de tejidos periféricos se reduce la utilización de glucosa, con excepción del tejido adiposo, el cual responde de manera eficiente tal y como lo muestra la segunda porción curva de glucosa (60 – 120 min) correspondiente al día 14 de gestación, así como la anatomía del animal, el cual al ser sacrificado se podía observar la gran cantidad de grasa presente principalmente en las zonas abdominal y del epidídimo. Tanto en los seres humanos como en animales, bajo condiciones de estado energéticamente estacionario, el balance energético determina las concentraciones

circulantes de leptina, la cantidad de esta hormona determina la dinámica del tejido adiposo corporal, es decir, la leptina puede considerarse un indicador de resguardo para el tejido adiposo en relación a la movilidad de triglicéridos [67]. Por lo tanto, la producción de leptina puede ser paralela al proceso de la acumulación de grasa en los adipocitos en lugar de, o además de, la cantidad de grasa almacenada [68].

El embarazo humano normal sólo es superado por la lactancia como el período más activo de anabolismo controlado y se caracteriza por alteraciones significativas en la composición corporal y del metabolismo energético. El rango de variación de peso en el embarazo es extenso, que van desde la pérdida de peso real a un sobre peso que puede estar caracterizado por una ganancia de más de 23 Kg [69]. Sin embargo, esta ganancia de peso parece estar gobernada por condiciones intra-individuo, ya que la cantidad de grasa corporal ganado durante el embarazo entre individuos puede ser muy diferente [70]. El peso ganado, independientemente del número de críos, proporciona una reserva de energía durante el embarazo y después la lactancia [71]. En el embarazo, también se caracteriza por aparición de fenómenos de resistencia a la insulina [72]. Conforme progresa el embarazo, el mantenimiento de la normoglucemia se asocia con el aumento progresivo de la insulina circulante, independiente del estatus de señalización de la hormona, lo cual también puede ser asociado con una pérdida en la sensibilidad a la insulina y no como una verdadera resistencia a insulina [72, 73]. La hiperinsulinemia mostrada por la madre también debe ser considerada en el feto, en el cual estimula el crecimiento y modula el peso al nacer y el desarrollo de grasa corporal que será indispensable para la manutención energética y fisiológica de este al nacimiento [74]. En concordancia con la hipótesis de Pedersen, la glucosa materna está íntimamente asociada con el peso al nacer [75-77].

Además, diversos estudios han encontrado una relación estrecha entre los lípidos maternos y el crecimiento del feto, especialmente los triglicéridos y HDL-colesterol; un estudio reciente demostró que el colesterol total es de importancia similar a la glucosa materna para peso al nacer [78]. Así mismo, Freinkel ha propuesto que una "mezcla" de nutrientes maternos (glucosa, lípidos y aminoácidos) no sólo afecta el

crecimiento y el desarrollo fetal, sino que también es condicionante para el posterior desarrollo de patologías [79]. Por lo que el aumento de los triglicéridos maternos se atribuye a un efecto de los estrógenos sobre el hígado, lo cual se ha descrito aún en el embarazo temprano, exagerado por el aumento de resistencia a la insulina progresiva paralelamente a la gestación [80]. La transferencia de glucosa a través de la placenta de la madre al feto está mediada tanto por difusión pasiva, como por transporte facilitado [81]. El colesterol se transfiere directamente, aunque los mecanismos no se han entendido del todo [82], mientras que los triglicéridos se descomponen en ácidos grasos y glicerol, que se transportan a través de la placenta, y se reconstituye antes de la transferencia al feto [83]. Glucosa y ácidos grasos se utilizan para la producción de energía por la placenta y el feto. Colesterol y ácidos grasos se utilizan como elementos estructurales de las membranas celulares y contribuyen a la síntesis de hormonas y otros mensajeros por el feto y la placenta.

El feto ha sido descrito como un organismo dependiente de glucosa, siendo el combustible primario para el feto, que representa alrededor del 80% del consumo energético. El 20% restante de las necesidades energéticas fetales es proporcionado por lactato, aminoácidos, y otros. Las tasas de utilización de glucosa fetales (5-7 mg / kg / min) son mayores que en los adultos (2-3 mg / kg / min). En este sentido, la placenta mantiene un suministro ininterrumpido continuo en el útero, sello distintivo de la vida fetal por el proceso de difusión facilitada [83]. Los tres puntos clave en esta compleja regulación del metabolismo de la glucosa fetal son:

- Aumento del gradiente de glucosa materno-fetal en dependencia de los niveles de glucosa cuando disminuyen las condiciones fetales debido al aumento en la absorción de insulina dependiente de la glucosa por el tejido adiposo y músculo esquelético.
- Aumento en la capacidad del transporte de glucosa a través de la placenta, por un aumento de los transportadores de glucosa fetales.

La difusión de la glucosa está mediada por una familia de proteínas estructuralmente similar conocido como los transportadores de glucosa (GLUT)

codificadas por una familia de genes SCL2A, los cuales en el feto se expresan de manera específica en los tejidos. GLUT 1 es la isoforma predominante en la mayoría de los tejidos fetales y de la placenta [84]. El GLUT 1 ubicado en la membrana basal celular es el transportador que conduce al paso limitante en los niveles de glucosa fetales. El lado materno de la placenta tiene un mayor aumento de GLUT 1 hasta de 5 veces más que el lado fetal. Insulina, factores de crecimiento insulínico (IGF), y otras hormonas y péptidos regulan su actividad y expresión. GLUT 1 es considerado un transportador de alta afinidad, ya que presenta una baja afinidad por su sustrato (~60 mg/dL), sin embargo, en la placenta no se saturan hasta 198.235 mg/dL en relación a los niveles de glucosa sérica materna, que son significativamente por encima del nivel habitual [85]. Esto puede de hecho ser un mecanismo de protección de los efectos adversos de la hiperglucemia grave. Con la progresión de la edad gestacional, la transferencia placentaria de glucosa se ve reforzada por el aumento de GLUT 1 y GLUT 3. El GLUT 3 es más eficiente, tiene afinidad muy fuerte a la glucosa y pueden ser responsables de la transferencia del carbohidrato inclusive a muy bajas concentraciones. La expresión de GLUT 4 es sobre regulada por la hipoglucemia y hipoinsulinemia en músculo esquelético y tejido adiposo, sin sufrir ningún cambio en el cerebro, y disminuyendo su regulación con hiperglucemia, hecho particular en el sistema fetal y considerado como un recurso celular de protección.

El gasto de energía del feto, medido por el consumo de oxígeno es de 55 kcal/kg/día y la cantidad de captación de glucosa es de sólo 32 kcal/kg/día. Incluso si se reduce el suministro de glucosa, el consumo de oxígeno fetal sigue siendo normal, ya que el feto es completamente capaz de utilizar otros sustratos tales como lactasa, ceto-ácidos, aminoácidos, ácidos grasos, y glucógeno como combustible [86]. Rutinariamente, aproximadamente 40 - 50% del transporte de glucosa es utilizado por placenta para la oxidación o convertida en glucógeno y lactato. El feto utiliza este lactato junto con la glucosa para la grasa y la síntesis de glucógeno. Con el aumento de la gestación, la lipólisis materna proporciona el combustible para la madre y precursores gluconeogénicos también para el feto. Normalmente, la gluconeogénesis y la cetogénesis no se ven en el feto cuando el suministro de

sustratos es adecuado. El mantenimiento de la concentración de glucosa materna mediante el aumento de la producción de glucosa y el desarrollo relativo de intolerancia a la glucosa materna y resistencia a la insulina, son promotores fisiológicamente normales de la capacidad energética fetal [82].

Es por esto que el metabolismo durante la gestación puede ser dividido en dos tiempos metabólicamente relevantes, durante la primera mitad del embarazo se da un aumento de la ingesta calórica la cual sustenta el crecimiento del feto y facilita la deposición de grasa materna bajo la insulina normales secreción, por lo que es considerada una fase materno anabólica. Y en la segunda mitad de la gestación es considerada la fase catabólica, la cual se define como el período de crecimiento exponencial fetal, con transferencia continua de la glucosa y nutrientes al feto, en donde la glucosa de ayuno y aminoácidos maternos son más bajos. Se movilizan las reservas de grasa materna y el resultado es hipertrigliceridemia, lo cual es considerado como el "combustible flotante" es beneficioso tanto para la madre y el bebé. El aumento de resistencia a la insulina (20 - 60%) es parte integrante de esta fase, lo que resulta en un incremento de tres veces en los niveles de insulina respecto de la etapa no gestante. El aumento de las hormonas lactógeno placentaria humana, progesterona y los estrógenos son en parte responsables de la insulina resistencia. Estos cambios son acentuados en las últimas semanas del periodo gestacional. Los procesos metabólicos maternos y los cambios hormonales subyacentes conllevan a estados de "inanición acelerada" de la madre, lo cual garantiza el combustible para el feto a expensas de la madre. Regulación hormonal de la utilización de sustratos metabólicos y el anabolismo en el feto es secundaria a la oferta de sustratos nutrientes [87, 88].

La sensibilidad a insulina por los tejidos maternos se ve reducida al igual que la capacidad de respuesta a la insulina, asociado con una disminución de la expresión tisular de la facilitación del transportador de glucosa-insulina sensible, GLUT 4 [89]. Lo anterior es corroborado con el resultado obtenido en el análisis del área bajo la curva al día 14 de gestación; en el gráfico 13b se puede apreciar un incremento del 15% en el área, el cual nos señala la resistencia a la insulina desarrollada por parte

del hígado. De forma similar, el área correspondiente a los tejidos dependientes a insulina al día 1 de lactancia, muestran dicho incremento. Esto corresponde a una pérdida de la sensibilidad periférica a la insulina, la cual se produce debido a cambios sustanciales en los espectros de esteroides. Cambios importantes en el eje hipotálamico influenciados por la actividad hipófisis-suprarrenales-gonadas determinan el crecimiento fetal y el momento del nacimiento. El aumento progresivo de las hormonas contra reguladoras incluyendo la hormona de crecimiento placentario (GH), glucocorticoides, cortisol, progesterona y citoquina inflamatoria TNF (Factor de Necrosis Tumoral). El TNF deteriora la señalización de la insulina por la disminución de la actividad tirosina quinasa del receptor, mediante el aumento de la fosforilación de la serina IRS-1 [90, 91], y también por la supresión de la adiponectina, que actúa como un sensibilizador a la insulina [92-94]. El incremento de factores de riesgo como la obesidad visceral, el gasto de energía baja, el alto consumo de carbohidratos, la privación del sueño, la etnia y antecedentes genéticos interactúan con el desarrollo de insulino resistencia y el mecanismo detrás de este fenómeno, es multifactorial con lo que se pueden propiciar cambios metabólicos relevantes tanto en la madre como en el feto [95].

Los esteroides sexuales, también conocidos como esteroides gonadales, son hormonas esteroides que interfieren con los receptores de andrógenos o estrógenos. El efecto es mediado por mecanismos genómicos que implican a los receptores nucleares, así como por mecanismos no genómicos que involucran receptores de membrana. Las dos clases principales de los esteroides gonadales son estrógenos y andrógenos. Sus derivados son estradiol y la testosterona, las hormonas altamente significativas en la fisiología de los mamíferos. Una tercera categoría comprende los gestágenos con su principal representante de progesterona. Tradicionalmente, el papel de los esteroides sexuales se ha atribuido principalmente a los órganos reproductivos: la mama, útero, ovarios, testículos, epidídimo, próstata. Sin embargo, los datos han hecho evidente que los esteroides desempeñan un papel esencial en la diferenciación adecuada de diversas glándulas y tejidos de los mamíferos durante el embarazo, por lo que los cambios que sufre la

dinámica hormonal producen desórdenes críticos que llevan a la generación de resistencia a insulina y desarrollo de síndrome metabólico [96-98].

En el embarazo por otro lado, se ha informado menor biodisponibilidad de andrógenos. Como consecuencia de la inducción hepática de las hormonas sexuales unidas a globulina durante el embarazo, el índice de andrógeno libre (FAI) disminuye en comparación con el inicio del embarazo [99]. El FAI en las mujeres embarazadas aumenta significativamente la testosterona sérica y las concentraciones de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), observándose remarcado este fenómeno durante en el segundo y tercer trimestre del embarazo, conllevando a que la concentración de insulina en ayunas y el índice de insulino resistencia HOMA-IR sean significativamente elevados, mientras que la glucosa en ayunas a la proporción de insulina (GIR) significativamente disminuida. Es importante resaltar que este efecto, aunque se genera intraindividualmente de manera diferente, la magnitud del mismo está en relación a conductas alimenticias, genéticas y el número de gestas por la madre [100]. Sin embargo, se ha mostrado que la hiperandrogenia que se puede generar durante el embarazo correlaciona con la aparición de insulino resistencia inducida [101].

Así mismo, los gestágenos en los que son representados por prolactina la cual tiene un papel importante en la señalización de la insulina y la función del páncreas endócrino [102]. Se ha informado de ciertas características diabetogénicas de la progesterona con el pico a las 32 semanas de embarazo en humanos, factor que explica el efecto en relación con el aumento de resistencia a insulina debido a una reducción de la expresión de GLUT4 lo cual conlleva un riesgo implícito en el desarrollo de diabetes gestacional [103, 104].

Por otro lado, de manera contraria en la etapa II, donde el metabolismo es catabólico. Etapa en la cual, se utilizan los depósitos de grasa almacenados durante la etapa previa, dado que los nutrientes aportados por la alimentación de la madre no son suficientes, es en esta etapa donde el feto alcanza su máximo crecimiento. La actividad lipolítica se ve favorecida y sus productos, ácidos grasos libres (AGL) y glicerol, son dirigidos al hígado materno, donde los AGL son convertidos a cuerpos

cetónicos y glucosa, y el glicerol a glucosa. Durante la gestación tardía, los productos lipolíticos también se utilizan para la síntesis de triglicéridos que se liberan a su vez a la circulación, en forma de las diferentes fracciones de lipoproteínas, estas fracciones son captadas por la glándula mamaria para la síntesis de la leche, y por la placenta para la hidrólisis y la transferencia de ácidos grasos no esterificados liberados para el feto [81].

Al final del embarazo y principios de lactancia, la respuesta de los tejidos periféricos a la insulina permanece severamente atenuada, pero se recuperan conforme la lactancia avanza, a partir de la mitad de esta etapa. En la cual se sabe que la secreción de insulina aumenta como consecuencia al desarrollo de resistencia a la insulina. Catalano et al [105] reportaron en la década de 1990 que la segunda fase de la secreción de insulina aumenta en casi un 300% durante toda la gestación. Esta adaptación de secreción de insulina se debe probablemente al aumento de las hormonas maternas que coincide con el desarrollo de resistencia a la insulina materna. Este hecho fue evidenciado por el área bajo la curva de los tejidos dependientes de insulina en la figura 13 a – c. La insulina aparece en la circulación fetal entre las semanas 10 - 12 de edad gestacional. El metabolismo de la glucosa fetal es relativamente independiente de los mecanismos de regulación de glucagón/insulina. La insulina es más importante para mejorar el crecimiento que para la regulación de los combustibles metabólicos durante la vida fetal. La insulina estimula el crecimiento de los tejidos específicos (por ejemplo, adiposo, hepático, conectivo, esquelético y músculo cardíaco). Como pudimos observar en nuestros resultados, una carga de glucosa provoca una respuesta de la insulina lento en los ratones gestantes no diabéticos (día 14). También se ha demostrado que la hiperglucemia crónica no fisiológica durante el embarazo, es propiciada por la reducción en la secreción de insulina [83, 106]. Pero en contraste, el feto de una madre diabética con hiperglucemia pulsátil responde con un lanzamiento rápido de insulina [107]. El exceso de secreción de insulina durante la vida fetal resultante a partir de tales condiciones como la diabetes materna hace que el crecimiento de los tejidos sensibles a la insulina desproporcionado, resultando en macrosomía. El

efecto anabólico de la insulina se ve reforzada por un efecto directo separado de la insulina sobre proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Las evidencias apuntan a que la insulina juega un papel importante en el éxito de la lactancia. Durante la lactancia la glándula mamaria expresa receptores de insulina y se vuelve extremadamente sensible a esta hormona; la glucosa circulante es desviada preferentemente a la glándula mamaria a través de una vía no insulino-independiente para satisfacer las demandas de la lactogénesis. Esta desviación puede reducir la carga de glucosa en las células- β pancreáticas y preservar la producción de insulina a largo plazo [108].

Aunado a lo anterior, en esta etapa existen hormonas como la prolactina, que pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la secreción de insulina y la homeostasis de la glucosa. Fisiológicamente los niveles elevados de prolactina inducen procesos adaptativos normales, mejora la homeostasis mediante el aumento de acción de la insulina y aumenta la sensibilidad a la insulina hepática [108]. En esta etapa los niveles de insulina y de glucosa son significativamente menores, mientras que la utilización de carbohidratos y gasto energético son mayores [109].

Después del nacimiento, hay movilización de las reservas de grasa, principalmente a nivel de las regiones supra-iliacas y del muslo, donde los de ácidos grasos son de tipo poliinsaturados de cadena larga. Estos lípidos del hígado y el músculo (tejidos no adiposos) son dirigidos hacia la glándula mamaria y participan en la síntesis de la leche materna; lo que reduce el riesgo materno para desarrollar una enfermedad metabólica [109].

Con base en lo descrito, en el presente trabajo se encontró una mejora del área bajo la curva al día 11 y 21 post-natal en los que se lleva a cabo la lactancia, lo que es indicativo de una mejor respuesta por parte de los tejidos hacia esta hormona y por ende una disminución en la resistencia a la insulina, con regulación efectiva de la glicemia circulante.

Así mismo se investigó la capacidad de respuesta pancreática y los cambios morfológicos que sufre el tejido a lo largo de la gestación y lactancia. En este punto pudimos observar que el peso de los páncreas se vio incrementados en todos los tiempos analizados a lo largo del estudio, sin embargo, significativamente este incremento se remarcó al día 14 de la gestación, y en los días lactancia 1 y lactancia 21. El incremento del peso pancreático se ha descrito en relación a estados de insensibilidad a la insulina, lo que genera una regulación positiva en la génesis celular de los islotes la cual está relacionada con el desarrollo del islote pancreático hiperplásico [110]. El aumento de la replicación de las células- β y la masa de células en el páncreas es la respuesta fisiológica a la resistencia a la insulina inducida por el embarazo [111].

El control óptimo de la concentración de glucosa en sangre depende de los cambios sutiles en la síntesis y secreción de insulina por las células- β y de su capacidad para generar grandes incrementos en la secreción de la insulina [112]. Es fundamental que los islotes mantengan la masa de células- β adecuada en respuesta a diversas fluctuaciones de la demanda corporal [112]. Por lo que en situación de sobre requerimiento insulínico como en el caso de la gestación, la masa de células- β se ve reforzada por la proliferación (replicación de las células- β), neogénesis (diferenciación de las células no beta), hiperplasia (aumento del número de células- β) y la hipertrofia (tamaño de las células- β aumentado), y se reduce por la muerte de las células- β ; a través de la apoptosis, la necrosis y la autofagia; hipoplasia (disminución del número de células- β); e hipotrofia (disminución del tamaño de las células- β). La expansión y la desaparición de la masa de células- β través de los estimulantes y los insultos respectivamente se activan probablemente a través de uno o más de estos procesos de reposición de células- β (expansión de las células- β) y la muerte (desaparición de las células- β) [113].

La proliferación de células- β está mediada por la tasa de replicación (compensación a estímulos o auto-reposición), mientras que la hiperplasia se produce por replicación de las células- β debida a la neogénesis a partir de células no beta. Tanto la replicación de células- β y la neogénesis contribuyen a la expansión de la masa

del islote y requieren estímulos externos, tales como hormonas y factores de crecimiento [5]. Las células- β son dinámicas, y actúan en respuesta a la demanda metabólica fluctuante de insulina. Por lo que la hipertrofia de las células- β y la hiperplasia se producen durante procesos de compensación [114]. En modelos de roedores resistentes a la insulina, la cantidad de los islotes se ha encontrado ligeramente aumentada, inclusive existe evidencia de hipertrofia e hiperplasia [115]. Además, la hipertrofia de las células- β contribuye a la reparación de los islotes en condiciones de inducción por dietas altas en grasas que producen resistencia a la insulina, hecho aunado a incrementos del factor de transcripción de las células- β maestro, conocido como homeobox pancreático duodenal 1 (Pdx1), el cual contribuye a la regulación del tamaño de las células- β [116], es decir, Pdx1 influencia la hipertrofia o hipotrofia de células- β . Por el contrario, la hipotrofia pura de las células- β se da a partir de la muerte celular a través de diversos procesos e insultos que contribuyen a que la masa de células- β se reduzca. Dicho efecto, se ha reportado en ratas destetadas hiperglucémicas expuestas a una dieta alta en grasa durante una sola semana de gestación en las que estados de hipotrofia de las células- β fueron descritos. La hiperglucemia puede ser exacerbada por la incapacidad de las células- β de sintetizar y secretar suficiente insulina a causa de conductas hipotróficas e hipoplasia; por lo tanto, resulta en hipoinsulinemia [114].

Por esta razón las células- β pueden considerarse como compensadoras iniciales en condiciones de resistencia a la insulina asociada con el embarazo [117]. Cuando la pérdida de células- β alcanza el punto en el cual se observa hiperglucemia, la tasa de replicación de células- β es de suponer que máximamente estimulada; por lo tanto, una elevación adicional en las concentraciones de glucosa no va a aumentar la replicación [118]. La homeostasis de la glucosa mantiene la normoglucemia mediante la adaptación de la masa y la función de las células- β que contrarrestan resistencia a la insulina, la masa de células- β reducida, y la nutrición exceso [119].

La masa de células- β es dinámica y puede responder a señales ambientales tales como la glucosa, así como a señales autónomas de insulina [120]. Se ha determinado que el número de células- β aumenta notablemente en el primer año

de vida de roedores [12, 42, 121, 122], hasta 1,5 veces durante el embarazo [42] y hasta 10 veces en los estados resistentes a la insulina [78]. En roedores neonatos, las tasas de replicación de las células- β en los ratones son muy variables desde un 2% [123] hasta 15% por día [124] con una media establecida del 5% de las células- β se replican por día hasta la edad de adultos jóvenes, por lo que las células- β se deben dividir aproximadamente cada 20 días [125]. Sin embargo, utilizando la gama de 2 a 15% la replicación de células- β por día, y la factorización en la mediana de una tasa de replicación 8,5%, es posible que las células- β pueden dividir cada 12 días, en los estados fisiológicos normales. Estados metabólicos alterados que requieren una mayor demanda de insulina alterarán las tasas de replicación de células- β . La replicación celular beta varía en los seres humanos y roedores. Las células- β humanas, a diferencia de las células- β de roedores jóvenes, son de larga vida con poco cambio adaptativo durante la edad adulta y se establecen en gran medida por 20 años [126]. En los seres humanos, una disminución relacionada con la edad de las células replicantes refleja una disminución en la capacidad de adaptación [127]. En roedores pequeños (<1 año), la vida media de las células- β se estima en 30-60 días [123]. En las células- β de adultos humanos, la replicación se estima en 10 veces menos que en los ratones adultos [20, 128] con la mayor tasa de replicación en los 5 años de edad [129].

En el presente trabajo se pudieron observar cambios finamente regulados desde el día gestación 14 con el mayor crecimiento del islote hasta el retorno a tamaño casi basal del mismo al día 21 de lactancia. El número de células por islote compaginó con dichas modificaciones homeostáticas observándose hiper e hipotrofias celulares en dependencia del momento de análisis, con lo que se pudo confirmar el dinamismo de las células- β pancreáticas y una disminución importante en el porcentaje de células- α (gráficos 27 y 28). Sin embargo, el comportamiento celular se ha observado que se encuentra íntimamente ligado a los cambios y modificaciones hormonales durante el embarazo y la lactancia. Las de hormonas de la madre gestante que se están liberando hacia la circulación, como lo es primordialmente la lactógeno placentaria y prolactina, están relacionadas con el

crecimiento del islote pancreático; a través de estimular la proliferación de las células- β [30].

El páncreas pasa por una serie de modificaciones no sólo exocrinas, también endocrinas. Durante esta etapa se ven favorecidas señalizaciones relacionadas con la proliferación, transdiferenciación y supervivencia de células; tales como ERK 1/2, JAK2/STAT5, PI3K/Akt [40, 43, 130]. Como consecuencia de la activación de estas vías, existe un aumento en la masa de las células- β . Al día 14 de gestación y al día 1 y 21 de lactancia, el peso del páncreas presenta un aumento significativo del 60% con respecto al grupo de los no gestantes. En cuanto al tamaño de los islotes pancreáticos, es al día 14 de gestación y al día 11 de lactancia donde se presentan los islotes de mayor tamaño. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos por Huang et al., aunque los modelos utilizados son animales knockout de la cepa C57BL/6 para el receptor de prolactina [130]. Este aumento de tamaño se ve acompañado de un aumento en el tamaño de la célula, ciertos estudios sugieren que estas células tienen una mayor capacidad de sintetizar, almacenar y secretar insulina. No se conoce específicamente como se lleva a cabo el control del tamaño de la célula- β , pero se cree que está relacionado con la vía serina/treonina proteína quinasa mTOR. Esta proteína regula la traducción proteica, en respuesta a nutrientes y factores de crecimiento, al fosforilar componentes de la maquinaria de la síntesis de proteínas como son p70S6K (proteína ribosomal S6 kinasa) y 4E-BP (proteína ligadora de 4E) [131]. Dentro de nuestros resultados nuevamente es al día 14 de gestación el grupo que presentó el mayor incremento en el área de la célula, correspondiente a un 48%.

Los islotes pancreáticos se encuentran constituidos principalmente por un mayor porcentaje de células- β , ya sea por neogénesis o transdiferenciación a partir de células- α , δ , ϵ , FF o acinares; cómo podemos observar, el porcentaje de células- α disminuye en todos los grupos a consecuencia de la transdiferenciación. Cada uno de estos procesos favorece que los islotes estén constituidos en una mayor proporción por células- β hiperplásicas e hipertróficas, cuya secreción de insulina

sea mayor a la almacenada; capaces de responder de manera eficiente y específica tal como se observó en este estudio [4].

En cuanto al proceso de supervivencia celular, está relacionado con la cascada de señalización de PI3K/Akt; de la cual existen evidencias de cómo esta vía favorece la actividad anti-apoptótica. La señalización por Akt inactiva varios factores anti-apoptóticos, favoreciendo mediadores transcripcionales como Foxm1 que regulan de manera positiva la supervivencia de las células- β , a través de la transcripción de Birc5, un gen anti-apoptótico inducido durante la gestación. Lo anterior ocasiona que la viabilidad de las células- β incremente tal y como se ve graficado al día 14 de gestación [21, 132]. Otro efecto relacionado con Akt, es la inactivación del gen p53; a través de la fosforilación y activación de MDM2, una proteína que regula negativamente a p53. Al estar la vía PI3K/Akt en un estado de activación permanente, el anterior mecanismo permite que una célula, aún en malas condiciones, resista a la apoptosis, sobreviva y prolifere [131].

Aunque se ha avanzado en el conocimiento de las vías compensatorias, aún no existe esclarecimiento de cómo se llevan a cabo y son regulados los cambios morfofuncionales en el páncreas durante la gestación y la lactancia en una misma cepa, particularmente en la C57BL/6; en el presente modelo experimental se dio un seguimiento de esta segunda etapa hasta el día 21. Con base en la bibliografía y en los resultados obtenidos, se ha podido evidenciar que en esta etapa existen muchos cambios fisiológicos y metabólicos; y que las demandas energéticas son aún mayores a las que se presentan durante la gestación, ya que esta primera etapa es relativamente corta (18 días) comparada a la duración de la lactación (3 semanas) [54]. La ingesta de alimentos también llega a ser mayor, lo cual favorece la producción de leche en la glándula mamaria, como lo pudimos observar en los resultados del monitoreo de consumo de alimento durante esta etapa [53].

Tras el nacimiento de las crías, la madre pasa por un proceso inflamatorio el cual contribuye a que la resistencia a la insulina sea más marcada al día 1 de lactancia. Las señales intracelulares activadas en respuesta a la inflamación inhiben las vías de señalización de la insulina. La JNK es activada, ya que es uno de los principales

reguladores metabólicos centrales, en condiciones de estrés. JNK fosforila a IRS1 en la posición serina 307, bloqueando así la señal e impidiendo la acción de la insulina. De la misma forma PKC se sobre expresa y actúa fosforilando tanto el IRS1 como el propio receptor de insulina, inactivándolos por disminución de su capacidad de autofosforilarse [133].

Ciertos estudios realizados en modelo animal de ratas sobre esta etapa; mencionan que después del parto, dentro de los primeros 10 días, la masa de las células- β sufre una reducción, principalmente por una disminución en la proliferación y un aumento en la apoptosis de dichas células; también mencionan que los niveles de hormonas lactogénicas regresan a valores normales [59]; otro estudio menciona que es a partir del día 3 cuando la apoptosis incrementa [57]. Dentro de nuestros resultados, observamos que es desde el 1er día de lactancia que existen cambios morfológicos generados por un aumento en la apoptosis, sin llegar a tener los islotes pancreáticos las mismas dimensiones que tenían antes de la gestación. La apoptosis juega un papel muy importante para asegurar la homeostasis del organismo; la masa de células- β empieza a disminuir, esto sin afectar la secreción de insulina. Durante este proceso se activan ciertas proteasas conocidas como caspasas, las cuales participan en la respuesta inflamatoria, siendo necesarias para la secreción de algunas citoquinas proinflamatorias como la interleucina 1beta (IL-1beta) y la interleucina 18 (IL-18) [134, 135].

Estas citocinas inflamatorias se han descrito elevadas en la etapa final de embarazo y el inicio de la lactancia, resistencia a insulina y diabetes mellitus tipo 2 [136-144]. La exposición aguda de estas citocinas a los islotes in vivo y ex vivo, además de líneas de células- β ha observado la inducción disfunción en las células- β . Las interacciones inflamatorias son clave en los procesos de muerte en células- β , dichas interacciones son mediadas por medio de citocinas, como ejemplo de ello se han descrito en el proceso IL-1 β , IFN- γ y TNF- α . Las combinaciones de estas citocinas ya sea de manera pareadas o triples se han descrito ampliamente como inductoras de insuficiencia de células- β y la promoción de la apoptosis. En líneas celulares de células- β o en islotes aislados en donde se ha dado tratamiento con una de las

citocinas únicamente no se ha observado la inducción de la disfunción o procesos de muerte. Por lo que, una sinergia en las vías de señalización intracelular mediada por citocinas es requerida en la inducción del daño [145, 146]. En estudios ex-vivo en islotes primarios humanos o de ratón muestran que una exposición breve (6 h) a las tres citocinas inflamatorias (IL-1 β , IFN- γ y TNF- α) es suficiente para resultar en la pérdida de la secreción de insulina estimulada por glucosa, aumento en la expresión inflamatoria génica, y la inducción de apoptosis [147, 148].

La disección de los eventos intracelulares que median la transición de una célula- β de funcional a disfuncional en un ambiente inflamatorio puede ofrecer nuevos enfoques para preservar las células- β expuestas a la inflamación. Este enfoque estratégico sería relevante para frenar la progresión de la diabetes como una monoterapia o revertir la diabetes como un enfoque combinatorio con una estrategia de regeneración de islotes, ya sea la estimulación endógena o exógena (trasplante de células, encapsulación, los xenotrasplantes, etc.) [149, 150].

No hay que perder de vista la asociación de los procesos inflamatorios con la producción de estrés oxidativo que conllevan al fracaso de los islotes hacia el final embarazo y el inicio lactancia. Estos dos fenómenos sinérgicos se han implicado en la expresión diferencial de genes relacionados con el estrés oxidativo en los islotes obtenidos por micro disección láser de páncreas humano [151]. Aunque las especies reactivas de oxígeno (ROS) sirven como una señal intracelular a nivel fisiológico, el exceso de ROS es perjudicial para las células- β [152], demostrando contundentemente que las células- β son vulnerables al estrés oxidativo debido a la baja capacidad antioxidante [153]. Se ha demostrado que la alta glucosa y ácidos grasos observados durante el embarazo, pero más evidentemente en el periodo final del mismo resultará en un aumento de la producción de ROS por las mitocondrias y NADPH oxidasa en los islotes [154-157]. Las mitocondrias son críticamente importantes para la secreción de insulina estimulada por glucosa y un orgánulo muy activo en las células- β . Los defectos en su función y morfología se observan con frecuencia en la DM2 y dan lugar a estrés oxidativo [158]. ROS es una señal fuerte para provocar la respuesta pro-inflamatoria tanto en las células

inmunes y células no inmunes; además, ROS es una vía potencial de conectar el estrés metabólico e inflamación en lactancia inicial en la cual los islotes través de la activación de JNK, p38-MAPK, NFκB, y AP-1 y la posterior producción de citoquinas incluyendo IL-1β, TNF-α y CCL2 pueden inducir la progresión en la muerte celular y por ende la recuperación en el tamaño original de los islotes pancreáticos y de la misma manera la normo secreción insulínica, recuperación de la sensibilidad a la hormona y la eliminación de la resistencia generada periféricamente a la misma [159, 160]. En efecto, en el presente trabajo se pudo observar la recuperación de la cantidad de insulina producida por las células-β al final del estudio, es decir, en el día 21 de lactancia. Así mismo, el decremento de la viabilidad de células-β pudo observarse, siendo el día 21 de lactancia el de mayor significancia (figuras 32 y gráfico 33).

10. Conclusiones

Durante la gestación y lactancia ocurren adaptaciones a nivel de las células- β ; como respuesta a los cambios metabólicos y hormonales. En la primera etapa el tamaño de los islotes pancreáticos aumentó un 92%, las células presentes mostraron hiperplasia e hipertrofia; en contraste con la lactancia, donde se registraron condiciones similares a los no gestantes.

Dichas adecuaciones celulares inducen una dinámica celular beta compensadora que lleva a la sobre producción insulínica durante la gestación, y que durante la lactancia favorecen a que la secreción de insulina y manejo de carbohidratos retornen a condiciones similares de no gestantes.

Durante ambas etapas los niveles de glucosa varían, en la gestación se observó un manejo deficiente de la glucosa, registrando un aumento de los niveles un 7% de la glucosa basal, sin embargo es al minuto 15 donde se evidencia un mayor impacto en la captación de glucosa por parte de los tejidos no dependientes, ya que los valores aumentan un 18%. En cuanto a la lactancia, el manejo de glucosa se vuelve más eficaz, lo que favorece que los niveles regresen a condiciones de un no gestante.

El incremento en la concentración de glucosa en sangre parece estar vinculado con el desarrollo de resistencia a insulina durante la fisiología natural en la gestación. Por otro lado, en la lactancia pese a que los requerimientos energéticos de los recién nacidos son más demandantes, la resistencia a la insulina desaparece.

Finalmente podemos concluir que existe una dinámica morfológica resultante del requerimiento metabólico, lo cual lleva a adaptaciones de la secreción insulínica que se hayan en respuesta de cada uno de los estadios evaluados, siendo así que, durante la gestación se presenta resistencia a la insulina y por lo tanto un mayor número de células- β pancreáticas fueron observadas, así como una mayor síntesis de insulina. Mientras que la fisiología de la lactancia con lleva a la desaparición de estado resistente a la hormona, un menor número de células- β pancreáticas y un mejor manejo de glucosa por el sistema.

11. Anexos

Tinción hematoxilina-eosina

La tinción se realizó de la siguiente forma.

Desparafinación y rehidratación de los tejidos:

- 1 lavado en xilol por 10 min.
- 15 lavados consecutivos en xilol.
- 15 lavados consecutivos en xilol-etanol.
- 15 lavados consecutivos en etanol al 100%.
- 15 lavados consecutivos en etanol al 100%.
- 15 lavados consecutivos en etanol al 96%.
- 15 lavados consecutivos en etanol al 96%.
- 15 lavados consecutivos en agua destilada.

Tinción

- Teñir con hematoxilina por 6 minutos.
- Lavado con agua, retirar la laminilla hasta que el agua ya no sea turbia por la hematoxilina.
- 1 lavado con carbonato de litio, el tejido vira de morado a azul.
- 1 lavado con agua.
- Tinción con eosina de 1 a 2 min.
- Enjuagues con agua, procurando que el chorro de agua no caiga directamente sobre el tejido.

Deshidratación

- 2 rondas de 15 lavados consecutivos en etanol al 96%.
- 2 rondas de 15 lavados consecutivos en etanol al 100%.
- 15 lavados consecutivos en xilol-etanol.
- 2 lavados en xilol.
- Colocar de 2 a 3 gotas de resina sobre la laminilla.

- Por último colocar el cubreobjetos sobre el tejido, evitando la formación de burbujas.

Análisis de islotes pancreáticos

Para realizar la medición del área del islote pancreático, lo primero que se hace es abrir la imagen en el programa **Image J 1.40** (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD). Una vez abierta la imagen se comienza a seleccionar la región de interés (ROI), que consiste en trazar el contorno del islote como se muestra en la figura 32 con la opción de selección poligonal, cada una de estas selecciones se guardó con el nombre correspondiente de cada islote para posteriormente medir cada uno de ellos.

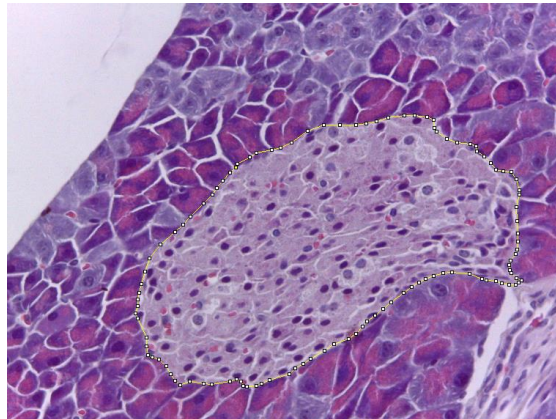


Figura 34. Islote a 20x; línea amarilla delimita el islote pancreático del acinar (ROI).

Al seleccionar el ROI de todas las imágenes se ingresa la escala al programa, es decir, la cantidad de pixeles equivalentes a una micra, dicha escala es propia de cada microscopio, en este caso la escala es de 2.463 (figura 33).

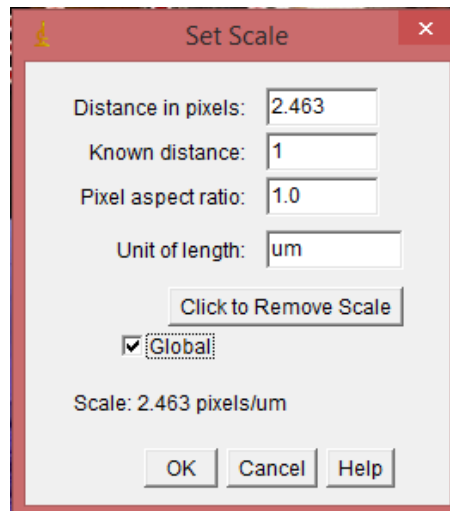


Figura 35. Cuadro donde se ingresan los datos de la escala.

Para poder medir cada islote, se abre la imagen con su ROI correspondiente, y posteriormente se selecciona la opción “Measure”, obteniendo las medidas en μ^2 ; estos datos se copiaron en una hoja de excell, para posteriormente ser analizados con el software Graph Pad Prism (AbacusConcepts, Berkeley, CA, USA) y obtener su gráfico.

En el caso del número de células, una vez seleccionado el ROI, con el plugin “ITCN” se contabilizó todas las células presentes en cada uno de los islotes del corte, para obtener al final el número de núcleos promedio por islote en cada grupo.

Inmunofluorescencia

Día 1

Desparafinación y rehidratación

- 2 lavados con Xilol por 3 minutos
- 1 lavado con etanol al 100% por 4 minutos
- 1 lavado con etanol al 96% por 4 minutos
- 1 lavado con etanol al 80% por 4 minutos
- 1 lavado con etanol al 70% por 4 minutos

- 1 lavado con etanol al 50% por 4 minutos
- 1 lavado con PBS 1X por 4 minutos
- Baño a 90°C con buffer de citrato por 15 minutos.
- Posterior al baño, dejar enfriar el buffer de citrato por 20 minutos.
- 3 lavados con PBS al 1X por 5 minutos.
- Dibujar una zona hidrófoba alrededor del tejido con PAP pen (Sigma Aldrich).
- Agregar por cada tejido 40 μ l de buffer de perforación e incubar en cámara húmeda por 45 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar anticuerpos primarios Insulina (1:150, Sigma) y Glucagón (1:4500, Sigma), 40 μ l por cada tejido, e incubar en cámara húmeda por 24 horas a 4°C.

Día 2

- Realizar 3 lavados con Suero normal de cabra al 1% (SNC1%) por 5 minutos cada uno.

A partir de este paso, las laminillas se manipulan en un lugar con poca luz.

- Incubar con 40 μ l por cada tejido con anticuerpos secundarios acoplados a FITC (1:200, Jackson) y Cy3 (1:800, Jackson) por una hora a temperatura ambiente.
- Realizar 3 lavados con PBS 1X por 5 minutos cada uno.
- Teñir núcleos con 40 μ l de DAPI (DAPI Sigma) por tejido e incubar por 5 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Agregar una gota por tejido de medio de montaje para fluorescencia (Dako) y colocar por último el cubreobjeto, procurando que no queden burbujas en el interior.
- Sellar las laminillas con barniz.
- Guardar laminillas en un lugar obscuro.

Análisis de área de células α y β

La medición del área de células- α y β en el islote, se procedió de la siguiente manera. Una imagen está compuesta de tres canales, verde (insulina), rojo (glucagon) y azul (DAPI) (figura 34), cuando las tres imágenes están unidas se le conoce como “color combine”, cuando separamos la imagen en sus tres canales se realiza un “Split channels”.

Abrimos la imagen con el programa de **Image J 1.40** (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD).

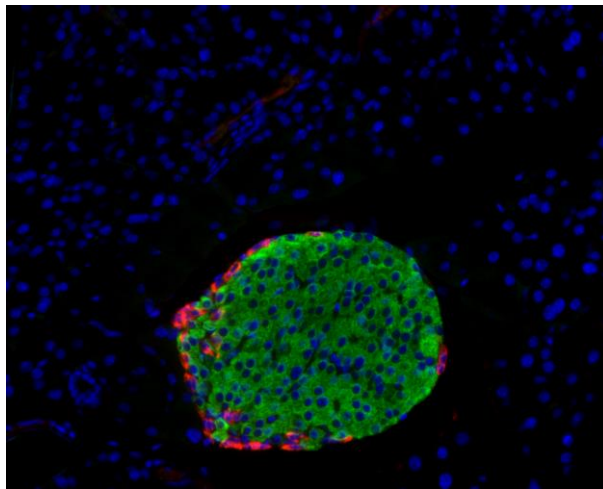


Figura 36. Islote a 20x; dicha imagen está compuesta por tres canales, rojo (glucagon), verde (insulina) y azul (DAPI).

Posteriormente se realiza un Split channels, y se procede a seleccionar el ROI del canal de insulina (figura 35A), este ROI se guarda con el nombre que deseemos; y después se selecciona el ROI del canal de glucagon (figura 35B), guardando dicha selección. Una vez seleccionadas las áreas, se ingresa la escala, este microscopio maneja que 2.75 pixeles equivalen a una μ ; posteriormente con el plugin “measure” se obtuvieron las medidas en unidades de μ^2 .

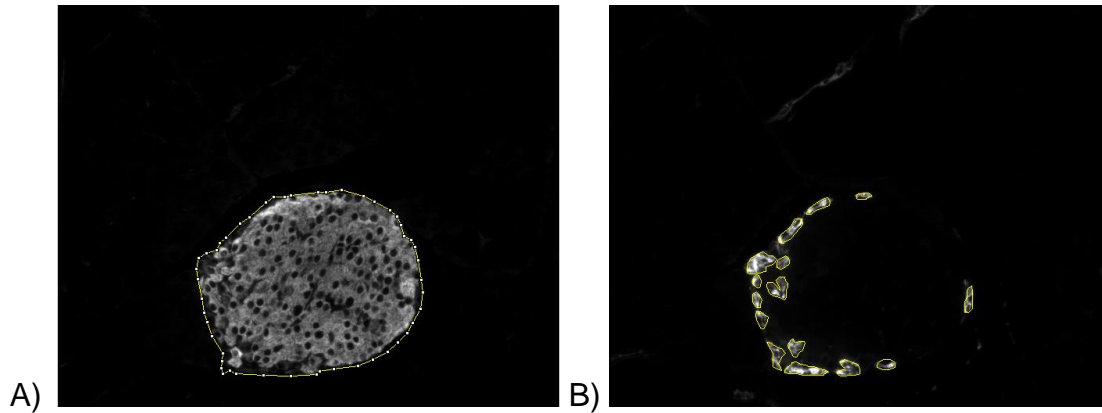


Figura 37. Split channels de un islote pancreático a 20x. A) área positiva a insulina. B) área positiva a glucagon.

Para obtener el número de núcleos de cada área, primero se abrió el ROI del área de insulina y se seleccionó el plugin “ITCN”, el cual contabiliza los núcleos que se encuentran en el área seleccionada, por último se abrió el ROI del área de glucagon y se contabilizaron los núcleos presentes en esta área con el mismo plugin.

Tras obtener los datos anteriores, se calculó el área individual promedio de cada célula.

$$\text{Área individual de célula-}\beta = \frac{\text{área de célula-}\beta}{\text{número de núcleos en el área de célula-}\beta}$$

Contenido de insulina en células- β

Para realizar este análisis utilizamos las mismas imágenes del análisis anterior, considerando únicamente el canal de insulina. Se eligió una imagen y a partir de ella se seleccionaron 5 áreas distintas, empezando por aquella cuya intensidad de color fuese más encendida, hasta seleccionar un área completamente negra; cada una de estas áreas correspondía a un 100% de la intensidad del marcaje, un 75%, 50%, 25% y 0%. Después de seleccionar las áreas pasamos estas imágenes a 8 bits y con el plugin de calibrar realizamos una regresión lineal (figura 38).

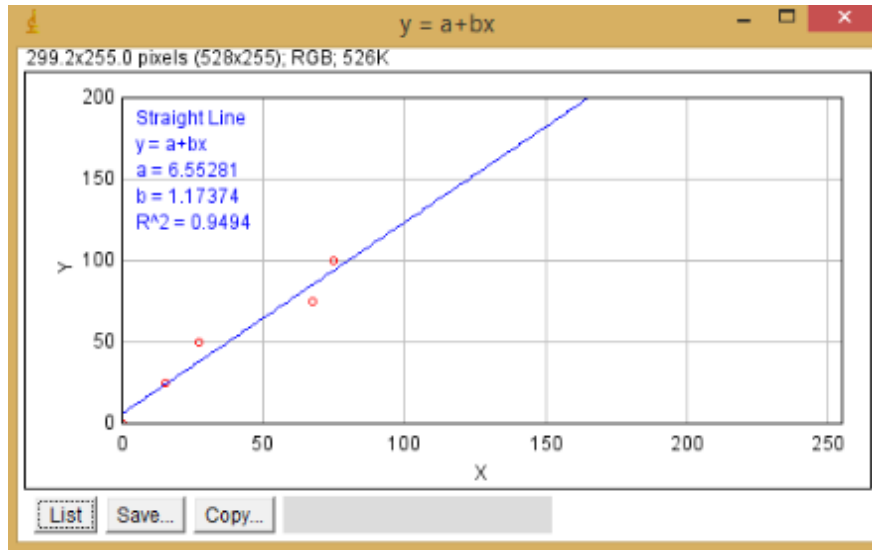


Figura 38. Regresión lineal para la cuantificación de insulina.

Una vez obtenidos estos datos se midió la intensidad de marcaje de insulina para cada islote, a los resultados obtenidos se aplicó la siguiente fórmula $Y = mx + b$. Al final graficamos el promedio de insulina almacenada de acuerdo al marcaje en cada islote.

Análisis de tejidos pancreáticos

El análisis del área del tejido se realizó en dos partes, la primera consistió en limpiar el ruido de fondo presente en la imagen, ya que de lo contrario, al medir el tejido se considerarían píxeles no pertenecientes. Dicha etapa se realizó en el programa GIMP 2 (Image Manipulation Program), con la ayuda de la herramienta de borrador se eliminó el ruido de fondo, al finalizar se guardó la imagen con el nombre correspondiente. La segunda etapa se realizó con el programa **Image J 1.40** (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD). Lo primero que se realizó una vez abierta la imagen fue pasarla a 8 bit ajustando el threshold a 1 y de esta manera obtuvimos una imagen en blanco y negro (Figura 36). Al tener estas características la imagen, se procedió a ingresar la escala de 0.13μ por pixel y posteriormente cuantificar como en los casos anteriores con el plugin “measure”.



Figura 38. Tejido a 4x, imagen a 8 bits.

A partir de los anteriores datos se calculó la densidad del islote (número de islotes/mm²) [161, 162].

$$\text{Densidad del islote} = \frac{\text{número de islotes por tejido}}{\text{área de tejido en mm}^2}$$

Viabilidad celular

Día 1

Desparafinación y rehidratación

- 2 lavados con Xilol por 3 minutos
- 1 lavado con etanol al 100% por 4 minutos
- 1 lavado con etanol al 96% por 4 minutos
- 1 lavado con etanol al 80% por 4 minutos
- 1 lavado con etanol al 70% por 4 minutos
- 1 lavado con etanol al 50% por 4 minutos

- 1 lavado con PBS 1X por 4 minutos
- Baño a 90°C con buffer de citrato por 15 minutos.
- Posterior al baño, dejar enfriar el buffer de citrato por 20 minutos.
- 3 lavados con PBS al 1X por 5 minutos.
- Dibujar una zona hidrófoba alrededor del tejido con PAP pen (Sigma Aldrich).
- Agregar por cada tejido 40 µl de buffer de perforación e incubar en cámara húmeda por 45 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar anticuerpo primario de Insulina (1:600, Alexa) e incubar en cámara húmeda por 24 horas a 4°C.

Día 2

- Realizar 3 lavados con Suero normal de cabra al 1% (SNC1%) por 5 minutos cada uno.

A partir de este paso, las laminillas se manipulan en un lugar con poca luz.

- Incubar con 40 µl por cada tejido con anticuerpo secundario acoplado a FITC (1:200, Jackson) por una hora a temperatura ambiente.
- Realizar 3 lavados con PBS 1X por 5 minutos cada uno.
- Teñir núcleos con 40 µl de DAPI (DAPI Sigma) por tejido e incubar por 5 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Agregar 10 µl de Ioduro de propidio a cada tejido y colocar inmediatamente el cubreobjeto, procurando que no queden burbujas en el interior.
- Sellar las laminillas con barniz.
- Guardar laminillas en un lugar oscuro.

Análisis de viabilidad

Una vez capturadas las imágenes, se procedió a seleccionar el ROI como en las imágenes de inmunofluorescencias empleando el programa **Image J 1.40** (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD); una

vez seleccionado el ROI dicha selección se guardó con el nombre correspondiente; posteriormente se cuantificó el número de células totales en el islote con el plugin ITCN. En el caso de las células no viables se cuantificaron aquellas células cuya coloración fuese morada o roja (figura 37).

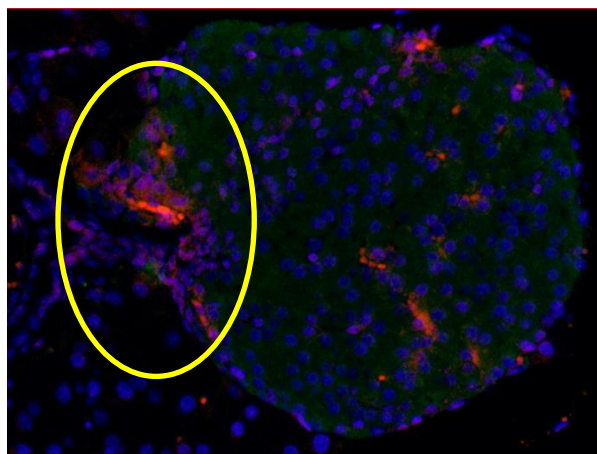


Figura 39. Islote pancreático a 20x teñido con insulina (verde), ioduro de propidio (rojo), DAPI (azul). Dentro del ovalo amarillo se encuentran algunas de las células que se consideraron no viables, su coloración es morada u roja.

Cálculos

Para conocer el porcentaje de viabilidad de cada islote, se realizó una regla de tres; tomando el número total de células en el islote como el 100%; a partir del porcentaje obtenido cada uno de los islotes fueron asignados a una de las 5 categorías de acuerdo a los siguientes criterios [64, 163]:

Categoría	Criterios	Porcentaje de viabilidad
0	La mayoría de células son rojas	0%
1	Aproximadamente 75% de células son rojas	25%
2	Aproximadamente 50% de células rojas	50%
3	Aproximadamente 25% de células roja	75%
4	Pocas o ninguna célula roja	100%

Tabla 40. Criterios para clasificar los islotes de acuerdo a su viabilidad.

Por último se calculó el porcentaje de viabilidad de cada grupo con las ecuaciones siguientes:

- **Viabilidad total** = $0.25 (\text{Total de categoría 1}) + 0.5 (\text{Total de categoría 2}) + 0.75 (\text{Total de categoría 3}) + (\text{Total de categoría 4})$
- **Número total de islotes** = Total de islotes de todas las categorías
- **Porcentaje de viabilidad** = $(\text{Viabilidad total} \times 100) / \text{Número total de islotes}$

12. Bibliografía

1. Slack JM: **Developmental biology of the pancreas.** *Development* 1995, **121**(6):1569-1580.
2. Wang X, Misawa R, Zielinski MC, Cowen P, Jo J, Periwal V, Ricordi C, Khan A, Szust J, Shen J *et al*: **Regional differences in islet distribution in the human pancreas--preferential beta-cell loss in the head region in patients with type 2 diabetes.** *PloS one* 2013, **8**(6):e67454.
3. Whitcomb D, Lowe M: **Human Pancreatic Digestive Enzymes.** *Digestive diseases and sciences* 2007, **52**(1):1-17.
4. Rieck S, Kaestner KH: **Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy.** *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2010, **21**(3):151-158.
5. Bouwens L, Rooman I: **Regulation of pancreatic beta-cell mass.** *Physiological reviews* 2005, **85**(4):1255-1270.
6. Brissova M, Powers A: **Architecture of Pancreatic Islets.** In: *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease.* edn. Edited by Seino S, Bell G: Springer Japan; 2008: 3-11.
7. Mirmira RG KR: **Metabolic Syndrome Poster: Pancreatic islet function during normal metabolic physiology.** 2010.
8. Suckale J, Solimena M: **The insulin secretory granule as a signaling hub.** *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2010, **21**(10):599-609.
9. Fu Z, Gilbert ER, Liu D: **Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes.** *Current diabetes reviews* 2013, **9**(1):25-53.
10. DeFronzo RA, Tripathy D: **Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes.** *Diabetes care* 2009, **32**(Suppl 2):S157-S163.
11. Chandra R, Liddle RA: **Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion.** *Current opinion in gastroenterology* 2009, **25**(5):441-446.
12. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA: **Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation.** *Nature* 2004, **429**(6987):41-46.
13. FC S: **Is GLUT2 required for glucose sensing?** *Diabetologia* 1997, **40**:104-111.
14. Matschinsky FM: **Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm.** *Diabetes* 1996, **45**(2):223-241.
15. Gloyn AL, Tribble ND, van de Bunt M, Barrett A, Johnson PR: **Glucokinase (GCK) and other susceptibility genes for beta-cell dysfunction: the candidate approach.** *Biochemical Society transactions* 2008, **36**(Pt 3):306-311.
16. Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, Matsui J, Suzuki R, Komeda K, Hara A, Toyoda Y, Miwa I, Aizawa S *et al*: **Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance.** *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(1):246-257.
17. Aguilar-Bryan L, Clement JPt, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J: **Toward understanding the assembly and structure of KATP channels.** *Physiological reviews* 1998, **78**(1):227-245.
18. Rorsman P, Renstrom E: **Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells.** *Diabetologia* 2003, **46**(8):1029-1045.
19. Migliorini A, Bader E, Lickert H: **Islet cell plasticity and regeneration.** *Mol Metab* 2014, **3**(3):268-274.
20. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: **Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes.** *Diabetes* 2003, **52**(1):102-110.

21. Rieck S, White P, Schug J, Fox AJ, Smirnova O, Gao N, Gupta RK, Wang ZV, Scherer PE, Keller MP *et al*: **The transcriptional response of the islet to pregnancy in mice.** *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 2009, **23**(10):1702-1712.
22. Ferrer J, Martin M, Servitja JM: **Putting pancreatic cell plasticity to the test.** *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(4):859-862.
23. Bringhenti I, Moraes-Teixeira JA, Cunha MR, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB: **Maternal obesity during the preconception and early life periods alters pancreatic development in early and adult life in male mouse offspring.** *PLoS one* 2013, **8**(1):e55711.
24. Freemark M: **Regulation of maternal metabolism by pituitary and placental hormones: roles in fetal development and metabolic programming.** *Hormone research* 2006, **65** Suppl 3:41-49.
25. Catalano PM: **Pregnancy and lactation in relation to range of acceptable carbohydrate and fat intake.** *European journal of clinical nutrition* 1999, **53** Suppl 1:S124-131; discussion S131-125.
26. Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Del Prato S: **Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes.** *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2003, **19**(4):259-270.
27. Drasutiene GS, Tutkuvienė J, Zakareviciene J, Ramasauskaite D, Kasilovskiene Z, Lauzikiene D, Drazdiene N, Barkus A, Arlauskiene A, Drasutis J: **[Changes in anthropometric and metabolic parameters in pregnancy and neonatal physical development during last decades].** *Medicina* 2007, **43**(1):10-26.
28. Al-Noaemi M SM: **Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus: The Past, the Present and the Future, Gestational Diabetes.** 2011.
29. Lain KY, Catalano PM: **Metabolic changes in pregnancy.** *Clinical obstetrics and gynecology* 2007, **50**(4):938-948.
30. Ernst S, Demirci C, Valle S, Velazquez-Garcia S, Garcia-Ocaña A: **Mechanisms in the adaptation of maternal β -cells during pregnancy.** *Diabetes management (London, England)* 2011, **1**(2):239-248.
31. Aerts L, Van Assche FA: **Intra-uterine transmission of disease.** *Placenta* 2003, **24**(10):905-911.
32. Sorenson RL, Brelje TC: **Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones.** *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 1997, **29**(6):301-307.
33. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL: **Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion.** *Endocrinology* 1992, **130**(3):1459-1466.
34. Amaral ME, Ueno M, Carvalheira JB, Carneiro EM, Velloso LA, Saad MJ, Boschero AC: **Prolactin-signal transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-signaling pathway.** *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2003, **35**(5):282-289.
35. Freemark M, Avril I, Fleenor D, Driscoll P, Petro A, Opara E, Kendall W, Oden J, Bridges S, Binart N *et al*: **Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance.** *Endocrinology* 2002, **143**(4):1378-1385.
36. Vasavada RC, Garcia-Ocana A, Zawalich WS, Sorenson RL, Dann P, Syed M, Ogren L, Talamantes F, Stewart AF: **Targeted expression of placental lactogen in the beta cells of transgenic mice results in beta cell proliferation, islet mass augmentation, and hypoglycemia.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(20):15399-15406.

37. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW: **What can we learn from rodents about prolactin in humans?** *Endocrine reviews* 2008, **29**(1):1-41.
38. Karnik SK, Chen H, McLean GW, Heit JJ, Gu X, Zhang AY, Fontaine M, Yen MH, Kim SK: **Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus.** *Science* 2007, **318**(5851):806-809.
39. Ramos-Roman MA: **Prolactin and lactation as modifiers of diabetes risk in gestational diabetes.** *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2011, **43**(9):593-600.
40. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Ropero AB, Quesada I: **The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance.** *The Journal of physiology* 2009, **587**(Pt 21):5031-5037.
41. Burnol AF, Leturque A, Ferre P, Kande J, Girard J: **Increased insulin sensitivity and responsiveness during lactation in rats,** vol. 251; 1986.
42. Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S: **Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas.** *Endocrinology* 1995, **136**(12):5461-5468.
43. Lombardo MF, De Angelis F, Bova L, Bartolini B, Bertuzzi F, Nano R, Capuani B, Lauro R, Federici M, Lauro D *et al*: **Human placental lactogen (hPL-A) activates signaling pathways linked to cell survival and improves insulin secretion in human pancreatic islets.** *Islets* 2011, **3**(5):250-258.
44. Avril I, Blondeau B, Duchene B, Czernichow P, Breant B: **Decreased beta-cell proliferation impairs the adaptation to pregnancy in rats malnourished during perinatal life.** *The Journal of endocrinology* 2002, **174**(2):215-223.
45. Weinhaus AJ, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL: **Dexamethasone Counteracts the Effect of Prolactin on Islet Function: Implications for Islet Regulation in Late Pregnancy.** *Endocrinology* 2000, **141**(4):1384-1393.
46. Catalano PM, Kirwan JP, Haugel-de Mouzon S, King J: **Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus.** *The Journal of nutrition* 2003, **133**(5 Suppl 2):1674s-1683s.
47. Shao J, Catalano PM, Yamashita H, Ruyter I, Smith S, Youngren J, Friedman JE: **Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprotein-1 overexpression in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus (GDM): evidence for increased serine/threonine phosphorylation in pregnancy and GDM.** *Diabetes* 2000, **49**(4):603-610.
48. Culha C, Gorar S, Demir Y, Serter R, Aral Y: **The Importance of Serum Adiponectin Concentrations during Pregnancy and Postpartum Period in Women with Gestational Diabetes Mellitus.** *Acta Endocrinologica (Buc)* 2011, **7**(2):173-187.
49. Sorenson RL, Brelje TC, Roth C: **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* 1993, **133**(5):2227-2234.
50. Kirwan JP, Haugel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM: **TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy.** *Diabetes* 2002, **51**(7):2207-2213.
51. Liu LX, Arany Z: **Maternal cardiac metabolism in pregnancy,** vol. 101; 2014.
52. Cambraia RPB, Vannucchi H, De-Oliveira LM: **Food intake and weight of lactating rats maintained on different protein-calorie diets, and pup growth.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1997, **30**:985-988.
53. Birk RZ, Regan KS, Brannon PM: **Lactation decreases pancreatic lipase mRNA level in the rat.** *The British journal of nutrition* 2005, **94**(6):885-889.

54. Koiter TR, Moes H, Valkhof N, Wijkstra S: **Interaction of late pregnancy and lactation in rats.** *Journal of reproduction and fertility* 1999, **115**(2):341-347.
 55. Yoshida M: **Strain Differences in Behaviours of Lactating Mice.** *Nihon Chikusan Gakkaiho* 1978, **49**(6):437-443.
 56. Lellis-Santos C, Sakamoto LH, Bromati CR, Nogueira TC, Leite AR, Yamanaka TS, Kinote A, Anhe GF, Bordin S: **The regulation of Rasd1 expression by glucocorticoids and prolactin controls peripartum maternal insulin secretion.** *Endocrinology* 2012, **153**(8):3668-3678.
 57. Bromati CR, Lellis-Santos C, Yamanaka TS, Nogueira TC, Leonelli M, Caperuto LC, Gorjao R, Leite AR, Anhe GF, Bordin S: **UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3 expression.** *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2011, **300**(1):R92-100.
 58. Svensson AM, Bodin B, Andersson A, Jansson L: **Pancreatic islet blood flow during pregnancy in the rat: an increased islet mass is associated with decreased islet blood flow.** *The Journal of endocrinology* 2004, **180**(3):409-415.
 59. Bonner-Weir S: **Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth.** *Endocrinology* 2000, **141**(6):1926-1929.
 60. Jager S, Jacobs S, Kroger J, Fritsche A, Schienkiewitz A, Rubin D, Boeing H, Schulze MB: **Breast-feeding and maternal risk of type 2 diabetes: a prospective study and meta-analysis.** *Diabetologia* 2014, **57**(7):1355-1365.
 61. Gunderson EP, Lewis CE, Wei GS, Whitmer RA, Quesenberry CP, Sidney S: **Lactation and Changes in Maternal Metabolic Risk Factors.** *Obstetrics and gynecology* 2007, **109**(3):729-738.
 62. Oliver Roig A: **La duración de la lactancia materna se asocia a un menor riesgo de infarto de miocardio entre la mediana edad y finales de la edad adulta.** *Enfermería Clínica* 2009, **19**(04):231-232.
 63. Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, Butler PC: **Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy.** *Diabetologia* 2010, **53**(10):2167-2176.
 64. Karaoz E, Genc ZS, Demircan PC, Aksoy A, Duruksu G: **Protection of rat pancreatic islet function and viability by coculture with rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** *Cell death & disease* 2010, **1**:e36.
 65. Riccardi C, Nicoletti I: **Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.** *Nat Protocols* 2006, **1**(3):1458-1461.
 66. Buchanan TA: **Glucose metabolism during pregnancy: normal physiology and implications for diabetes mellitus.** *Israel journal of medical sciences* 1991, **27**(8-9):432-441.
 67. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV: **Leptin: the tale of an obesity gene.** *Diabetes* 1996, **45**(11):1455-1462.
 68. Sørensen TI, Echwald S, Holm JC: **Leptin in obesity.** *BMJ : British Medical Journal* 1996, **313**(7063):953-954.
 69. Hytten F CG: **Total Amount and Pattern of Weight Gain: Physiologic and Maternal Determinants**
- 2edn: Blackwell Scientific Publications; 1980.
70. Goldberg GR, Prentice AM, Coward WA, Davies HL, Murgatroyd PR, Wensing C, Black AE, Harding M, Sawyer M: **Longitudinal assessment of energy expenditure in pregnancy by the doubly labeled water method.** *The American journal of clinical nutrition* 1993, **57**(4):494-505.

71. King JC, Butte NF, Bronstein MN, Kopp LE, Lindquist SA: **Energy metabolism during pregnancy: influence of maternal energy status.** *The American journal of clinical nutrition* 1994, **59**(2 Suppl):439s-445s.
72. Sattar N, Greer IA, Pirwani I, Gibson J, Wallace AM: **Leptin levels in pregnancy: marker for fat accumulation and mobilization?** *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 1998, **77**(3):278-283.
73. Retnakaran R, Hanley AJ, Sermer M, Zinman B: **The impact of insulin resistance on proinsulin secretion in pregnancy: hyperproinsulinemia is not a feature of gestational diabetes.** *Diabetes care* 2005, **28**(11):2710-2715.
74. J P: **Diabetes and pregnancy: blood sugar of newborn infants.** *PhD thesis.* Copenhagen: Danish Science Press.
75. Catalano PM, McIntyre HD, Cruickshank JK, McCance DR, Dyer AR, Metzger BE, Lowe LP, Trimble ER, Coustan DR, Hadden DR *et al*: **The hyperglycemia and adverse pregnancy outcome study: associations of GDM and obesity with pregnancy outcomes.** *Diabetes care* 2012, **35**(4):780-786.
76. Black MH, Sacks DA, Xiang AH, Lawrence JM: **The relative contribution of prepregnancy overweight and obesity, gestational weight gain, and IADPSG-defined gestational diabetes mellitus to fetal overgrowth.** *Diabetes care* 2013, **36**(1):56-62.
77. Kim SY, Sharma AJ, Sappenfield W, Wilson HG, Salihu HM: **Association of maternal body mass index, excessive weight gain, and gestational diabetes mellitus with large-for-gestational-age births.** *Obstetrics and gynecology* 2014, **123**(4):737-744.
78. Kulkarni SR, Kumaran K, Rao SR, Chougule SD, Deokar TM, Bhalerao AJ, Solat VA, Bhat DS, Fall CH, Yajnik CS: **Maternal lipids are as important as glucose for fetal growth: findings from the Pune Maternal Nutrition Study.** *Diabetes care* 2013, **36**(9):2706-2713.
79. Freinkel N: **Banting Lecture 1980. Of pregnancy and progeny.** *Diabetes* 1980, **29**(12):1023-1035.
80. Emilio H, Henar O: **Metabolism in normal pregnancy.** In: *Textbook of Diabetes and Pregnancy, Second Edition.* edn.: CRC Press; 2008: 25-34.
81. Herrera E: **Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development--a review.** *Placenta* 2002, **23** Suppl A:S9-19.
82. Rao PNS, Shashidhar A, Ashok C: **In utero fuel homeostasis: Lessons for a clinician.** *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2013, **17**(1):60-68.
83. Hay WW: **Placental-Fetal Glucose Exchange and Fetal Glucose Metabolism.** *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2006, **117**:321-340.
84. Richard A. Polin WWF, Steven H. Abman: **Fetal and Neonatal Physiology**, 4 edn. Philadelphia; 2011.
85. Oakley NW, Beard RW, Turner RC: **Effect of Sustained Maternal Hyperglycaemia on the Fetus in Normal and Diabetic Pregnancies.** *British Medical Journal* 1972, **1**(5798):466-469.
86. ST. B: **Carbohydrate, fat and protein metabolism.** In: *Maternal, fetal, and neonatal physiology.* 2 edn. Edited by ST B. St Louis; 2003: 599-629.
87. Hay WW, Jr., Sparks JW: **Placental, fetal, and neonatal carbohydrate metabolism.** *Clinical obstetrics and gynecology* 1985, **28**(3):473-485.
88. Hay WW J, Anderson MS: **Fuel homeostasis in the fetus and neonate.** In: *Endocrinology.* edn. Edited by Degroot LJ JL. Philadelphia; 2005: 3387-3405.
89. Bell AW, Bauman DE: **Adaptations of Glucose Metabolism During Pregnancy and Lactation.** *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **2**(3):265-278.

90. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE: **Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes.** *Diabetes care* 2007, **30 Suppl 2**:S112-119.
91. Altinova AE, Toruner F, Bozkurt N, Bukan N, Karakoc A, Yetkin I, Ayvaz G, Cakir N, Arslan M: **Circulating concentrations of adiponectin and tumor necrosis factor-alpha in gestational diabetes mellitus.** *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 2007, **23**(3):161-165.
92. Winzer C, Wagner O, Festa A, Schneider B, Roden M, Bancher-Todesca D, Pacini G, Funahashi T, Kautzky-Willer A: **Plasma adiponectin, insulin sensitivity, and subclinical inflammation in women with prior gestational diabetes mellitus.** *Diabetes care* 2004, **27**(7):1721-1727.
93. Heitritter SM, Solomon CG, Mitchell GF, Skali-Ounis N, Seely EW: **Subclinical inflammation and vascular dysfunction in women with previous gestational diabetes mellitus.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2005, **90**(7):3983-3988.
94. Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B: **Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2003, **285**(3):E527-533.
95. Dahlgren J: **Pregnancy and Insulin Resistance.** 2006, **4**:149-152. .
96. Munoz-Cruz S, Togno-Pierce C, Morales-Montor J: **Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role.** *Current topics in medicinal chemistry* 2011, **11**(13):1714-1727.
97. G. Banos VG, M. El Hafidi and I Perez-Torres.: **Sex Hormones, Metabolic Syndrome and Kidney.** In: *Current topics in medicinal chemistry. Volume 11*, edn.; 2011: 1694-1705.
98. Francisco Jimenez-Trejo M, CaSM: **Sex Steroids Effects in Normal Endocrine Pancreatic Function and Diabetes** In: *Current topics in medicinal chemistry. Volume 11*, edn.; 2011: 1728-1735.
99. Falbo A, Rocca M, Russo T, D'Ettore A, Tolino A, Zullo F, Orio F, Palomba S: **Changes in androgens and insulin sensitivity indexes throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): relationships with adverse outcomes.** *Journal of Ovarian Research* 2010, **3**:23-23.
100. Jana Vrbikova SS, Karel Vondra, Katerina Zajickova, Luboslav Starka: **Insulin Resistance in Endocrine Disorders.** In: *Insulin Resistance new research.* edn. Edited by Yao EB. New York 2009: 1-47.
101. Vejrazkova D, Vcelak J, Vankova M, Lukasova P, Bradnova O, Halkova T, Kancheva R, Bendlova B: **Steroids and insulin resistance in pregnancy.** *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2014, **139**:122-129.
102. Picard F, Wanatabe M, Schoonjans K, Lydon J, O'Malley BW, Auwerx J: **Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to beta -cell proliferation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(24):15644-15648.
103. Darcy Barry Carr M, and Steven Gabbe: **Gestational Diabetes: Detection, Management, and Implications.** In: *CLINICAL DIABETES.* 1998: 1-17.
104. Branisteanu DD, Mathieu C: **Progesterone in gestational diabetes mellitus: guilty or not guilty?** *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2003, **14**(2):54-56.
105. Catalano PM, Tyzbit ED, Wolfe RR, Calles J, Roman NM, Amini SB, Sims EA: **Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes.** *The American journal of physiology* 1993, **264**(1 Pt 1):E60-67.

106. Carver TD, Anderson SM, Aldoretta PA, Esler AL, Hay WW, Jr.: **Glucose suppression of insulin secretion in chronically hyperglycemic fetal sheep.** *Pediatric research* 1995, **38**(5):754-762.
107. Limesand SW, Rozance PJ, Zerbe GO, Hutton JC, Hay WW, Jr.: **Attenuated insulin release and storage in fetal sheep pancreatic islets with intrauterine growth restriction.** *Endocrinology* 2006, **147**(3):1488-1497.
108. Much D, Beyerlein A, Roßbauer M, Hummel S, Ziegler A-G: **Beneficial effects of breastfeeding in women with gestational diabetes mellitus.** *Molecular Metabolism* 2014, **3**(3):284-292.
109. Stuebe AM, Rich-Edwards JW: **The reset hypothesis: lactation and maternal metabolism.** *American journal of perinatology* 2009, **26**(1):81-88.
110. Mahler RJ: **The relationship between the hyperplastic pancreatic islet and insulin insensitivity in obesity.** *Acta diabetologica latina* 1981, **18**(1):1-17.
111. Georgia S, Bhushan A: **Pregnancy hormones boost beta cells via serotonin.** *Nat Med* 2010, **16**(7):756-757.
112. Pelengaris Stella MAK, ElenaTarabra **A simple matter of life and death : the trials of postnatal beta-cell mass regulation.** *International journal of endocrinology* 2012.
113. Cerf ME: **Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance.** *Frontiers in Endocrinology* 2013, **4**:37.
114. Cerf ME, Chapman CS, Louw J: **High-fat programming of hyperglycemia, hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperleptinemia, and altered islet architecture in 3-month-old wistar rats.** *ISRN endocrinology* 2012, **2012**:627270.
115. Jones HB, Nugent D, Jenkins R: **Variation in characteristics of islets of Langerhans in insulin-resistant, diabetic and non-diabetic-rat strains.** *International journal of experimental pathology* 2010, **91**(3):288-301.
116. Sachdeva MM, Claiborn KC, Khoo C, Yang J, Groff DN, Mirmira RG, Stoffers DA: **Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(45):19090-19095.
117. Kasuga M: **Insulin resistance and pancreatic β cell failure.** *Journal of Clinical Investigation* 2006, **116**(7):1756-1760.
118. 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*: **Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism.** *Cell metabolism* 2011, **13**(4):440-449.
119. Liu YQ, Montanya E, Leahy JL: **Increased islet DNA synthesis and glucose-derived lipid and amino acid production in association with beta-cell hyperproliferation in normoglycaemic 60 % pancreatectomy rats.** *Diabetologia* 2001, **44**(8):1026-1033.
120. Paris M, Bernard-Kargar C, Berthault MF, Bouwens L, Ktorza A: **Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats.** *Endocrinology* 2003, **144**(6):2717-2727.
121. Montanya E, Nacher V, Biarnes M, Soler J: **Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy.** *Diabetes* 2000, **49**(8):1341-1346.
122. Van Assche FA, Aerts L, De Prins F: **A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy.** *British journal of obstetrics and gynaecology* 1978, **85**(11):818-820.
123. Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S: **Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model.** *Diabetes* 1995, **44**(3):249-256.
124. Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA: **Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice.** *Diabetes* 2005, **54**(9):2557-2567.

125. Brennand K, Huangfu D, Melton D: **All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance.** *PLoS biology* 2007, **5**(7):e163.
126. Cnop M, Hughes SJ, Igoillo-Esteve M, Hoppa MB, Sayyed F, van de Laar L, Gunter JH, de Koning EJ, Walls GV, Gray DW *et al*: **The long lifespan and low turnover of human islet beta cells estimated by mathematical modelling of lipofuscin accumulation.** *Diabetologia* 2010, **53**(2):321-330.
127. Reers C, Erbel S, Esposito I, SchmieB, Buchler MW, Nawroth PP, Ritzel RA: **Impaired islet turnover in human donor pancreata with aging.** *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2009, **160**(2):185-191.
128. Butler PC, Meier JJ, Butler AE, Bhushan A: **The replication of beta cells in normal physiology, in disease and for therapy.** *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism* 2007, **3**(11):758-768.
129. Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, Rizza RA, Butler PC: **Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans.** *Diabetes* 2008, **57**(6):1584-1594.
130. Huang C, Snider F, Cross JC: **Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy.** *Endocrinology* 2009, **150**(4):1618-1626.
131. Pinzón CE, Serrano ML, Sanabria MC: **Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos.** *Revista Ciencias de la Salud* 2009, **7**:47-66.
132. Hemmings BA, Restuccia DF: **PI3K-PKB/Akt pathway.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2012, **4**(9):a011189.
133. Chakraborty C: **Biochemical and molecular basis of insulin resistance.** *Current protein & peptide science* 2006, **7**(2):113-121.
134. Rhodes C: **Regulation of Beta-Cell Growth and Death.** In: *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease.* edn. Edited by Seino S, Bell G: Springer Japan; 2008: 215-243.
135. Kaminski A, Kaminski ER, Morgan NG: **Pre-incubation with interleukin-4 mediates a direct protective effect against the loss of pancreatic beta-cell viability induced by proinflammatory cytokines.** *Clinical and experimental immunology* 2007, **148**(3):583-588.
136. Al-Maskari M, Al-Shukaili A, Al-Mammari A: **Pro-inflammatory cytokines in Omani type 2 diabetic patients presenting anxiety and depression.** *Iranian journal of immunology : IJI* 2010, **7**(2):124-129.
137. Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Ramirez B, Rotellar F, Pastor C, Silva C, Rodriguez A, Gil MJ, Cienfuegos JA, Fruhbeck G: **Proinflammatory cytokines in obesity: impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass.** *Obesity surgery* 2007, **17**(11):1464-1474.
138. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T: **A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis.** *Diabetologia* 2001, **44**(12):2115-2133.
139. Igoillo-Esteve M, Marselli L, Cunha DA, Ladriere L, Ortis F, Grieco FA, Dotta F, Weir GC, Marchetti P, Eizirik DL *et al*: **Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes.** *Diabetologia* 2010, **53**(7):1395-1405.
140. Jorns A, Gunther A, Hedrich HJ, Wedekind D, Tiedge M, Lenzen S: **Immune cell infiltration, cytokine expression, and beta-cell apoptosis during the development of type 1 diabetes in the spontaneously diabetic LEW.1AR1/Ztm-iddm rat.** *Diabetes* 2005, **54**(7):2041-2052.
141. Kang YS, Song HK, Lee MH, Ko GJ, Cha DR: **Plasma concentration of visfatin is a new surrogate marker of systemic inflammation in type 2 diabetic patients.** *Diabetes research and clinical practice* 2010, **89**(2):141-149.

142. Steinberg GR: **Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance.** *Cell cycle* 2007, **6(8)**:888-894.
143. Su SC, Pei D, Hsieh CH, Hsiao FC, Wu CZ, Hung YJ: **Circulating pro-inflammatory cytokines and adiponectin in young men with type 2 diabetes.** *Acta diabetologica* 2011, **48(2)**:113-119.
144. Tilg H, Moschen AR: **Inflammatory Mechanisms in the Regulation of Insulin Resistance.** *Molecular Medicine* 2008, **14(3-4)**:222-231.
145. Eizirik DL, Miani M, Cardozo AK: **Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation.** *Diabetologia* 2013, **56(2)**:234-241.
146. Rabinovitch A, Sumoski W, Rajotte RV, Warnock GL: **Cytotoxic effects of cytokines on human pancreatic islet cells in monolayer culture.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1990, **71(1)**:152-156.
147. Taylor-Fishwick DA, Weaver JR, Grzesik W, Chakrabarti S, Green-Mitchell S, Imai Y, Kuhn N, Nadler JL: **Production and function of IL-12 in islets and beta cells.** *Diabetologia* 2013, **56(1)**:126-135.
148. Weaver JR, Holman TR, Imai Y, Jadhav A, Kenyon V, Maloney DJ, Nadler JL, Rai G, Simeonov A, Taylor-Fishwick DA: **Integration of pro-inflammatory cytokines, 12-lipoxygenase and NOX-1 in pancreatic islet beta cell dysfunction.** *Molecular and cellular endocrinology* 2012, **358(1)**:88-95.
149. Taylor-Fishwick DA, Pittenger GL: **Harnessing the pancreatic stem cell.** *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 2010, **39(4)**:763-776.
150. Taylor-Fishwick DA, Pittenger GL, Vinik AI: **Transplantation and beyond.** *Drug Development Research* 2008, **69(3)**:165-176.
151. Marselli L, Thorne J, Dahiya S, Sgroi DC, Sharma A, Bonner-Weir S, Marchetti P, Weir GC: **Gene expression profiles of Beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes.** *PloS one* 2010, **5(7)**:e11499.
152. Pi J, Collins S: **Reactive oxygen species and uncoupling protein 2 in pancreatic beta-cell function.** *Diabetes, obesity & metabolism* 2010, **12 Suppl 2**:141-148.
153. Lenzen S: **Oxidative stress: the vulnerable beta-cell.** *Biochemical Society transactions* 2008, **36(Pt 3)**:343-347.
154. Koulajian K, Desai T, Liu GC, Ivovic A, Patterson JN, Tang C, El-Benna J, Joseph JW, Scholey JW, Giacca A: **NADPH oxidase inhibition prevents beta cell dysfunction induced by prolonged elevation of oleate in rodents.** *Diabetologia* 2013, **56(5)**:1078-1087.
155. Drews G, Krippeit-Drews P, Dufer M: **Oxidative stress and beta-cell dysfunction.** *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2010, **460(4)**:703-718.
156. Rolo AP, Palmeira CM: **Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress.** *Toxicology and applied pharmacology* 2006, **212(2)**:167-178.
157. Zraika S, Hull RL, Udayasankar J, Aston-Mourney K, Subramanian SL, Kisilevsky R, Szarek WA, Kahn SE: **Oxidative stress is induced by islet amyloid formation and time-dependently mediates amyloid-induced beta cell apoptosis.** *Diabetologia* 2009, **52(4)**:626-635.
158. Supale S, Li N, Brun T, Maechler P: **Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta cells.** *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2012, **23(9)**:477-487.
159. Lamb RE, Goldstein BJ: **Modulating an oxidative-inflammatory cascade: potential new treatment strategy for improving glucose metabolism, insulin resistance, and vascular function.** *International Journal of Clinical Practice* 2008, **62(7)**:1087-1095.

160. Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA, Tse HM: **The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013, **1281**:16-35.
161. Adeyemi DO, Komolafe OA, Adewole OS, Obuotor EM, Abiodun AA, Adenowo TK: **Histomorphological and morphometric studies of the pancreatic islet cells of diabetic rats treated with extracts of *Annona muricata*.** *Folia morphologica* 2010, **69**(2):92-100.
162. Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, Clemente G, Hu J, Pontecorvi A, Holst JJ, Giaccari A, Kulkarni RN: **Insulin resistance alters islet morphology in nondiabetic humans.** *Diabetes* 2014, **63**(3):994-1007.
163. Bank HL: **Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes.** *Diabetologia* 1987, **30**(10):812-816.