



**Universidad de Valladolid**



PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Tesis Doctoral

**Papel de la célula  $\delta$ -pancreática en la regulación de la homeostasis de la glucosa durante la gestación**

Presentado por: Arianna Carolina Goncalves Ramírez  
para optar por el grado de Doctora por la Universidad de Valladolid

Directores de tesis:

Irene Cózar Castellano, PhD

Germán M. Perdomo Hernández, PhD

Valladolid, España

2025

**“Uno de los grandes desafíos de la vida es saber lo suficiente sobre un tema para pensar que tienes razón, pero no lo suficiente para saber que estás equivocado”**

*— Neil deGrasse Tyson*

**“Las personas que están lo suficientemente locas como para pensar que pueden cambiar el mundo son las que lo hacen”**

*— Steve Jobs*

# Agradecimientos

---

# Índice

---

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	9
<b>Lista de figuras</b> .....	12
<b>Lista de tablas</b> .....	15
<b>Resumen</b> .....	16
<b>I. Introducción</b>	
1. Páncreas	
1.1. Aspectos morfológicos del páncreas.....	18
1.1.1. Anatomía.....	18
1.1.2. Histología y embriología.....	19
1.1.2.1. Páncreas exocrino.....	19
1.1.2.2. Páncreas endocrino.....	20
1.2. Aspectos funcionales del páncreas.....	22
1.2.1. Páncreas exocrino.....	22
1.2.2. Páncreas endocrino.....	22
1.2.2.1. Célula $\beta$ -pancreática.....	23
1.2.2.2. Célula $\alpha$ -pancreática.....	25
1.2.2.3. Célula $\delta$ -pancreática.....	26
1.2.2.4. Célula $\epsilon$ -pancreática.....	31
1.2.2.5. Célula $\chi$ -pancreática.....	32
1.2.3. Regulación paracrina $\alpha$ - $\beta$ - $\delta$ en el islote pancreático.....	33
1.2.3.1. Relación paracrina entre célula $\beta$ - y $\delta$ -pancreática.....	33
1.2.3.2. Relación paracrina entre célula $\alpha$ - y $\delta$ -pancreática.....	35
2. Diferenciación celular del islote pancreático	
2.1. Factores de transcripción.....	37
2.2. Desdiferenciación y transdiferenciación.....	38
2.2.1. Plasticidad del islote pancreático.....	40

2.2.2. Plasticidad $\beta$ y $\delta$ en modelos de diabetes.....	41
3. Diabetes Mellitus	
3.1. Aspectos generales.....	42
3.2. Fisiopatología.....	42
3.2.1. Tipos de diabetes.....	44
3.2.1.1. Diabetes tipo 1.....	44
3.2.1.2. Diabetes tipo 2.....	45
3.2.1.3. Diabetes gestacional.....	49
3.2.1.4. Otros tipos de diabetes.....	51
3.2.2. Resistencia a la insulina.....	53
3.3. Embarazo como modelo de resistencia insulina.....	54
<b>II. Justificación</b>	
1. ¿Por qué estudiar las células $\delta$ -pancreáticas?	
1.1. La diabetes: un problema de salud pública.....	57
<b>III. Limitaciones</b>	
1. Limitaciones del proyecto.....	60
<b>IV. Hipótesis y Objetivos</b>	
1. Hipótesis de trabajo	
1.1. Hipótesis general.....	62
1.2. Hipótesis específica.....	62
2. Objetivos del proyecto	
2.1. Objetivo general.....	63
2.2. Objetivos específicos.....	63
<b>V. Materiales y métodos</b>	
1. Diseño metodológico	
1.1. Diseño del estudio.....	66
2. Modelos experimentales	
2.1. Aspectos éticos .....	66

2.2. Modelos de gestación.....	68
2.2.1. Descripción del material biológico.....	68
2.2.2. Definición de los modelos de experimentación .....	68
2.3. Medios de cultivo y de extracción.....	69
2.3.1. Medios de cultivo.....	69
2.3.2. Medios de extracción.....	70
2.4. Protocolos de extracción.....	70
2.4.1. Protocolo de extracción para modelo gestacional.....	70
2.4.2. Protocolo de extracción para modelo hormonal.....	71
2.4.2.1. Extracción de islotes pancreáticos en ratas.....	71
2.4.2.2. Extracción de islotes pancreáticos en ratones.....	73
2.4.2.3. Extracción de islotes pancreáticos en humanos.....	74
2.5. Generación de modelo hormonal.....	75
2.5.1. Prueba con hormonas gestacionales.....	75
3. Técnicas de estudio	
3.1. Histología e inmunofluorescencia.....	76
3.1.1. Fijación.....	76
3.1.2. Bloques de Histogel™.....	76
3.1.3. Bloques de parafina.....	77
3.1.4. Cortes histológicos.....	78
3.1.5. Inmunofluorescencia.....	78
3.1.6. Microscopía.....	78
3.1.7. Análisis de imagen.....	79
3.2. Secreciones y ELISA.....	79
3.2.1. Medios de secreción.....	79
3.2.2. Protocolo de secreción de somatostatina.....	79
3.2.3. Ensayo ELISA.....	80
3.3. ADN complementario (ADNc) y qPCR.....	82
3.3.1. Procesamiento de la muestra.....	82

3.3.2. Extracción de ARN.....	82
3.3.3. Síntesis de ADNc.....	83
3.4. Proteínas y western blot.....	84
3.4.1. Tampones y disoluciones.....	84
3.4.2. Procesamiento de muestras.....	84
3.4.3. Electroforesis, transferencia y revelado.....	85
4. Análisis estadístico	
4.1. Método de análisis estadístico.....	86

## **VI. Resultados**

1. Adaptaciones de las células del islote pancreático durante la gestación	
1.1. Histomorfometría del islote pancreático.....	88
1.1.1. Distribución de las células hormonales dentro del islote pancreático en ratonas preñadas.....	88
1.1.2. Presencia de células bihormonales en los islotes de ratonas preñadas.....	90
1.1.3. El estradiol (E <sub>2</sub> ) induce cambios en la composición del islote pancreático.....	91
1.1.4. Distribución de las células hormonales dentro del islote tras el tratamiento con E <sub>2</sub> .....	93
1.1.4.1. Islotes de rata.....	93
1.1.4.2. Islotes de humanos.....	93
1.1.5. E <sub>2</sub> causa un aumento en las células bihormonales del islote pancreático.....	96
1.1.5.1. Islotes de rata.....	96
1.1.5.2. Islotes de humano.....	97
1.1.6. Expresión de factores de transcripción.....	101
1.1.6.1. Las células δ-pancreáticas expresan factores de transcripción de linaje β en un modelo de gestación.....	101

1.1.6.2.	El E <sub>2</sub> es el responsable de que las células δ-pancreáticas expresen FTs de linaje β.....	104
1.1.6.2.1.	Islotes de rata.....	104
1.1.6.2.2.	Islotes de humanos.....	106
1.2.	Cambios en la función de las células δ-pancreáticas tras el tratamiento con E <sub>2</sub> .....	109
1.3.	Adaptaciones de la expresión génica de marcadores β y δ tras el tratamiento con E <sub>2</sub> .....	110
1.4.	Adaptaciones en los agonistas de la secreción de somatostatina durante la gestación.....	114
1.4.1.	Urocortina 3(UCN3).....	114
1.4.2.	Dinorfina.....	116
<b>VII.</b>	<b>Discusión</b>	
1.	Adaptaciones morfológicas del páncreas durante la gestación.....	119
1.1.	Plasticidad de las células δ-pancreáticas.....	119
1.1.1.	Modelo de gestación.....	119
1.1.2.	Modelo de tratamiento hormonal.....	119
2.	Adaptaciones funcionales del páncreas endocrino tras el tratamiento con E <sub>2</sub> .....	121
2.1.	Cambios en la maquinaria δ-pancreática.....	125
2.2.	Cambio en las concentraciones de UCN3 y dinorfina.....	128
2.2.1.	Urocortina 3 (UCN3).....	128
2.2.2.	Dinorfina.....	128
<b>VIII.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	132
<b>IX.</b>	<b>Apéndice</b> .....	134
<b>X.</b>	<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	140

## Lista de abreviaturas

---

$\beta/\delta$ : Célula bihormonal beta y delta

AC: Adenilato ciclasa

ADA: Asociación Americana De Diabetes

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AEMPS: Agencia Española De Medicamentos Y Productos Sanitarios

AMP: Adenosín monofosfato

AMPC: AMP cíclico

ARN: Ácido desoxirribonucleico

ARNm: ARN mensajero

Arx: Proteína homeobox relacionado al *aristaless*

ATP: Adenosín trifosfato

BSA: Albúmina sérica bovina

Cav: Canal de calcio dependiente voltaje

CRHR2: Receptor de la hormona liberadora de corticotropina tipo 2

CRL4B: Ubiquitina ligasa *Cullin4B-Ring E3*

DG: Diabetes gestacional

DM: Diabetes mellitus

DMSO: Dimetilsulfóxido

Dpc: Días *post coitum*

E<sub>2</sub>: 17-β estradiol

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

FDA: Administración de Alimentos y medicamentos de Estados Unidos

FoxO1: Proteína *forkhead box O1*

Ft: Factor de transcripción

GAPDH: Gliceraldehido 3 fosfato

Gcg; Glucagón

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico

Hhex: Proteína homeobox expresado hematopoyéticamente

Ins; Insulina

Irs1: Sustratos del receptor de insulina 1

Irs2: Sustratos del receptor de insulina 2

Lp; Lactógeno placentario

Maf-A: Proteína de la familia del oncogén A del fibrosarcoma musculoaponeurótico

Maf-B: Proteína de la familia del oncogén B del fibrosarcoma musculoaponeurótico

NGS: Suero de cabra

NKx6.1: Proteína homeobox NK6

OMS: Organización Mundial de la Salud

Pax4: Proteína pairedbox 4

Pax6: Proteína pairedbox 6

PBS: Tampón fosfato

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Pdx1: Proteína del homeobox pancreático y duodenal

PI3K/PKB: Vía fosfatidilinositol 3 kinasa / Proteína kinasa B

PKA: Proteína kinasa A

PRC2: *Polycomb repressive complex 2*

Prl: Prolactina

RI: Resistencia a la insulina

Rpl18: Proteína ribosomal 18

Rt-Qpcr: qPCR en tiempo real

SEM: Error estándar de la media

SDS: Dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

Sst: Somatostatina

SstR: Receptor de somatostatina

Tris-HCL: Trisaminometano más ácido clorhídrico

UCN3: Urocortina 3

## Lista de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Desarrollo embrionario normal del páncreas.....	19
<b>Figura 2.</b> Arquitectura del islote pancreático según especie.....	21
<b>Figura 3.</b> Distribución del receptor de insulina.....	24
<b>Figura 4.</b> Mecanismos moleculares por los que la somatostatina inhibe la secreción hormonal en célula $\beta$ -pancreática.....	30
<b>Figura 5.</b> Esquema de la regulación paracrina excitatoria $\beta$ - $\delta$ .....	35
<b>Figura 6.</b> Esquema de la regulación paracrina excitatoria $\alpha$ - $\delta$ .....	36
<b>Figura 7.</b> Esquema del desarrollo de las líneas celulares endocrinas del islote pancreático .....	39
<b>Figura 8.</b> Esquema de plasticidad celular $\beta$ - $\delta$ .....	39
<b>Figura 9.</b> Protocolo de extracción de islotes de rata.....	72
<b>Figura 10.</b> Protocolo de extracción de islotes de ratón.....	74
<b>Figura 11.</b> Islotes pancreáticos vistos por microscopio óptico 10X.....	75
<b>Figura 12.</b> Procesamiento de los islotes pancreáticos.....	77
<b>Figura 13.</b> ELISA competitivo.....	81
<b>Figura 14.</b> Esquema del procedimiento de extracción de ARN.....	83
<b>Figura 15.</b> Inmunofluorescencia del islote pancreático en ratones preñadas.....	89
<b>Figura 16.</b> Presencia de células bihormonales en islotes de ratonas preñadas.....	91
<b>Figura 17.</b> Islotes pancreáticos de rata tratados hormonalmente.....	92

<b>Figura 18.</b> Inmunofluorescencia de islotes pancreáticos de rata tratados y no tratados con estrógenos.....	94
<b>Figura 19.</b> Inmunofluorescencia de islotes pancreáticos de humanos tratados y no tratados con estrógenos.....	95
<b>Figura 20.</b> Presencia de células bihormonales en islotes de rata tratados y no tratados con estrógenos.....	97
<b>Figura 21.</b> Presencia de células bihormonales en islotes del donante Hm97.....	98
<b>Figura 22.</b> Presencia de células bihormonales en islotes del donante Hm98.....	99
<b>Figura 23.</b> Presencia de células bihormonales en islotes del donante Hm102.....	100
<b>Figura 24.</b> Expresión de PDX1 en islotes de ratones preñadas.....	102
<b>Figura 25.</b> Expresión de Maf-A en islotes de ratones preñadas.....	103
<b>Figura 26.</b> Expresión de PDX1 en islotes de rata tratados y no tratados con estrógenos.....	105
<b>Figura 27.</b> Expresión de Maf-A en islotes de rata tratados y no tratados con estrógenos.....	105
<b>Figura 28.</b> Expresión de PDX1 en islotes de humanos tratados y no tratados con estrógenos .....	107
<b>Figura 29.</b> Expresión de Maf-A en islotes de humanos tratados y no tratados con estrógenos .....	108
<b>Figura 30.</b> Secreción de somatostatina en islotes tratados con estrógenos.....	110

<b>Figura 31.</b> Expresión génica de marcadores de célula $\delta$ tras el tratamiento con estrógenos.....	111
<b>Figura 32.</b> Expresión génica de marcadores de célula $\beta$ tras el tratamiento con estrógenos.....	112
<b>Figura 33.</b> Expresión génica de FTs de célula $\beta$ tras el tratamiento con estrógenos.....	113
<b>Figura 34.</b> Cuantificación de UCN3 en islotes pancreáticos .....	115
<b>Figura 35.</b> Cuantificación de dinorfina en islotes pancreáticos.....	117
<b>Figura 36.</b> Cambios en la distribución celular $\delta$ , $\beta$ y $\alpha$ durante la gestación y el tratamiento con $E_2$ .....	124
<b>Figura 37.</b> Cambios en las células bihormonales durante la gestación y el tratamiento con $E_2$ .....	124
<b>Figura 38.</b> Presencia de células $\delta/PDX1+$ y $\delta/Maf-A+$ durante la gestación y el tratamiento con $E_2$ .....	125
<b>Figura 39.</b> Hipótesis de efecto de $E_2$ sobre los genes de célula $\delta$ -.....	127
<b>Figura 40.</b> Modelo propuesto.....	131

## Lista de tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Características basales de los modelos murinos.....	135
<b>Tabla 2.</b> Características biométricas de los donantes.....	135
<b>Tabla 3.</b> Protocolos de inmunofluorescencia usados para los páncreas de ratón.....	136
<b>Tabla 4.</b> Protocolos de inmunofluorescencia usados para los islotes de rata.....	136
<b>Tabla 5.</b> Protocolos de inmunofluorescencia usados para los islotes de humanos.....	137
<b>Tabla 6.</b> Anticuerpos usados para inmunofluorescencia.....	137
<b>Tabla 7.</b> Lista de Taqman™ y SYBR™ Green utilizados para ratas.....	138
<b>Tabla 8.</b> Lista de Taqman™ y SYBR™ Green utilizados para ratones.....	138
<b>Tabla 9.</b> Lista de anticuerpos usados para western blot.....	139

## Resumen

---

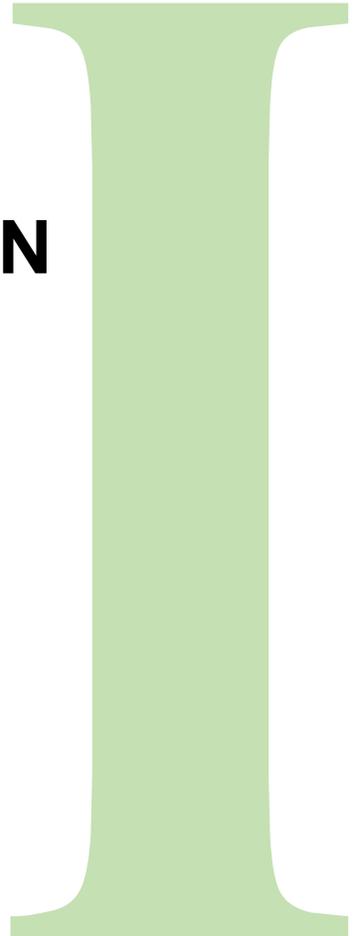
El metabolismo glucídico está sujeto a una compleja regulación en el organismo, donde diversos mecanismos hormonales y enzimáticos trabajan en conjunto para mantener un equilibrio; dentro de las hormonas implicadas en dicha regulación destacamos la insulina (células  $\beta$ ), la cual se encarga de disminuir los niveles de glucosa postprandial y la somatostatina (células  $\delta$ ) quien inhibe su secreción.

Durante el embarazo se sabe que los niveles de ciertas hormonas aumentan y entre todas ellas, los estrógenos juegan un papel crucial; se cree que un aumento de esta hormona provoca cambios en la masa de células  $\beta$  y en su función para hacer frente a la resistencia a la insulina, pero no existen estudios sobre la regulación de las células  $\delta$  y la secreción de somatostatina durante el embarazo.

En este estudio hemos encontrado una disminución en el número de células  $\delta$  y un aumento de células  $\delta$  bihormonales que expresaban tanto PDX1 como Maf-A en islotes pancreáticos de un modelo *in vivo* de gestación y tras el tratamiento con estradiol ( $E_2$ ), además de una disminución de la secreción de somatostatina, pero un aumento de genes tanto de célula  $\beta$  como de célula  $\delta$  tras el tratamiento con  $E_2$  de forma aguda. Por otro lado, encontramos que el  $E_2$  disminuye algunos de los activadores de la secreción de somatostatina: UCN3 y dinorfina, en ambos modelos; por lo que proponemos una desregulación transcriptómica debido a un efecto indirecto del  $E_2$  sobre las células  $\delta$  vía depleción de sus activadores.

En conclusión, este estudio aporta evidencia de la importancia de las células  $\delta$ -pancreáticas y su capacidad de sufrir procesos de plasticidad celular según las necesidades metabólicas del organismo para mantener la homeostasis del metabolismo intermediario.

**INTRODUCCIÓN**



### **1 - Páncreas**

#### **1.1 - Aspectos morfológicos del páncreas**

##### **1.1.1 - Anatomía**

El páncreas es un órgano parenquimatoso ubicado a nivel retroperitoneal, que en humanos tiene un peso aproximado de 100-150 gr y una longitud total de 15-25 cm<sup>(1)</sup>.

El páncreas está dividido estructuralmente en tres partes, estas son: cabeza, cuerpo y cola. La región de la cabeza del páncreas es relativamente plana y está situada en extrema relación con el duodeno. La región de la cola está muy cerca del hilio del bazo; y entre ambas porciones, se encuentra el cuerpo del páncreas que posee forma de prisma<sup>(1)</sup>.

La cabeza del páncreas está irrigada por las arterias pancreaticoduodenal superior y pancreaticoduodenal inferior, que son ramas del tronco celíaco y la arteria mesentérica superior respectivamente. El cuerpo y la cola están irrigados por ramas pancreáticas de la arteria esplénica.

Por su parte, el drenaje venoso se lleva a cabo por medio de las venas pancreática y pancreaticoduodenal, que forman parte del sistema venoso portal.

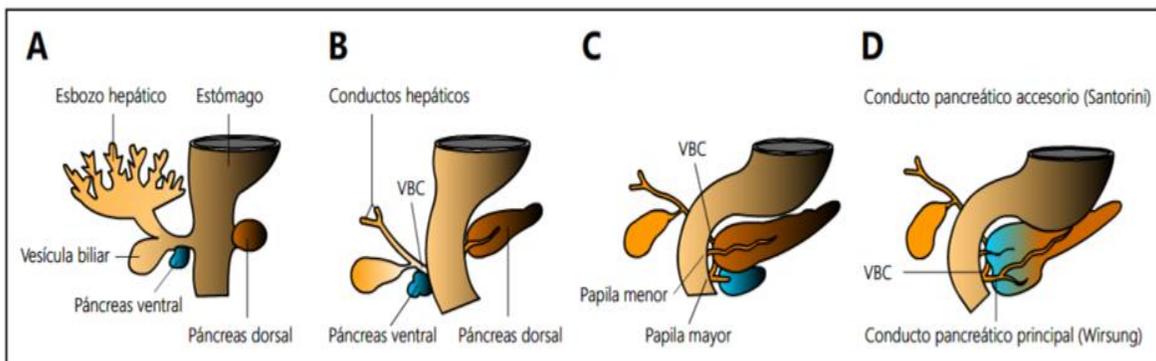
Finalmente, la inervación del páncreas es dada por el plexo pancreático, el ganglio celíaco y el nervio vago<sup>(1)</sup>.

## 1.1.2 - Histología y embriología

### 1.1.2.1 - Páncreas exocrino

El páncreas, casi en su totalidad, corresponde al páncreas exocrino y se reconoce como un órgano digestivo. La unidad funcional del páncreas exocrino son los acinos pancreáticos, los cuales están formados por un cúmulo de células secretoras dispuestas en grupos (asemejando una baya), y que convergen en conductos que van a recoger las secreciones pancreáticas, estos a su vez convergen en dos grandes conductos (Wirsung y Santorini) que vierten su contenido directamente al duodeno. Dentro de la composición del acino pancreático encontramos varios tipos celulares, estas son las células acinares secretoras, centroacinares y ductales<sup>(2)</sup>.

El páncreas exocrino se forma a partir del intestino primitivo, específicamente a partir de dos esbozos endodérmicos (ventral y dorsal) ubicados en el mesoduodeno, los cuales se desarrollan por separado y posteriormente se movilizan hasta fusionarse. De la misma forma, los conductos excretores primitivos de cada esbozo se fusionan con el objetivo de formar los conductos de Wirsung y Santorini<sup>(3)</sup> (**Figura 1**).



**Figura 1. Desarrollo embrionario normal del páncreas.** Las letras indican el orden cronológico del desarrollo del órgano. VBC: Vía biliar común. Adaptado y modificado de Arenas et al.<sup>(4)</sup>

### 1.1.2.2 - Páncreas endocrino

El páncreas endocrino representa un 2% del parénquima glandular y está compuesto por conglomerados ovoideos de células productoras de hormonas denominados islotes pancreáticos que, durante la embriogénesis, se forman a partir de un ensanchamiento distal de la pared de los conductos pancreáticos, que posteriormente se liberan y distribuyen por todo el órgano<sup>(4)</sup>.

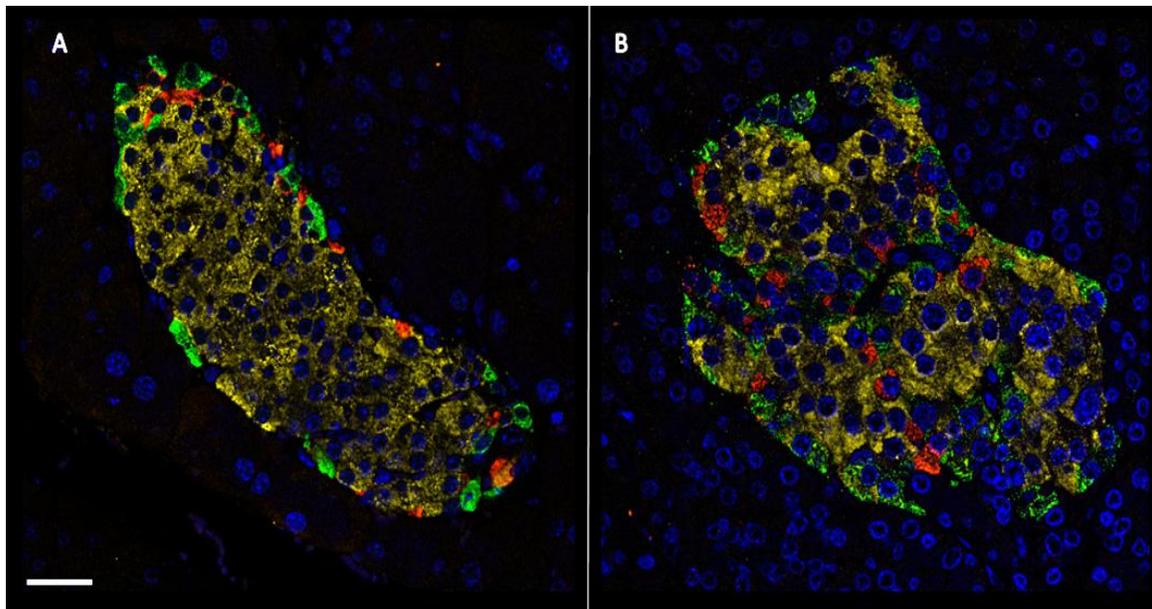
Existen cinco líneas celulares endocrinas dentro del islote pancreático, estas son:

- $\beta$ -pancreáticas: Estas células sintetizan insulina, una hormona hipoglucemiante que es secretada después de la ingesta de alimentos y cuya principal función es permitir la entrada de la glucosa a los tejidos. Estas células representan el 75% del islote pancreático en roedores y 54% en humanos<sup>(5)</sup>.
- $\alpha$ -pancreáticas: Estas células sintetizan glucagón, una hormona hiperglucemiante que es secretada durante el ayuno y cuya función es la degradación del glucógeno y la liberación de glucosa al torrente sanguíneo. Estas células representan aproximadamente 20% del islote pancreático en roedores y 35% en humanos<sup>(5)</sup>.
- $\delta$ -pancreáticas: Estas células sintetizan somatostatina, una hormona que inhibe la secreción de insulina, glucagón, hormona del crecimiento y otras hormonas. Su principal función a nivel pancreático consiste en mantener el equilibrio metabólico entre la insulina y el glucagón<sup>(5)</sup>.
- $\epsilon$ -pancreáticas: Estas células secretan grelina, conocida como la hormona del apetito ya que se encarga de activar el centro hipotalámico del hambre, por lo que es una hormona orexigénica. Estas células representan aproximadamente 1% del islote pancreático en roedores y seres humanos<sup>(5)</sup>.

- $\chi$ -pancreáticas: Estas células sintetizan el polipéptido pancreático, una hormona que regula la secreción del resto de hormonas pancreáticas. Estas células se encuentran en pequeñas proporciones en roedores y en humanos<sup>(5)</sup>.

Sin embargo, además de las mencionadas líneas celulares endocrinas, un islote pancreático tendrá células vasculares, fibroblastos, células del sistema inmunitario y células del sistema nervioso.

La organización de los componentes celulares del islote pancreático es específica de cada especie y depende de los requerimientos energéticos y hormonales de cada una. En los ratones, las células no- $\beta$  ( $\alpha$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\chi$ - pancreáticas), se encuentran inmediatamente adyacentes a los capilares, rodeando un núcleo central conformado por células  $\beta$ , mientras que en humanos, o en islotes de gran tamaño, los capilares penetran en el centro del islote y las células no- $\beta$  aparecen dentro del núcleo  $\beta$ <sup>(5-7)</sup> (**Figura 2**).



**Figura 2. Arquitectura del islote pancreático según especie.** (A) islote pancreático de un ratón, con su característico núcleo de células  $\beta$  (amarillo) rodeado de células no- $\beta$  (verde y rojo). (B) islote pancreático humano, con su característica mezcla de componentes celulares (distribución heterogénea de colores).

## **1.2 - Aspectos funcionales del páncreas**

El páncreas cumple un papel mixto durante la digestión, pues cumple tanto funciones exocrinas como endocrinas. Las funciones exocrinas del páncreas se llevan a cabo por medio de la secreción de enzimas digestivas, por ejemplo: amilasa, proteasas y lipasas; mientras que la función endocrina se lleva a cabo por medio de la secreción de hormonas que regulan el metabolismo de la glucosa, por ejemplo: insulina, glucagón y somatostatina.

### **1.2.1 - Páncreas Exocrino**

La principal función exocrina del páncreas es secretar el jugo pancreático, un líquido incoloro y alcalino, que ayuda en la digestión y alcalinización del bolo alimenticio. De esta manera, el jugo pancreático está compuesto por dos tipos de secreciones: la enzimática y la hidroelectrolítica. La primera de estas secreciones está compuesta por enzimas proteolíticas, glucolíticas, lipolíticas y nucleolíticas, mientras que la segunda está compuesta por agua rica en sodio, bicarbonato y otros electrolitos. Así, el jugo pancreático es secretado por las células acinares y ductales en respuesta a ciertas señales bioquímicas (estimulantes o inhibitorias) de naturaleza hormonal (secretina, colecistoquinina), nerviosa (acetilcolina, péptido intestinal vasoactivo) o digestiva (nutrientes, sales biliares)<sup>(2)</sup>.

### **1.2.2 - Páncreas endocrino**

El islote pancreático es la unidad funcional del páncreas endocrino y su objetivo consiste en la secreción hormonal. Esto permite que el páncreas pueda regular de forma directa el metabolismo glucídico y de forma indirecta el metabolismo lipídico y proteico. De esta manera, los cinco tipos celulares del islote pancreático ejercen su actividad hormonal bajo un estricto control paracrino.

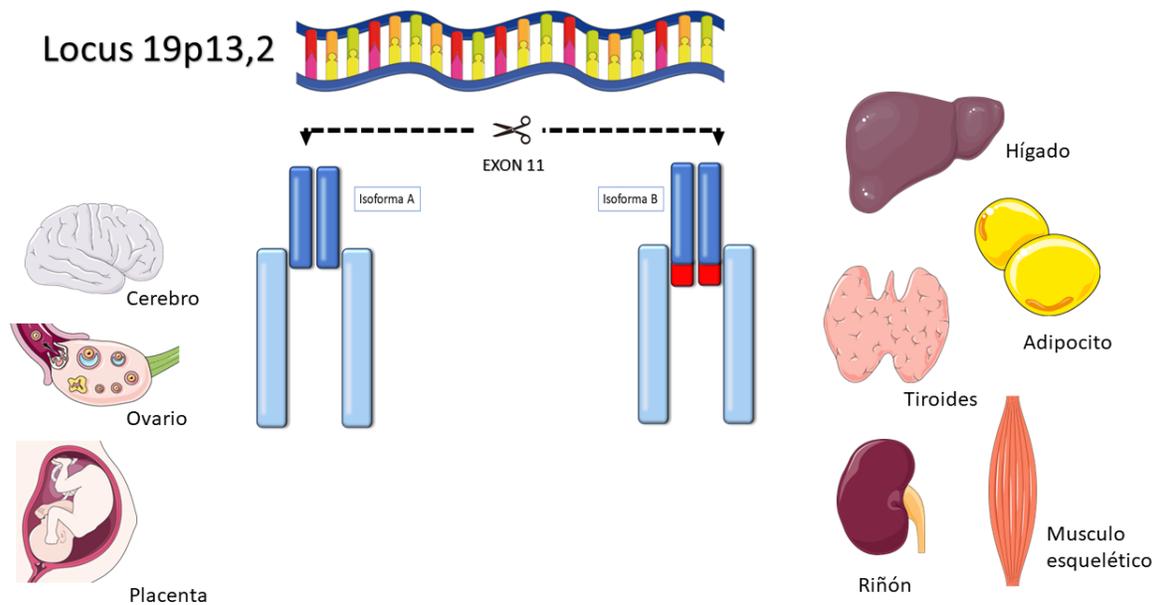
### 1.2.2.1 - Células $\beta$ -pancreáticas

Son células poligonales, tienen un diámetro promedio de 13-18 ( $\mu\text{m}$ ) y poseen aproximadamente 10.000 gránulos secretores por célula. Como se comentó previamente, las células  $\beta$  representan la mayor población del islote pancreático y su principal función radica en la secreción de insulina, lo que constituye un 5-10% del total del contenido proteico de la célula. Aunque la disposición de los gránulos de insulina en las células  $\beta$  del ratón suelen tener una distribución regular (aparición de "huevo frito"), en humanos esta distribución es más heterogénea.

Las células  $\beta$  humanas también contienen cuerpos de lipofuscina (pigmentos de desgaste) que pueden usarse para estimar la edad de las células  $\beta$ <sup>(7)</sup>. Además, estas células también co-secretan otros péptidos que le permiten interactuar con las células vecinas, como por ejemplo: amilina, urocortina 3 (UCN3), serotonina y ácido- $\gamma$ -aminobutírico (GABA)<sup>(8-9)</sup>.

La insulina es una hormona peptídica de 5 kDa aproximadamente. Al igual que otras hormonas, la insulina es empaquetada dentro de las vesículas secretoras del aparato de Golgi como una pro-hormona y posteriormente alcanza su configuración molecular definitiva por medio de la acción de enzimas proteolíticas (pro-convertasa tipo 1 y tipo 2)<sup>(10)</sup>. La insulina es secretada por las células  $\beta$ -pancreáticas en respuesta al aumento de la glucemia ocurrido tras la ingesta de alimentos y tiene una acción hipoglucemiante; al ser la única hormona con esta función, es indispensable para la vida. Su receptor es de tipo tirosina quinasa. Está codificado por un gen en el cromosoma 19 y puede sufrir *splicing* alternativo, generando dos isoformas (A y B). La función y distribución de los receptores de insulina dependerá de su isoforma<sup>(11)</sup> (**Figura 3**).

A su vez los receptores de insulina están formados por dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$ , que se unen y dimerizan con otras subunidades idénticas para unirse a la insulina.



**Figura 3. Distribución del receptor de insulina:** Adaptado de Westermeier et al.<sup>(11)</sup>. La imagen fue creada utilizando Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

Cuando la insulina es reconocida por el receptor, éste se autofosforila y desencadena una cascada de señalización por la vía fosfatidilinositol 3 quinasa/Proteína quinasa B (PI3K/PKB), que desencadenará fosforilaciones seriadas que favorecerán la entrada de glucosa en las células para ser usadas en la obtención de energía, o almacenadas en forma de glucógeno en el músculo esquelético, tejido adiposo<sup>(12)</sup> e hígado<sup>(13)</sup>.

Así, la insulina se encarga de mantener la glucemia basal en un rango aproximado de 60-100 mg/dl; sin embargo, concentraciones elevadas de glucosa plasmática pueden sobrecargar la producción y secreción de la hormona, causando la eventual disfunción de la célula  $\beta$ -pancreática. Por el contrario, concentraciones bajas de glucosa plasmática normalmente desencadenan la acción de hormonas hiperglucemiantes como el glucagón, que, a su vez, estimula la secreción de insulina. Finalmente, niveles altos de insulina estimulan la secreción de somatostatina e inhiben la secreción de glucagón.

### 1.2.2.2 - Células $\alpha$ -pancreáticas

Son células con morfología esférica, suelen medir en torno a 10  $\mu\text{m}$  y poseen 7.000 gránulos por célula aproximadamente. Constituyen la segunda línea celular más extensa del islote pancreático, tanto en humanos como en muchas especies animales, de forma que son menos frecuentes y más pequeñas que las células  $\beta$ . Secretan glucagón y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1). Sus gránulos secretores característicamente suelen estar dispuestos muy cerca de la membrana plasmática, lo que permite una respuesta muy rápida<sup>(14)</sup>.

El glucagón es una hormona peptídica que tiene un peso molecular 29 kDa aproximadamente. Al igual que otras hormonas, su estructura molecular definitiva se consigue tras la proteólisis de su precursor, una pro-hormona denominada pro-glucagón, por la enzima pro-convertasa 2.

Por otro lado, es una hormona contrarreguladora de la insulina que favorece la hiperglucemia y ejerce su función principalmente a nivel de hígado, donde estimula la gluconeogénesis y la glucogenólisis. Esta hormona se secreta cuando la glucemia es inferior a 70 mg/dl aproximadamente, su receptor posee siete dominios transmembrana y está asociado a proteínas G; estos receptores se encuentran en el hígado, tejido graso, cerebro, corazón, riñón y tracto gastrointestinal<sup>(15)</sup>. Por su parte, concentraciones plasmáticas elevadas de glucagón pueden estimular la secreción de somatostatina. Esto ocurre como consecuencia de la acción sinérgica del glucagón y otros péptidos co-secretados por las células  $\alpha$ -pancreáticas, como por ejemplo: GLP-1, la acetilcolina y el glutamato<sup>(8)</sup>.

Finalmente, la secreción de glucagón parece estar inhibida cuando existen concentraciones plasmáticas elevadas de insulina y GABA; sin embargo, los mecanismos exactos que permiten esta acción inhibitoria siguen siendo objeto de estudio en la actualidad.

De esta forma, algunos autores sostienen que la secreción de somatostatina, inducida por un estado de hiperinsulinemia posprandial, podría ser responsable de la acción inhibitoria que se produce sobre la secreción de glucagón inmediatamente después de la ingesta de alimentos; configurando un sistema regulatorio que permite a las células  $\beta$  inhibir de forma indirecta la actividad de las células  $\alpha$  por medio de la activación de las células  $\delta$ <sup>(16)</sup>.

### 1.2.2.3 - Células $\delta$ -pancreáticas

Las células  $\delta$  constituyen la tercera línea celular más frecuente del islote pancreático y secretan somatostatina, que es un potente inhibidor de la secreción de insulina y glucagón; su morfología como su tamaño varían según la especie.

En ratones, las células  $\delta$ -pancreáticas tienen una forma alargada y una apariencia similar a neuronas, pues las células  $\delta$  están compuestas por un soma y por un proceso citoplasmático alargado denominado filopodia. Así, estas células se disponen de tal manera que, junto a las células  $\alpha$ -pancreáticas, forman un sincitio que recubren el exterior del islote pancreático como si fuera un manto.

Sin embargo, en humanos, estas células poseen una morfología y una distribución espacial distinta a la que ha sido descrita en modelos murinos, ya que las filopodias son más compactas y los cuerpos celares o somas se encuentran mayoritariamente dispersos dentro del núcleo de células  $\beta$ <sup>(10,17)</sup>.

La filopodia determina el tamaño de las células  $\delta$ -pancreáticas (2-27  $\mu\text{m}$ ) y parece contribuir en la regulación paracrina de la somatostatina<sup>(8)</sup>; por otro lado, se piensa que la longitud de la filopodia podría estar en relación con la localización que las células  $\delta$ -pancreáticas tienen dentro del islote según la especie, así como con la capacidad que tienen para interactuar con las células vecinas<sup>(18-19)</sup>.

La somatostatina fue aislada y sintetizada por primera vez en 1973, mientras se buscaba identificar un factor que estimulara la secreción hipofisiaria de la hormona

del crecimiento, encontrando, contrario a lo que se pretendía, un poderoso inhibidor de la misma. De esta forma, la somatostatina es una hormona peptídica de 1,6 kDa aproximadamente, posee una vida media corta y su función principal es la inhibición de varias enzimas y hormonas peptídicas<sup>(19-21)</sup>.

El gen responsable de la síntesis de la somatostatina se encuentra ubicado en el cromosoma 3 y su traducción genera un precursor hormonal denominado pre-prosomatostatina que, a través de enzimas pro-convertasas, es convertido en prosomatostatina y posteriormente en somatostatina. La forma definitiva de la hormona tiene dos variantes moleculares distintas, una con 14 aminoácidos (Sst-14) y otra con 28 (Sst-28), de manera que la Sst-14 es la forma predominante en el cerebro y en el páncreas, mientras que la Sst-28 es la forma predominante del intestino.

A diferencia de otras hormonas, la somatostatina puede ser producida y liberada en tres estructuras distintas del organismo:

- El hipotálamo y otras zonas del sistema nervioso central, que secretan la forma Sst-14 y su objetivo es la neurotransmisión e inhibición de la secreción adenohipofisaria de la hormona del crecimiento y la tirotrópina. De esta forma, la secreción hipotalámica de somatostatina es responsable del 25% de la concentración plasmática total de esta hormona.
- Las células D del intestino, que secretan la forma Sst-28 con el fin de regular la secreción gastroduodenal de motilina, gastrina y péptido intestinal vasoactivo, entre otras enzimas digestivas. Así, la secreción intestinal de somatostatina es responsable del 70% de la concentración plasmática de esta hormona.
- Las células  $\delta$ -pancreáticas, que secretan la forma Sst-14, con fines autocrinos y paracrinos. Esto permite regular la función de las células adyacentes del islote pancreático con el objetivo de inhibir la secreción de insulina y glucagón. Además, la Sst-14 pancreática puede inhibir su propia

liberación. Finalmente, solo un 5% de la concentración plasmática de somatostatina tiene origen pancreático<sup>(22-26)</sup>.

La somatostatina ejerce su función mediante receptores acoplados a proteína G, los cuales son: tipo 1 (SstR<sub>1</sub>), tipo 2 (SstR<sub>2</sub>) que para ratones tiene dos isoformas A y B, tipo 3 (SstR<sub>3</sub>), tipo 4 (SstR<sub>4</sub>) y tipo 5 (SstR<sub>5</sub>).

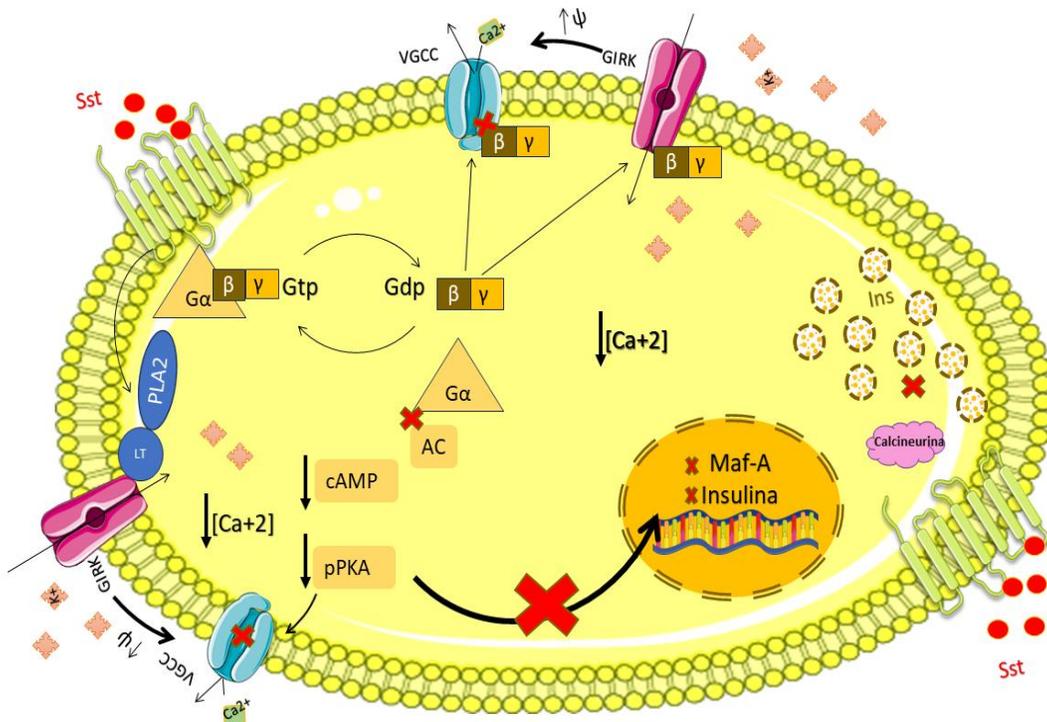
Estos receptores están formados por 364-418 aminoácidos aproximadamente, conservan un 40-60% de homología entre sí y un 42-60% de homología entre especies (humano/ratón). Todos los subtipos de receptores tienen puentes disulfuros, sitios de N-glicosilación y muchos sitios para la fosforilación intracelular<sup>(27)</sup>. Además, los SstR<sub>1</sub>, SstR<sub>2</sub>, SstR<sub>3</sub> y SstR<sub>4</sub> son igualmente sensibles para ambas formas de la hormona (Sst-14 y Sst-28), mientras que SstR<sub>5</sub> es más sensible para la Sst-28<sup>(28)</sup>.

Se ha descrito que el tejido pancreático, tanto humano como el murino, posee los 5 tipos de receptores, pero no se ha llegado a un consenso sobre la especificidad celular de cada receptor, pues parece que esto depende de cada especie. De esta forma, estudios de inmunohistoquímica demuestran la expresión de todos estos receptores en todas las células del islote pancreático<sup>(29)</sup>; sin embargo, estudios funcionales con moléculas agonistas solo han podido demostrar que la somatostatina actúa sobre las células  $\beta$ -pancreáticas por medio de los receptores SstR<sub>2,5</sub> y sobre las células  $\alpha$ -pancreáticas por medio del receptor SstR<sub>2</sub><sup>(30-36)</sup>.

No obstante, existen opiniones divididas a este respecto, pues *Adamson et al.*<sup>(37)</sup> han identificado receptores SstR<sub>3</sub> en células  $\beta$ -pancreáticas de modelos murinos; *Kumar et al.*<sup>(38)</sup> afirmaron que en humanos las células  $\beta$  expresan mayoritariamente SstR<sub>1</sub> y las  $\delta$  poseen SstR<sub>5</sub>; *Raulf et al.*<sup>(39)</sup> describieron que el páncreas de rata no posee SstR<sub>4</sub>, y *Digruccio et al.*<sup>(40)</sup> informaron que las células  $\beta$  murinas expresan solo receptores SstR<sub>3</sub>, las  $\alpha$  receptores SstR<sub>2,3</sub> y las  $\delta$  principalmente receptores SstR<sub>1,3</sub>, y en menor cantidad receptores SstR<sub>2</sub>.

Una vez que la somatostatina se une a su receptor, se desencadenarán una serie de reacciones bioquímicas en cascada que inhibirán la secreción hormonal en la célula diana (**Figura 4**), estas son:

- Inhibición de la adenilato ciclasa (AC), esto a partir de la subunidad  $G\alpha_i$  del SstR, lo que reduce la concentración intracelular de AMPc y secundariamente disminuye las concentraciones de las fosforilaciones de las subunidades reguladoras de la PKA. Así, se impide la traslocación de la enzima al núcleo y se bloquea la transcripción génica de la hormona diana<sup>(41)</sup>.
- Apertura de los canales de potasio rectificadores internos acoplados a proteína G (GIRK) y los canales de potasio acoplados a ATP, gracias a la subunidad  $\beta\gamma$  del SstR, que induce un cambio conformacional en el receptor y permite el desplazamiento de iones de  $K^+$  desde el espacio intracelular hasta el extracelular, siguiendo un gradiente de concentración. Esto desencadena la hiperpolarización del espacio intracelular y el bloqueo secundario de los canales de calcio<sup>(42-44)</sup>. Por otro lado, los GIRKs también pueden ser activados mediante la estimulación que tiene la somatostatina sobre la fosfolipasa  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>)<sup>(45-47)</sup>.
- Inhibición directa de los canales de  $Ca^{+2}$ , nuevamente, mediante la subunidad  $\beta\gamma$ , e indirectamente por la disminución de la pPKA, lo que reduce la concentración intracelular del ion y desencadena los efectos descritos previamente<sup>(33,47-49)</sup>.
- Bloqueo directo de la exocitosis de vesículas secretoras en la célula diana, posiblemente por la activación de la calcineurina que interrumpiría la maquinaria de secreción de vesículas secretoras<sup>(50-53)</sup>.



**Figura 4. Mecanismos moleculares por los que la somatostatina inhibe la secreción hormonal en célula  $\beta$ -pancreática.** En cuadros de colores se muestran los iones: Cuadro verde,  $\text{Ca}^{2+}$ ; cuadro rosa,  $\text{K}^+$ . La imagen fue creada utilizando Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

Además, la somatostatina posee actividad anti-proliferativa, anti-angiogénica y supresora de tumores<sup>(54)</sup>, ya que es capaz de inhibir directamente la proliferación celular, deteniendo el ciclo celular en fase G1/S (SstR<sub>1,2,4,5</sub>) y G2/M (SstR<sub>3</sub>), y promover la apoptosis, este efecto es dependiente del tipo de SstR que es estimulado; sin embargo, se puede llegar al consenso de que SstR<sub>1-4</sub> actúan por una vía dependiente de fosfatasa de tirosina (PTP) y que involucra diferentes cascadas metabólicas, como por ejemplo: la proteína MAPK, el sistema de las caspasas, la proteína supresora de tumores p53, la ruta de PI3K/PKB, entre otras; por el contrario, SstR<sub>5</sub> estimula estos procesos por una vía independiente de PTP e involucra el GMPc, la fosfolipasa C (PLC) y eventualmente las MAPK<sup>(17,54-59)</sup>. La

vía de las MAPK y la PI3K/PKB son las principales dianas farmacológicas en la actualidad, y explica por qué los análogos de la somatostatina (octreótido y lanreótido) han tenido efectos beneficiosos en el tratamiento de tumores en la práctica clínica<sup>(60)</sup>. Finalmente, además de lo antes expuesto, la somatostatina es capaz de inducir apoptosis mediante la acidificación intracelular, por inhibición de la bomba  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a través de los  $\text{SstR}_{1,3,4}$ <sup>(22,54,61)</sup>.

Dicho lo anterior, nos parece relevante mencionar que *Li et al.*<sup>(62)</sup> demostraron, al menos en modelos murinos neonatales, como la ausencia de células  $\delta$ -pancreáticas desencadenaba una hipersecreción anómala de insulina así como una subsecuente muerte.

#### **1.2.2.4 - Células $\epsilon$ - pancreáticas**

Las células  $\epsilon$  constituyen una línea celular poco frecuente en el islote pancreático. De esta forma, aunque representan el 10% de las células de los islotes pancreáticos en embriones y fetos humanos, su cantidad disminuye hasta el 1% después del nacimiento. En muestras de páncreas humano adulto se observa que las células  $\epsilon$ -pancreáticas tienen forma redondeada y permanecen en la periferia del islote, tanto en grupos como en células individuales<sup>(63)</sup>. En ratones, estas células están presentes en los islotes pancreáticos y en la mucosa del estómago durante la fase de desarrollo embrionario, pero solo es posible identificar células  $\epsilon$ -estomacales después del nacimiento.

De hecho, hasta la fecha, no se ha podido identificar células  $\epsilon$  productoras de grelina en el páncreas de ningún otro modelo animal adulto. De esta forma, los humanos son la única especie conocida capaces de mantener células  $\epsilon$ -pancreáticas funcionalmente activas después del nacimiento<sup>(63)</sup>.

La grelina es una hormona peptídica que consta de 28 aminoácidos, un peso molecular de 3,3 kDa aproximadamente y una N-octanoilación en la serina 3, al igual

que las otras hormonas, proviene de una pre-pro-hormona de 117 aminoácidos, que se escinde para dar la grelina y la obestatina. Comparte receptor con el secretagogo de la hormona del crecimiento 1a (GHSR1a), que es un receptor acoplado a proteína G, altamente distribuido en cerebro, hipotálamo (en las neuronas que poseen neuropéptido NPY) y núcleos basales, además de órganos periféricos endocrinos como islotes pancreáticos, tiroides y glándulas suprarrenales. Es importante destacar que, para cumplir su función, la hormona debe ser acilada en la serina 3<sup>(63)</sup>.

Es conocida como la hormona del hambre porque estimula el apetito activando el centro del hambre en el núcleo arcuato del hipotálamo. Está descrito que el ayuno aumenta la expresión de ARNm, así como la traducción de su proteína<sup>(63-64)</sup>.

#### **1.2.2.5 - Células $\chi$ - pancreáticas**

En ratones, como el resto de células no- $\beta$ , las células  $\chi$  se encuentran ubicadas en la periferia de los islotes pancreáticos, especialmente en aquellos islotes que están localizados en la región de la cabeza del páncreas<sup>(65)</sup>. Secretan, principalmente el polipéptido pancreático; la cual es una hormona peptídica de 36 aminoácidos y un peso molecular de 4 kDa aproximadamente, forma parte de la familia del neuropéptido Y (NPY), junto al péptido tirosina-tirosina (PYY) y, en general, se cree que afecta la motilidad gastrointestinal, la homeostasis de la glucosa (inhibiendo la somatostatina<sup>(66)</sup> y la regulación del apetito<sup>(65)</sup>). Su receptor (NPYR) forma parte de la familia de receptores asociados a proteína  $G\alpha_i$  de tipo rodopsina, cuya función principal es la inhibición de AMPc; existen 4 receptores (NPYR<sub>1,2,4,5</sub>), de los cuales NPY<sub>4</sub> parecer ser exclusivo de PP<sup>(67-68)</sup>. Su gen se encuentra en el cromosoma 17 y se traduce como un pro-hormona inusualmente corta, la cual se escinde para producir el PP, un icosapéptido pancreático y un oligopéptido de 5 a 7 aminoácidos<sup>(69)</sup>.

## 1.2.3 – Regulación paracrina $\alpha$ - $\beta$ - $\delta$ del islote pancreático

### 1.2.3.1 - Relación paracrina entre célula $\beta$ y $\delta$ -pancreática

Las células  $\beta$ - y  $\delta$ -pancreáticas están acopladas tanto eléctricamente, por medio de uniones gap de conexina 36, como de forma química, a través de péptidos que tiene acción paracrina (**Figura 5**). De esta forma, las células  $\beta$ -pancreáticas pueden regular la actividad secretora de las células  $\delta$ -pancreáticas<sup>(9-10)</sup>.

Algunos de los péptidos y vías de señalización responsables de la regulación de las células  $\beta$  sobre las  $\delta$ :

- Insulina, que se une al co-transportador de  $\text{Na}^+$  y glucosa tipo 2 (SGLT2) ubicado en la membrana celular de las células  $\delta$ -pancreáticas<sup>(70)</sup>. Esto favorece la entrada de  $\text{Na}^+$  y glucosa dentro del espacio intracelular, despolarizando la membrana celular y activando la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  voltaje dependiente. Así, el aumento de la concentración de calcio intracelular activa la secreción de somatostatina<sup>(8)</sup>. A su vez, se ha descrito que la secreción de insulina es capaz de regular la longitud de la filopodia<sup>(18)</sup>.
- Urocortina 3 (UCN3), es reconocida por las células  $\delta$ -pancreáticas a través del receptor de la hormona liberadora de corticotropina tipo 2 (CRHR2) y estimula la secreción de somatostatina a través de una ruta bioquímica rápida dependiente de AC, AMPc y apertura de canales de calcio<sup>(71)</sup>. Por otro lado, también existe una estimulación lenta que inactiva un mecanismo represor transcripcional conformado por la ubiquitina ligasa *Cullin4B-Ring E3* (CRL4B) y una histona metiltransferasa denominada *polycomb repressive complex 2* (PRC2) mediante la inhibición de una proteína llamada *Cullin-4B* (Cul4B). De esta manera, la inactivación del supercomplejo CRL4B/PRC2 favorece la expresión del canal de calcio dependiente del voltaje tipo L, subunidad alfa 1C (Cav1,2) y la Adenilato ciclasa 6 (AC6), aumentando con ello la

concentración intracelular de calcio y AMPc respectivamente, y por tanto, aumentando también la secreción de somatostatina<sup>(8,42,72-73)</sup>.

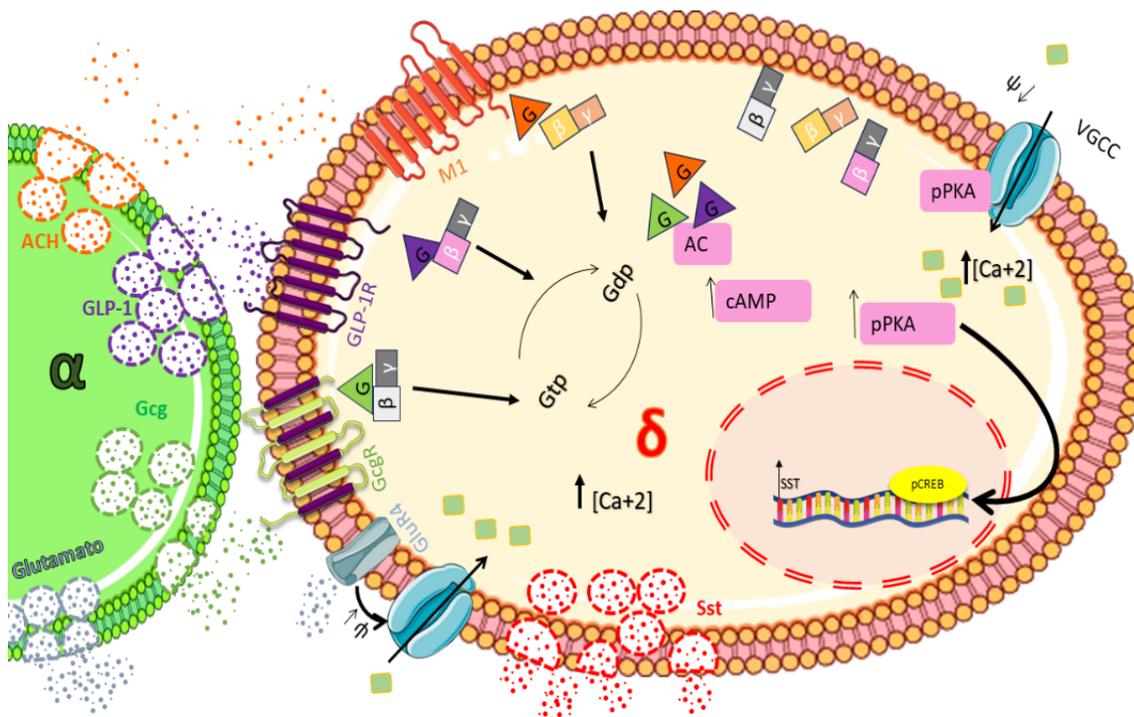
Es importante resaltar que *Digruccio et al.*<sup>(40)</sup> han descrito la presencia de ARN del receptor CRHR2, exclusivamente en las  $\delta$ -pancreáticas.

- GABA, induce la secreción de somatostatina a través del receptor  $\alpha$ , que despolariza la membrana mediante la salida de iones de  $\text{Cl}^-$ , lo que activa la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, aumentando la concentración citoplasmática de este segundo mensajero y estimulando la secreción.
- Serotonina, se co-secreta con la insulina y al contrario que todos los péptidos mencionados anteriormente, ésta se encarga de inhibir la secreción de somatostatina a través del receptor 5-hidroxitriptamina 5A (5-HT5A); al ser un receptor acoplado a proteína G, posee una subunidad  $\alpha_i$  por lo que actúa mediante la inhibición de la AC y consecuente disminución de las concentraciones de AMPc<sup>(74)</sup>.
- Dinorfina, es un opioide que se ha descrito que existe en célula  $\beta$  murinas y que se secreta tras la estimulación con altas concentraciones de glucosa. Su función ha sido poco estudiada, sin embargo, parece cumplir un rol en la regulación de la secreción de glucagón y somatostatina. Actúa a nivel de los receptores de opioides y aunque el receptor  $\kappa$  es el que posee mayor afinidad por el opioide, los receptores  $\mu$  y  $\delta$  también pueden mediar alguno de los efectos de la dinorfina<sup>(75-80)</sup>.



- Acetilcolina, se une a un receptor muscarínico tipo 1 (M1) ubicado en la membrana celular e inducen la secreción de somatostatina vía AC y AMPc.
- Glutamato, que unido a la subunidad 4 del receptor AMPA (GluR4), presente en la membrana de las células  $\delta$ -pancreáticas, favorece la despolarización celular vía canales de calcio voltaje dependientes<sup>(8)</sup>.

Finalmente, no se puede olvidar que la somatostatina es una hormona relacionada con el sistema digestivo, y por este motivo, la ingesta de nutrientes constituye otra vía metabólica que estimula la secreción de esta hormona. De esta forma, además de la glucosa, los ácidos grasos o los aminoácidos pueden afectar la secreción de somatostatina



**Figura 6. Esquema de la regulación paracrina excitatoria  $\alpha$ - $\delta$ .** En cuadros de colores se muestran los iones: Cuadro verde,  $Ca^{2+}$ . Adaptado de Gao et al.<sup>(9)</sup>. La imagen fue creada utilizando Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

## **2 – Diferenciación celular del islote pancreático**

### **2.1 – Factores de transcripción**

La diferenciación celular es el proceso mediante el cual una célula progenitora madura adquiere las características genotípicas y fenotípicas necesarias para funcionar. De esta manera, para que las células progenitoras puedan formar un islote pancreático funcional, estas han de sufrir tanto proliferación como diferenciación celular.

Dentro de este proceso cobran mucha importancia los factores de transcripción (FTs), que son proteínas nucleares capaces de unirse al ácido desoxirribonucleico (ADN) y que se encargan de regular la transcripción génica, ocultando o descubriendo secuencias de unión específicas del ADN y controlando así el desarrollo de tipos celulares específicos<sup>(81)</sup>. Los FTs, como cualquier otra proteína, se transcriben en el núcleo y se traducen en el citoplasma; una vez allí, algunos FTs son transportados directamente de vuelta al núcleo celular, mientras que otros lo hacen de forma indirecta por medio de proteínas específicas. Los FTs no solo deben ser transportados al núcleo, también deben ser activados para poder ejercer su función. Esta activación puede ocurrir por unión a un ligando (receptores de hormonas tiroideas y sexuales), por interacciones proteína-proteína (proteína de unión a CREB) o por fosforilación (pPKA/CREB)<sup>(82)</sup>.

Así, para que se produzca la diferenciación celular del islote pancreático es necesario que se expresen diferentes FTs, especialmente la proteína del homeobox pancreático y duodenal (PDX1); la cual favorecerá el proceso de maduración desde una célula del endodermo intestinal a una célula endocrina madura (**Figura 7**).

PDX1 juega un papel crucial en el desarrollo del páncreas, pues es responsable de la expansión de los esbozos mesoduodenales emergentes<sup>83-84</sup>). A partir de aquí, todas las células progenitoras pancreáticas tendrán PDX1, y esto les permitirá seguir con la diferenciación celular; una vez el páncreas exocrino y endocrino se

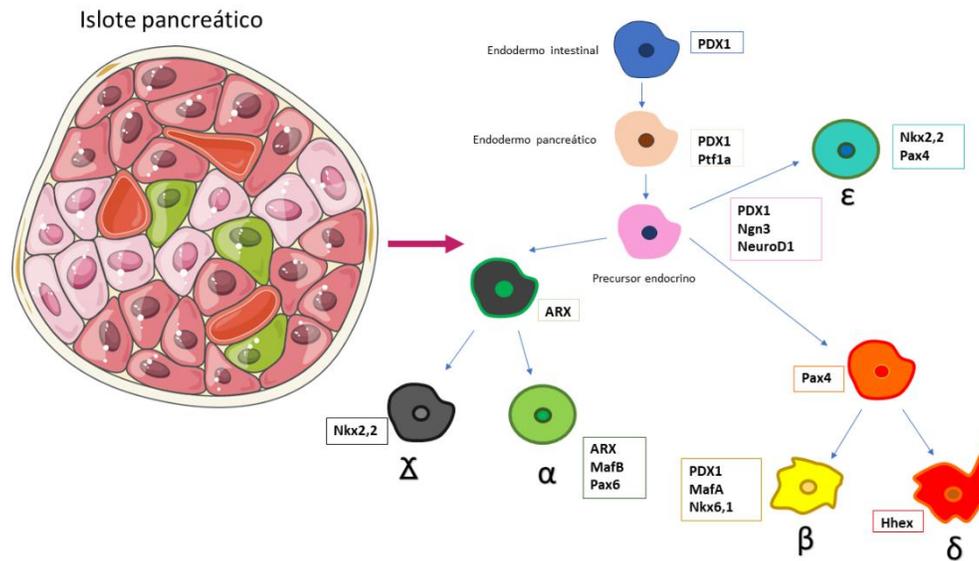
han desarrollado y diferenciado completamente, gran parte de este FT se restringirá a las células  $\beta$ -pancreáticas maduras<sup>(84)</sup>, y en menor medida en las células  $\delta$ <sup>(40,85)</sup>. Así, las células funcionalmente maduras del islote pancreático expresarán FTs específicos de linaje, lo que les permitirá secretar las diferentes hormonas pancreáticas<sup>(9,84-86)</sup> (**Figura 7**). Algunos de los FTs más importantes son:

- Célula  $\beta$ -pancreática: Además de PDX1, expresan la proteína de la familia del oncogén A del fibrosarcoma musculoaponeurótico (Maf-A), la proteína *homeobox* NK6 (NKx6.1) y la proteína *pairedbox* 4 (PAX4), entre otras.
- Células  $\alpha$ -pancreáticas: Expresan la proteína *homeobox* relacionado al *aristaless* (ARX), la proteína de la familia del oncogén B del fibrosarcoma musculoaponeurótico (Maf-B) y la proteína *pairedbox* 6 (Pax6), entre otras.
- Células  $\delta$ -pancreáticas: Expresan la proteína *homeobox* expresado hematopoyéticamente (HHEX)<sup>(9,40,87-90)</sup>.

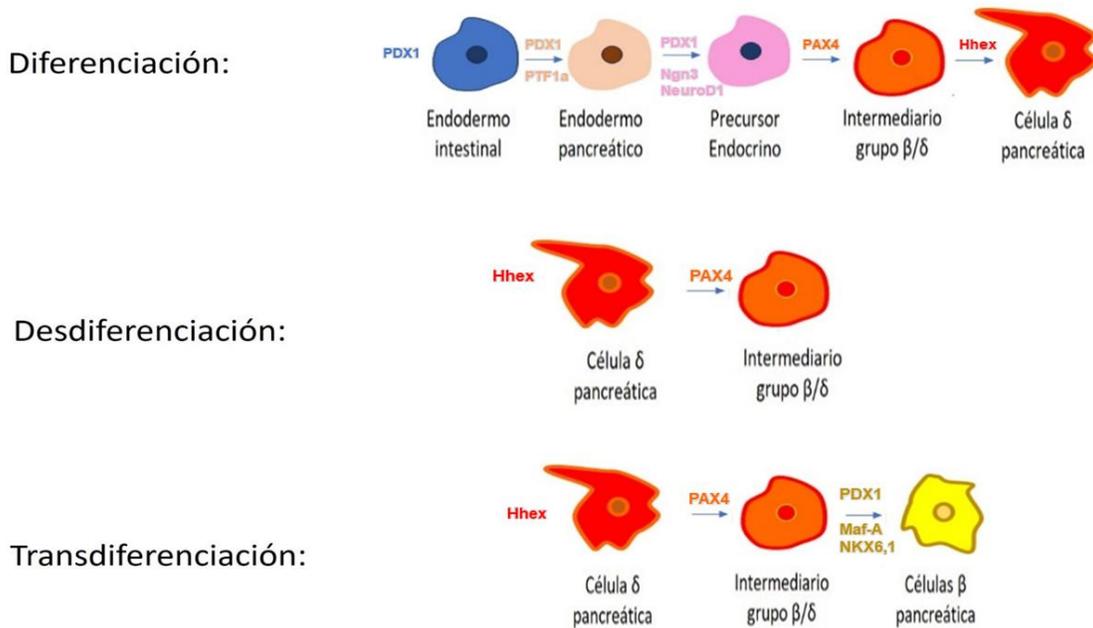
Así, los progenitores endocrinos pancreáticos dan origen a tres grandes bloques celulares, uno está conformado por las células  $\epsilon$ -pancreáticas maduras y los otros dos por intermedios inmaduros  $\alpha/\chi$  y  $\beta/\delta$ . Esto explicaría las diferencias estructurales y funcionales que existen dentro de las diferentes líneas celulares del islote y la estrecha relación que existe entre células con ancestros comunes<sup>(86, 91)</sup>.

## 2.2 – Desdiferenciación y transdiferenciación

La desdiferenciación es un proceso que ocurre cuando una célula madura pierde su identidad celular y retrocede a estados inmaduros en la línea evolutiva. Por su parte, la transdiferenciación es un proceso que ocurre cuando una célula madura recibe señales externas que hacen que se active una reprogramación celular, expresando FTs de otros linajes celulares, y “transformándose” en una célula diferente (**Figura 8**).



**Figura 7. Esquema del desarrollo de las líneas celulares endocrinas en el islote pancreático.** Adaptado de Panzer et al.<sup>(91)</sup>. La imagen fue creada utilizando Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.



**Figura 8. Esquema de plasticidad celular β-δ.** La fila superior muestra el proceso de diferenciación normal de la célula δ. La fila intermedia muestra la desdiferenciación de la célula δ. La fila inferior muestra el proceso de transdiferenciación δ-β.

### 2.2.1 –Plasticidad del islote pancreático

Varios estudios han demostrado que el páncreas posee plasticidad, de forma que las células endocrinas son capaces de adaptarse al estrés metabólico mediante procesos de transdiferenciación<sup>(92-97)</sup>. En este sentido, los trabajos publicados por *Chera et al.*<sup>(98)</sup> sugirieron que la pérdida masiva de células  $\beta$ -pancreáticas estimulaba procesos de transdiferenciación celular  $\alpha$ - $\beta$  y  $\delta$ - $\beta$  en modelos murinos adultos y jóvenes respectivamente. Por su parte, dentro de la literatura científica consultada, encontramos varios estudios sobre modificaciones génicas a nivel de FTs que podrían confirmar la capacidad que tienen las células del islote pancreático de sufrir procesos de transdiferenciación; así pues, *Druelle et al.*<sup>(99)</sup> describieron como la expresión ectópica de PAX4 era capaz de estimular la expresión de un fenotipo  $\beta$  funcional en células  $\delta$ , mientras inducía neogénesis  $\beta$  a partir de células  $\delta$  y células ductales pancreáticas; *Talchai et al.*<sup>(100)</sup> quienes mediante estudios de trazado de linaje revelaron que la delección de la proteína *forkhead box O1* (FOXO1), un FT implicado en la señalización de la insulina, inducía la desdiferenciación de las células  $\beta$ -pancreáticas, mientras que estimulaba la expresión de PDX1, Maf-A y NKx6.1 en las células  $\alpha$ -pancreáticas y  $\delta$ -pancreáticas.

A su vez, *Schaffer et al.*<sup>(101)</sup> estudiaron que la delección de NKx6.1 en las células  $\beta$ -pancreáticas estimulaba la expresión de un fenotipo  $\delta$  en estas células, sugiriendo que NKx6.1 suprimía ciertos genes característicos de las células  $\delta$ -pancreáticas dentro de los núcleos de las células  $\beta$ -pancreáticas. De igual manera, se ha descrito que algunos fármacos pueden inducir procesos de transdiferenciación, tal es el caso del GABA, que parece inducir hiperplasia  $\beta$  a través una transdiferenciación  $\alpha$ - $\beta$ <sup>(102)</sup>; de igual forma, a través de la vía de señalización del GABA, un fármaco antimalárico, la artemisina es capaz de inducir transdiferenciación  $\alpha$ - $\beta$ , junto con un aumento de la secreción de insulina en células  $\alpha$ TC1, en larvas de *zebrafish* y en islotes humanos<sup>(103)</sup>. Finalmente, estudios realizados por *Piran et al.*<sup>(104)</sup> mostraron que el tratamiento con caeruleina, un fármaco parecido a la colecistoquinina, inducía

transdiferenciación  $\alpha$ - $\beta$  y posteriormente transdiferenciación  $\beta$ - $\delta$  en modelos murinos a los que previamente se les había destruido la masa celular  $\beta$  con alloxano.

### 2.2.2 – Plasticidad $\beta$ - $\delta$ en modelos de diabetes

Como se ha descrito anteriormente (**Figura 7**) las células  $\beta$ - y  $\delta$ -pancreáticas, además de tener un ancestro común, están acopladas eléctricamente, por lo que no es extraño pensar que exista algún tipo de relación fisiológica entre ambas<sup>(19,105)</sup>. Esto se pone en evidencia cuando observamos que, durante la pérdida o disminución de FTs claves para el linaje  $\beta$  aparecen alteraciones en las células  $\delta$ -pancreáticas, o en la somatostatina<sup>(99-100,106-108)</sup>. Aunque en estos estudios se ha manipulado la maquinaria transcriptómica de la célula, esta relación  $\beta$ - $\delta$  ha sido observada, además, en escenarios clínicos que cursan sin alteración de los FTs, por ejemplo: tras la destrucción de célula  $\beta$ -pancreática en la diabetes mellitus (DM) o cuando se altera la secreción de insulina por una mutación de activación sobre los canales de potasio acoplados a ATP. En ambos casos, se pueden observar alteraciones en la actividad de las células  $\delta$ -pancreática<sup>(16)</sup>. Así también, la relación  $\beta$ - $\delta$  ha sido descrita en diferentes modelos de DM<sup>(96)</sup>. Este es el caso de *Plesner et al.*<sup>(109)</sup>, quienes observaron insulinitis mediada por hiperplasia  $\beta$ -pancreática en ratones diabéticos no obesos (NOD) tratados previamente con estreptozotocina. Esta insulinitis ocurría a las 12 semanas de edad y posteriormente era seguida de una disminución de la masa celular  $\beta$  y un aumento de la masa celular  $\delta$  a las 24 semanas. También *Alán et al.*<sup>(110)</sup> describieron la existencia de una hiperplasia de células  $\delta$ -pancreáticas en las ratas Goto Kakizaki, un modelo espontáneo de DM2. A su vez, *Gallego et al.*<sup>(111)</sup> encontraron este mismo patrón en un modelo de ratas con diabetes durante la gestación. Finalmente, esta relación  $\beta$ - $\delta$  también ha sido descrita en humanos, tal es el caso de *Yoneda et al.*<sup>(112)</sup> y *Cinti et al.*<sup>(113)</sup>, quienes hallaron un aumento de células bihormonales insulina+/somatostatina+ y mayor cantidad de células  $\delta$ -pancreáticas expresando FTs de linaje  $\beta$  en pacientes con resistencia a la insulina (RI) y DM.

## **3 – Diabetes Mellitus**

### **3.1 – Aspectos generales**

Según la organización mundial de la salud (OMS)<sup>(114)</sup> se conoce como diabetes a todo trastorno metabólico crónico que cursa con aumento de la glucosa en sangre, que puede ir desde alteraciones genéticas hasta lesiones pancreáticas; y que con el tiempo provoca daño a diferentes órganos.

Se estima que un total de 537 millones de personas alrededor del mundo sufrían DM2 en 2021<sup>(115)</sup>, 8,4 millones presentaban DM1<sup>(116)</sup> y la diabetes gestacional tenía una prevalencia del 14%<sup>(117)</sup>. Además, 6-7 millones de personas murieron ese año por causa de esta enfermedad. En la actualidad se estima que existen más de 61 millones de personas diabéticas en Europa y que los gastos económicos alcanzan los 170 millones de euros al año aproximadamente<sup>(115)</sup>. Aunque el aumento en la esperanza de vida y la incorporación global de hábitos sociales poco saludables han ido aumentando la prevalencia de esta enfermedad, se estima que un 40% de los pacientes siguen sin ser diagnosticados en la actualidad, lo que tiene implicaciones pronósticas y terapéuticas. Finalmente, si no existen cambios en la tendencia, se espera que la DM alcance una prevalencia mundial de 12,2% y afecte a casi 783 millones de personas para el año 2045 aproximadamente<sup>(115)</sup>.

### **3.2 – Fisiopatología**

Según ha sido descrito anteriormente, la regulación del metabolismo de la glucosa se lleva a cabo por medio de la secreción hormonal de los islotes pancreáticos, de forma que la hiperglucemia estimula la secreción de insulina y la hipoglucemia la secreción de glucagón; mientras que la somatostatina actúa como inhibidor de ambas hormonas.

Cuando este delicado equilibrio metabólico y hormonal se rompe, puede aparecer el trastorno clínico conocido como DM. De forma que, esta enfermedad se caracteriza por hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperglucagonemia y, tal vez, una hiposomatostatínemia, debido a una posible reducción y disfunción de las células  $\delta$ -pancreáticas<sup>(8,18,118-122)</sup>. Por otro lado, estudios de metabolómica han demostrado que no solo el metabolismo de la glucosa está alterado, al parecer también se encuentran alteraciones en el perfil proteico (aminoácidos aromáticos y ramificados) y lipídico (fosfolípidos, esfingolípidos, glicerofosfolípidos, etc), demostrando una asociación entre la diabetes y los trastornos proteicos y lipídicos<sup>(123-126)</sup>.

Como se ha visto, los aspectos fisiopatológicos de la DM siguen sin estar del todo claros en la actualidad, sin embargo, se puede afirmar que la hiperglucemia es la condición clínica que define la enfermedad. De esta forma, las guías de práctica clínica de las diferentes sociedades científicas han propuesto una serie de criterios diagnósticos basados en la concentración de la glucosa plasmática siendo requerido uno solo de estos criterios positivos para el diagnóstico<sup>(127)</sup>:

- Glucemia en ayunas de 8 horas  $\geq 126$  mg/dl
- Glucemia 2 horas después de sobrecarga con 75 gramos de glucosa  $\geq 200$  mg/dl
- Hemoglobina glucosilada A1C  $\geq 6,5\%$
- Glucemia aleatoria  $\geq 200$  mg/dl en paciente con síntomas clásicos.

Algunos de los síntomas clásicos del paciente diabéticos son: polifagia, pérdida de peso, polidipsia, poliuria, disnea e infecciones recurrentes. Muchos de estos síntomas se explican porque, al no haber insulina funcional, las células son incapaces de captar la totalidad de la glucosa del plasma, de forma que, se produce una disminución en el rendimiento energético de las mismas.

Este déficit de energía produce un aumento del apetito y explica la pérdida de peso descrita en estos pacientes. Por su parte, la hiperglucemia produce un aumento de

la osmolaridad plasmática y estimula la sed. Finalmente, el aumento del volumen plasmático desencadena un aumento de la frecuencia y el volumen miccional.

Si la hiperglucemia no se controla y se mantiene en el tiempo, puede causar daños agudos y crónicos a la salud. Dentro de las complicaciones agudas de la DM encontramos la cetoacidosis diabética, el coma hiperosmolar y la hipoglucemia, cuadros clínicos complejos que, de no ser tratados inmediatamente, pueden poner en riesgo la vida del paciente. Por otro lado, la DM puede cursar con daño macrovascular y microvascular, estas son complicaciones crónicas que van deteriorando el organismo progresivamente, disminuyendo tanto la calidad como la expectativa de vida del paciente. Las complicaciones macrovasculares más frecuentes son la enfermedad arterial coronaria, la arteriopatía periférica y la enfermedad cerebrovascular. Finalmente, las complicaciones microvasculares más frecuentes son la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía periférica<sup>(115)</sup>.

### **3.2.1 – Tipos de diabetes**

#### **3.2.1.1 – Diabetes mellitus tipo 1**

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmune producida por una destrucción masiva de las células  $\beta$ -pancreáticas debido a la acción de linfocitos B y T autorreactivos. Debido a esta destrucción, el páncreas es incapaz de producir insulina en respuesta a la hiperglucemia.

Actualmente se cree que en esta autoreactividad del sistema inmune, están implicados una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas, siendo el 50% de estas debido a mutaciones en los *loci* del antígeno leucocitario humano (HLA), ubicados en el cromosoma 6; el resto de alteraciones estarían fuera de estos *loci*, como la inactivación del alelo materno para el gen de la insulina o como el *splicing* alternativo del ARNm del islote<sup>(128-129)</sup>.

Dentro de la historia natural de la DM1 encontramos 3 fases, aunque de duración incierta: una primera fase en la que el paciente es asintomático pero tiene presencia de autoanticuerpos; una segunda fase en la que presenta alteraciones del metabolismo de la glucosa (disglucemia); y una tercera fase en la que ya hay presencia de síntomas<sup>(130)</sup>. El diagnóstico de DM1 se realiza por medio de la identificación de autoanticuerpos en sangre, ya que son negativos en otros tipos de diabetes. Entre los autoanticuerpos más frecuentes están<sup>(131-133)</sup>: anti-islotos (ICA), anti-descarboxilasa del ácido glutámico (AntiGAD), anti-tirosina fosfatasa (IA-2A), anti-insulina (IAA), anti-transportador de zinc 8 (ZnT8A).

Los pacientes con DM1 solo pueden ser tratados con insulina inyectable y tienden a debutar a muy corta edad, muchas veces presentando una cetoacidosis diabética; sin embargo, aunque la DM1 es la forma típica en la infancia, esta entidad también puede manifestarse en pacientes adultos<sup>(134)</sup> y se le identifica como diabetes autoinmune latente del adulto (LADA).

### **3.2.1.2 – Diabetes mellitus tipo 2**

A diferencia de la DM1, en la DM2 no hay autoanticuerpos, pero, los tejidos periféricos se hacen resistentes a la insulina; esto quiere decir que, aunque hay hormona en circulación no hay receptores suficientes o los tejidos no son capaces de responder por fallos en la vía de señalización; por ende, son necesarias mayores cantidades de la hormona para que entre la glucosa a las células. Por su parte, como los tejidos no responden, se acumula la glucosa y se genera hiperglucemia. De este modo se crea un círculo vicioso en donde, a mayor resistencia, mayor secreción de insulina, estableciéndose una hiperinsulinemia que durante un tiempo contrarresta la hiperglucemia. Sin embargo, las células  $\beta$ -pancreáticas no son capaces de mantener este ciclo de forma indefinida y terminan claudicando, generando un déficit de insulina similar al que ha sido descrito en pacientes con DM1.

Las causas de la DM2 son todavía desconocidas. A diferencia de la DM1, donde gran parte de las alteraciones ocurren en los *loci* del HLA, en la DM2 solo sabemos que es una enfermedad poligénica<sup>(135-136)</sup>, y que está sujeta a la influencia de varios factores que se conocen como exposoma (estilos de vida, valores intrínsecos de la persona como la microbiota o la obesidad, influencia del ambiente externo, etc.)<sup>(137-138)</sup>, ya que diversos metaanálisis han demostrado la asociación que existe entre una mayor exposición a estos factores y un mayor riesgo a padecer la enfermedad.

A diferencia de la DM1, a los pacientes con DM2 se les trata con fármacos que permiten mejorar la resistencia a la insulina, ya sea porque mejoran la sensibilidad de los tejidos, aumentan la secreción de insulina, o impiden la absorción de carbohidratos a nivel gástrico; a estos fármacos se les conoce como hipoglucemiantes orales y entre los más usados tenemos:

- Sulfonilureas y meglitinidas, son fármacos que estimulan directamente a la célula  $\beta$ -pancreática, potenciando la secreción de insulina (secretagogos). Su mecanismo de acción radica en la inhibición del canal de potasio acoplado a ATP, causando una alteración en el potencial de reposo de la membrana, lo que permite la entrada de calcio y la subsecuente liberación de los gránulos secretorios<sup>(139)</sup>.

Las sulfonilureas se clasifican según la generación: primera (Tolbutamida, Tolazamida, etc.) y segunda (Glibenclamida, Glicazida, Glimepirida, etc); actualmente se prescriben solo los de segunda generación debido a la gran cantidad de efectos secundarios obtenidos con los de la primera generación (hipoglicemias, ganancia de peso, problemas cardiacos, etc)<sup>(140)</sup>.

Las meglitinidas, son secretagogos con la misma función que las sulfonilureas pero con estructura diferente, actualmente existen dos fármacos para su uso clínico: Repaglinida y Nateglinida<sup>(141)</sup>.

- Biguanidas, dentro de este grupo de fármacos, la Metformina es la única aprobada para el tratamiento de la diabetes, su mecanismo de acción implica la disminución de la gluconeogénesis hepática al bloquear lanzaderas redox mitocondriales<sup>(142-143)</sup>. Sin embargo, aún no se comprende del todo el mecanismo de acción de la Metformina y es probable que el fármaco tenga efectos pleiotrópicos; varios estudios han demostrado que la Metformina es un sensibilizador de la insulina y probablemente actúa en la luz intestinal, la microbiota o incluso las mitocondrias hepáticas<sup>(144)</sup>.

Actualmente la Metformina es el fármaco de primera línea para tratar la DM2, ya que logra disminuir la glucemia, tiene un perfil de seguridad amplio, pocos efectos secundarios e interacciones medicamentosas y es de bajo costo<sup>(145)</sup>. Como segunda línea se usa combinado con cualquier otro hipoglicemiante. La Fenformina y la Butformina no están recomendadas debido a su implicación en acidosis láctica.

- Agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), como su nombre indica, son fármacos que reproducen los efectos del GLP-1 endógeno. Por ende, estimulan la secreción de insulina a través de la estimulación del AMPc y PKA, inhiben la secreción de glucagón y promueven el enlentecimiento del vaciamiento gástrico debido a su acción sobre el nervio vago, que induce relajación del estómago, reducción del antro y disminución de la motilidad del duodeno. Por otro lado, promueven la saciedad al actuar sobre neuronas NPY del núcleo arcuato y el núcleo parabraquial lateral<sup>(146-149)</sup>.

De entre los fármacos más usados encontramos la Exenatida, Liraglutida y Semaglutida, etc.

- Inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (iDPP-4), son fármacos que inhiben la DPP-4, la cual es una enzima que degrada GLP-1. Por ende, al actuar sobre estas enzimas, los niveles de GLP-1 en sangre aumentan 2 a 3 veces.

Sin embargo, la estimulación del receptor de GLP-1 es mayor con los agonistas de GLP-1 que con los iDPP4<sup>(150)</sup>.

Como representante de esta familia de fármacos encontramos la Sitagliptina, saxagliptina, la alogliptina y la vildagliptina.

- Tiazolidinedionas, son fármacos que actúan sobre el receptor y activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR- $\gamma$ ); el cual es un receptor nuclear. La unión de PPAR- $\gamma$  con estos fármacos puede causar activación o represión de genes diana que regulan la transcripción y traducción genética de una variedad de proteínas involucradas en la diferenciación celular y el metabolismo de la glucosa (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , resistina y 11- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa-1) y los lípidos (lipoproteína lipasa, proteína transportadora de ácidos grasos y receptor 1 de LDL oxidado), mejorando la sensibilidad a la insulina e inhibiendo la gluconeogénesis, la lipólisis periférica y los niveles de ácidos grasos libres y grasa visceral<sup>(151-152)</sup>. La pioglitazona y la rosiglitazona son fármacos de este grupo. Sin embargo, la Administración de Alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA) y la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) han comunicado que la pioglitazona aumenta el riesgo de cáncer de vejiga<sup>(153-154)</sup>. Con respecto a la rosiglitazona, al menos en Europa, se ha suspendido su comercialización debido a un aumentado riesgo cardiovascular<sup>(155)</sup>.
- Inhibidores del cotransportador sodio/glucosa 2 (iSGLT2), son fármacos que, como su nombre lo indica, inhiben el cotransportador sodio/glucosa 2 que se encuentra en el segmento 1 del túbulo renal proximal; éste es el transportador de mayor importancia del riñón y transporta glucosa gracias al gradiente de energía electroquímica que se genera por la reabsorción de sodio en el filtrado tubular. Su mecanismo de acción radica en aumento de la pérdida de glucosa por orina (glucosuria), generando disminución de la glucemia y

glucotoxicidad, además de aumentar la sensibilidad a la insulina, disminuir la hemoglobina glucosilada A1C y potenciar la función  $\beta$ .

Por otro lado, el uso de los iSGLT2 previene la aparición de nefropatía diabética y mejora los parámetros cardiovasculares, al inducir pérdida de sal por orina (natriuresis) y disminuir la volemia y presión arterial. Además, induce pérdida de peso al someter al cuerpo a un estado de deprivación glucémica debido a la glucosuria<sup>(156-157)</sup>.

Entre los miembros de esta familia se encuentran: Depaglafozina, Canaglifozina y Empaglifozina.

No obstante, cuando las células  $\beta$ -pancreáticas se agotan y terminan en un fallo de secreción o incluso en muerte celular, estos fármacos no tienen un efecto positivo y es por ello que, llegado el caso es necesario usar insulina inyectable.

### **3.2.1.3 – Diabetes gestacional**

El término diabetes gestacional (DG) hace referencia a una mujer sana que durante su embarazo presenta resistencia a la insulina (RI) e hiperglucemia, lo que desencadena una diabetes que puede ser transitoria, o no. Por lo tanto, esta condición clínica no debe ser confundida con la de una paciente previamente diabética que resulta embarazada, pues son dos situaciones distintas desde el punto de vista fisiopatológico.

El embarazo es un proceso en el cual ocurren adaptaciones fisiológicas que buscan establecer las condiciones óptimas para la supervivencia del feto; de entre estos cambios, es relevante destacar el papel que cumple el sistema endocrino. Se sabe que conforme va avanzando la gestación la sensibilidad a la insulina se va perdiendo, hasta llegar a un déficit de aproximadamente el 50%, sin que esto signifique la existencia de DG<sup>(158-161)</sup>. Sin embargo, aunque existe una RI fisiológica y los niveles de glucosa aumentan, la insulina circulante es suficiente para regular la glucemia. En la madre, el equilibrio entre la RI y la hiperactividad de las células

$\beta$ -pancreáticas, asegura un flujo constante de nutrientes hacia el feto hasta el final del embarazo; y, al menos en modelos murinos, se ha visto que comenzando un poco antes del parto y extendiéndose hasta el período posparto, la masa de células  $\beta$ -pancreáticas se reduce a su tamaño previo<sup>(162)</sup>.

La DG aparece cuando ocurre un fallo en esta regulación y los niveles de glucosa en sangre aumentan a tal nivel que la insulina circulante es incapaz de contrarrestarlos<sup>(163)</sup>. Durante este escenario pueden ocurrir dos finales, una vez la madre da a luz, el equilibrio metabólico vuelve y la RI desaparece; o estos mecanismos de adaptación del embarazo fallan y la RI más la hiperglucemia continúan tras el parto, desarrollando una DM2<sup>(158)</sup>, en especial, en aquellas mujeres con antecedentes de riesgo de síndrome metabólico (edad, tabaco, sedentarismo, dieta hipercalórica, hipertensión, entre otros). La DG se diagnostica entre las 24-28 semanas a través de una sobrecarga oral de glucosa (SOG). La *American Diabetes Association* (ADA)<sup>(164)</sup> y la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO)<sup>(165)</sup>, establecen que los criterios para diagnosticar la DG son: niveles de glucemia en ayunas superiores a los 105 mg/dl, glucemia a 1 hora postprandial >190mg/dl y a las 2 horas postprandial >145 mg/dl. La DG no solo causa daño a la madre como preeclampsia, hipoglicemias, polihidramnios, aborto espontáneo, riesgo de parto pretérmino, etc., sino también al feto, ya que la constante entrada de altos niveles de glucosa a la circulación fetal causan que éste sufra un sinnúmero de patologías metabólicas que dificultaran el parto y la vida del niño; ejemplo de éstas son: macrosomía, comunicaciones interventriculares, retraso del crecimiento intrauterino (RCIU), resistencia a la insulina, hipoglicemia fetal, malformaciones estructurales y muerte fetal<sup>(166-167)</sup>. El tratamiento de la DG debe tomar en cuenta las posibles consecuencias que implicaran para el feto. Por eso, actualmente el tratamiento se basa en cambios de estilo de vida y control de peso de la madre. En cuanto a fármacos, el único tratamiento aceptado para la DG es la insulina. Sin embargo, al tener una patogenia parecida a la DM2 se han hecho estudios sobre el uso de hipoglucemiantes orales, que, para la fecha, no han sido concluyentes<sup>(168)</sup>.

### 3.2.1.4 – Otros tipos de diabetes

Por otro lado, existen otros tipos de diabetes en los que las causas varían, ya sea por mutaciones genéticas específicas, donde encontramos la diabetes del adulto de inicio juvenil (MODY); la cual es una enfermedad autosómica dominante cuya alteración se encuentra a nivel de los genes que regulan la secreción de insulina como respuesta a la glucosa<sup>(169)</sup>. Hasta la fecha se conocen 14 mutaciones diferentes que generan un MODY; de entre ellas las más comunes son:

- MODY 1, en donde la mutación se encuentra en el gen del factor nuclear 4 alfa del hepatocito (HNF4A); los pacientes presentan macrosomía y aumento de peso al nacer, además una disminución del colesterol HDL.
- MODY 2, en donde la mutación se encuentra en el gen de la glucokinasa (GCK), los pacientes presentan una ligera hiperglucemia ya que el umbral para insulina se altera, sin embargo, el riesgo de complicaciones micro y macrovasculares es bajo.
- MODY 3, en donde la mutación se encuentra en el gen del factor nuclear 1 alfa del hepatocito (HNF1A), esta enzima juega un papel crucial en el transporte y metabolismo celular, así como también en el metabolismo mitocondrial de la célula  $\beta$ . Estos pacientes poseen un umbral renal para la glucosa disminuido.
- MODY 4, en donde la mutación se encuentra en el gen de PDX1.
- MODY 5, en donde la mutación se encuentra en el gen del factor nuclear 1 beta del hepatocito (HNF1B), esta forma representa <5%. Los pacientes pueden presentar sintomatología variada como diabetes de edad temprana, así como malformaciones renales (quistes renales, displasias renales, Enfermedad glomeruloquística renal familiar hipoplásica).

- MODY 6, en donde la mutación se encuentra en el gen de la diferenciación neurogénica 1 (NeuroD1).

De entre los anteriores, las formas más comunes son MODY 3, MODY 2, MODY 1.

Por otro lado, existen diabetes causadas por lesiones pancreáticas que, según la ADA y la OMS, son definidas como DM tipo 3c. En este caso la lesión ocurre por daño del tejido exocrino sobre el tejido endocrino, como por ejemplo pancreatitis (79%), adenocarcinoma de páncreas (8%), hemocromatosis (7%) fibrosis quística (4%), o pancreatectomías (2%)<sup>(170-171)</sup>. De igual forma, encontramos diabetes por tumores endocrinos<sup>(172-173)</sup> como, por ejemplo:

- Glucagonomas (tumores secretores de glucagón), con una incidencia de 1 caso por 20.000.000 de habitantes. Los síntomas aparecen cuando el tumor tiene un tamaño de entre 4 a 5 cm y ha hecho metástasis, principalmente a hígado. La clínica se caracteriza por el eritema migratorio necrolítico, una diabetes leve, lesiones bucales (glositis, queilitis, estomatitis), trombosis venosa profunda, pérdida de peso y anemia normocítica, normocrómica.
- Somatostatina (tumores secretores de somatostatina), con una incidencia de 1 caso por 40.000.000 de habitantes. A pesar de ser un tumor secretor de somatostatina, este tumor presenta hipersomatostatinemia en menos del 10% de los casos, siendo la clínica típica la de diabetes, esteatorrea, colelitiasis, pérdida de peso e hipoclorhidria.
- Acromegalia (tumores secretores de hormona de crecimiento), la hormona del crecimiento induce gluconeogénesis, glucogenólisis y lipólisis, causando RI, lo que genera un aumento en la secreción de insulina que, eventualmente se deteriora, y se desarrolla DM.

Además de lo anterior, también existe DM inducida por fármacos<sup>(172)</sup> como por ejemplo glucocorticoides,  $\beta$ -bloqueantes, tiazidas, etc.

### 3.2.2 – Resistencia a la insulina (RI)

Según ha sido descrito, la RI juega un papel clave en el desarrollo de DM2 y DG, por lo que es importante comprender los mecanismos responsables de la RI. Se sabe que la RI es un estado metabólico en el que los tejidos periféricos no son capaces de captar la glucosa con niveles fisiológicos de insulina, desencadenando una hiperglucemia y una hiperinsulinemia; la causa de este fallo en el metabolismo de la glucosa todavía no está claro, pero es sabido que hay algún componente genético involucrado, pues esto varía según el individuo.

Uno de los aspectos fisiopatológicos más importantes de la RI es la incapacidad de los tejidos periféricos para reconocer la insulina, principalmente el músculo y el hígado. Es probable que el estrés oxidativo, la inflamación o la lipodistrofia, interfieran con la señalización de la insulina, suprimiendo los sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1, IRS-2) e inhibiendo, aguas abajo, la ruta PI3K/PKB<sup>(174-179)</sup>. Esto dificultaría la entrada de glucosa, favorecería la hiperglucemia y estimularía tanto la lipólisis como una mayor secreción de insulina.

Además, la célula  $\beta$ -pancreática responde a la RI con una hiperplasia e hipertrofia inicial, que genera una respuesta adaptativa caracterizada por un aumento en la secreción de insulina y un daño en el acoplamiento de las señales de calcio<sup>(180-181)</sup>. Así, el aumento de la glucemia y de los ácidos grasos en sangre incrementan el daño en las células  $\beta$ -pancreáticas. Además, se ha descrito que la acumulación de amilina en el páncreas, principalmente en las células  $\beta$ -pancreática, causa mayor estrés oxidativo, llevando eventualmente a la apoptosis de la célula<sup>(177-178)</sup>.

Finalmente, es importante resaltar que, debido a la hiperglucemia, en las células  $\alpha$ -pancreáticas parece haber alteraciones en la vía de la proteína diana del complejo 1 de la rapamicina de mamíferos (mTORC1), causando hiperglucagonemia en ayunas y un retraso de la supresión del glucagón en estado postprandial<sup>(121,182-183)</sup>.

### 3.3 – Embarazo como modelo de resistencia insulina

Como se ha descrito previamente, durante el embarazo existen una serie de cambios metabólicos que pueden crear un estado de RI similar al que ocurre durante la DM2. Es probable que esto suceda como consecuencia de un aumento de la concentración plasmática de hormonas placentarias como los estrógenos, la progesterona, la prolactina (PRL), el cortisol o el lactógeno placentario humano (LP). Aunque no se ha demostrado un efecto directo de éstas hormonas sobre la sensibilidad de los receptores a la insulina materna<sup>(162, 184)</sup>, los estrógenos son capaces de inducir aumento de la masa celular  $\beta$  y de la secreción de insulina en modelos murinos<sup>(185-189)</sup>, mientras que en humanos este aumento celular  $\beta$  esta descrito sin relación con la hiperinsulinemia<sup>(184)</sup>. Por otro lado hay estudios que asocian el efecto de PRL y LP con un aumento de la proliferación celular  $\beta$ , así como también con un aumento en la secreción de insulina tanto en islotes murinos como en humanos<sup>(190-195)</sup>, además de que en células Ins-1 se ha descrito como la expresión constitutiva de LP induce proliferación y aumento de la transcripción de los genes de la insulina y el receptor de la glucosa Glut-2<sup>(196)</sup>. Sin embargo, *Rassie et al.*<sup>(197)</sup> en un meta-análisis de 2022, cuestionaron el efecto del PL sobre la glicemia en mujeres embarazadas.

Por su parte, las concentraciones plasmáticas de estradiol ( $E_2$ ), de entre todos los estrógenos, son las que aumentan de forma más significativa durante la gestación. Esto sugiere que, tanto la disminución de hasta un 50% de la sensibilidad a la insulina durante el embarazo<sup>(158)</sup>, como la disminución de IRS-1 y su fosforilación<sup>(198)</sup>, podrían estar en relación con el aumento de los niveles plasmáticos de esta hormona.

Aunque la mayoría de los estudios realizados sobre los cambios estructurales y funcionales que sufre el islote pancreático durante el embarazo han sido enfocados en las células  $\beta$ <sup>(199-200)</sup>, también se ha descrito un aumento en la proliferación y en

el área de las células  $\alpha$ -pancreáticas<sup>(201-202)</sup>. Sin embargo, actualmente se sabe muy poco sobre los cambios que sufren las células  $\delta$ -pancreáticas durante la gestación.

De esta forma, si se toma en cuenta el papel inhibitorio que ejerce la somatostatina sobre la secreción de insulina y glucagón, parece lógico suponer que el estudio del comportamiento de las células  $\delta$ -pancreáticas en un entorno de RI, como el que ha sido descrito en la gestación, podría ayudar a aclarar las interacciones que existen dentro del islote pancreático y su plasticidad para responder a distintos estímulos metabólicos.

**JUSTIFICACIÓN**

### 1 - ¿Por qué estudiar las células $\delta$ -pancreáticas?

#### 1.1 – La diabetes: un problema de salud pública

Han pasado más de 100 años desde el descubrimiento de la insulina y, aun así, seguimos sin encontrar una cura definitiva para la DM. Todos los estudios que se han hecho sobre la estructura y función del islote pancreático solo han servido para darnos cuenta de que la DM es una enfermedad más complicada de lo que se pensaba, pues no implica tan solo un trastorno en la producción y funcionamiento de la insulina, sino que, al contrario, esta enfermedad es el resultado de una compleja disfunción multihormonal.

El islote pancreático funciona gracias a una interrelación paracrina compleja que ocurre entre todos los tipos celulares que lo conforman. Hasta ahora la mayoría de los trabajos de investigación se han centrado en el estudio de las células  $\alpha$ - y  $\beta$ -pancreáticas, pues estas células son las que se encuentran en mayor proporción dentro del islote; siendo escasa la evidencia científica disponible en relación con el resto de las líneas celulares.

En este sentido, las células  $\delta$ -pancreáticas son una minoría dentro del islote pancreático, pero cumplen un papel importante en la regulación de la insulina y el glucagón, ya que secretan el principal inhibidor de estas hormonas, estamos hablando de la somatostatina. Aunque se desconoce el papel que juegan las células  $\delta$ -pancreáticas en la fisiopatología de la DM, recientemente se ha demostrado que la función de las mismas podría estar alterada durante la enfermedad<sup>(18, 117-118)</sup>.

Así, para poder comprender el papel que juegan las células  $\delta$ -pancreáticas en situaciones patológicas como la RI o la DM, podría ser necesario determinar primero cómo se comportan estas células en situaciones fisiológicas de estrés.

De esta forma queda justificado este proyecto de investigación, pues el estudio de los cambios estructurales y funcionales que sufren las células  $\delta$ -pancreáticas durante situaciones de estrés metabólico como la gestación podría ayudarnos a definir mejor algunos aspectos fisiopatológicos de la DM2 y la DG. Finalmente, los resultados de este proyecto podrían sentar las bases para el desarrollo de futuras investigaciones sobre la enfermedad, como, por ejemplo: la identificación de nuevas dianas terapéuticas o el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas.

# III

## **LIMITACIONES**

## III - Limitaciones

---

### 1 – Limitaciones del proyecto

Durante la realización de este trabajo se encontraron las siguientes limitaciones:

- Modelo de trabajo: Debido a la imposibilidad de realizar una biopsia de tejido pancreático humano, la obtención de islotes pancreáticos humanos se vio limitada a la utilización de necropsias, lo que impidió obtener una cantidad de muestras mayor. Es por ello que la mayoría de los resultados se obtuvieron en modelos murinos y solo podemos asumir que los resultados obtenidos son equiparables a lo que sucedería en los humanos.
- Trazado de linaje: Esta técnica es la adecuada según estándares actuales para estudiar la transdiferenciación, sin embargo, es una herramienta complicada de desarrollar porque se necesitan animales específicos y difíciles de obtener. Estos ratones tienen que contener el promotor de somatostatina y un marcador (GFP, tomate, etc). De esta forma, no podemos hablar de transdiferenciación *per se* y solo podemos interpretar los resultados obtenidos mediante técnicas menos específicas.
- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR): Al no existir líneas celulares de células  $\delta$ -pancreáticas, las qPCRs se realizaron con extractos completos de islote pancreáticos, por lo que no se puede discernir de forma específica la expresión correspondiente a las células  $\delta$ .

# **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

## IV – Hipótesis y objetivos

---

### 1 - Hipótesis de trabajo

#### 1.1 – Hipótesis general

Durante la gestación el páncreas de la madre sufre una serie de adaptaciones para responder a las demandas metabólicas propias de dicha situación fisiológica. Por ello proponemos que las células  $\delta$ -pancreáticas sufren procesos de plasticidad celular como respuesta a los cambios hormonales propios de la gestación.

De esta forma, las células  $\delta$  estarían funcionando como una fuente de células endocrinas que pueden producir otras hormonas en estas condiciones especiales.

#### 1.2 – Hipótesis específica

1. Las hormonas de la gestación inducen cambios en el páncreas endocrino.
2. Las células del islote pueden sufrir procesos de transdiferenciación celular como consecuencia de la acción de las hormonas del embarazo.
3. Las células  $\delta$ -pancreáticas pueden funcionar como un reservorio de células endocrinas, apagando y encendiendo factores de transcripción, para dar lugar a secreciones hormonales requeridas en determinadas circunstancias metabólicas.

## **2 - Objetivos del proyecto**

### **2.1 – Objetivo general**

Describir los cambios estructurales y funcionales que sufren las células del islote pancreático en modelos experimentales de gestación.

### **2.1 – Objetivos específicos**

1. Determinar la expresión proteica de insulina, glucagón, somatostatina y UCN3 en páncreas de roedores gestantes y controles.
2. Determinar la población de células bihormonales (insulina/somatostatina, insulina/glucagón, glucagón/somatostatina) en páncreas de roedores gestantes y controles.
3. Determinar la población de células  $\delta$ -pancreáticas que expresan marcadores nucleares de linaje  $\beta$  (Pdx1, Maf-A) en páncreas de roedores gestantes y controles.
4. Evaluar el efecto del estradiol y el lactógeno placentario sobre la expresión proteica de somatostatina en islotes pancreáticos murinos.
5. Determinar la expresión proteica de insulina, glucagón y somatostatina en islotes pancreáticos murinos y humanos tratados con hormonas de la gestación y controles.
6. Determinar la población de células bihormonales (insulina/somatostatina, insulina/glucagón, glucagón/somatostatina) en islotes pancreáticos murinos y humanos tratados con hormonas de la gestación y controles.

7. Cuantificar las células  $\delta$ -pancreáticas con marcadores nucleares de linaje  $\beta$  (somatostatina/Pdx1, somatostatina/Maf-A) en islotes pancreáticos murinos y humanos tratados con hormonas de la gestación y controles.
8. Cuantificar la secreción de somatostatina en islotes pancreáticos murinos y humanos tratados con hormonas de la gestación y comparar los resultados obtenidos con respecto a controles.
9. Cuantificar la expresión relativa de genes de célula  $\beta$  y  $\delta$  en islotes pancreáticos murinos tratados con hormonas de la gestación y comparar los resultados obtenidos con respecto a controles.
10. Cuantificar la expresión proteica de UCN3 y dinorfina en islotes pancreáticos murinos tratados con hormonas de la gestación y comparar los resultados obtenidos con respecto a controles.



**MATERIALES Y MÉTODOS**

## V – Materiales y métodos

---

### 1 - Diseño metodológico

#### 1.1 - Diseño del estudio

Se trata de un estudio preclínico de investigación básica, que utilizó modelos experimentales animales y humanos para desarrollar análisis descriptivos *in vivo* y *ex vivo*.

### 2 - Modelos experimentales

#### 2.1 - Aspectos éticos

En este proyecto se utilizaron muestras biológicas de origen animal y humano.

Los modelos experimentales animales fueron criados en condiciones de cautiverio por el Servicio de Investigación y Bienestar Animal (SIBA) de la Universidad de Valladolid (UVa), utilizando jaulas ventiladas con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas cada uno y un suministro de agua *ad libitum*.

El personal responsable de la manipulación de los animales de experimentación fue debidamente formado y acreditado para este fin por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Consejería de Medio Ambiente, Agricultura e Interior de la Comunidad de Madrid, España.

Finalmente, todos los experimentos llevados a cabo con modelos animales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación y Bienestar Animal de la Uva y por la consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca de la junta de Castilla y León, con número de proyecto 8608731.

Por su parte, las muestras biológicas de origen humano fueron obtenidas a partir de necropsias en el Hospital de Montpellier, en el laboratorio de terapia celular para diabetes (LCTD). Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con el comité de ética local (Centro de Recursos Biológicos, Colección IRB 5 '*Human Islets of Langerhans*', Biobank no. BB-0033-00031, CHU, Montpellier), el comité de ética de la *Agence de la Biomédecine* francesa (ABM no. PFS 13-008) y del Ministerio de Investigación francés (DC-2011-1401 y AC-2017-3039).

La donación de órganos y la extracción post mortem para trasplantes se llevó a cabo de acuerdo con los estatutos de la legislación francesa de bioética y la Agencia Francesa de Biomedicina.

De esta forma, el primer paso consistió en la verificación del consentimiento presunto mediante la consulta del Registro Nacional de Negativas. Así, se pudo confirmar que el donante, en vida, no se negaba a la donación de órganos con fines terapéuticos o de investigación.

Finalmente, el equipo médico responsable de la extracción solicitó a los familiares y allegados del donante la firma de un consentimiento informado sobre el procedimiento. De esta manera, las muestras solo fueron extraídas del cadáver después de haberse confirmado la disposición del fallecido y su entorno familiar a la extracción y donación de órganos.

## 2.2 - Modelos de gestación

### 2.2.1 - Descripción del material biológico

En este proyecto de investigación se extrajeron, procesaron y analizaron muestras de tejido pancreático de origen murino y humano.

Las muestras biológicas obtenidas de los modelos murinos procedían de roedores de 8 semanas de vida. Para los experimentos *in vivo* se usaron ratonas gestantes y para los experimentos *ex vivo* solo se utilizaron roedores macho puesto que estas muestras iban a ser estimuladas con estrógenos y se tenía que evitar los efectos de las hormonas del ciclo estral. De esta forma, las características basales de los roedores empleados se describen en el **Apéndice: Tabla 1**.

Por su parte, las muestras de tejido pancreático humano fueron extraídas de donantes no diabéticos que habían muerto por una causa ajena a la estructura o función del páncreas. Las características biométricas básicas de los donantes se describen en el **Apéndice: Tabla 2**.

### 2.2.2 – Definición de los modelos de experimentación

En este proyecto se utilizaron dos modelos de experimentación diferentes: un modelo de gestación *in vivo* y un modelo de hormonas gestacionales *ex vivo*. Ambos modelos fueron diseñados con el objetivo de evaluar el comportamiento de las células  $\delta$ -pancreáticas en respuesta a condiciones de estrés fisiológico como las que suceden durante el embarazo.

De esta manera, en el modelo de gestación se usaron cortes histológicos de tejido pancreático procedentes de ratonas hembra C57BL/6J. Los ejemplares fueron divididos en dos grupos, uno experimental y otro control. El grupo experimental estuvo conformado por hembras preñadas con 14,5 días *post coitum* (dpc)

hiperinsulinemicas pero normoglucemicas; mientras que el grupo control estuvo formado por hembras no preñadas: Las características metabólicas de estas ratonas es la siguiente: Glucosa preñadas  $126 \pm 4$  mg/dl vs control  $125 \pm 3$  mg/dl; insulina preñadas  $1,219 \pm 0,337$  ng/ml vs control  $0,218 \pm 0,014$  ng/ml.

Por su parte, en el modelo de hormonas gestacionales se utilizaron islotes pancreáticos de origen murino: ratones C57BL/6J y ratas Wistar; además de islotes humanos. Como la cantidad de islotes pancreáticos disponibles en las muestras biológicas procedentes de ratones, ratas y humanos era significativamente diferente, se tuvieron que usar protocolos de extracción específicos para cada especie.

Las muestras obtenidas fueron depositadas en un medio de cultivo específico para islotes pancreáticos y posteriormente fueron utilizadas para generar un modelo de tratamiento hormonal con diferentes combinaciones de hormonas gestacionales.

## **2.3 - Medios de cultivo y de extracción**

Durante la extracción y manipulación de los islotes pancreáticos fue necesario utilizar una serie de medios de extracción y de cultivo con el objetivo de garantizar la correcta realización de la técnica y la viabilidad del tejido biológico. De modo que, las características de cada uno de estos medios se describen en el apartado correspondiente.

### **2.3.1 - Medios de cultivo**

- Medio de islotes sin rojo fenol:

Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, sin glucosa, sin rojo fenol, (Gibco, EE. UU.); Suero fetal bovino (SFB), sin carbón, 10% v/v (Gibco, EE. UU.); Glucosa 5 mM y Streptomycin/Penicilina 10 µg/ml.

- Medio de islotes:

RPMI 1640, sin glucosa; SFB 10% v/v; Glucosa 5 mM y Streptomycin/Penicilina 10 µg/ml.

### **2.3.2 - Medios de extracción**

- Medio de aislamiento pH 7,4:

NaCl 115 mM; NaHCO<sub>3</sub> 10 mM; KCl 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,1 mM; HEPES 25 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM; Glucosa 5,5 mM; BSA sin ácidos grasos (Sigma-Aldrich, EE. UU.) 1% m/v en H<sub>2</sub>O Mili-Q.

- Medio de Hanks:

Medio Hanks (Gibco, EE. UU.) y NaHCO<sub>3</sub> 4 mM.

- Medio de Hanks - SFB:

Medio Hanks y SFB 10% v/v.

## **2.4 – Protocolos de extracción**

### **2.4.1 - Protocolo de extracción para modelo gestacional**

Tras cruzar hembras y machos se confirmó la fecundación por la presencia del tapón vaginal a primera hora de la mañana, a partir de aquí se esperaron 14 días para el sacrificio. Las ratonas fueron sacrificadas para la extracción del páncreas y posterior procesamiento de este para la obtención de bloques de parafina.

## **2.4.2 - Protocolo de extracción para modelo hormonal**

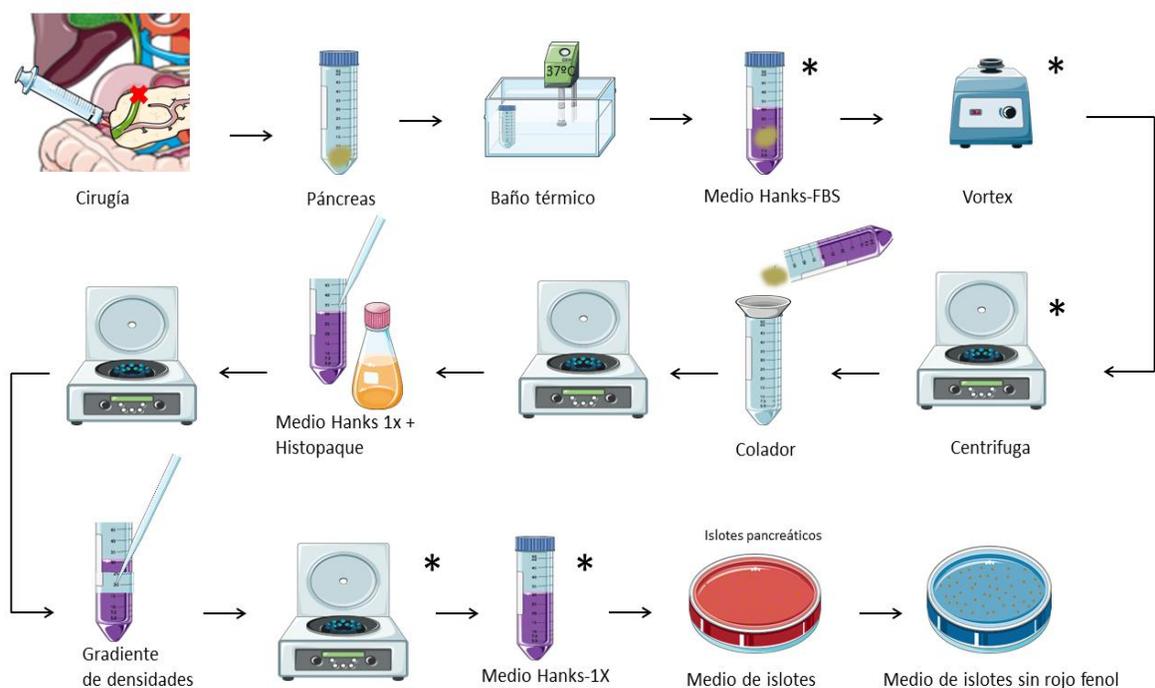
### **2.4.2.1- Extracción de islotes pancreáticos en ratas**

Las ratas fueron sacrificadas usando inhalación de isoflurano. Seguidamente, se realizó un corte en la línea media del abdomen, se realizó una disección por planos y se localizó el páncreas. Posteriormente se realizó una ligadura del colédoco y se perfundió a través del ducto pancreático 10 ml de solución de colagenasa (Roche, EE. UU.) al 0,017% m/v con el objetivo de preparar la digestión del páncreas. Acto seguido, se seccionaron las conexiones anatómicas, se extrajeron los páncreas de todas las ratas y se depositaron en tubos de 50 ml. De esta forma, cada uno de los tubos fue incubado en un baño térmico a 37°C durante 17 minutos con el fin de activar la acción digestiva de la colagenasa.

Posteriormente, los tubos fueron depositados en hielo para detener la reacción digestiva. Entonces, se vertió solución Hanks-SFB hasta completar 15 ml, a continuación, se agitaron los tubos con un vórtex y finalmente se centrifugaron a temperatura ambiente, durante 2 minutos y a 200 xG. Una vez acabado, se desechó el sobrenadante y se repitió este paso dos veces más. Tras completar los tres ciclos de centrifugado, se desecharon los sobrenadantes, se volvió a verter solución Hanks-SFB hasta llegar a los 10 ml, se usó de nuevo el agitador vórtex y se filtró el tejido pancreático con ayuda de un colador. De esta forma, el tejido pancreático recuperado fue introducido en nuevos tubos y estos fueron centrifugados a 200 xG, a temperatura ambiente durante 2 minutos. Tras desechar de nuevo los sobrenadantes, se añadió 10 ml de Histopaque® 10771 (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y se resuspendieron los sedimentos usando vórtex.

Posteriormente, se añadieron 10 ml de solución Hanks 1X de forma lenta y continua, generando un gradiente de densidades. Entonces, se centrifugó a 1.580 xG y 10°C durante 20 minutos y sin freno, para no romper el gradiente. Una vez cumplido el tiempo, se retiraron los islotes de la interfase entre el Histopaque® y el medio Hanks

con una pipeta y se depositaron en nuevos tubos, a los que se les añadió solución Hanks 1X hasta completar 30 ml y se centrifugó a 200 xG, a temperatura ambiente, durante 2 minutos. Posteriormente se lavaron 3 veces con Hanks 1X, con el fin de extraer los restos de Histopaque® que pudiesen quedar en los islotes. Tras realizar los lavados, se desecharon los sobrenadantes con pipeta y se añadieron 10 ml de medio para islotes a 37°C. Entonces, se resuspendieron los islotes y se pasaron a placas de Petri sin tratar para cultivo, para evitar adherencias, de 90x15 mm, que posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 2 horas para que se recuperasen del estrés sufrido. Cumplido el tiempo, se pasaron los islotes a medio de islotes sin rojo fenol y se dejaron las placas en el incubador durante 24 horas, quedando de esta manera listas para ser utilizadas al siguiente día (**Figura 9**).



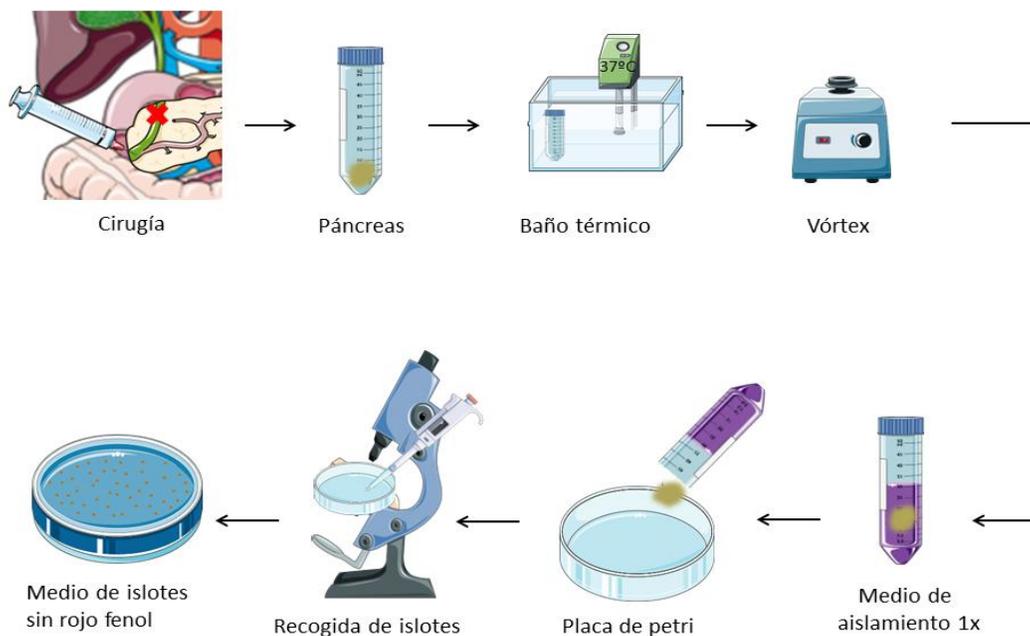
**Figura 9: Protocolo de extracción de islotes de rata.** Esta composición de imágenes muestra de forma simplificada los pasos que fueron necesario realizar con el fin de extraer los islotes pancreáticos de ratas. Los asteriscos indican aquellos pasos que deben ser repetidos varias veces. Las imágenes fueron creadas por medio de Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

#### **2.4.2.2- Extracción de islotes pancreáticos en ratones**

La extracción comenzó con el sacrificio de los ratones, usando para ello inhalación de isoflurano. Seguidamente, se realizó un corte en la línea media del abdomen, se realizó una disección por planos y se localizó el páncreas. Posteriormente se realizó una ligadura del colédoco y se perfundió a través del ducto pancreático 3 ml de solución colagenasa (Sigma-Aldrich Aldrich, EE. UU.) al 0,07% m/v con el fin de preparar la digestión del páncreas. Acto seguido, se seccionaron las conexiones anatómicas, se extrajeron los páncreas de todos los ratones y se depositó en tubos de 50 ml. De esta forma, cada uno de los tubos fue incubado en un baño térmico a 37°C durante 15 minutos con el fin de activar la acción digestiva de la colagenasa.

Posteriormente, los tubos fueron agitados con vórtex hasta que el tejido pancreático quedó disgregado por completo. Entonces, las muestras se mezclaron con medio de aislamiento hasta completar 25 ml de solución y se enfriaron con hielo para detener la reacción. A continuación, se vertió el sobrenadante en una placa de Petri sin tratar y se extrajeron los islotes pancreáticos con ayuda de una micropipeta, una lupa y un microscopio. Por su parte, el sedimento remanente de los tubos fue mezclado con un medio de aislamiento 1X hasta completar de nuevo 25 ml de solución. De modo que, el vertido de sobrenadante en las placas y la posterior adición del medio de aislamiento al sedimento fue un proceso que se realizó un total de cuatro veces.

Así pues, los islotes pancreáticos extraídos fueron incubados a 37°C durante 2 horas con el fin de aliviar el estrés sufrido por los mismos durante la extracción. Finalmente, los islotes se pasaron a un medio sin rojo fenol y se incubaron durante 24 horas a 37°C antes de ser utilizados (**Figura 10**).

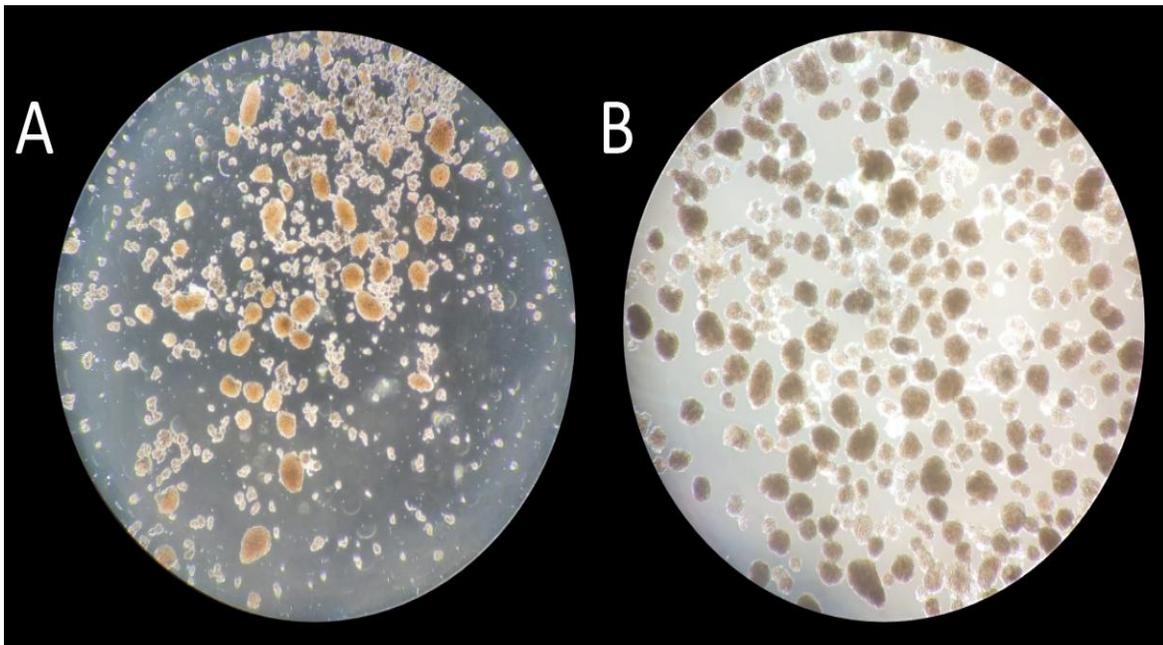


**Figura 10: Protocolo de extracción de islotes de ratón.** Esta composición de imágenes muestra de forma simplificada los pasos que fueron necesario realizar con el fin de extraer los islotes pancreáticos de ratones. Las imágenes fueron creadas por medio de Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

### 2.4.2.3- Extracción de islotes pancreáticos en humanos

Los islotes pancreáticos de origen humano fueron extraídos a partir de necropsias. Según ha sido descrito en el apartado de modelos experimentales, los aislamientos fueron realizados por el equipo de trabajo del LTCD siguiendo un protocolo de extracción específico del centro y de acuerdo con la legislación vigente. Para más información, consultar la página web: <https://www.chu-montpellier.fr>.

Una vez que los islotes pancreáticos fueron adquiridos por nuestro laboratorio, estos fueron depositados en medio de islotes y se dejaron en el incubador durante un total de 24 horas. Posteriormente, los islotes fueron trasladados al medio sin rojo fenol durante 2 horas. Finalmente, cumplido este tiempo, las muestras quedaron listas para ser utilizadas (**Figura 11**).



**Figura 11: Islotes pancreáticos vistos por microscopio óptico 10X.** (A) Islotes pancreáticos murinos, (B) Islotes pancreáticos humanos. La diferencia de color es debido a la intensidad de luz del microscopio.

## 2.5 - Generación de modelo hormonal

### 2.5.1 - Prueba con hormonas gestacionales

Se separaron los islotes en placas sin tratar, de 35 x 10 mm, y se hicieron cuatro grupos de experimentación: Grupo control, medio de islotes sin rojo fenol con DMSO 10<sup>-5</sup>% v/v (Sigma-Aldrich, EE. UU.); Grupo tratado con lactógeno placentario (LP), 2 µM (Prospec, EE. UU.) diluido en medio sin rojo fenol en DMSO 10<sup>-5</sup>% v/v; Grupo tratado con estradiol (E<sub>2</sub>), 17β-estradiol 10 nM (Sigma-Aldrich, EE. UU.) resuspendido en DMSO al 10<sup>-5</sup>% v/v; Grupo tratado con E<sub>2</sub> y LP: LP 2 µM diluido en disolución E<sub>2</sub> 10 nM. Una vez que el tratamiento fue aplicado, las placas se dejaron en el incubador a 37°C durante 24 horas.

### **3 - Técnicas de estudio**

#### **3.1 - Histología e inmunofluorescencia**

##### **3.1.1 - Fijación**

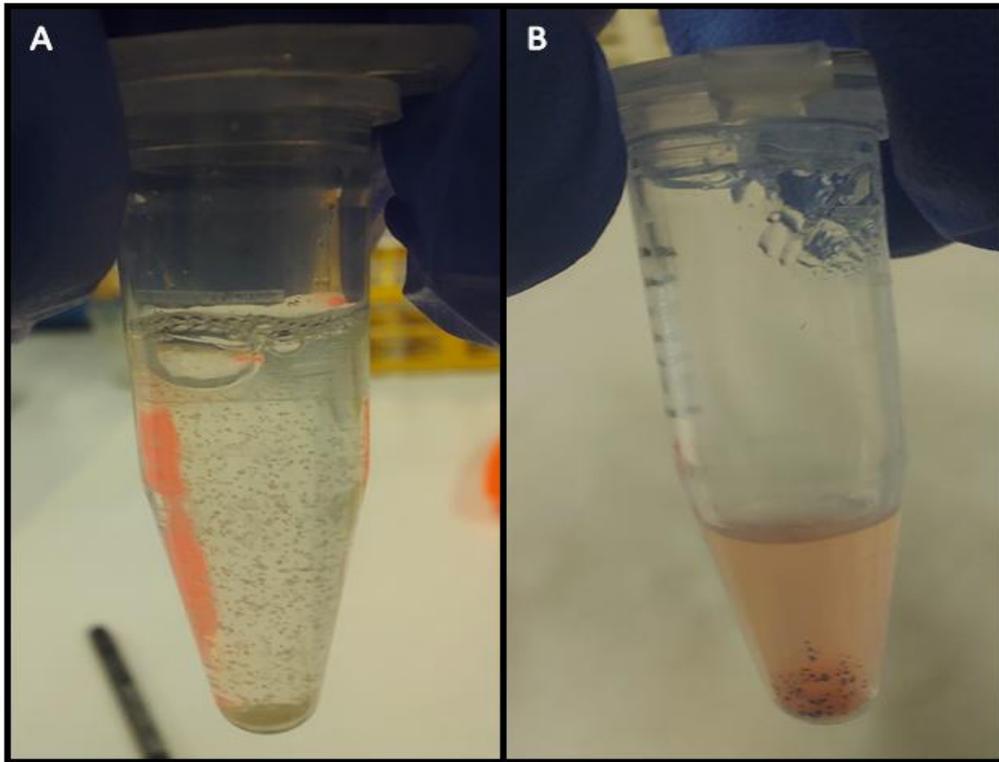
Cumplido el protocolo de extracción de los islotes pancreáticos, se realizó la fijación de los mismos de acuerdo con el procedimiento que se señala a continuación:

Se depositaron las muestras en tubos de 1,7 ml y se centrifugaron a 100 xG durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el PBS, y se repitió la centrifugación a 100 xG durante 2 minutos a temperatura ambiente. Luego, se descartó nuevamente el sobrenadante y se añadió 1 ml de formalina al 10%, se dejó incubando durante 2 horas y después se realizó otra centrifugación a 100 xG durante 2 minutos a temperatura ambiente; se descartó la formalina y se añadió PBS. Se repitió nuevamente la centrifugación a 100 xG durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se añadió PBS. Finalmente, se almacenaron los tubos a 4°C.

##### **3.1.2 - Bloques de HistoGel™**

Cumplido el protocolo de fijación de los islotes pancreáticos, se prepararon los bloques de HistoGel™ de acuerdo con el siguiente procedimiento (**Figura 12**):

Se añadieron 20 µl de AffiGEL®, (Bio-Rad™, EE. UU) a la suspensión de islotes y se mezclaron con los mismos (este paso es necesario para la posterior identificación de la localización de los islotes); Se añadieron 300 µl de HistoGel™, (Lab Stroage System®, EE. UU.) y se centrifugaron a 850 xG, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se enfriaron a 4°C durante 1 hora para inducir solidificación del HistoGel™. Se cortaron los extremos del cono de gel para facilitar la manipulación y se almacenaron los islotes contenidos en HistoGel™ dentro de PBS hasta el procesamiento para los bloques de parafina.



**Figura 12: Procesamiento de los Islotes pancreáticos.** (A)Tubo con islotes pancreáticos fijados en formalina al 10%. La sombra naranja que aparece dentro del tubo es un artefacto creado por el reflejo de un objeto cercano de ese color. (B) Tubo con los islotes pancreáticos embebidos en el bloque de HistoGel™. en presencia de las bolitas azules de AffiGEL™ utilizadas para detectar los islotes.

### 3.1.3 - Bloques de parafina

Una vez que los islotes pancreáticos fueron embebidos dentro del gel, se prepararon los bloques de parafina de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Los conos de HistoGel™ que contenían los islotes se deshidrataron aplicando primero concentraciones crecientes de alcoholes (70%-100%) y posteriormente xileno 100% durante 20 minutos cada uno, repitiendo este procedimiento un total de dos veces, se incluyeron en parafina de medio punto de fusión y se dejaron enfriar.

### **3.1.4 - Cortes histológicos**

Los bloques fueron conservados a temperatura ambiente hasta que llegó el momento de cortarlos. Los cortes fueron realizados con microtomo a un grosor de 5  $\mu\text{m}$  y fueron almacenados a temperatura ambiente hasta su utilización.

### **3.1.5 - Inmunofluorescencia**

Los páncreas se deshidrataron con xileno al 100% durante 15 minutos y posteriormente con etanol 100% durante 10 minutos. El resto de los alcoholes con concentraciones decrecientes (95%-70%) se usaron durante 10 minutos para los páncreas y durante 3 minutos para los islotes murinos y humanos. Para las diferentes tinciones se usaron diversos desenmascaramientos y soluciones de bloqueo (**Apéndice: Tablas 3-5**), según fuera conveniente. Finalmente, la lista de anticuerpos y diluciones usadas para la inmunofluorescencia se describen en el **Apéndice: Tabla 6**.

### **3.1.6 - Microscopía**

Se utilizó microscopio de epifluorescencia Nikon 90I con filtros para longitudes de onda de 594 nm, 488 nm y 470 nm, correspondientes a los colores rojo, verde y azul respectivamente. Se observaron los tejidos a 20x y 40x.

Se utilizó microscopio confocal LEICA SP5X con filtros para longitudes de ondas respectivas para los colores rojo, verde, azul (ultravioleta) y rojo lejano (647 nm). Se observaron los tejidos a 40X.

### 3.1.7 - Análisis de imagen

Se utilizó el software *NIS-elements* (Laboratory Imaging s.r.o, CZ) para fotografiar los islotes pancreáticos teñidos. Para la cuantificación de área, el número de células e intensidad, se utilizó el software ImageJ (NIH, EE. UU.) y se analizó cada hormona teñida con respecto al total de células en el islote. A su vez, también se analizó la presencia de células bihormonales (se consideró positivo los núcleos que tuvieran un citoplasma rodeándolo con más de dos colores) con respecto al total de células del islote y el total de células de la población celular estudiada ( $\alpha$ - $\beta$ - $\delta$ ). La intensidad se normalizó por el total de intensidades de los controles. Por otro lado, la colocalización de somatostatina con FTs se cuantificó tomando como positivo las células de somatostatina con núcleos PDX1+ o Maf-A+ en los diferentes modelos usados.

## 3.2 - Secreciones y ELISA

### 3.2.1 - Medios de secreción

- Medio KRB pH 7,4:

NaCl 139 mM; KCl 3,5 mM; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,49 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,049 mM; NaHCO<sub>3</sub> 1,99 mM; HEPES 4,99 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,59 mM en H<sub>2</sub>O MiliQ.

Para los medios de baja y alta glucosa, se usaron las concentraciones de 1 mM y 20 mM de glucosa respectivamente, además se añadió BSA 0,1%.

### 3.2.2 - Protocolo de secreción de somatostatina

Tras el tratamiento hormonal, los islotes se prepararon para la realización del ensayo de ELISA de la siguiente manera:

Se transfirieron los islotes a insertos para cultivos y se incubaron a 37°C en el medio de tratamiento correspondiente para que se adaptaran. Luego, se descartó el medio y se preincubaron durante 1 hora a 37°C añadiendo 600 µl de medio KREBS-Ringer (KRB) con 1 mM de glucosa en cada inserto. Tras esto, se descartó el sobrenadante y se añadió nuevamente 600 µl de medio KRB con 1 mM de glucosa en cada inserto, incubándose a 37°C durante 1 hora y se recogió el sobrenadante. El procedimiento se repitió con medio KRB a 20 mM de glucosa en cada inserto, incubándose nuevamente a 37°C durante 1 hora y el sobrenadante se recogió según la condición y se almacenó a -80°C.

### **3.2.2 - Ensayo ELISA**

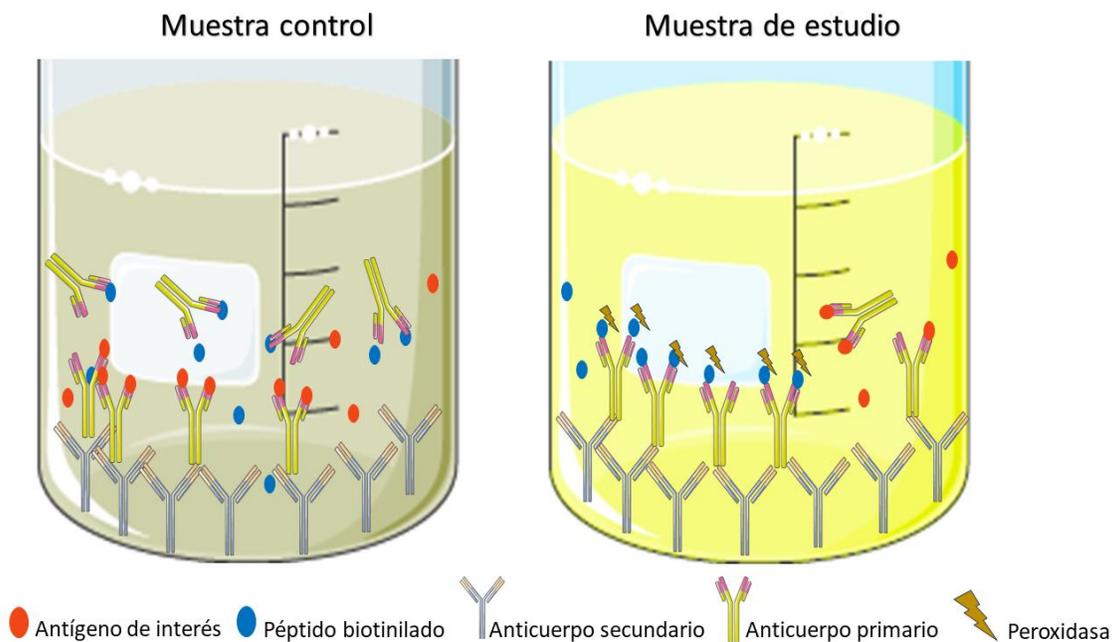
La determinación de los niveles hormonales de somatostatina se realizó mediante un ensayo ELISA (Phoenix pharmaceuticals, DE) de tipo competitivo. Para la realización de este ELISA se usa el fundamento de competitividad, en el que el antígeno de estudio compite con un antígeno marcado con biotina (biotinilado) para unirse al anticuerpo primario. La unión de los inmunocomplejos formados por el antígeno marcado y el anticuerpo primario serán los que, al unirse al anticuerpo secundario, crearán la reacción colorimétrica, de modo que, en una muestra con gran cantidad de antígeno de estudio, la reacción colorimétrica será menor (**Figura 13**). En este tipo de ELISA la placa está recubierta previamente con el anticuerpo secundario y los sitios de unión no específicos están bloqueados.

Se siguió el protocolo indicado por el fabricante, el cual se detalla a continuación:

Se agregó un péptido estándar suministrado por el kit, con concentraciones conocidas, para establecer la curva patrón. Luego, se depositaron las muestras de control, E<sub>2</sub> y controles positivos en los pocillos designados de la placa. A continuación, se añadió el anticuerpo primario y el antígeno biotinilado en cada uno de los pocillos. La placa se agitó durante 2 horas a 300 revoluciones por minuto

(rpm) a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó con tampón de lavado cuatro veces consecutivas, se añadió la peroxidasa de rábano picante en cada pocillo y se agitó la placa a 300 rpm durante 1 hora. Después, se realizó otro lavado con tampón de lavado cuatro veces seguidas y se añadió el sustrato de la enzima, 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina (TMB), durante 1 hora a 300 rpm, protegido de la luz. Finalmente, se añadió HCl 2N para detener la reacción y se realizó la lectura de la placa.

Para la lectura del ELISA se empleó el lector de placas Versamax® (Bionova Científica S.L., ES) con una longitud de onda de 450 nm para determinar la absorbancia de cada muestra. Los resultados se normalizaron según el número de islotes por condición.



**Figura 13: ELISA competitivo.** A mayor cantidad de antígeno en la muestra de estudio, menor cantidad de inmunocomplejos “péptido biotinilado / anticuerpo primario”. De esta forma, la cantidad de inmunocomplejos “péptido biotinilado / anticuerpo primario” disponibles para unirse al anticuerpo secundario será menor, y por tanto, la reacción colorimétrica será también menor. La imagen fue creada utilizando Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

## **3.3 - ADN complementario (ADNc) y qPCR**

### **3.3.1 - Procesamiento de las muestras**

Se realizaron tratamientos de 4 horas en islotes pancreáticos de ratón y 24 horas en islotes pancreáticos de rata y ratón; cumplido el tiempo correspondiente, los islotes se procesaron de acuerdo con el protocolo que se señala a continuación:

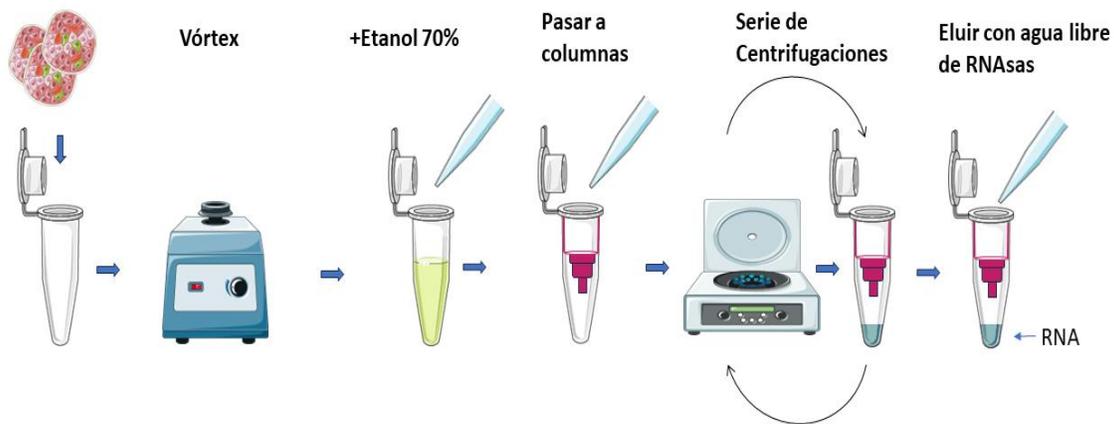
Se centrifugaron a 100 xG, a 4°C durante 2 minutos, se descartó del sobrenadante, y se añadió 150 µl de tampón RLT frío (*RNeasy micro kit*®, Qiagen, DE). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **3.3.2 - Extracción de ARN**

El ARN de los islotes se extrajo usando el *RNeasy micro kit* ®, el cual permite la purificación de la muestra a través de columnas de centrifugado, estas columnas poseen membranas de sílice que permitirán al ARN unirse iónicamente a ellas.

El protocolo usado fue el indicado por el fabricante, el cual se detalla a continuación:

Se descongelaron las muestras y se lisaron con la ayuda de un vórtex. Posteriormente, se añadió etanol al 70% al lisado y se homogenizó. Las muestras se traspasaron a columnas de centrifugado y se centrifugaron a 9.500 xG durante 30 segundos. Se descartó el sobrenadante y se mezcló con tampón RW1, (suministrado por el kit), para luego centrifugar nuevamente a 9.500 xG durante 30 segundos. A continuación, se realizó un tratamiento para eliminar DNAsas. Se mezcló con tampón RPE (también suministrado por el kit), y se centrifugó a 9.500xG durante 30 segundos y se descartó el sobrenadante. Luego, se añadió etanol al 80% y se centrifugó a 9.500 xG durante 2 minutos, descartando nuevamente el sobrenadante. Se centrifugaron las columnas abiertas a 15.900 xG durante 5 minutos y se eluyó el ARN con agua libre de RNAsas. Finalmente, se centrifugó a 15.900 xG durante 1 minuto, obteniendo aproximadamente 100 ng de ARN.



**Figura 14. Esquema del procedimiento de extracción de ARN.** La imagen fue creada utilizando Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

### 3.3.3 - Síntesis del ADNc

Tras culminar el proceso de extracción del ARN, comenzó el proceso de síntesis del ADNc, utilizando para ello el *iScript™ cDNA synthesis kit* (Bio-Rad™, EE. UU.) según indicaciones del fabricante. Los niveles de ARNm del gen de interés se determinaron mediante qPCR con ensayos TaqMan™ o SYBR™ Green en un sistema *LightCycler® 480*. Las qPCR se realizaron en cantidades iguales de ADNc por duplicado, triplicado o cuadruplicado, utilizando la *Maxima Probe qPCR Master Mix* (Thermo Scientific™, EE. UU.) para los ensayos TaqMan™ y *Maxima SYBR™ Green qPCR Master Mix* (Thermo Scientific™, EE. UU.) para los ensayos SYBR™ Green. Además de los genes estudiados, se cuantificaron los niveles de la proteína ribosomal L18 (*Rpl18*) como control interno, ya que su expresión no se ve alterada por las condiciones experimentales. La cuantificación relativa de los genes se realizó mediante el uso de la técnica  $2^{-\Delta\Delta CT}$  que permite calcular las variaciones del gen a estudiar con respecto a *Rpl18*. Los ensayos TaqMan™ y primers usados se describen en el **Apéndice: Tablas 7 y 8**.

## 3.4 - Proteínas y Western blot

La técnica del western blot permite cuantificar la cantidad de proteínas específicas en una muestra. El primer paso consiste en la realización de una electroforesis en gel con el objetivo de separar las proteínas según su peso, posteriormente se transfieren las proteínas a la superficie de una membrana y finalmente son incubadas con anticuerpos específicos para su detección.

### 3.4.1 - Tampones y disoluciones

Para la realización del Western blot se usaron los siguientes tampones y disoluciones.

- Tampón de lisado celular:

Tris HCL pH 6,8 125 mM; SDS 2% (m/v); DTT 1mM en H<sub>2</sub>O miliQ.

- Tampón de carga (LSB) 4X:

Tris-HCL pH 6,8 60 mM; Glicerol 10% (v/v); SDS 2% (v/v); Azul de bromofenol (BPB) 0,01% (v/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v) en H<sub>2</sub>O miliQ.

- Disolución de bloqueo 5%:

5% de leche desnatada en PBS 0,1% Tween 20.

### 3.4.2 - Procesamiento de muestras

Tras el tratamiento hormonal, los islotes pancreáticos fueron recogidos y lavados según el siguiente protocolo:

Los islotes se centrifugaron a 100 xG a 4°C durante 2 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de PBS 1X (repetiendo este paso dos veces más). Tras desechar el sobrenadante, se añadió 30 µl de tampón de lisado y se homogenizó utilizando un sonicador ultrasónico (Bioblock Scientific, Vibra-Cell™, EE. UU.). Posteriormente, se cuantificaron las proteínas utilizando el Micro BCA™ kit (Thermo-Fisher, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente, se mezcló con 10 µl de LSB 4X y se hirvió a 100°C en un termobloque durante 5 minutos.

### 3.4.3 - Electroforesis, transferencia y revelado

Se cargaron 20 µg de proteína en geles de 15% de poliacrilamida, posteriormente se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P, Millipore™, EE. UU.) durante 3 horas a 100 voltios y 4°C. Al día siguiente las membranas fueron bloqueadas con disolución de bloqueo 5% (m/v) durante 1 hora y posteriormente se incubaron los anticuerpos respectivos (**Apéndice: Tabla 9**) en solución de bloqueo 0,5% (m/v) durante 1 hora. Una vez terminado, las membranas se lavaron 3 veces con PBS 1X + Tween 0,2% (PBST) durante 10 minutos y se incubaron los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en disolución de bloqueo 0,5% (m/v) durante 30 minutos; al finalizar, las membranas se volvieron a lavar (como en el paso anterior). Las proteínas se detectaron mediante luminiscencia (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad™, EE. UU.) y exposición a una película de rayos X. Además de las proteínas estudiadas, se utilizó la cuantificación de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control interno de carga. Las películas reveladas se escanearon a 600 píxeles por pulgada con HP Scanjet G4010 (Hewlett-Packard, ES) usando el software HP Photosmart Premier 6,5. Para analizar la intensidad de cada banda por separado se usó el software ImageJ y se normalizó con GAPDH. Los datos se presentaron en unidades arbitrarias.

## **4 – Análisis estadístico**

### **4.1 - Método de análisis estadístico**

Se utilizó el programa Microsoft Excel como base de datos y el programa Graphpad Prism 8 para la realización de gráficos y pruebas estadísticas. Para estudiar las distribuciones poblacionales se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresaron con la media  $\pm$  y el error estándar de la media (SEM). Se usó la prueba T de Student (paramétrica) o Mann-Whitney (no paramétrica) para comparar dos muestras; el One way Anova para la comparación de más de dos muestras y el Two Way Anova se usó para comparar las diferencias entre las condiciones de glucosa durante las secreciones hormonales. Se consideró como significancia estadística una  $P < 0,05$ .

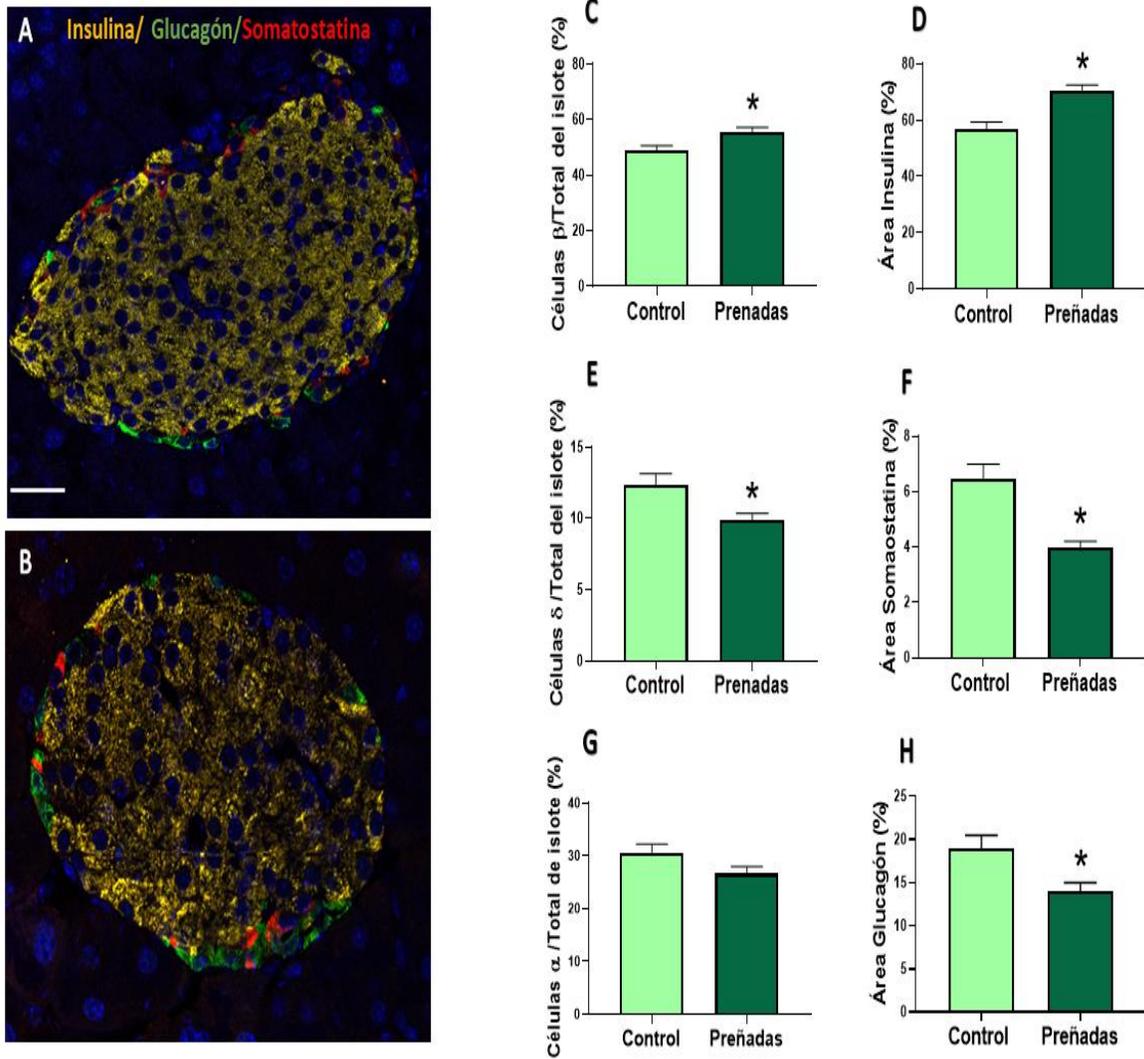
**Resultados**

### **1 – Adaptaciones de las células del islote pancreático durante la gestación**

#### **1.1. – Histomorfometría del islote pancreático**

##### **1.1.1 – Distribución de las células hormonales dentro del islote pancreático en ratonas preñadas**

Con el objetivo de estudiar las adaptaciones de la población  $\delta$ -pancreática y su relación con el resto de las células del islote pancreático durante la gestación, lo primero que hicimos fue identificar las poblaciones de células  $\beta$ ,  $\alpha$  y  $\delta$  mediante tinción de las hormonas insulina, glucagón y somatostatina (**Figura 15A-B**), respectivamente, para así poder describir la distribución de cada población celular correspondiente. Se encontró un aumento de la insulina (~15% para el número de células y ~25% para el área) (**Figura 15C-D**). Sin embargo, para nuestra sorpresa encontramos que la somatostatina disminuía significativamente (~20% para el número de células y 40% para el área) (**Figura 15E-F**); de igual forma se encontró que el glucagón disminuía significativamente (~15% para el número de células y ~26% para el área) (**Figura 15G-H**). Estos resultados nos hacen pensar que, durante la gestación, el islote sufre una redistribución celular adaptativa para enfrentar el estrés metabólico característico de esta etapa y en respuesta a las hormonas propias de este estado fisiológico.

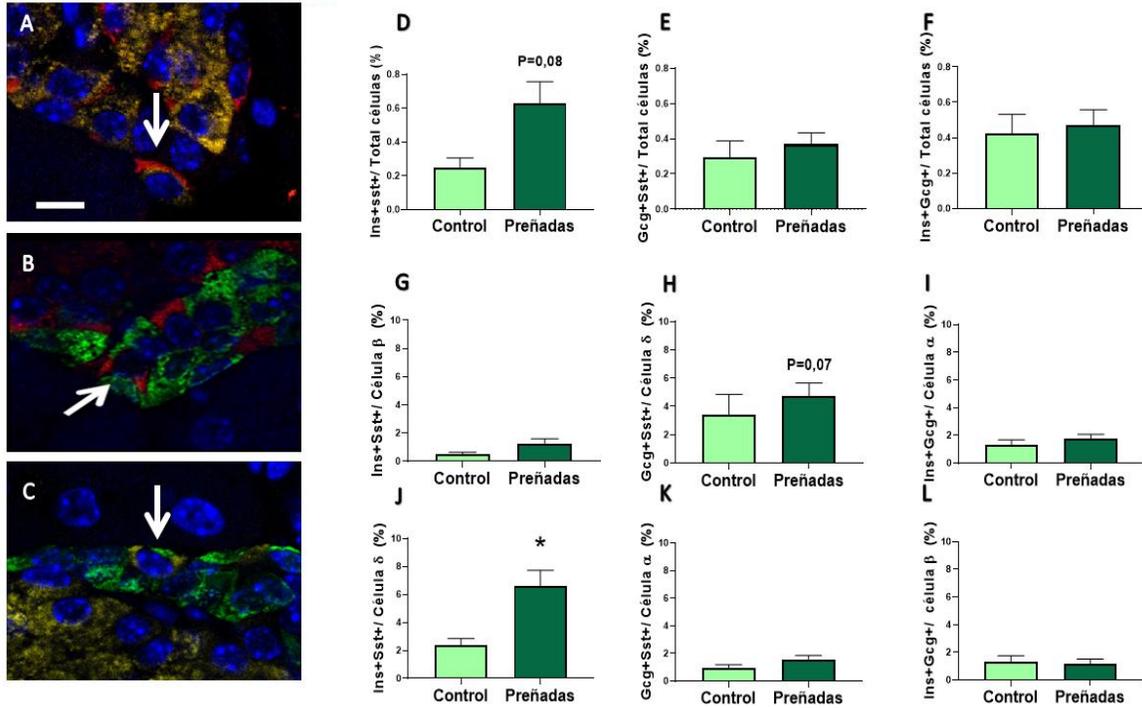


**Figura 15. Inmunofluorescencia del islote pancreático en ratonas preñadas.** (A) Foto representativa de un islote pancreático aislado de una ratona no preñada. (B) Foto representativa de un islote pancreático aislado de una ratona preñada. Barra de escala= 30  $\mu$ m (C) Porcentaje del número de células y (D) área de insulina+ con respecto al total del islote. (E) Porcentaje del número de células y (F) área de somatostatina+ con respecto al total del islote. (G) Porcentaje del número de células y (H) área de glucagón+ con respecto al total del islote. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM. N=5 ratones por condición. \* $p < 0,05$  vs control por t-Student.

### 1.1.2 – Presencia de células bihormonales en los islotes de ratonas preñadas

Ya que los resultados anteriores demostraban disminución del área y número de células  $\delta$ -pancreáticas, nos preguntamos cuál podría ser la razón de tal suceso. Es por ello que, nos planteamos si algún proceso de desdiferenciación o plasticidad celular podría estar ocurriendo; de este modo, decidimos cuantificar las células que presentaban doble tinción hormonal, en todas las combinaciones posibles (insulina+/somatostatina+, glucagón+/somatostatina+, insulina+/glucagón+), **(Figura 16A-C)**. Al calcular la cantidad de células bihormonales glucagón+/somatostatina+ e insulina+/glucagón+ con respecto al total del islote, no se halló significancia estadística frente al grupo control, sin embargo, se encontró una tendencia de aumento en las células insulina+/somatostatina+ (~150%) **(Figura 16D)**. El siguiente paso fue estudiar estos valores con respecto a las poblaciones  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\delta$ -pancreática. Se encontró un aumento significativo de células expresando tanto insulina como somatostatina con respecto a la población  $\delta$ -pancreática de aproximadamente un 180% respecto al control. Por otro lado, al cuantificar estas células insulina+/somatostatina+ con respecto a la población  $\beta$ -pancreática, no encontramos diferencias **(Figura 16G y 16J)**. Con respecto al resto de combinaciones, no encontramos diferencias destacables, a excepción de una tendencia no significativa de aumento en las células doble positivas glucagón+/somatostatina+ con respecto a la población de células  $\delta$ -pancreática de un 40%, **(Figura 16H)**. Estos resultados sugieren que, durante la gestación, ocurren cambios en el islote, induciendo a las células  $\delta$ -pancreáticas a producir otras hormonas.

Insulina/ Glucagón/Somatostatina

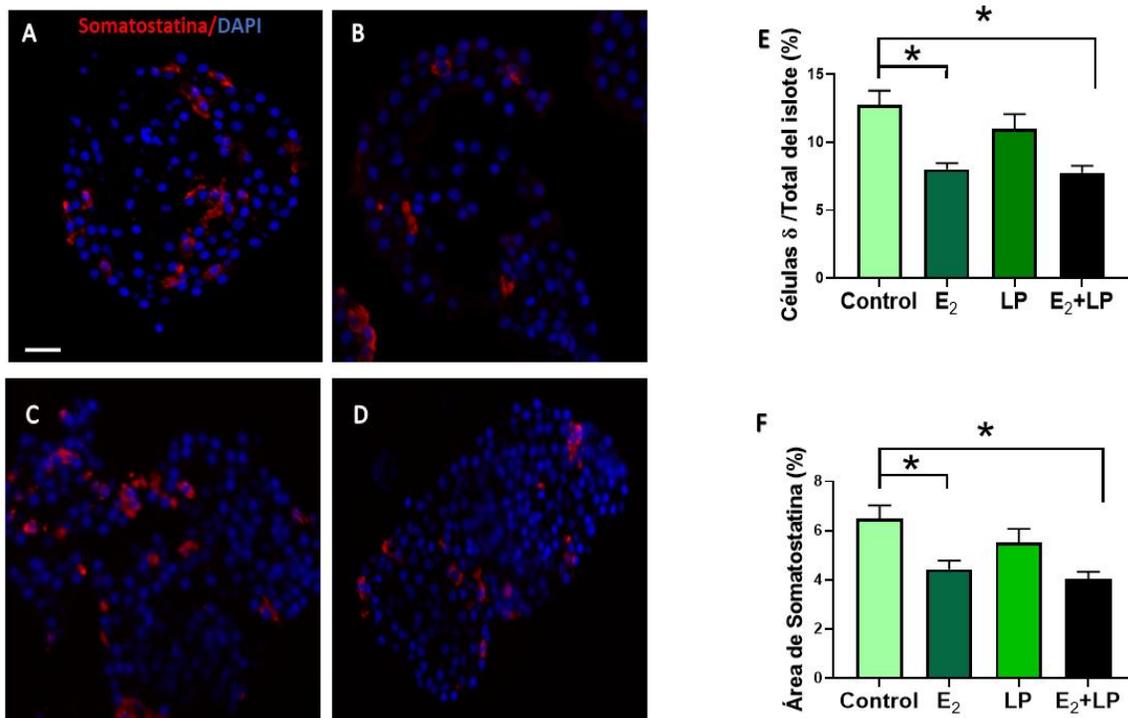


**Figura 16. Presencia de células bihormonales en islotes de ratonas preñadas.** (A) Imagen representativa de células doble positivas para Ins+Sst+, (B) Foto representativa de células doble positivas para Gcg+Sst+, (C) Foto representativa de células doble positivas para Ins+Gcg+. La flecha indica la célula que expresa doble tinción. (D-F) Porcentaje de células doble positivas con respecto al total de células del islote. (G-L) Porcentaje de células doble positivas con respecto a las poblaciones  $\beta/\delta/\alpha$ . Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM. N=5 ratonas por condición. \* $p < 0,05$  vs control por t-Student.

### 1.1.3 – El estradiol (E<sub>2</sub>) induce cambios en la composición del islote pancreático.

Al ver los resultados obtenidos, nos planteamos que los estrógenos podrían ser los causantes de tales sucesos; ya que, durante la gestación, estas hormonas aumentan hasta 10 veces. De entre los estrógenos, E<sub>2</sub> es el que aumenta en mayor cantidad; sin embargo, no podemos olvidar que también aumentan los niveles de LP. De este modo, para determinar la relación causa-efecto del E<sub>2</sub> y/o el LP, se aislaron islotes pancreáticos de ratas y fueron incubados con E<sub>2</sub> 10 nM, LP 2  $\mu$ M, y E<sub>2</sub> + LP durante 24 horas, seguido de un análisis histomorfométrico de las células

delta-pancreáticas (**Figura 17A-D**). El grupo tratado con E<sub>2</sub> presentó una disminución significativa tanto del número de células δ-pancreáticas (37%), como del área de somatostatina (30%) con respecto al control y al grupo tratado con LP. De igual forma, el tratamiento combinado también presentó disminución tanto de área (40%) como en el número de células δ-pancreáticas (40%), sin embargo, al comparar el grupo tratado con E<sub>2</sub> y el grupo tratado con la mezcla de hormonas, no hubo diferencias significativas (**Figura 17E-F**). Estos resultados nos indican que es el E<sub>2</sub>, y no LP, el causante de los cambios observados en la población δ-pancreáticas en el modelo de ratones preñadas. Así pues, a partir de aquí todos los experimentos siguientes se realizaron solo con el tratamiento de E<sub>2</sub> 10 nM durante 24 horas.



**Figura 17. Islotes pancreáticos de rata tratados hormonalmente.** Imágenes representativas islotos pancreáticos tratados y no tratados con estrógenos. (A)Control. (B) E<sub>2</sub>. (C) LP. (D)E<sub>2</sub>+LP. Escala= 30 μm (E). Porcentaje del número de células y (F) área de células somatostatina+ tras los diferentes tratamientos durante 24 horas. Los datos están expresados como la media ± SEM. N=4 ratas por condición. \*p<0,05 vs control por ANOVA.

## 1.1.4 – Distribución de las células hormonales dentro del islote tras el tratamiento con E<sub>2</sub>

### 1.1.4.1 – Islotes de rata

Una vez observado que el E<sub>2</sub> desencadenaba cambios en las células  $\delta$ -pancreáticas, quisimos estudiar el resto de poblaciones celulares del islote pancreático ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) para determinar si E<sub>2</sub> era un agente causal en el fenotipo observado en dichas poblaciones celulares en el modelo animal de gestación (**Figura 18A-B**). Al cuantificar las células  $\beta$ -pancreáticas, observamos el aumento tanto del número de células (20%) y una tendencia de aumentar el área total de la hormona (25%) en el grupo tratado con E<sub>2</sub> (**Figura 18C-D**); una disminución del número de células  $\delta$ -pancreáticas (15%) y de su área (20%) tras el tratamiento con E<sub>2</sub> (**Figura 18E-F**), y, por último, al estudiar las células  $\alpha$ -pancreáticas, encontramos la disminución esperada en cuanto al número de células (20%) y el área hormonal (~30%) (**Figura 18G-H**).

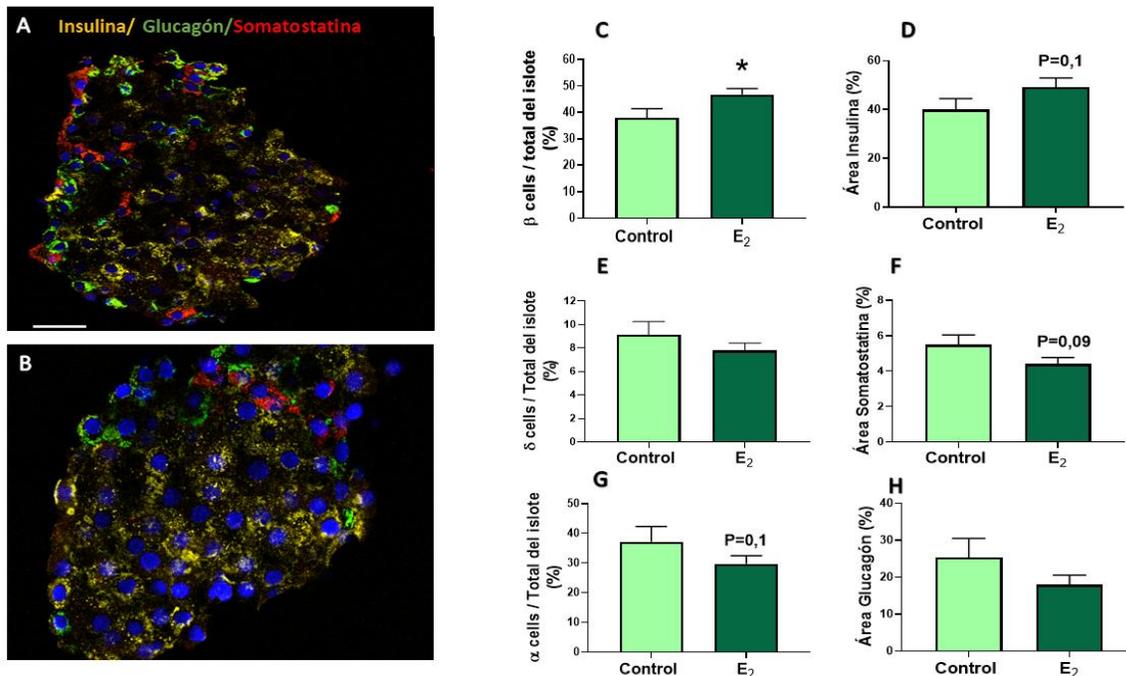
### 1.1.4.2 – Islotes Humanos

Lo siguiente que hicimos fue tratar islotes pancreáticos de 3 donantes diferentes con E<sub>2</sub>, para confirmar que los resultados obtenidos en modelos murinos podían extrapolarse al ser humano. De este modo, lo primero que observamos fue la gran cantidad de necrosis que presentaban los islotes, presentando un mejor estado aquellos que recibieron el tratamiento con E<sub>2</sub>; no obstante, debido a que solo pudimos teñir las muestras de solo 3 donantes, la cantidad de islotes conseguidos no fue suficiente para encontrar diferencias significativas.

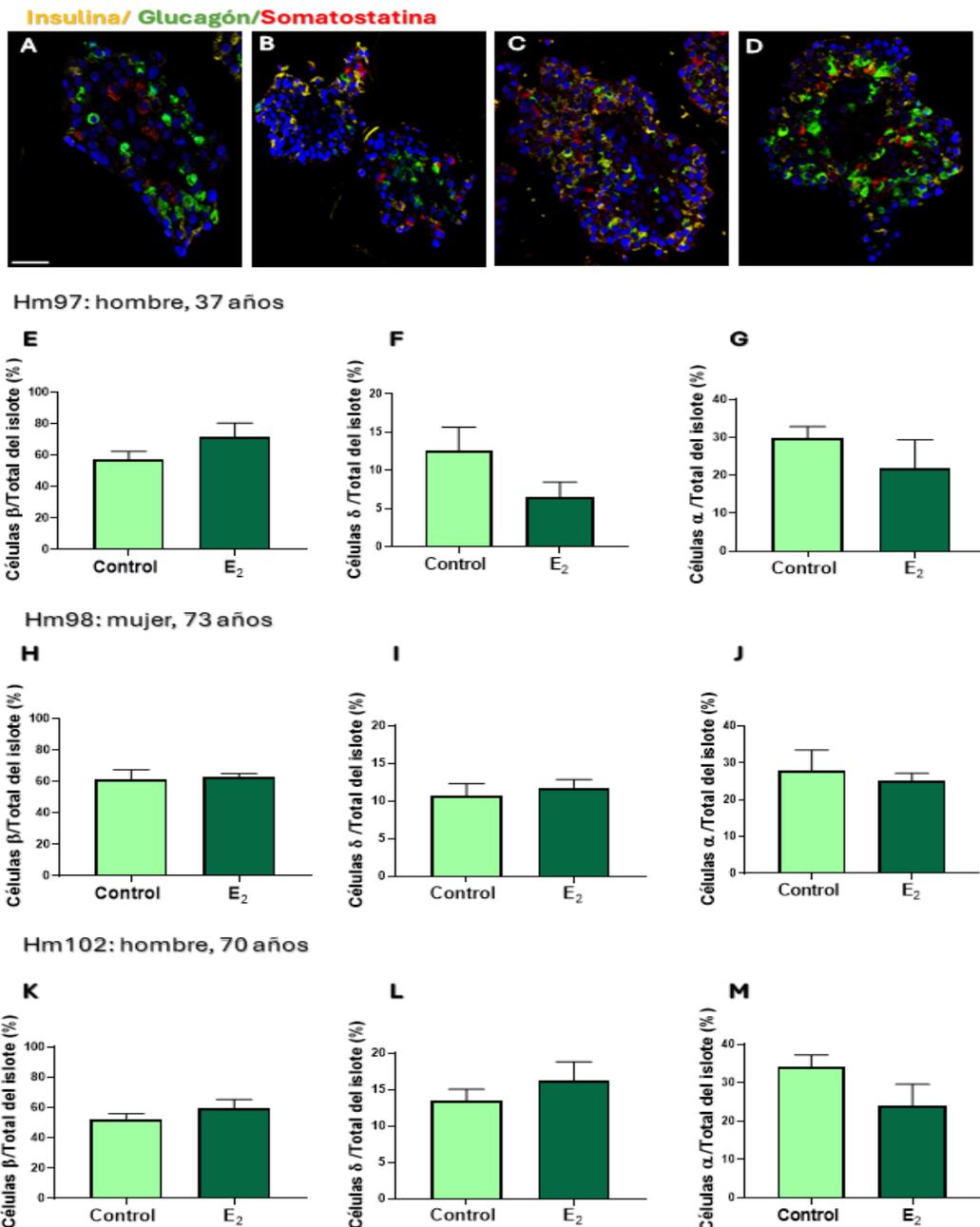
Debido a que las muestras de tejido provenían de donantes muy diferentes entre sí, el estudio de la distribución celular se hizo analizando cada donante por separado. Encontramos que el donante Hm97, después del tratamiento estrogénico, presentó un fenotipo similar a lo encontrado en nuestros modelos previos: un aumento del

número de células  $\beta$  (25%) y una disminución tanto del número de célula  $\delta$  (50%) como  $\alpha$  (20%). Sin embargo, la donante Hm98 no presentó cambios en ninguna de las poblaciones celulares estudiadas y el donante Hm102, aunque presentó disminución de las células  $\alpha$  (30%), no presentó diferencias con respecto al número de células  $\beta$  y aumento de células  $\delta$  (20%) (**Figura 19**).

Los resultados obtenidos en los islotes tratados, tanto en ratas como en humanos, podrían sugerir que los efectos obtenidos con el  $E_2$  no son dependientes de especie ya que fueron reproducibles en ambos modelos de estudio, sin embargo, puede que el sexo y la edad influya en dichos efectos.



**Figura 18. Inmunofluorescencia de islotes pancreáticos de ratas tratados y no tratados con estrógenos.** (A) Foto representativa de un islote control. (B) Foto representativa de un islote tratado con  $E_2$ . Escala=  $30\mu m$ . (C) Porcentaje del número de células y (D) área de células insulina+ tras el tratamiento durante 24 horas. (E) Porcentaje del número de células y (F) área de células somatostatina+ tras el tratamiento durante 24 horas. (G) Porcentaje del número de células y (H) área de células glucagón+ tras el tratamiento durante 24 horas. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM. N=3 ratas por condición. \* $p < 0,05$  vs control según la prueba T de Student.



**Figura 19. Inmunofluorescencia de islotes pancreáticos de humanos tratados y no tratados con estrógenos.** (A) Foto representativa de un islote control. (B) Foto representativa de un islote tratado con E<sub>2</sub> de Hm97. (C) Foto representativa de un islote tratado con E<sub>2</sub> de Hm98. (D) Foto representativa de un islote tratado con E<sub>2</sub> de Hm102. Escala= 30µm. (E-G) Porcentaje del número de células β-, δ- y α-pancreáticas del donante Hm97 tras el tratamiento durante 24 horas. (H-J) Porcentaje del número de células β-, δ- y α-pancreáticas del donante Hm98 tras el tratamiento durante 24 horas. (K-M) Porcentaje del número de células β-, δ- y α-pancreáticas del donante Hm102 tras el tratamiento durante 24 horas. Los datos están expresados como la media ± SEM. N=3 donantes por condición. \*p<0,05 vs control según la prueba T de Student.

## 1.1.5 – E<sub>2</sub> causa un aumento en las células bihormonales del islote pancreático

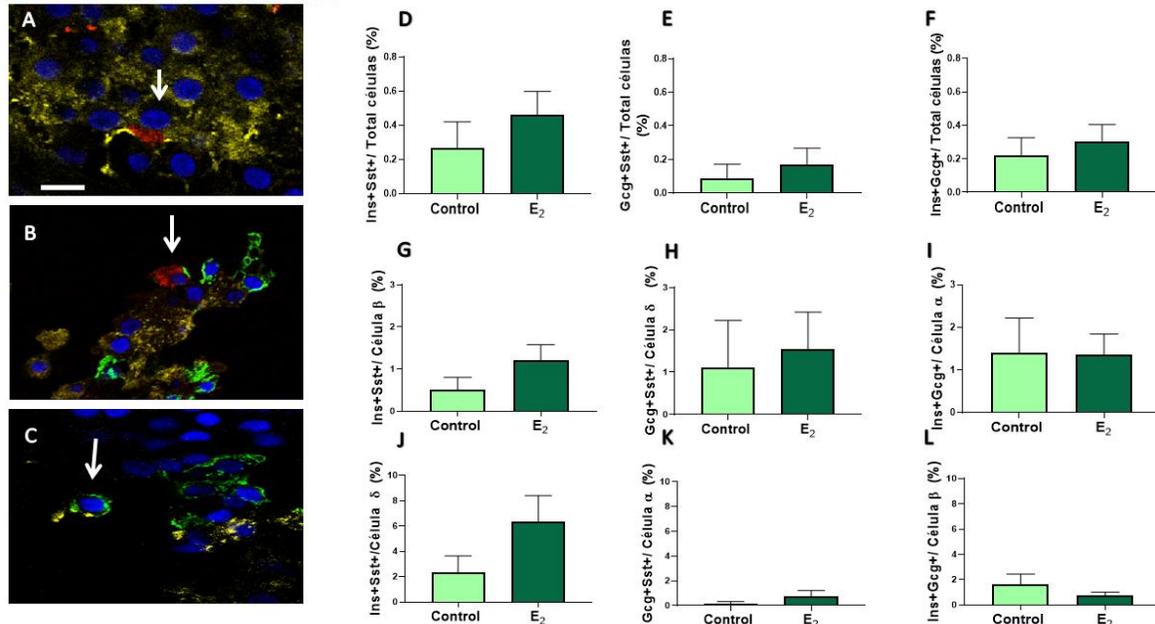
### 1.1.5.1 – Islotes de rata

Una vez demostrado que el tratamiento con E<sub>2</sub> causa las mismas alteraciones, en el número y área de las células  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ , que en el modelo de gestación, quisimos estudiar si dichas adaptaciones eran debido a un aumento en el número de células bihormonales.

Al cuantificar las células bihormonales insulina+/somatostatina+, glucagón+/somatostatina+ e insulina+/glucagón+ en relación al total de células del islote, no encontramos diferencias, sugiriendo una discrepancia con lo observado en el modelo de gestación (**Figura 20**). Al pasar a las cuantificaciones de las poblaciones celulares, a pesar de no haber significancias estadísticas debido al número de islotes estudiados, nos parece importante destacar que encontramos un aumento no significativo del doble de células insulina+/somatostatina+ con respecto a células  $\delta$ -pancreáticas.

El resto de células bihormonales no presentaron diferencias, a excepción de las células insulina+/glucagón+ que parecían disminuir. Así pues, podemos concluir que, en ratas, las células  $\delta$ -pancreáticas en presencia de E<sub>2</sub>, adquieren características que les permiten producir insulina.

### Insulina/ Glucagón/Somatostatina

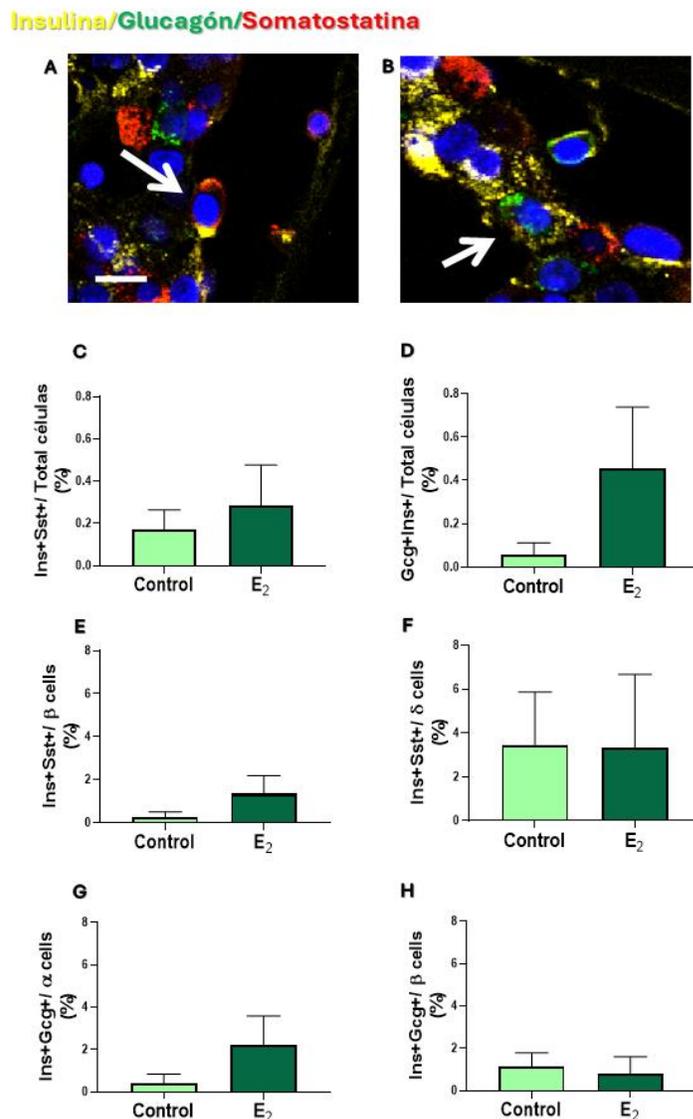


**Figura 20. Presencia de células bihormonales en islotes de rata tratados y no tratados con estrógenos.** (A) Foto representativa de células doble positivas para Ins+Sst+, (B) Foto representativa de células doble positivas para Gcg+Sst+, (C) Foto representativa de células doble positivas para Ins+Gcg+. La flecha indica la célula que expresa doble tinción. Barra de escala: 10  $\mu$ m. (D-F) Porcentaje de células doble positivas con respecto al total de células del islote. (G-L) Porcentaje de células doble positivas con respecto a las poblaciones  $\beta/\delta/\alpha$ . Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM. N=4 ratas por condición. \* $p < 0,05$  vs control por t-Student.

### 1.1.5.2 – Islotes Humanos

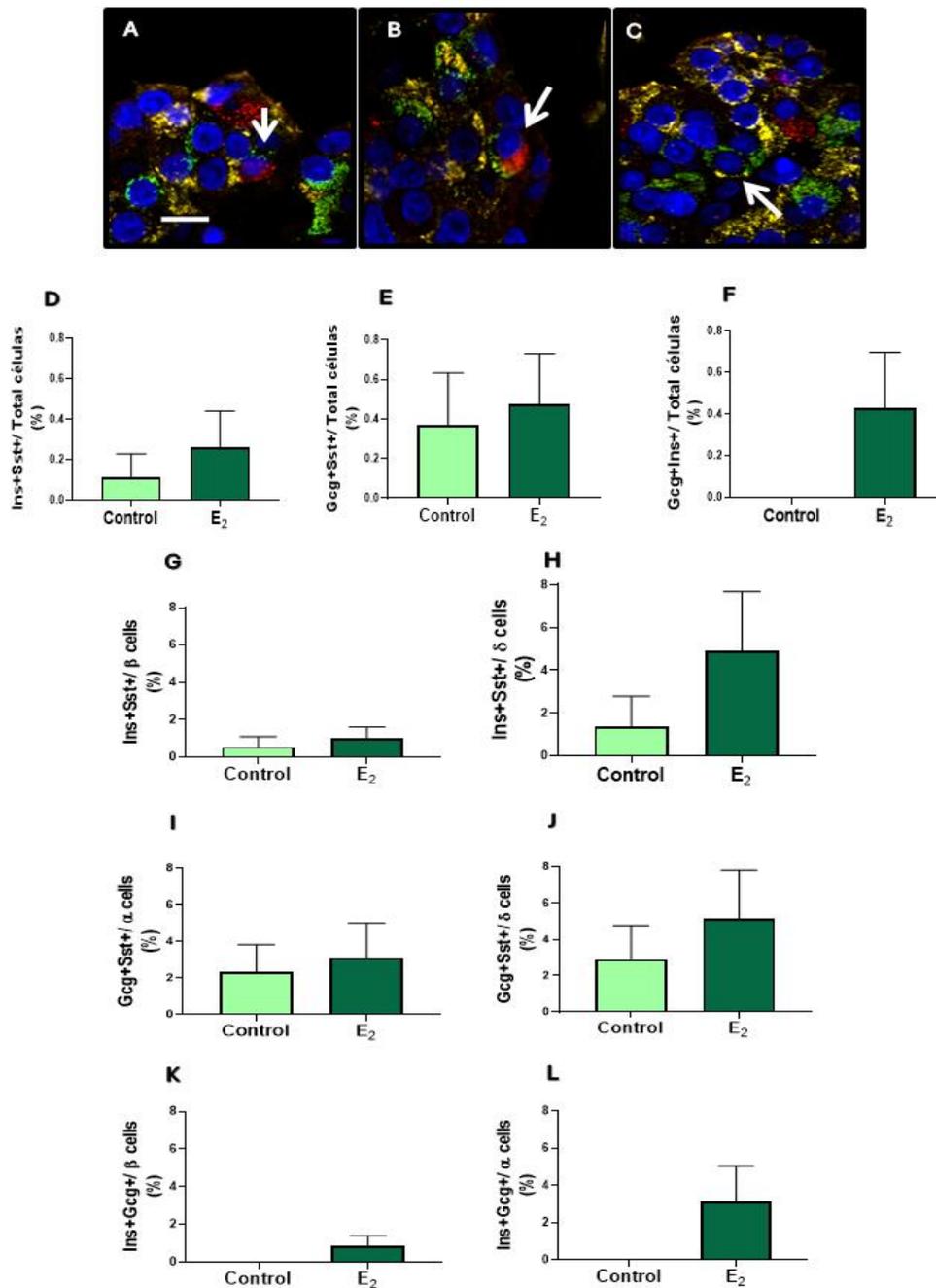
Ya que los resultados en el modelo de tratamiento hormonal de rata coincidía con los resultados encontrados en el modelo de gestación (en cuanto a células bihormonales insulina+/somatostatina+), quisimos confirmar si los islotes humanos se comportaban de igual manera que en los modelos anteriores. Al analizar las muestras de los tres donantes, encontramos un aumento no significativo de células bihormonales en las tres poblaciones estudiadas tras el tratamiento con E<sub>2</sub>, sin embargo hay que destacar que Hm97 no presentó células glucagón+/somatostatina+ ni en el grupo control ni en el tratado (**Figura 21**) y Hm98 no presentó células insulina+/glucagón+ en el grupo control (**Figura 22**), pero sí en

el grupo tratado con E<sub>2</sub>. Hm102 presentó células bihormonales tanto en el grupo control como en el tratado (**Figura 23**). Estos resultados nos demuestran la gran variabilidad que existe entre los donantes estudiados y nos plantea que en humanos el tratamiento con E<sub>2</sub> puede inducir procesos de plasticidad celular en células β, α y δ.



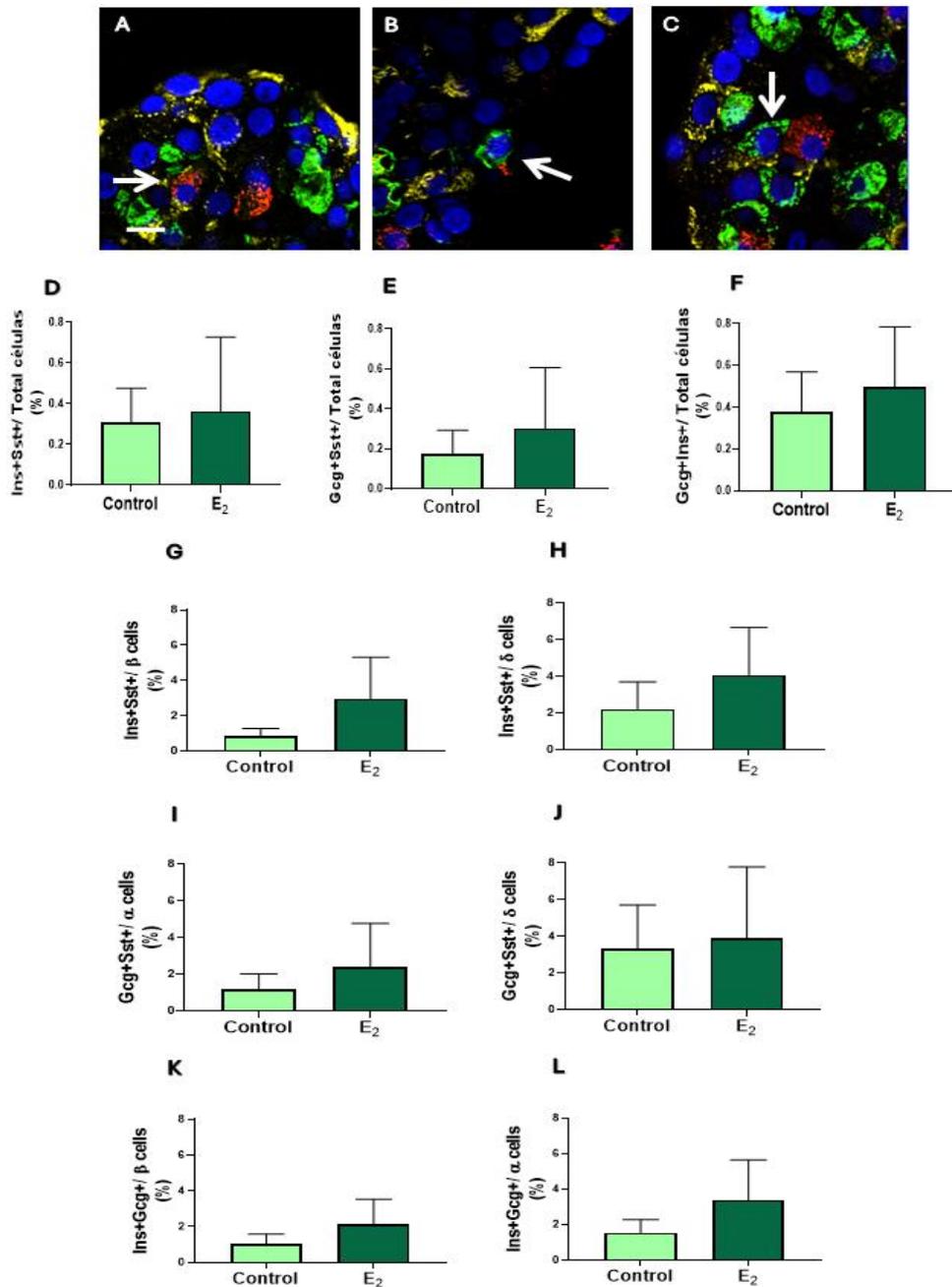
**Figura 21. Presencia de células bihormonales en islotes del donante Hm97.** (A) Foto representativa de células doble positivas para Ins+Sst+. (B) Foto representativa de células doble positivas para Ins+Gcg+. La flecha indica la célula que expresa doble tinción. Barra de escala: 10 μm. (C-D) Porcentaje de células doble positivas con respecto al total de células del islote. (E-H) Porcentaje de células doble positivas con respecto a las poblaciones β/δ/α

## Insulina/Glucagón/Somatostatina



**Figura 22. Presencia de células bihormonales en islotes de la donante Hm98.** (A) Foto representativa de células doble positivas para Ins+Sst+. (B) Foto representativa de células doble positivas para Gcg+Sst+. (C) Foto representativa de células doble positivas para Ins+Gcg+. La flecha indica la célula que expresa doble tinción. Barra de escala: 10  $\mu$ m. (D-F) Porcentaje de células doble positivas con respecto al total de células del islote. (G-L) Porcentaje de células doble positivas con respecto a las poblaciones  $\beta/\delta/\alpha$ .

## Insulina/Glucagón/Somatostatina



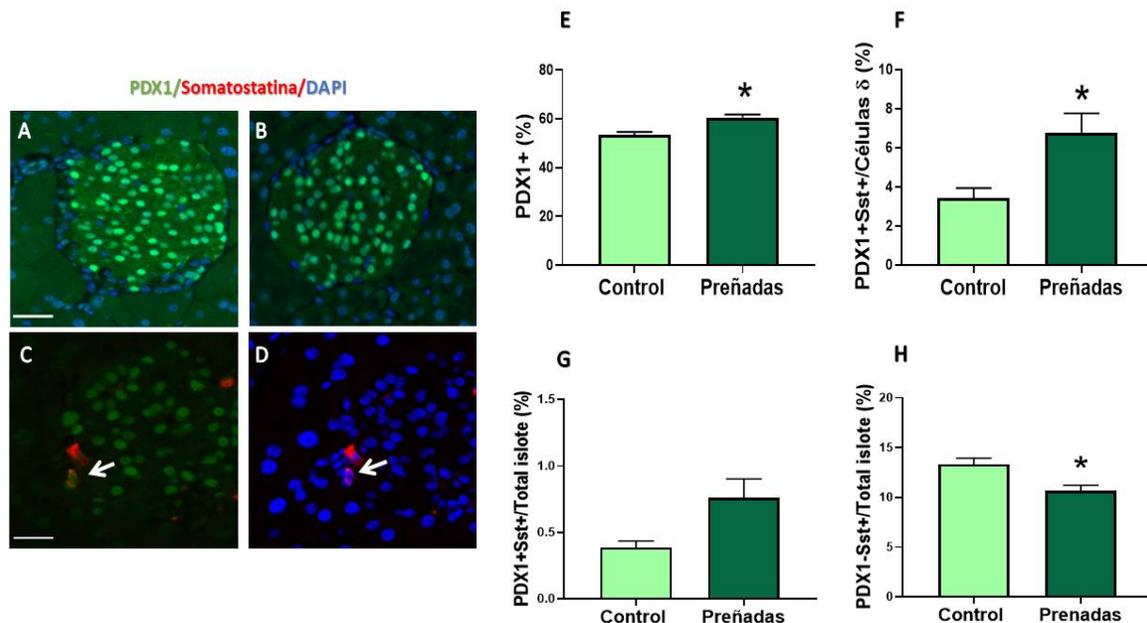
**Figura 23. Presencia de células bihormonales en islotes del donante Hm102.** (A) Foto representativa de células doble positivas para Ins+Sst+. (B) Foto representativa de células doble positivas para Gcg+Sst+. (C) Foto representativa de células doble positivas para Ins+Gcg+. La flecha indica la célula que expresa doble tinción. Barra de escala: 10  $\mu$ m. (D-F) Porcentaje de células doble positivas con respecto al total de células del islote. (G-L) Porcentaje de células doble positivas con respecto a las poblaciones  $\beta/\delta/\alpha$ .

## 1.1.6 – Expresión de factores de transcripción

### 1.1.6.1 – Las células $\delta$ -pancreáticas expresan factores de transcripción de linaje $\beta$ en un modelo murino de gestación

Se sabe que los FTs son importantes para determinar la identidad celular, y, por ende, el tipo de hormona que cada célula secretará en el islote pancreático. Analizando los resultados obtenidos previamente, nos llamó la atención que, en los tres modelos, las células  $\delta$ -pancreáticas disminuían y las células  $\beta$ -pancreáticas aumentaban. Dado que ambas células comparten un ancestro común (**Figura 5**), nos planteamos la posibilidad de que las células  $\delta$ -pancreáticas estuviesen sufriendo algún proceso celular de remodelado o de plasticidad en el cual las células  $\delta$  estuviesen actuando como células  $\beta$ -pancreáticas. Es por eso que decidimos estudiar FTs importantes para el linaje  $\beta$ .

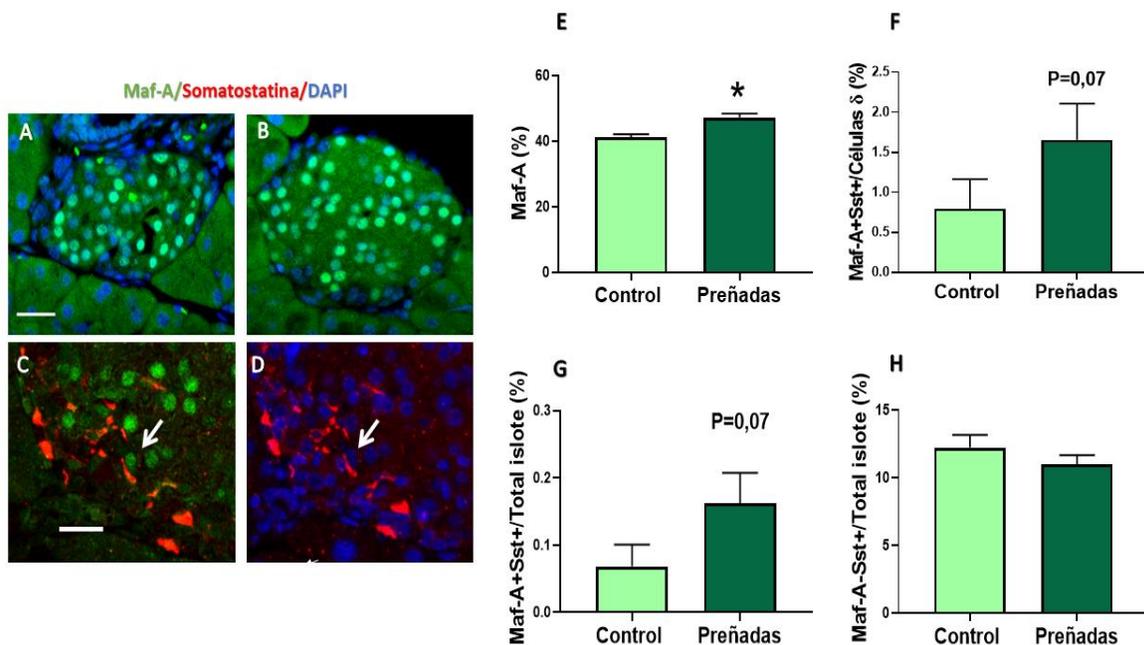
Con objeto de identificar posibles células  $\delta$  expresando marcadores de linaje  $\beta$ , se realizaron tinciones para el factor transcripcional PDX1 en los islotes de las ratonas preñadas (**Figura 24A-D**). Al cuantificar el PDX1 total encontramos un aumento significativo en las ratonas preñadas (15%) (**Figura 24E**); que, para nuestra sorpresa, coincidía con un aumento de células  $\delta$ /PDX1+ con respecto al total de células  $\delta$ -pancreáticas (100%) (**Figura 24F**), aunque al compararla con respecto al total del islote, el aumento no llegaba a la significancia estadística (100%). (**Figura 24G**). Durante la cuantificación de estas células, encontramos que de forma basal existían células  $\delta$  que expresaban PDX1 y células  $\delta$  que no. De modo que, para confirmar si el aumento observado de células  $\delta$ /PDX1+ era correcto, pensamos que aquellas células que no presentaba el FT, debían de disminuir en el grupo tratado; lo que, en efecto, encontramos de forma significativa (20%) (**Figura 24H**).



**Figura 24. Expresión de PDX1 en islotes de ratonas preñadas.** (A) Foto representativa de un islote pancreático aislado de una ratona no preñada. (B) Foto representativa de un islote pancreático aislado de una ratona preñada. (C) Imagen representativa de células doble positivas para PDX1+/Sst+ (D) Imagen representativa de células positivas para Sst+. Escala= 30  $\mu$ m. La flecha indica la célula que expresa doble tinción. (E) Porcentaje total de PDX1 con respecto al total del islote. (F) Porcentaje de células doble positivas PDX1+/Sst+ con respecto a la población  $\delta$  (G) Porcentaje de células doble positivas PDX1+/Sst+ con respecto al total del islote (H) Porcentaje de células PDX1-/Sst+ con respecto al total del islote. Los datos están expresados  $\pm$  SEM. N=5 ratones por condición.  $p < 0,05$  vs control por t-Student.

Una vez descrita la distribución de PDX1 en las células  $\beta$  y  $\delta$  de nuestro modelo de gestación, estudiamos la expresión de Maf-A, porque es un FT de linaje  $\beta$  más específico que PDX1, debido a que este último puede aparecer, aunque en menor cantidad en célula  $\delta$  (**Figura 25A-D**). Al igual que en el caso anterior, lo primero que hicimos fue estudiar la cantidad de Maf-A total expresado en las ratonas preñadas, encontrando un aumento significativo (15%) (**Figura 25E**), seguidamente cuantificamos la cantidad de células  $\delta$ /Maf-A+ en este modelo, encontrando tendencias de aumento casi significativas con respecto al total de células  $\delta$ -pancreáticas (100%) (**Figura 25F**) y al total del islote (130%) (**Figura 25G**). De igual forma que con PDX1, encontramos que de forma basal existían una mínima porción de células  $\delta$  que expresaban Maf-A de forma basal, de modo que cuantificamos la

disminución de aquellas células  $\delta$ /Maf-A- y aunque encontramos una tendencia a disminuir, no fue significativa (10%) (**Figura 25H**).



**Figura 25. Expresión de Maf-A en islotes de ratonas preñadas.** (A) Foto representativa de un islote pancreático aislado de una ratona no preñada. (B) Foto representativa de un islote pancreático aislado de una ratona preñada. (C) Imagen representativa de células doble positivas para Maf-A+/Sst+ (D) Imagen representativa de células positivas para Sst+. Escala= 30  $\mu$ m. La flecha indica la célula que expresa doble tinción. (E) Porcentaje total de Maf-A con respecto al total del islote. (F) Porcentaje de células doble positivas Maf-A+/Sst+ con respecto a la población  $\delta$  (G) Porcentaje de células doble positivas Maf-A+/Sst+ con respecto al total del islote (H) Porcentaje de células Maf-A-/Sst+ con respecto al total del islote. Los datos están expresados  $\pm$  SEM. N=5 ratones por condición.  $p < 0,05$  vs control por t-Student.

PDX1 es un FT importante para la correcta formación del páncreas que, una vez el órgano madura, se expresará de forma mayoritaria en las células  $\beta$ -pancreáticas. Por otro lado, Maf-A es necesaria para la correcta transcripción del gen de la insulina. De modo que, considerando los resultados obtenidos, se puede hipotetizar que las células  $\delta$ -pancreáticas están sufriendo procesos en los que parecen adquirir características propias de células  $\beta$ , probablemente desarrollando características propias de este tipo celular, para hacer frente al estrés metabólico de la gestación.

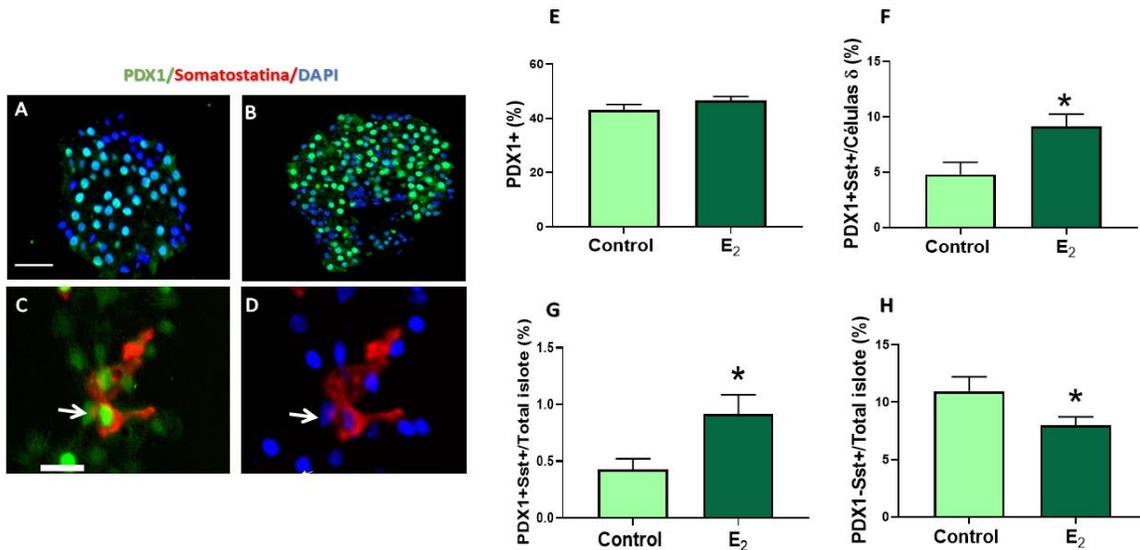
### 1.1.6.2 – El E<sub>2</sub> es el responsable de que las células $\delta$ -pancreáticas expresen FTs de linaje $\beta$

Una vez establecida la presencia de células  $\delta$ -PDX1+ y  $\delta$ -Maf-A+ en los islotes de ratonas preñadas, quisimos estudiar los modelos de estudio *ex vivo*.

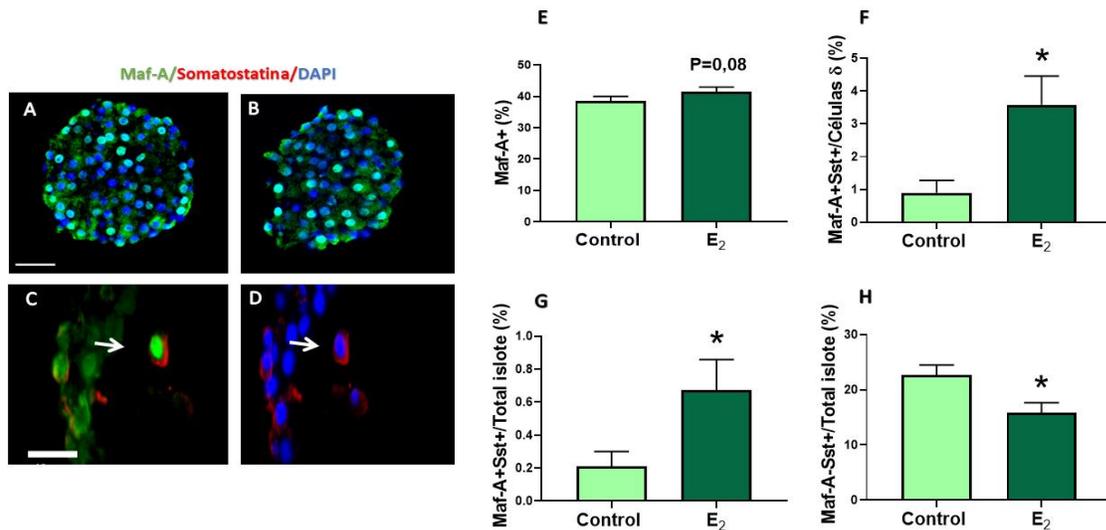
#### 1.1.6.2.1 – Islotes de rata

Cuando estudiamos los islotes de rata (**Figura 26A-D**), a diferencia de lo visto en las ratonas preñadas, no conseguimos diferencias significativas en cuanto al PDX1 total en el grupo tratado con E<sub>2</sub> (**Figura 26E**); no obstante, al cuantificar las células  $\delta$ -PDX1+, encontramos un aumento significativo tanto si se calculaba con respecto al total de células  $\delta$ -pancreáticas (190%) como si era el total del islote (120%) en el grupo tratado (**Figura 26F-G**). Al cuantificar el número de células  $\delta$ -PDX1-, encontramos que, en el grupo tratado, ocurría una disminución significativa de un 25% (**Figura 26H**).

Con respecto a la expresión de Maf-A (**Figura 27A-D**), encontramos un aumento, casi significativo, de este TF en el grupo tratado (10%) (**Figura 27E**). En cuanto a las células  $\delta$ -Maf-A+, encontramos aumentos significativos con respecto a la población  $\delta$ -pancreáticas (300%) y al total del islote (200%) (**Figura 27F-G**); y una disminución del 30% de células  $\delta$ -Maf-A- (**Figura 27H**).



**Figura 26. Expresión de PDX1 en islotes de ratas tratadas y no tratadas con estrógenos.** (A) Foto representativa de un islote control. (B) Foto representativa de un islote tratado con E<sub>2</sub>. Barra de escala= 30 μm (C) Imagen representativa de células doble positivas para PDX1+/Sst+ (D) Imagen representativa de células positivas para Sst+. Barra de escala= 10 μm. La flecha indica la célula que expresa doble tinción. (E) Porcentaje total de PDX1 con respecto al total del islote tras el tratamiento durante 24 horas. (F) Porcentaje de células doble positivas PDX1+/Sst+ con respecto a la población δ tras el tratamiento durante 24 horas (G) Porcentaje de células doble positivas PDX1+/Sst+ con respecto al total del islote tras el tratamiento durante 24 horas (H) Porcentaje de células PDX1-/Sst+ con respecto al total del islote tras el tratamiento durante 24 horas. Los datos están expresados ± SEM. N= 4 ratas por condición. p<0,05 vs control por t-Student.



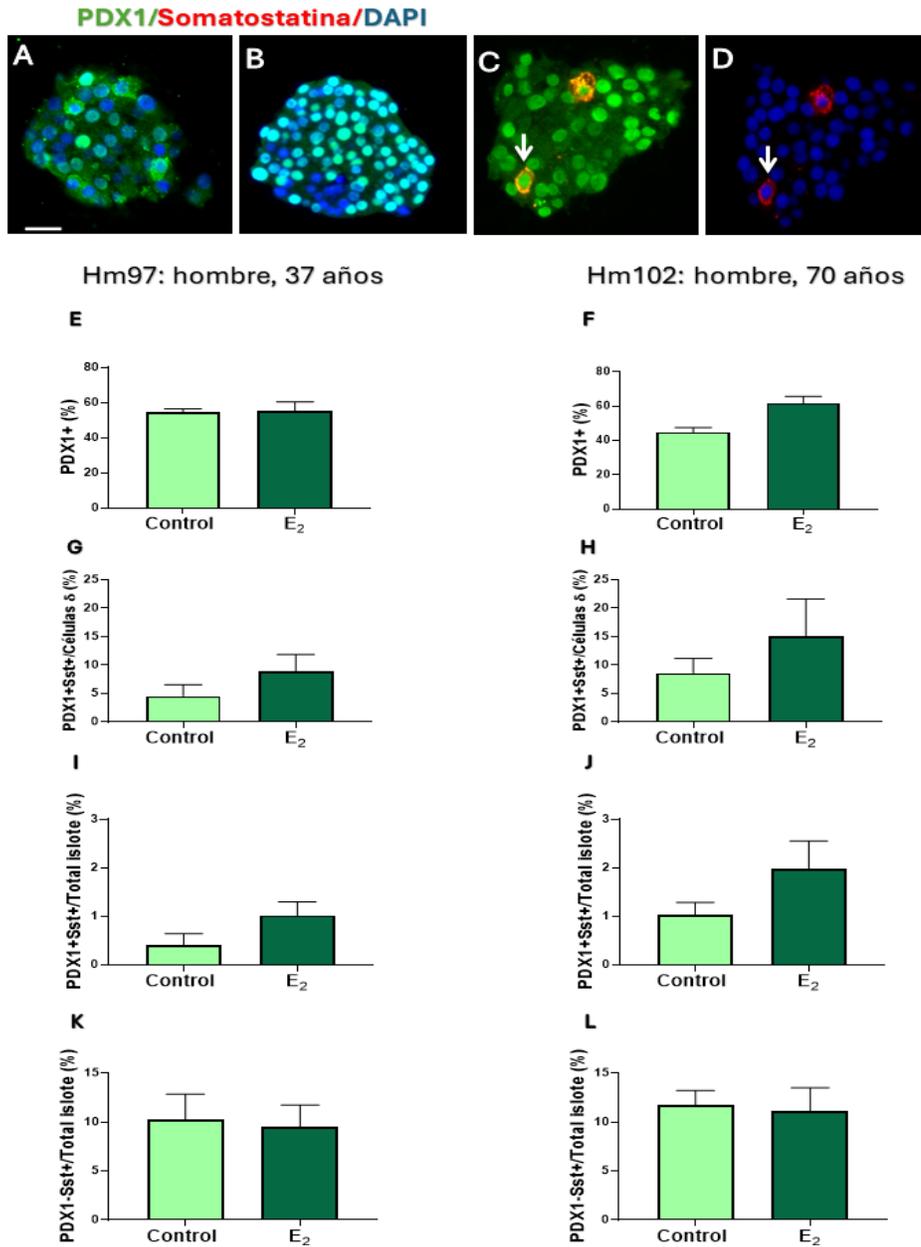
**Figura 27. Expresión de Maf-A en islotes de ratas tratadas y no tratadas con estrógenos.** (A) Foto representativa de un islote control. (B) Foto representativa de un islote tratado con E<sub>2</sub>. Barra de escala= 30 μm (C) Imagen representativa de células doble positivas para Maf-A+/Sst+ (D) Imagen representativa de células positivas para Sst+. Barra de escala= 10 μm. La flecha indica la célula que expresa doble tinción. (E) Porcentaje total de Maf-A con respecto al total del islote tras el tratamiento durante 24 horas. (F) Porcentaje de células doble positivas Maf-A+/Sst+ con respecto a la población δ tras el tratamiento durante 24 horas (G) Porcentaje de células doble positivas Maf-A+/Sst+ con respecto al total del islote tras el tratamiento durante 24 horas (H) Porcentaje de células Maf-A-/Sst+ con respecto al total del islote tras el tratamiento durante 24 horas. Los datos están expresados ± SEM. N= 4 ratas por condición. p<0,05 vs control por t-Student.

### 1.1.6.2.2 – Islotes Humanos

Para estudiar el paralelismo con las células humanas, procedimos a estudiar la presencia de las células  $\delta$ /PDX1+ y Maf-A+ en los islotes humanos. Debido a problemas en la técnica de inmunofluorescencia, la donante Hm98 fue descartada de los siguientes estudios, de tal modo que los resultados de los donantes Hm97 y Hm102 se explicarán de forma separada (**Figuras 28-29**). En cuanto a PDX1, el donante Hm97 no presentó cambios con respecto al PDX1 total después del tratamiento con E<sub>2</sub>; sin embargo, al cuantificar las células bihormonales, encontramos un aumento de células  $\delta$ -PDX1+ con respecto a la población  $\delta$  (100%) y total del islote (50%). Al estudiar las células  $\delta$ -PDX1- encontramos una tendencia de disminución del 10%. Para Hm102 encontramos que PDX1 total aumentaba un 40% después del tratamiento con E<sub>2</sub>, las células  $\delta$ -PDX1+ con respecto a la población  $\delta$  aumentaban un 75% y al total del islote un 80%. Al estudiar las células  $\delta$ -PDX1- encontramos una tendencia de disminución del 6%.

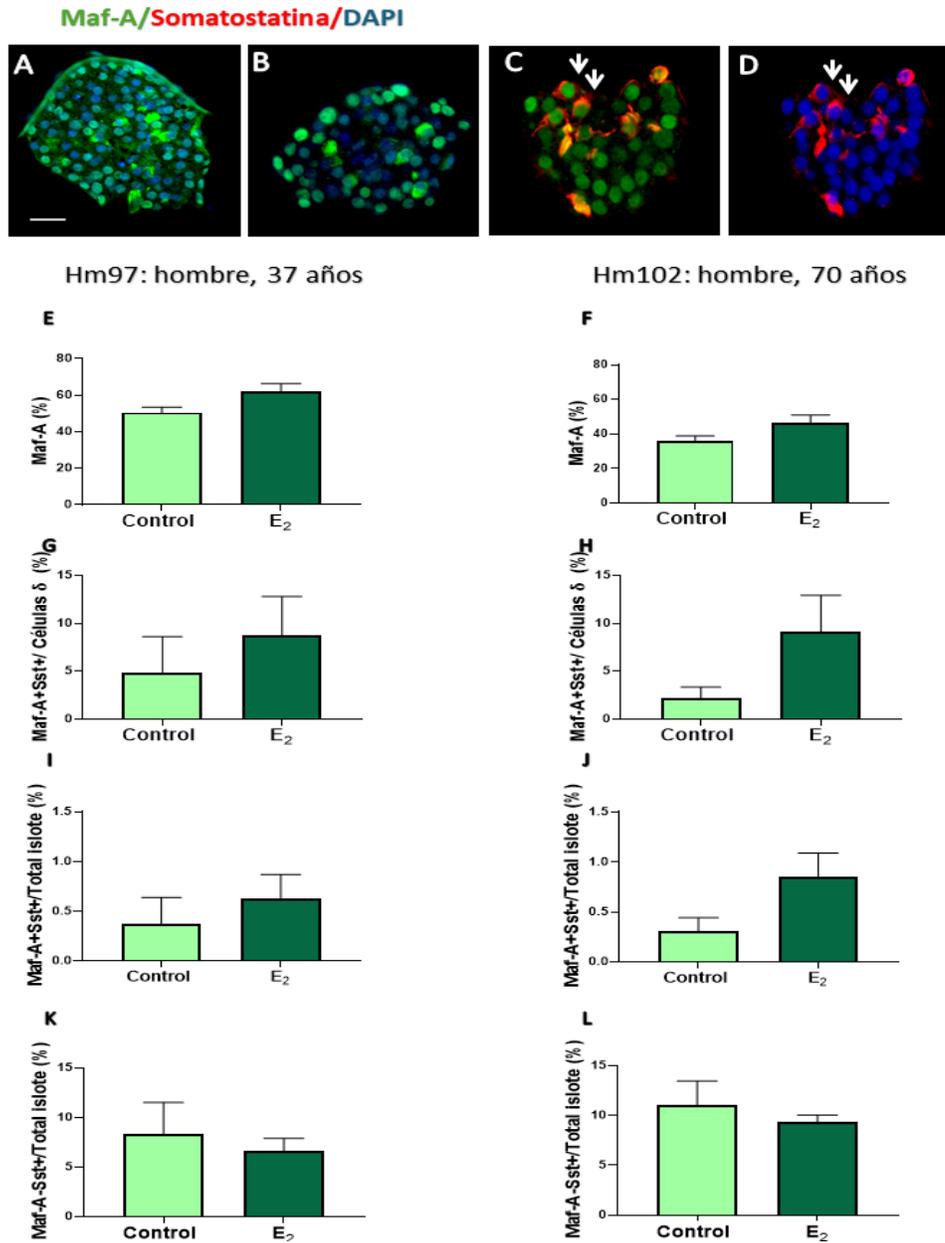
En cuanto a Maf-A, el donante Hm97 presentó un aumento del 23% del Maf-A total después del tratamiento con E<sub>2</sub>; un aumento del 80% de células  $\delta$ -Maf-A+ con respecto a la población  $\delta$  y de un 70% con respecto al total del islote. Al estudiar las células  $\delta$ -Maf-A- encontramos una disminución del 20%. Para Hm102 encontramos que Maf-A total aumentaba un 30% después del tratamiento con E<sub>2</sub>, las células  $\delta$ -Maf-A+ con respecto a la población  $\delta$  aumentaban un 320% y al total del islote un 180%. Al estudiar las células  $\delta$ -PDX1- encontramos una disminución del 15%.

Nuestros resultados indican que, en los modelos de rata y humanos, concuerdan con los resultados obtenidos previamente; por lo que podemos concluir que los estrógenos son capaces de inducir la aparición de células  $\delta$ -pancreáticas bihormonales, independientemente de la especie. Además, estos efectos parecen estar implicados en la activación de procesos de plasticidad celular como respuesta a las hormonas del embarazo para intentar compensar los cambios metabólicos.



**Figura 28. Expresión de PDX1 en islotes de humanos tratados y no tratados con estrógenos.**

(A) Foto representativa de un islote pancreático aislado del donante HM97 sin E<sub>2</sub>. (B) Foto representativa de un islote pancreático aislado del donante HM97 con E<sub>2</sub> durante 24 horas (C) Imagen representativa de células doble positivas para PDX1+/Sst+ (D) Imagen representativa de células positivas para Sst+. Escala= 30 μm. La flecha indica la célula que expresa doble tinción. (E-F) Porcentaje total de PDX1 con respecto al total del islote en tras el tratamiento con E<sub>2</sub> durante 24 horas. (G-H) Porcentaje de células doble positivas PDX1+/Sst+ con respecto a la población δ tras el tratamiento con E<sub>2</sub> durante 24 horas (I-J) Porcentaje de células doble positivas PDX1+/Sst+ con respecto al total del islote tras el tratamiento con E<sub>2</sub> durante 24 horas (J-K) Porcentaje de células PDX1-/Sst+ con respecto al total del islote tras el tratamiento con E<sub>2</sub> durante 24 horas

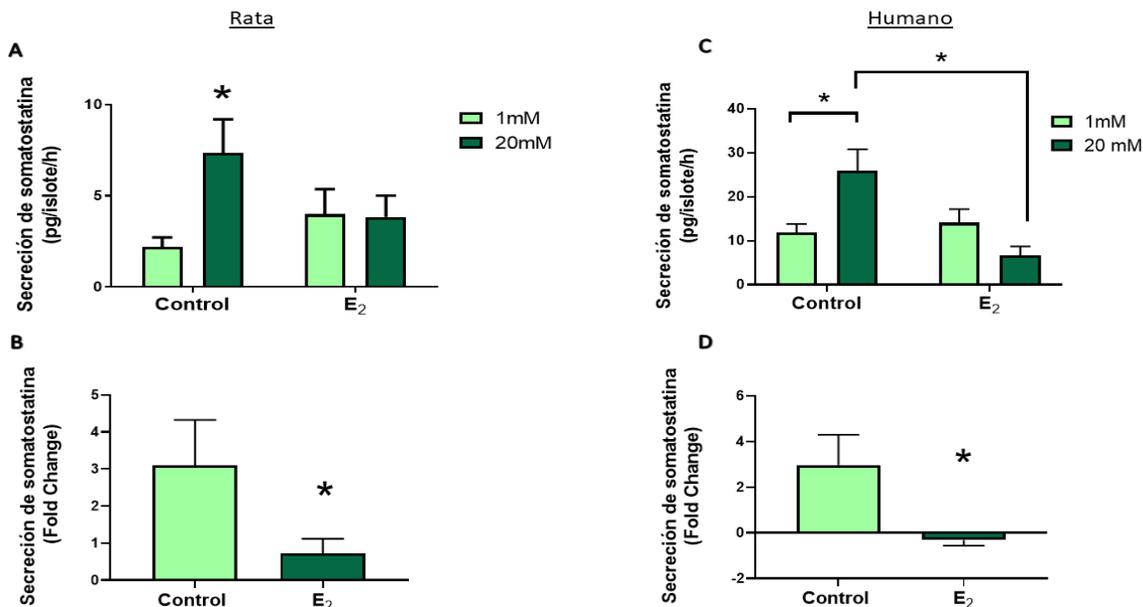


**Figura 29. Expresión de Maf-A en islotes pancreáticos de humanos tratados y no tratados con estrógenos.** (A) Foto representativa de un islote control. (B) Foto representativa de un islote tratado con E<sub>2</sub>. (C) Imagen representativa de células doble positivas para Maf-A+/Sst+ (D) Imagen representativa de células positivas para Sst+. Escala= 30 μm. La flecha indica la célula que expresa doble tinción. (E-F) Porcentaje total de Maf-A con respecto al total del islote en tras el tratamiento con E<sub>2</sub> durante 24 horas. (G-H) Porcentaje de células doble positivas Maf-A+/Sst+ con respecto a la población δ tras el tratamiento con E<sub>2</sub> durante 24 horas (I-J) Porcentaje de células doble positivas Maf-A+/Sst+ con respecto al total del islote tras el tratamiento con E<sub>2</sub> durante 24 horas (J-K) Porcentaje de células Maf-A-/Sst+ con respecto al total del islote tras el tratamiento con E<sub>2</sub> durante 24 horas.

## 1.2. – Cambios en la función de las células $\delta$ -pancreáticas tras el tratamiento con E<sub>2</sub>

Como se ha explicado en el apartado 1.2.2.3 sobre el páncreas endocrino, una de las principales funciones de las células  $\delta$ -pancreáticas es la secreción de la somatostatina, de modo que, las observaciones realizadas de que el número de células  $\delta$ -pancreáticas en los islotes sometidos al tratamiento estrogénico, disminuía; sumado a células  $\delta$  positivas para FTs de linaje  $\beta$ , nos llevó a preguntarnos si la funcionalidad celular estaría alterada también. Por ello, se realizó un ensayo de secreción de somatostatina en islotes de rata (**Figura 30**), en el que se confirmó el aumento de secreción hormonal de somatostatina tras la estimulación con altas concentraciones de glucosa en el grupo control y un impedimento en dicha secreción durante la estimulación en los islotes tratados con E<sub>2</sub> (**Figura 30A-B**). También se realizó la cuantificación del contenido intracelular de dichas secreciones, normalizado según la cantidad de proteína, pero a pesar de que existía una tendencia de aumento, no encontramos diferencias significativas. Subsecuentemente se realizó el mismo ensayo en islotes humanos, encontrando, nuevamente, secreción de somatostatina ante la estimulación con alta glucosa en el grupo control y un impedimento significativo de la secreción con alta glucosa en los islotes tratados con E<sub>2</sub> (**Figura 30C-D**).

Estos resultados sugieren que el E<sub>2</sub> también genera una alteración funcional en las células  $\delta$ -pancreáticas, porque las células no son capaces de responder adecuadamente a los altos niveles de glucosa *ex vivo*.

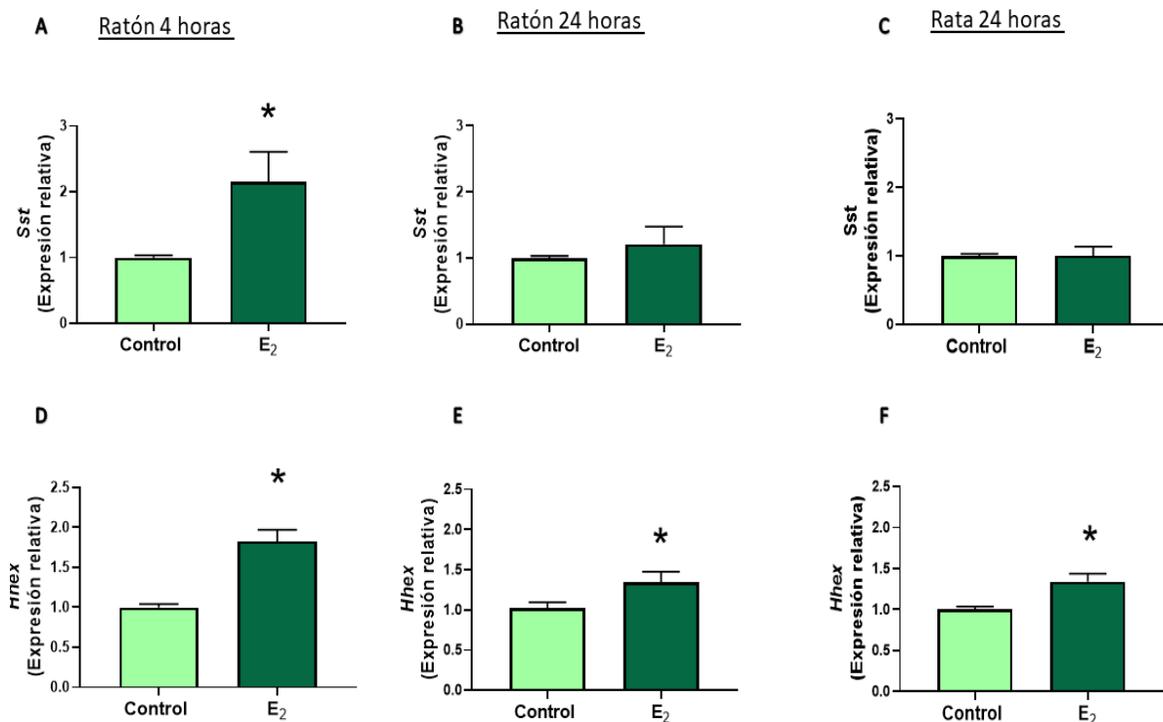


**Figura 30. Secreción de somatostatina en islotes tratados con estrógenos.** Islotes pancreáticos humanos y murinos fueron preincubados con E<sub>2</sub> a una concentración de 10 nM durante 24 horas. Seguidamente, se cuantificó la secreción de somatostatina baja glucosa (1 mM) y alta (20 mM), y se normalizó según el número de islotes, según lo descrito en la sección 3.2.1.2 de Materiales y Métodos. (A) Secreción de somatostatina en baja y alta glucosa en islotes de rata (N= 3) (B) Fold change de la secreción de somatostatina en islotes de ratas (C) Secreción de somatostatina en baja y alta glucosa en islotes humanos (N= 2). (D) Fold change de la secreción de somatostatina en islotes de humanos. Los datos están expresados como la media ± SEM \*p<0,05 vs control por ANOVA (paneles A y C) o T de student (paneles B y D).

### 1.3. – Adaptaciones de la expresión génica de marcadores β y δ tras el tratamiento con E<sub>2</sub>

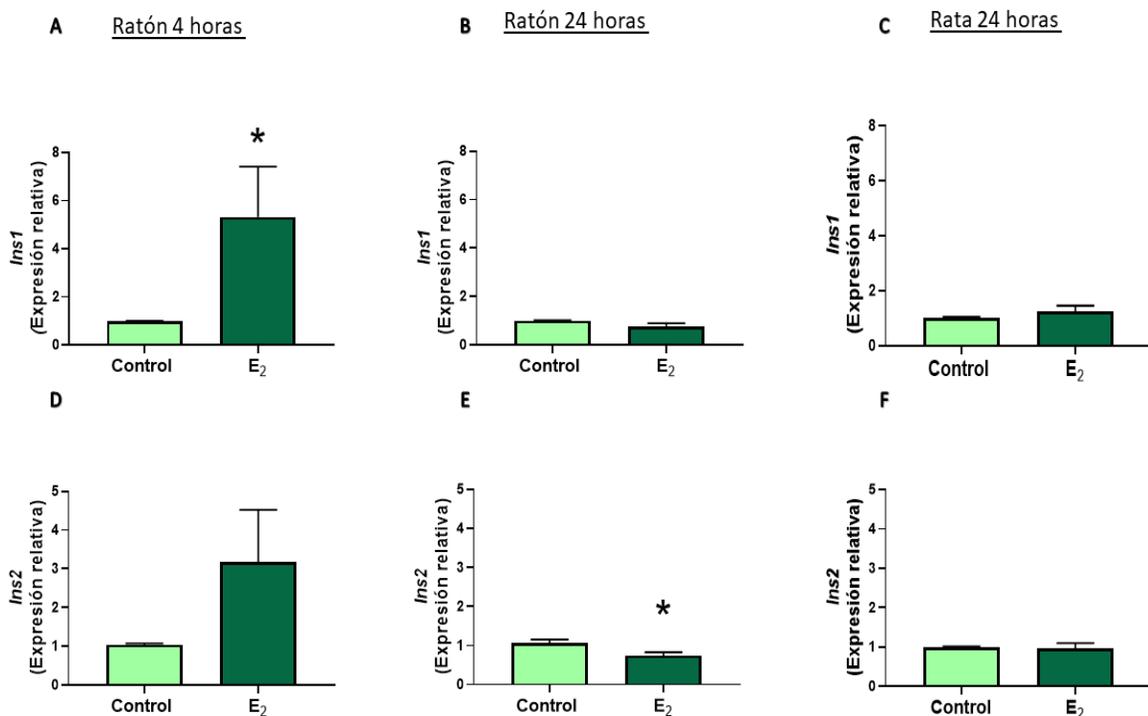
Debido a que la secreción de somatostatina se encontraba disminuida en los modelos *in vitro*, y sabiendo que los estrógenos parecen aumentar el gen de la insulina<sup>(185)</sup>, nos cuestionamos si estos estarían actuando de alguna forma sobre el gen de la somatostatina; es por ello que se trataron islotes de ratón y de rata con E<sub>2</sub> 10 nM durante 4 y 24 horas, se obtuvo el ARNm y se realizaron ensayos de qPCR. **(Figura 31)**. Lo primero que hicimos fue ver el comportamiento del gen de la somatostatina tras el tratamiento con E<sub>2</sub> y nos llamó la atención que, de forma

tiempo dependiente, el E<sub>2</sub> aumentó en 100% la expresión del gen de somatostatina (4 horas), mientras que a las 24 horas este efecto se perdió (**Figura 31A-C**). Siguiendo con los genes de las células δ-pancreáticas, decidimos estudiar *Hhex* que se ha descrito que es un activador directo del gen de la somatostatina<sup>(87, 90)</sup>. El tratamiento con E<sub>2</sub> durante 4 horas, aumentó en 80% dicho gen y se mantuvo durante 24 horas de tratamiento, tanto en ratones (30%) como en ratas (30%), aunque en menor medida (**Figura 31D-F**).



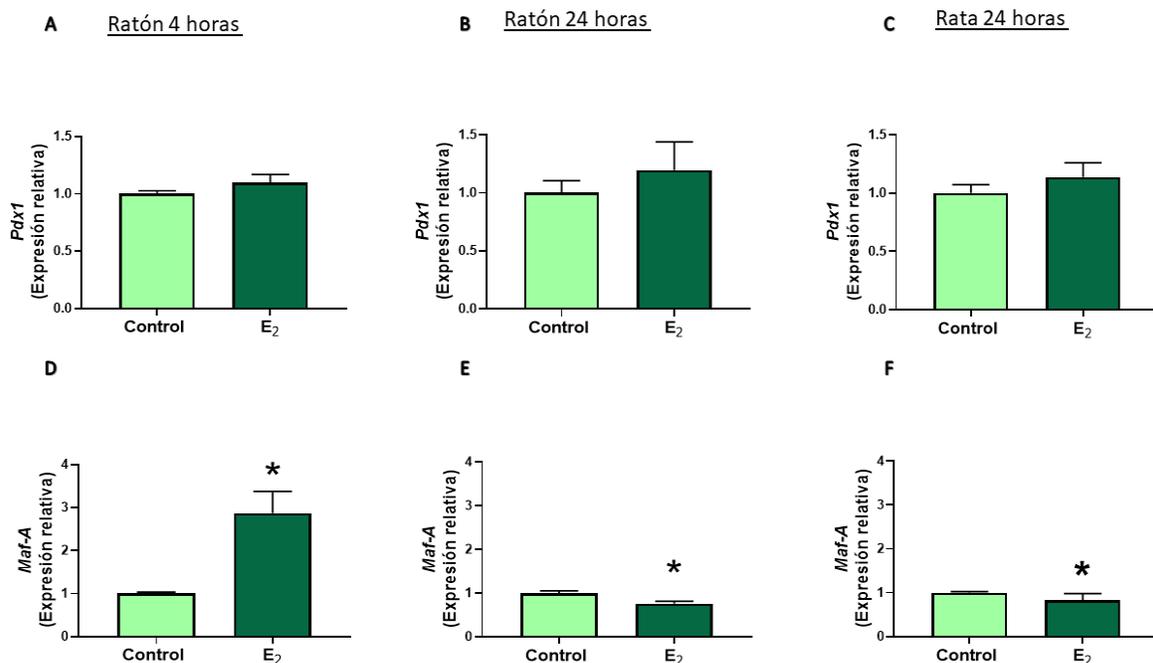
**Figura 31. Expresión génica de marcadores de célula δ tras el tratamiento con estrógenos.** ARNm de Islotes pancreáticos de ratones y ratas macho de 2-3 meses tras el tratamiento con E<sub>2</sub>. (A-C) Sst. (D-F) Hhex. Los datos están expresados como la media ±SEM. N=2-7 x triplicado por condición. \* p<0,05 vs. Control según la prueba T de Student.

Lo siguiente que estudiamos fueron los genes de la célula  $\beta$ , empezando con los dos genes de insulina (*Ins1* e *Ins2*) que se expresan en roedores. El tratamiento con  $E_2$ , durante 4 horas, aumentó en 400% la expresión del gen *Ins1*. Este efecto no se observó a las 24 horas de tratamiento, tanto en islotes aislados de rata como de ratón, (**Figura 32A-C**). En cuanto a *Ins2*, el  $E_2$  durante 4 horas aumentó de forma no significativa la expresión del gen (200%); este efecto se perdió tras 24 horas de tratamiento tanto en islotes aislados de ratones como en ratas (**Figura 32D-F**).



**Figura 32. Expresión génica de marcadores de célula  $\beta$  tras el tratamiento con  $E_2$ .** ARNm de Islotes pancreáticos de ratones y ratas macho de 2-3 meses tras el tratamiento con  $E_2$ . (A-C) *Ins1*. (D-F) *Ins2*. Los datos están expresados como la media  $\pm$ SEM. N=3-7 x triplicado por genotipo y condición. \*  $p < 0,05$  vs. Control según la prueba T de Student.

Posteriormente estudiamos los FTs de célula  $\beta$ , donde *Pdx1* no presentó cambios en ninguno de los tiempos de tratamiento con  $E_2$ , ni en los modelos murinos usados (**Figura 33A-C**). Por último, estudiamos *Maf-A*, y al igual que en casos anteriores, su comportamiento era tiempo dependiente. El tratamiento con  $E_2$  durante 4 horas causó un aumento en 180%, el cual se perdió después de 24 horas de tratamiento tanto en islotes aislados de ratones (30%,) como de ratas (20%) (**Figura 33D-F**). Estos resultados demuestran que los cambios observados hasta ahora en las diferentes poblaciones celulares del islote pancreático, tras el tratamiento con  $E_2$ , son resultado de cambios a nivel transcriptómico que suceden a partir de las 4 horas, y los cuales se pierden tras las 24 horas de tratamiento probablemente por mecanismos de adaptación.



**Figura 33. Expresión génica de marcadores de FTs de célula  $\beta$  tras el tratamiento con  $E_2$ .** ARNm de Islotes pancreáticos de ratones y ratas macho de 2-3 meses tras el tratamiento con  $E_2$ . (A-C) *Pdx1*. (D-F) *Maf-A*. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM.  $N=2-7$  x triplicado por genotipo y condición. \*  $p < 0,05$  vs. Control según la prueba T de Student.

## 1.4. – Adaptaciones en los agonistas de la secreción de somatostatina durante la gestación.

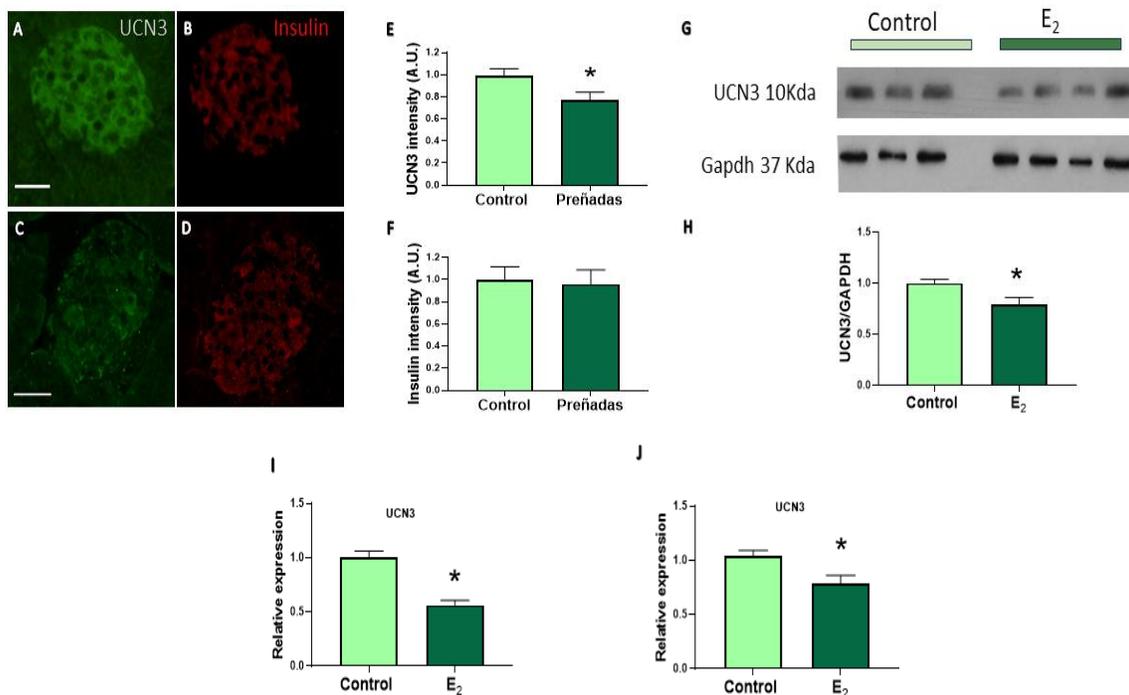
### 1.4.1 – Urocortina 3 (UCN3)

En la búsqueda por encontrar mecanismos moleculares que subyacen al defecto secretor de somatostatina en los islotes tratados con E<sub>2</sub> y debido a que nuestros resultados demostraban que dicho tratamiento durante 24 horas disminuía la secreción de somatostatina en islotes murinos y humanos (**Figura 30**) pero, que tras 4 horas de tratamiento, aumentaba la expresión de los genes de somatostatina y de *Hhex* (**Figura 31**), decidimos identificar otros mecanismos de regulación que explicaran el fallo de la secreción. Elegimos como posible diana a UCN3; ya que, como se explicó en el apartado 1.2.2.3 de páncreas endocrino, es importante para la correcta secreción de somatostatina. Por lo que nos preguntamos si el tratamiento con E<sub>2</sub> estaba ejerciendo algún efecto sobre la expresión de UCN3, pudiendo ser la causante de las alteraciones encontradas en la secreción de somatostatina.

Por ello, detectamos la expresión de UCN3 e insulina mediante una co-tinción con anticuerpos contra ambas hormonas, en los páncreas de las ratonas preñadas. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia como medida de la expresión de dichas proteínas (**Figura 34A-D**); de este modo, encontramos una disminución significativa de la intensidad de UCN3 en el grupo de preñadas (20%) (**Figura 34E**) y ningún cambio en la intensidad de la insulina (**Figura 34F**), esto sugiere una disminución de la cantidad de UCN3 en las vesículas de secreción.

Una vez establecido lo que ocurría en el modelo de estudio *in vivo*, pasamos al modelo *ex vivo*. Debido a problemas de reconocimiento antigénico por parte del anticuerpo en otra especie que no fuera ratón, y a que no hay otros anticuerpos anti-UCN3 comerciales de buena calidad, decidimos realizar los estudios solo con islotes de ratón, los cuales fueron tratados con E<sub>2</sub> 10 nM durante 24 horas para analizar la cantidad de UCN3 mediante western blot. Al cuantificar los resultados, encontramos que, al igual que los resultados del modelo *in vivo* de gestación, en los islotes

murinos existía una disminución significativa de 20% de UCN3 tras el tratamiento estrogénico (**Figura 34G-H**). Visto lo anterior, nos preguntamos si el efecto del E<sub>2</sub> podría estar ocurriendo no solo a nivel proteico sino también a nivel transcripcional; por lo que, se trataron los islotes con E<sub>2</sub> durante 4 y 24 horas, se obtuvo su ARNm y se realizaron ensayos de qPCR para estudiar las variaciones del gen de UCN3. A diferencia de los genes anteriormente estudiados, cuyo comportamiento variaba según el tiempo de tratamiento, la expresión del gen *Ucn3* disminuyó 50% (4 horas) y 20% (24 horas) debido al tratamiento con E<sub>2</sub> (**Figura 34I-J**). Estos resultados sugieren que los estrógenos inhiben la expresión de UCN3 a nivel transcripcional y esto deriva en una disminución de la proteína.

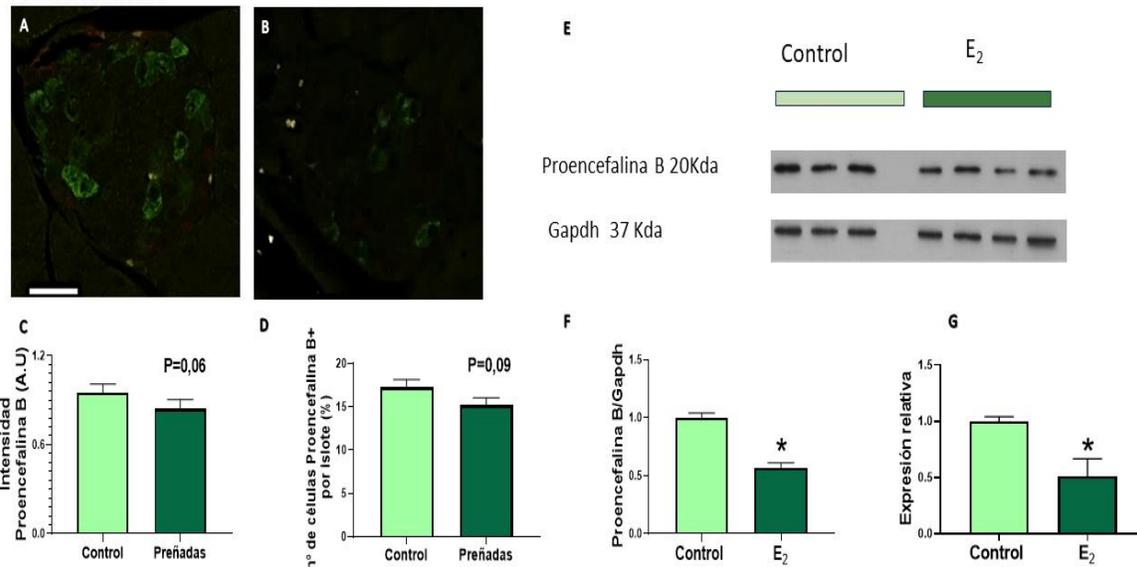


**Figura 34. Cuantificación de UCN3 en islotes pancreático.** (A-B) Foto representativa de un islote pancreático aislado de una ratona no preñada. (C-D) Foto representativa de un islote pancreático aislado de una ratona preñada. Escala= 30  $\mu$ m. (E-F) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de UCN3 e insulina, normalizada según los controles. N=3-4 ratones por condición. (G-H) Foto representativa y cuantificación de un western blot para UCN3 en islotes de ratón tratados o no con E<sub>2</sub>, normalizado según valores de GAPDH. N=7 ratones por condición. Expresión relativa del gen de UCN3 en islotes de ratón después de (I) 4 horas y (J) 24 horas de tratamiento con E<sub>2</sub>. N=2-4 ratones por condición (por triplicado y cuatriplicado). Los datos de cada experimento están expresados  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$  vs control por *t*-Student.

## 1.4.2 – Dinorfina

La dinorfina es un opioide que mayoritariamente se encuentra en el sistema nervioso central y que regula las vías sensoriales del dolor, estrés y adicción, aunque también puede mediar la retroalimentación negativa sobre las neuronas productoras de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para inhibir la liberación de hormona luteinizante (LH)<sup>(203-208)</sup>. *Blandino et al.* determinaron la existencia de dinorfina en las células  $\beta$ -pancreáticas<sup>(75)</sup> y describieron que este opioide desencadenaba una inhibición indirecta sobre la secreción de insulina, mediante la estimulación de la secreción de somatostatina<sup>(76)</sup>; comportamiento muy parecido al de UCN3. Por tal motivo, y recordando que la expresión de UCN3 está disminuida en nuestros modelos experimentales en respuesta a estrógenos, quisimos estudiar el comportamiento de dinorfina en nuestros modelos. Debido a la poca disponibilidad comercial de anticuerpos anti-dinorfina, los resultados obtenidos durante esta tesis se hicieron en base a la pro-proteína (proencefalina B), la cual, una vez procesada resulta en dos formas bioactivas: dinorfina A y dinorfina B. Se estudió la expresión de proencefalina B en islotes de ratonas preñadas mediante inmunofluorescencia (**Figura 35A-B**) y cuantificación de la misma, encontrándose una disminución de la intensidad no significativa (~10%) que coincidía con una disminución del número de células proencefalina B+ con respecto al total del islote (~15%) (**Figura 35C-D**). Cuando pasamos al modelo *ex vivo* de islotes de ratón tratados con E<sub>2</sub> durante 24 horas, y detección mediante *western blot*, confirmamos una disminución de proencefalina B en el grupo tratado con E<sub>2</sub> (40%) (**Figura 35E-F**). A continuación, comprobamos el comportamiento del gen de dinorfina a diferentes tiempos tras el tratamiento con E<sub>2</sub>, de modo que, tras el tratamiento de 4 horas, encontramos una disminución significativa del 50% (**Figura 35G**). Estos resultados, junto a los resultados obtenidos con la UCN3, nos hacen pensar que el déficit de secreción de somatostatina es debido a un efecto del E<sub>2</sub> sobre la maquinaria transcriptómica de las células  $\beta$ , donde se pierde la expresión de algunos de los agonistas de la secreción.

## Proencefalina B



**Figura 35. Cuantificación de proencefalina B en islotes pancreático.** (A) Foto representativa de un islote pancreático aislado de una ratona no preñada. (B) Foto representativa de un islote pancreático aislado de una ratona preñada. Escala= 30  $\mu$ m. (C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de proencefalina B, normalizada según los controles. (D) Porcentaje del número de células Proencefalina B+ con respecto al total del islote. N=5 ratones por condición. (E-F) Foto representativa y cuantificación de un western blot para proencefalina B en islotes de ratón tratados o no con E<sub>2</sub> 24 horas, normalizado según valores de GAPDH. N= 4 ratones por condición. (G) Expresión relativa del gen de proencefalina B en islotes de ratón después de 4 horas de tratamiento con E<sub>2</sub>. N=2-4 ratones por condición (por triplicado y cuatuplicado). Los datos de cada experimento están expresados  $\pm$  SEM. *p*<0,05 vs control por *t*-Student.

# WII

**Discusión**

### **1 – Adaptaciones morfológicas del páncreas endocrino durante la gestación**

#### **1.1. – Plasticidad de las células $\delta$ -pancreáticas**

##### **1.1.2 – Modelo de gestación**

La gestación es un estado metabólico de estrés fisiológico en el que aumenta la producción y secreción de hormonas como los estrógenos o el lactógeno placentario, con el propósito de preparar al cuerpo materno y llevar a término al nuevo individuo. De entre las adaptaciones que ocurren durante esta etapa, nos parece importante resaltar la aparición de RI debido a cambios en el metabolismo glucídico: aumento de la secreción de insulina en roedores y humanos; y aumento del tamaño de los islotes pancreáticos y aumento de la masa  $\beta$  y  $\alpha$  pancreáticas en roedores<sup>(192-196)</sup>. Todos estos cambios son necesarios para asegurar el flujo de nutrientes hacia el feto, sin embargo, una alteración en este equilibrio puede desencadenar una DG.

Los mecanismos implicados en las adaptaciones del páncreas endocrino durante la gestación siguen estudiándose, centrándose mayoritariamente en las células  $\beta$  y  $\alpha$  pancreáticas.

Las células  $\delta$ -pancreáticas secretan somatostatina, principal hormona inhibidora de la secreción de insulina y glucagón, sin embargo, no hay suficientes estudios sobre el papel que juegan estas células durante el embarazo, es por ello que, con esta tesis intentamos dilucidar las adaptaciones que sufren las mismas durante la gestación.

Nuestras observaciones en un modelo *in vivo* de gestación resaltan la capacidad adaptativa del páncreas endocrino en respuesta a cambios en el microambiente hormonal. De esta manera, nuestros resultados van en concordancia con lo descrito en la literatura sobre el aumento de las células  $\beta$  como posible respuesta adaptativa ante la disminución de células  $\delta$ <sup>(62)</sup> y con lo descrito en la literatura sobre el aumento de las células  $\beta$ <sup>(185,189,199-200)</sup> durante la gestación, sin embargo, se opone a lo encontrado por *Quesada-Candela et al.*<sup>(201)</sup> y *Sharma et al.*<sup>(188)</sup> quienes encontraron un aumento de la población  $\alpha$  en esta etapa, a diferencia de nuestros resultados que apuntan a una disminución; esta discrepancia puede ser debido a diferencias en los tiempos de gestación de los modelos usados, puesto que en dichos estudios se usaron ratonas preñadas de 18,5 dpc, mientras que nosotros usamos ratonas con una gestación más temprana (14,5 dpc).

Por otro lado, nuestros hallazgos difieren de lo encontrado por *Gallego et al.*<sup>(111)</sup> que describieron una disminución de células  $\beta$  y un aumento de células  $\delta$  en ratas Wistar de 18 dpc con DG, estos resultados podrían explicarse debido a la presencia de DG; sin embargo, podemos observar que, en este modelo de gestación, al igual que lo que sugieren nuestros datos, existe una regulación entre las células  $\beta$  y  $\delta$ . Otra diferencia con su modelo y el nuestro es la especie (rata vs ratón) y el tiempo de gestación.

La presencia de células bihormonales insulina+/somatostatina+ en nuestro modelo nos hace hipotetizar que dicha regulación  $\beta/\delta$  depende de las necesidades metabólicas del organismo. Estos resultados concuerdan con lo visto por *Yoneda et al.*<sup>(112)</sup> y *Cinti et al.*<sup>(113)</sup> quienes encontraron en pacientes con DM2 un aumento de dichas células bihormonales.

La transdiferenciación celular es un proceso que ha sido estudiado previamente en el islote pancreático, y se ha encontrado que ante situaciones de estrés metabólico las células  $\beta$  y  $\alpha$  son capaces de activar este proceso<sup>(92-94,98)</sup>. Aunque en las células  $\delta$  este mecanismo se ha logrado estudiar solo mediante la sobreexpresión o la

ablación de FTs<sup>(89-92, 99-101)</sup>, nosotros hemos observado un aumento de células que expresan factores de transcripción específicos de célula  $\beta$  ( $\delta$ /PDX1+ y  $\delta$ /Maf-A+) en nuestro modelo *in vivo*; aunque para confirmar que estos resultados implican un proceso de transdiferenciación necesitaríamos llevar a cabo un trazado de linaje *in vivo*, nuestros datos muestran que las células  $\delta$ -pancreáticas están sufriendo procesos de plasticidad celular que les permite adquirir un fenotipo  $\beta$  para sobrellevar los cambios metabólicos de la gestación.

### 1.1.2 – Modelo de tratamiento hormonal

Durante la gestación existe una alteración en la secreción de hormonas maternas y muchas de las cuales que antes eran sintetizadas por los órganos maternos, pasan a ser sintetizadas por la placenta<sup>(199,209-211)</sup>.

Los estrógenos representan una de las hormonas más importantes durante esta etapa; en el primer trimestre de embarazo son sintetizados por los ovarios maternos, pero al entrar al segundo trimestre, con el desarrollo definitivo de la placenta, su producción pasa a depender de ésta.

Dentro de la familia de los estrógenos encontramos tres integrantes: la estrona ( $E_1$ ), el estradiol ( $E_2$ ) y el estriol ( $E_3$ ), los cuales aumentan significativamente durante la gestación, de entre ellos, el  $E_2$  es el que aumenta en mayor proporción (normal: 0,1-0,4 ng/ml, término: 6-30 ng/ml) y se le atribuyen varios de los cambios ocurridos durante esta etapa<sup>(197-198)</sup>, destacando los cambios del metabolismo glucídico: aumento de la masa  $\beta$  funcional, hiperinsulinemia, aumento del gen de la insulina<sup>(178-183,187, 199)</sup>.

No obstante, los estrógenos no son las únicas hormonas que se producen en la placenta, tal es el caso del LP una hormona peptídica que aumenta sus concentraciones progresivamente hasta llegar a ser la hormona placentaria mayoritaria al final del embarazo (inicio: 3,5 $\mu$ g/ml; término:25  $\mu$ g/ml). De entre sus

funciones resaltamos la influencia en el metabolismo de la glucosa, ya que actúa como una hormona antagónica a la insulina, activando la lipólisis y proteólisis, además de inducir resistencia a la insulina por hiperinsulinemia. El objeto de los efectos de LP sería aumentar la cantidad de nutrientes en sangre para ser transportados a la circulación fetal<sup>(194-196,200)</sup>.

De modo que, usando un modelo *ex vivo* de rata, observamos como E<sub>2</sub>, y no LP, parece ser responsable, de los cambios en la composición del islote pancreático. Nuestros hallazgos van en concordancia con lo descrito en otros estudios sobre la capacidad de E<sub>2</sub> de aumentar la masa  $\beta$ <sup>(183, 185, 187)</sup>.

Nuestro estudio es el primero en demostrar que el tratamiento con E<sub>2</sub> es capaz de inducir cambios en la célula  $\delta$ -pancreática e inducir un posible fenotipo  $\beta$  en estas células a través de la expresión de FTs específicos.

Además, nos parece importante destacar que, aunque E<sub>2</sub> induce cambios sobre la célula  $\delta$ , no encontramos un aumento en la cuantificación de PDX1 y Maf-A total del islote pancreático en el modelo *ex vivo*, esto difiere del modelo *in vivo* muy probablemente debido a la interacción de otras hormonas en circulación que podrían estar potenciando o inhibiendo el efecto de E<sub>2</sub>, mientras que en el modelo *ex vivo* estamos limitando el comportamiento celular solo al estímulo hiperestrogénico.

Para comprobar esta hipótesis se podrían realizar tratamientos con distintas combinaciones de hormonas gestacionales para descartar alguna sinergia o antagonismo, no vista durante la realización de los experimentos *ex vivo*.

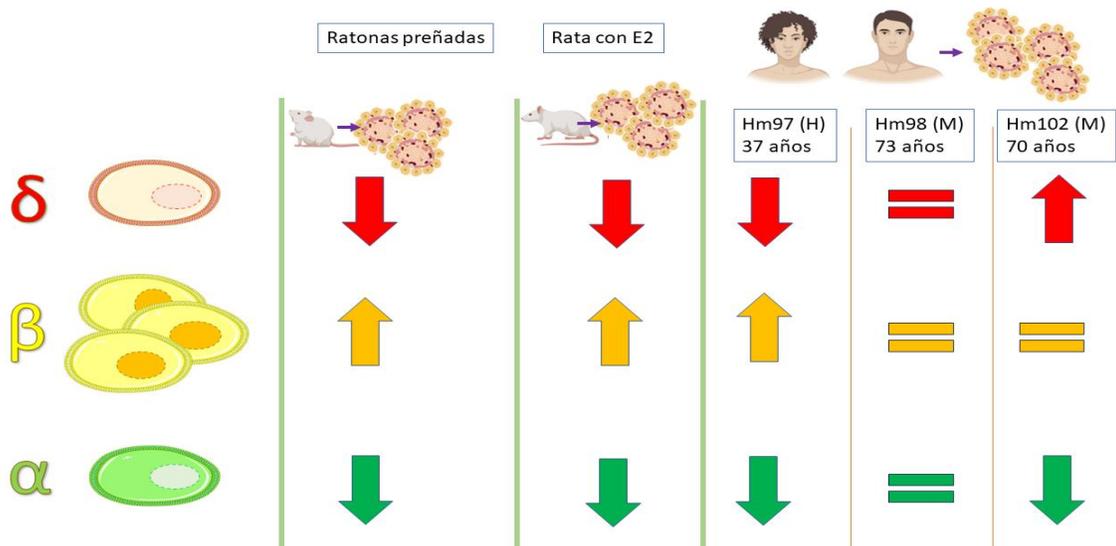
También es importante señalar que en el modelo *ex vivo* de humanos, debido a la gran variabilidad entre los donantes y la poca disponibilidad de islotes humanos, los resultados obtenidos en cuanto a la distribución celular no fueron lo suficientemente concluyentes como para asegurar que el fenotipo observado en los modelos murinos es reproducible. Aunque, nuestros hallazgos difieren entre los donantes, el donante Hm97 presentó un fenotipo similar al de los modelos de roedores: aumento

de células  $\beta$  y disminución de  $\alpha$  y  $\delta$ ; esto nos sugiere que los efectos de  $E_2$  pueden ser dependientes de la edad, puesto que dicho donante era joven, al igual que los animales estudiados. En este mismo orden de ideas, los islotes de Hm102 que proceden de un donante de 70 años presentó un aumento de células  $\delta$  en contraposición a los roedores y al donante Hm97 joven, indicando que  $E_2$  está actuando por otro mecanismo en células envejecidas.

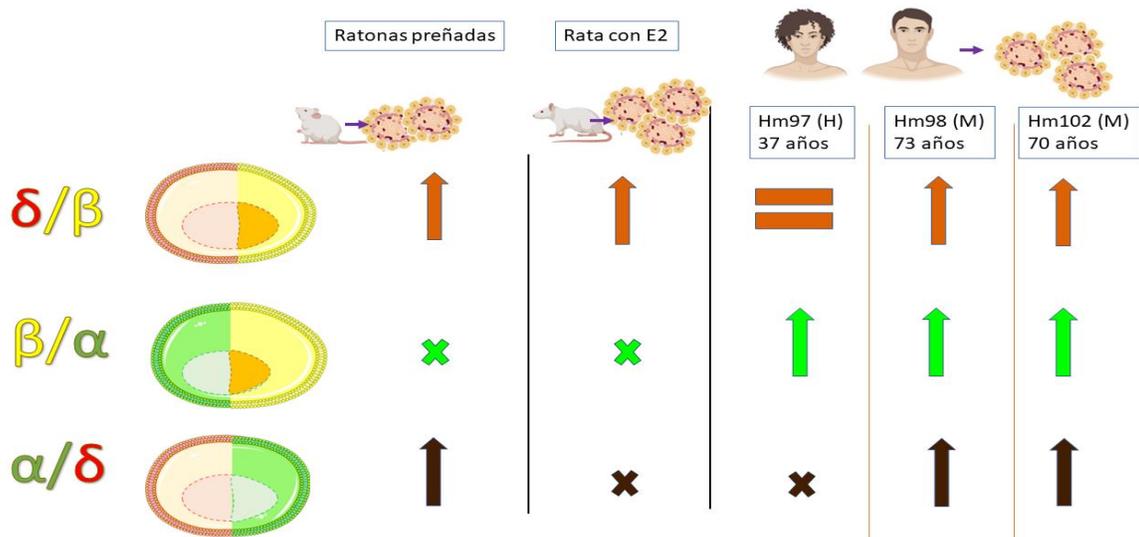
Respecto a las diferencias encontradas de Hm98 y Hm102 que compartían edades similares, es muy probable que la diferencia de resultados sea debido al sexo, y que las dosis usadas en Hm98 (mujer) no fueran las suficientes como para desencadenar algún efecto. Para comprobar las hipótesis sugeridas, se podría estudiar en el futuro, la distribución hormonal en islotes pancreáticos de mujeres y hombres jóvenes y mayores en necropsias de páncreas.

Nuestros hallazgos en islotes humanos sugieren que el efecto de  $E_2$  sobre la expresión de FTs de linaje  $\beta$  en célula  $\delta$  podrían considerarse ciertos, ya que reproducen el fenotipo observado en los modelos previos. De igual forma, este estudio se beneficiaría de un aumento en el número de donantes para futuros experimentos.

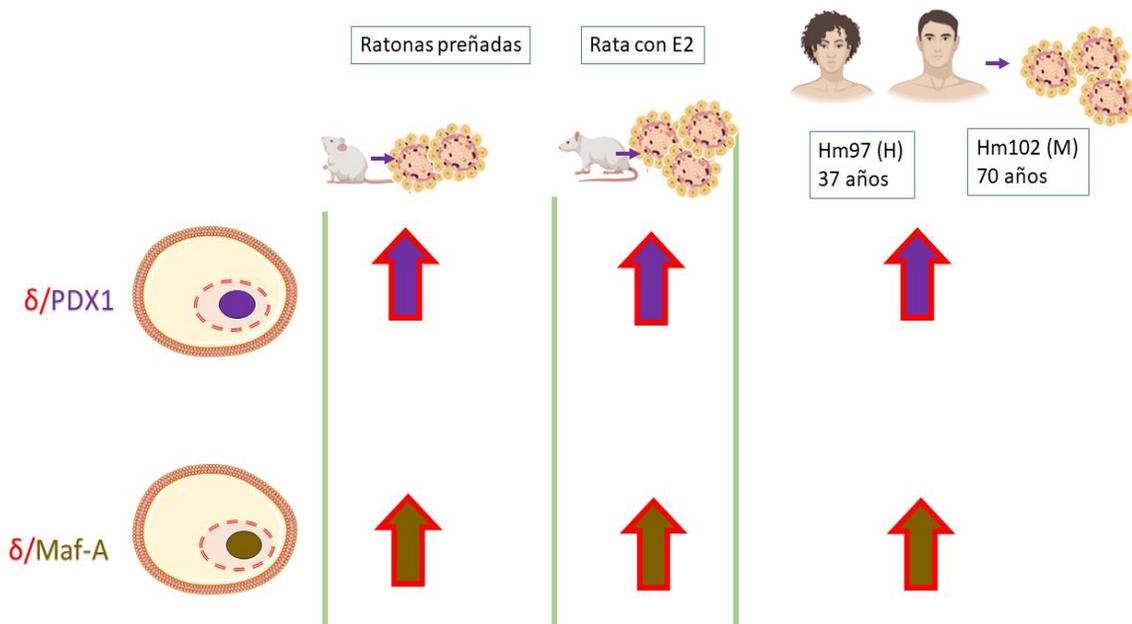
Un resumen gráfico de los resultados obtenidos en cuanto a las adaptaciones morfológicas del páncreas endocrino durante la gestación se puede encontrar en las **Figuras 36 a 38**.



**Figura 36. Cambios en la distribución celular  $\delta$ ,  $\beta$  y  $\alpha$  durante la gestación y el tratamiento con  $E_2$ .** La imagen fue creada utilizando Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.



**Figura 37. Cambios en las células bihormonales durante la gestación y el tratamiento con  $E_2$ .** La imagen fue creada utilizando Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.



**Figura 38. Presencia de células  $\delta$ /PDX1+ y  $\delta$ /Maf-A+ durante la gestación y el tratamiento con E<sub>2</sub>. La imagen fue creada utilizando Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.**

## **2 – Adaptaciones Funcionales del páncreas endocrino tras el tratamiento con E<sub>2</sub>.**

### **2.1. –Cambios en la maquinaria $\delta$ -pancreática**

La somatostatina tiene como función principal en el páncreas endocrino la inhibición de la secreción de insulina y glucagón, y se ha observado que en DM2 está disminuida por disfunción de las células  $\delta$ <sup>(18, 112, 118-119)</sup>, sin embargo, su papel durante la gestación no ha sido estudiada.

Nuestros resultados, tanto en el modelo *ex vivo* de ratas como el de humanos, demostraron que el E<sub>2</sub> desencadena un déficit en la secreción de somatostatina muy similar a lo encontrado en los estudios de DM2<sup>(119-120, 212-213,122)</sup>, no obstante, dichos cambios no se lograron explicar por cambios a nivel transcriptómico; ya que encontramos un aumento del gen de la somatostatina junto al gen de *Hhex*, lo que

tendría sentido pues algunos autores proponen que este FT es necesario para activar la transcripción del gen que codifica dicha hormona<sup>(82, 204)</sup>. Llama la atención que, pasadas 24 horas, *Hhex* se mantuvo aumentado mientras que el gen de la somatostatina disminuyó hasta valores semejantes al control. Esto difiere de lo publicado previamente<sup>(79-80,106)</sup>, aunque se podrían explicar si tenemos en cuenta que, los modelos usados en los estudios publicados previamente presentaban DM2 o estaban genéticamente modificados (se hace delección total de *Hhex* o de *Ucn3*), mientras que en nuestro estudio se usaron islotes sanos de roedores de cepas silvestre, sin modificaciones génicas.

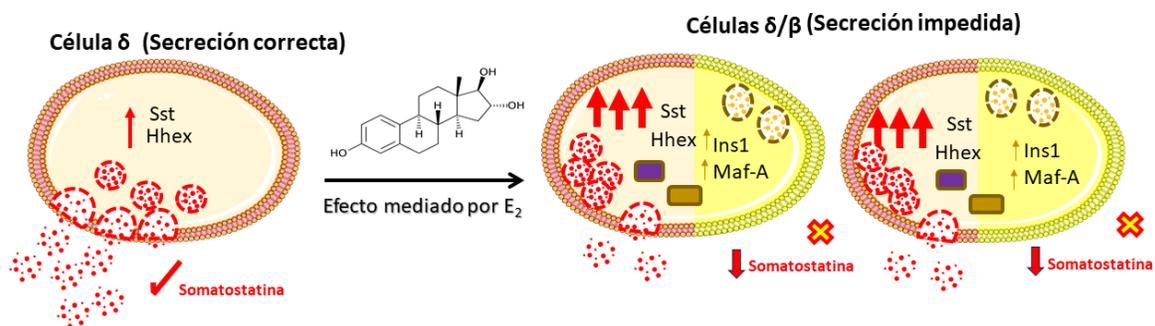
Otros genes estudiados fueron aquellos implicados en la producción de insulina y diferenciación  $\beta$ ; observando un aumento de *Ins1*, *Ins2* y *Maf-A* a tiempos cortos, lo que concuerda con lo descrito por *Alonso-Magdalena et al.*<sup>(187)</sup> y *Sekido et al.*<sup>(214)</sup>. Así pues, nuestro estudio aporta una nueva visión a lo ya descrito sobre la regulación génica que ejerce el E<sub>2</sub> sobre la célula  $\beta$ , puesto que después de 24 horas todos estos genes disminuyeron drásticamente, muy probablemente debido a un mecanismo de retroalimentación negativa sobre la transcripción génica.

Por otro lado, nuestros resultados se oponen a lo encontrado por *Song et al.*<sup>(215)</sup>, ya que la transcripción del gen de *Pdx1* no cambió en ninguna de las condiciones de tratamiento ni modelos estudiados. Esto puede que sea debido a que se cultivaron los islotes pancreáticos en un medio con una concentración de glucosa mayor (11 mM) al que fue usado durante la realización de nuestro estudio (5 mM), por lo que, es muy factible que lo reportado por *Song et al.* sea un efecto del E<sub>2</sub> debido las condiciones experimentales de hiperglucemia.

Es interesante que, durante tiempos cortos de tratamiento, el E<sub>2</sub> aumentara la mayoría de genes estudiados, pero pasadas las 24 horas los genes de las células  $\beta$  disminuían y los de las células  $\delta$  no cambiaban o seguían aumentados. En este sentido, *Schaffer et al.*<sup>(101)</sup> y *Taylor et al.*<sup>(108)</sup> describieron como las células  $\beta$  al perder NKx6.1 adquirirían un fenotipo pro- $\delta$ , de modo que, nuestros hallazgos

podrían explicarse si asumimos que un mecanismo similar está ocurriendo. Así pues, E<sub>2</sub> desencadenaría desdiferenciación  $\delta$ , provocando la aparición de dos eventos simultáneos: por un lado, un grupo de células  $\delta$  adquirirían un fenotipo pro- $\beta$  (aumento de células insulina+/somatostatina+,  $\delta$ /PDX1+ y  $\delta$ /Maf-A+); mientras que, por el otro, dicha desdiferenciación activaría mecanismos de protección del linaje celular (aumento de los genes *Hhex* y somatostatina). Después de 24 horas, el número de células  $\delta$ -pancreáticas monohormonales habría disminuido a tal punto que, a pesar de seguir transcribiéndose el gen de *Hhex*, la estimulación de este sobre el gen de la somatostatina no sería suficiente para producir un aumento en la transcripción de la hormona (**Figura 39**).

Esta hipótesis se podría confirmar si, al realizar co-tinciones de HHEX, somatostatina y Maf-A encontráramos células  $\delta$ /Maf-A+ o PDX1+/HHEX+; otra forma de estudiar estos eventos sería a través de la técnica de secuenciación de ARN seq para célula única, en la que, tras el tratamiento con E<sub>2</sub>, se buscarían genes de célula  $\beta$  en las células  $\delta$ -pancreáticas.



**Figura 39. Hipótesis del efecto del E<sub>2</sub> sobre los genes de célula  $\delta$ .** Las células rojo/amarillo son células bihormonales. Los puntos rojos representan la secreción de somatostatina, que en el caso de las células bihormonales esta disminuida. Los cuadros representan: PDX1 (morado); Maf-A (dorado). La imagen fue creada utilizando Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

## 2.2. – Cambio en las concentraciones de UCN3 y dinorfina

### 2.3.1–Urocortina 3 (UCN3)

La UCN3 es una hormona peptídica de la célula  $\beta$  que se co-secreta con la insulina y cuya principal función es estimular la secreción de somatostatina, potenciando así la inhibición de la secreción de insulina. Los resultados de esta tesis muestran que  $E_2$  es capaz de disminuir hasta un 20% la expresión proteica de esta hormona en el modelo *in vivo*, y hasta un 50% de la expresión génica en el modelo *ex vivo*. Esto va en concordancia con lo encontrado con *Van der Muelen et al.*<sup>(9)</sup> quienes tras deletar el gen de UCN3 en un modelo de ratón, encontraron un fenotipo de disfunción  $\delta$ , muy parecido al fenotipo encontrado en nuestros modelos tras el tratamiento con  $E_2$ .

Aunque no se han encontrado estudios que relacionen  $E_2$  con UCN3, nuestros hallazgos se suman a lo descrito por *Owens et al.*<sup>(216)</sup>, *Haeger et al.*<sup>(217)</sup> y *Watanabe et al.*<sup>(218)</sup> quienes estudiaron el efecto del  $E_2$  sobre la UCN1 y UCN2. En dichos estudios, las uricortinas disminuían tras el tratamiento con  $E_2$  y explicaban tal efecto por la presencia de elementos de unión a estrógenos (EREs) parciales en los promotores de UCN1 y UCN2. Debido a que UCN1 y UCN2 guardan una homología de aproximadamente del 40% con UCN3<sup>(219-220)</sup>, pensamos que los efectos de  $E_2$  sobre UCN3 son a través de EREs parciales.

### 2.3.1–Dinorfina

Nuestros resultados muestran que tanto en un modelo *in vivo*, como en un modelo *ex vivo*,  $E_2$  disminuye la expresión proteica y génica de este opioide. Esto va en concordancia con lo encontrado por *Yang et al.*<sup>(221-222)</sup> y *Gottsch et al.*<sup>(223)</sup> quienes observaron un efecto inhibitorio de  $E_2$  sobre neuronas del núcleo arcuato, y que parece ser dependiente de EREs.

Así pues, parece que los opioides cumplen un papel sobre la secreción de somatostatina, ya que nuestro fenotipo de disminución de dinorfina y disfunción  $\delta$  concuerda con lo encontrado por *Blandino et al.*<sup>(76)</sup>, quienes encontraron que al deletar el receptor de opioides de las células  $\delta$  ocurría una disminución en la secreción de somatostatina; y por *Hermansen et al.*<sup>(224)</sup> quienes usando met-enkefalina y leu-enkefalina también encontraron inhibición de la secreción de somatostatina. No obstante, recientemente *Blandino et al.*<sup>(75)</sup> también ha descrito como un aumento en la transcripción y secreción de la insulina va en paralelo con un aumento de la transcripción y secreción de dinorfina, de forma opuesta a lo observado en nuestros modelos, donde a pesar de tener aumento de la transcripción, número de células e intensidad de la insulina, la dinorfina se encontraba disminuida en todos los parámetros estudiados. Esto tal vez sea debido a que sus experimentos fueron hechos bajo condiciones de hiperglucemia, mientras que nosotros trabajamos en condiciones de normoglucemia y bajo tratamiento con E<sub>2</sub>.

Basándonos en la información previa que disponemos y ante los hallazgos obtenidos durante la realización de esta tesis, creemos que E<sub>2</sub> actúa de forma rápida y directa sobre la célula  $\beta$ -pancreática, aumentando la transcripción de los genes de insulina (*Ins1* e *Ins2*) y *Maf-A* pero inhibiendo los genes de *Ucn3* y dinorfina; como consecuencia de esto, existiría una disminución proteica de dichas hormonas y, por ende, una disminución en la funcionalidad  $\delta$ -pancreática. La célula  $\delta$ , al no ser capaz de secretar somatostatina correctamente, causaría un acumulo de vesículas de secreción en el citosol que generaría un proceso de desregulación transcripcional en donde se activarían genes que normalmente estarían apagados, como lo son *Ins1* y *Maf-A*.

Por otro lado, *Quesada-Candela et al.*<sup>(201)</sup> mostraron que el tratamiento con E<sub>2</sub> no solo disminuía la proliferación celular  $\alpha$ -pancreática, sino también la secreción de glucagón. Aunque en nuestro estudio no pudimos medir la secreción de glucagón

debido a que las concentraciones de glucosa usadas fueron optimizadas para la secreción de somatostatina; como también encontramos una disminución significativa del número de células  $\alpha$ , podemos asumir que su secreción está disminuida. De este modo, y recordando la bioquímica de la célula  $\delta$ , donde el glucagón funciona como un activador de la secreción de somatostatina, como consecuencia de la pérdida de glucagón, se perdería el estímulo paracrino sobre la secreción de somatostatina.

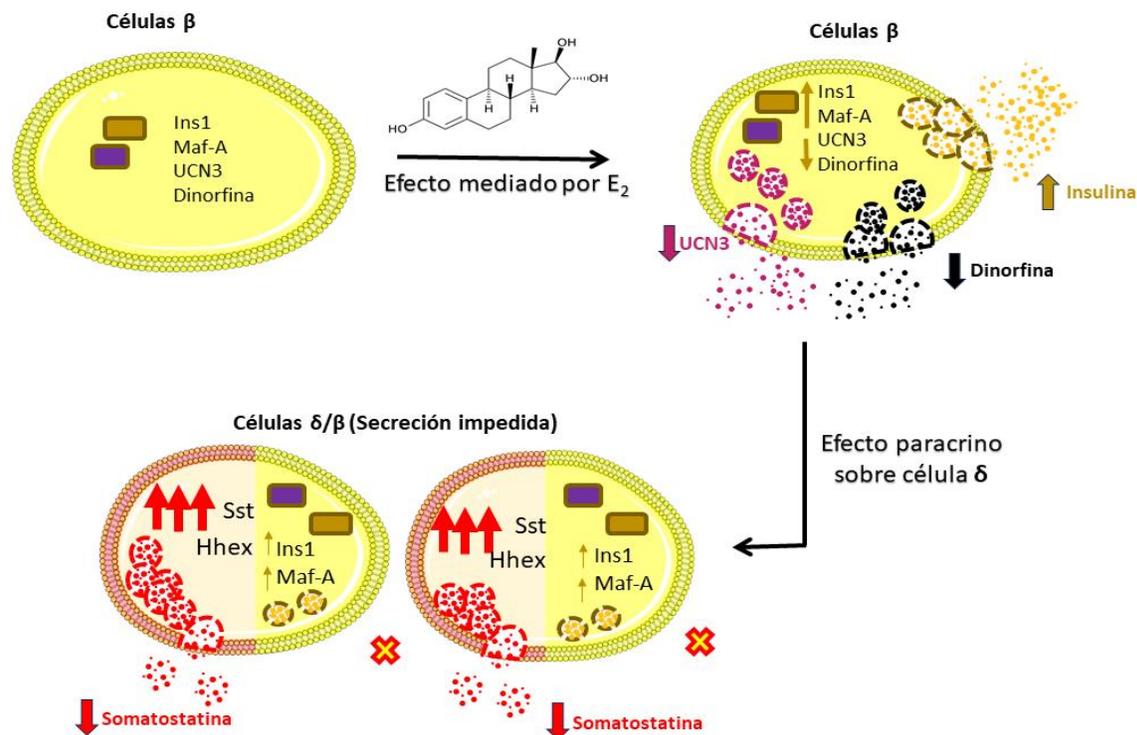
La nueva célula intermedia  $\delta/\beta$  actuaría como una célula bihormonal, explicando el aumento de células insulina+/somatostatina+,  $\delta$  /PDX1+ y  $\delta$ /Maf-A+ encontradas. Así mismo, los aumentos en los genes *Ins1* y *Maf-A* serían atribuibles al efecto directo del  $E_2$  sobre la célula  $\beta$ -pancreática pero también a la transcripción de los mismos genes en estas células  $\delta/\beta$ .

No hallamos diferencias en el gen de PDX1 a pesar de encontrar un aumento en su proteína (células  $\delta$ /PDX1+), quizá porque el efecto de  $E_2$  ocurre a nivel de su traducción proteica y no sobre la transcripción génica, de este modo la célula  $\delta$  tendría ARNm de PDX1 que no se traduciría sin los estímulos apropiados.

Lo más probable es que durante la gestación existan tanto células  $\delta$ -pancreáticas funcionales, que son capaces de responder a los niveles secretados de UCN3, dinorfina y glucagón, así como también células  $\delta/\beta$  incapaces de secretar correctamente. De este modo, a pesar de que *Hhex* está aumentado, probablemente como mecanismo de respuesta a la desregulación transcripcional  $\delta$ , no es suficiente para mantener la correcta secreción de somatostatina y el control de la insulinemia (**Figura 40**).

Nuestra hipótesis se ve respaldada ante el hecho de que las células  $\delta$ -pancreáticas humanas parecen poseer *splicing* alternativo del gen de la insulina<sup>(225)</sup>, lo que nos confirmaría la presencia de genes de célula  $\beta$  en dichas células; además, un estudio de ARN seq. en célula única demostró el enriquecimiento de vías de señalización de estrógenos<sup>(226)</sup> en células  $\delta$ -pancreáticas de ratonas preñadas.

Por todo lo anterior, creemos que los hallazgos obtenidos en el presente estudio ofrecen información novedosa sobre la importancia de las células  $\delta$ -pancreáticas en la regulación paracrina del islote pancreático durante la gestación. Al ser la gestación un estado fisiológico de RI, nuestros resultados podrían aportar una nueva visión sobre la capacidad que tienen estas células de sufrir procesos de plasticidad para adecuarse a cambios en el microambiente hormonal y ante demandas metabólicas en las que se necesite dicha plasticidad para mantener la homeostasis del metabolismo intermediario.



**Figura 40. Modelo propuesto.** E<sub>2</sub> inhibe la secreción de glucagón, UCN3 y dinorfina, lo que causa desdiferenciación  $\delta$  hacia un fenotipo pro- $\beta$ .. Las células rojo/amarillo son células bihormonales. Los puntos rojos representan la secreción de somatostatina, que en el caso de las células bihormonales esta disminuida y por eso el símbolo x. Los cuadros representan: PDX1 (morado);Maf-A (dorado). La imagen fue creada utilizando Servier Medical Art, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

# WMI

**Conclusión**

## VIII – Conclusión

---

1. Durante la gestación hay una redistribución celular en el páncreas endocrino como respuesta a las necesidades metabólicas que se traduce en: un aumento de células  $\beta$ ; una disminución de las células no- $\beta$ ; y un aumento de células  $\delta$  que expresan PDX1 y Maf-A, factores de transcripción propios de célula  $\beta$ .
2. El estradiol, y no el lactógeno placentario, es el desencadenante de las modificaciones observadas en el páncreas endocrino durante la gestación.
3. El estradiol inhibe la secreción de somatostatina en islotes pancreáticos de roedores y humanos.
4. La disfunción de las células  $\delta$ -pancreáticas bajo el efecto del estradiol, es secundaria a un efecto de la hormona sobre las células  $\beta$ -pancreáticas, en las que inhibe la transcripción de los genes que codifican UCN3 y dinorfina, que tienen efectos paracrinos estimuladores sobre las células  $\delta$ .
5. La disfunción de las células  $\delta$ -pancreáticas bajo el efecto del estradiol, está relacionada con procesos de desdiferenciación, en los que las células  $\delta$  regresan a un estado intermedio  $\beta/\delta$ , y actúa como una célula bihormonal expresando factores de transcripción propios de las células  $\beta$ -pancreáticas.

**Apéndice**

**IX**

## X – Apéndice

### 1 – Lista de tablas

Variables	Ratones	Ratas
Especie	Mus musculus	Rattus norvegicus
Cepa	C57BL/6J	Wistar
Edad	8 semanas	8 semanas
Modelo <i>ex vivo</i>	70 animales	20 animales
Modelo <i>in vivo</i>	10 animales	
- Preñadas	5	
- Controles	5	

**Tabla 1. Características basales de los modelos murinos.** Las muestras de tejido pancreático fueron obtenidas a través de protocolos de extracción específicos para cada una de las especies.

ID	Sexo	Edad (años)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Causa de Muerte
Hm97	Hombre	37	26	Ruptura de aneurisma cerebral
Hm98	Mujer	73	23	Anoxia por ahogamiento
Hm102	Hombre	70	24,7	Muerte vascular
Hm121	Mujer	70	21	Muerte encefálica

**Tabla 2. Características biométricas de los donantes.** Las muestras de tejido pancreático fueron obtenidas a través de necropsias realizadas a 5 donantes fallecidos por causa no pancreática. Hm: humano, ID: Identificación, IMC: índice de masa corporal.

<b>PÁNCREAS DE RATÓN</b>		
	<b>Desenmascaramiento</b>	<b>Solución de bloqueo</b>
<b>Insulina, glucagón, somatostatina y UCN3</b>	Citrato sódico pH 6; 30 minutos a 100°C	Bloqueo con PBS 1X + BSA 1% (v/v) + Suero NGS 2% (v/v); 1 hora.
<b>PDX1</b>		Bloqueo PBS 1X + Tween 0,2% (v/v, PBST) + FBS 3% (v/v); 1 hora.
<b>Maf-A</b>		-Bloqueo con PBS 1X + Tritón® x-100 1% (v/v); 20 minutos. -Bloqueo con PBS 1X + BSA 3% (v/v) + NGS 5% (v/v); 1 hora.
<b>Dinorfina (Proencefalina B)</b>		-Bloxall™ (Vectorlab, Newark, CA, EE. UU.); 10 minutos -Bloqueo PBS 1X + BSA 1% (v/v) + NGS 2% (v/v)

**Tabla 3. Protocolos de inmunofluorescencia usados para los páncreas de ratón.**

<b>ISLOTES DE RATA</b>		
	<b>Desenmascaramiento</b>	<b>Solución de bloqueo</b>
<b>Insulina, glucagón y somatostatina</b>	Citrato sódico pH 6; 30 minutos a 100°C	Bloqueo con PBS 1X + BSA 1% (v/v) + Suero NGS 2% (v/v); 1 hora.
<b>PDX1</b>	Tris-HCL pH 10, T6455 (Sigma-Aldrich Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.); 10 minutos a 100°C.	Bloqueo con PBS 1X + BSA 1% (v/v) + Suero NGS 2% (v/v) + Tritón® x-100 1% (v/v); 1 hora.
<b>Maf-A</b>		

**Tabla 4. Protocolos de inmunofluorescencia usados para los islotes de rata.**

ISLOTES DE HUMANOS		
	Desenmascaramiento	Solución de bloqueo
Insulina, glucagón y somatostatina	EDTA pH 8,5, E1161 (Sigma-Aldrich Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.); 10 minutos a 100°C.	Bloqueo con PBS 1X + BSA 1% (v/v) + Suero NGS 2% (v/v); 1 hora.
PDX1		-Bloqueo con PBS 1X; 20 minutos.
Maf-A		-Bloqueo con PBS 1X + BSA 3% (v/v)+ NGS 5% (v/v)+ Tritón® x-100 1% (v/v); 1 hora.

**Tabla 5. Protocolos de inmunofluorescencia usados para los islotes de humano.**

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia
Insulina	Ratón	1/250	I2018 (Sigma-Aldrich Aldrich, EE.UU.)
Glucagón	Conejo	1/1000	AB92517 (Abcam™, GB)
Somatostatina	Rata	1/50	MAB2358 (R&D systems, EE. UU.)
	Ratón	1/100	Ma517182 (Invitrogen, EE. UU.)
UCN3	Conejo	1/1000	Casero #7218 suministrado por Mark Huisig
PDX1	Cobaya	1/200	AB47308 (Abcam™, GB )
Maf-A	Conejo	1/50	NBP1-00121 (Novus biologicals, GB)
Proencefalina B	Ratón	1/500	sc-398808 (Sta Cruz biotech, EE. UU.)

**Tabla 6. Anticuerpos usados para inmunofluorescencia.**

Gen (rata)	Referencia	Primers
Ins1	Rn02121433_g1	
Ins2	Rn01774648_g1	
Sst	Rn00561967_m1	
PDX1	Rn00755591_m1	
Rpl18	Rn00821260_g1	
HHEX	Rn00577750_m1	
Maf-A		R: 5'-TGACCTCCTCCTTGCTGAAG-3' F: 5'-CTCTGCCACCATCACCATC-3'

**Tabla 7. Lista de Taqman™ y SYBR™ Green utilizados para ratas.**

Gen (ratón)	Referencia	Primers
Ins1	Mm01950294_s1	
Ins2	Mm00731595_gH	
Sst	Mm00436671_m1	
PDX1	Mm00435565_m1	
UCN3	Mm00453206_s1	
HHEX	Mm00433954_m1	
Rpl18		R: 5'-AGCCTTGAGGATGCGACTC-3' F: 5'-AAGACTGCCGTGGTTGTGG-3'
Maf-A		R: 5'-GAGGAGGTCATCCGACTGAAA-3' F: 5'-GCACTTCTCGCTCTCCAGAAT-3'
Proencefalina B		R: 5'-CTGACTCACTTGTGGCTGC-3' F: 5'-CGTTGCTGTCAAGATCTGTTGC-3'

**Tabla 8. Lista de Taqman™ y SYBR™ Green utilizados para ratones.**

<b>Proteína</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Referencia</b>
<b>Proencefalina B</b>	Ratón	1/500	sc-398808, Sta Cruz Biotec (EE. UU.)
<b>GAPDH</b>	Ratón	1/40.000	MAB374, Merck (DE)
<b>UCN3</b>	Ratón	1/10.000	Casero #7218, suministrado por Mark Huisin

**Tabla 9. Lista de anticuerpo usados para western blot.**

# **Referencias Bibliográficas**



## IX – Referencias Bibliográficas

---

1. Leung PS. Overview of the Pancreas. En: The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010 [citado 11 de septiembre de 2023]. p. 3-12. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 690). Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-90-481-9060-7\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-90-481-9060-7_1)
2. Sastre J, Sabater L, Aparisi L. Fisiología de la secreción pancreática. Gastroenterol Hepatol. 15 de febrero de 2005;28:3-9.
3. Motta-Ramírez GA, Arteaga JDR, Segura AC, Montañez DM, Aldatz RB. Hallazgos por imagen seccional de variantes congénitas pancreáticas y su correlación clínica. Anales de Radiología México. 2011;10(2):75-83.
4. Arenas M. Aspectos embriológicos y morfológicos del páncreas. Duazary: Revista internacional de Ciencias de la Salud. 2005;2(2):130-4.
5. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. J Histochem Cytochem. septiembre de 2005;53(9):1087-97.
6. Brereton MF, Iberl M, Shimomura K, Zhang Q, Adriaenssens AE, Proks P, et al. Reversible changes in pancreatic islet structure and function produced by elevated blood glucose. Nat Commun. diciembre de 2014;5(1):4639.
7. Rorsman P, Ashcroft FM. Pancreatic  $\beta$ -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. Physiol Rev. 1 de enero de 2018;98(1):117-214.
8. Gao R, Yang T, Zhang Q.  $\delta$ -Cells: The Neighborhood Watch in the Islet Community. Biology (Basel). 21 de enero de 2021;10(2):74.
9. van der Meulen T, Donaldson CJ, Cáceres E, Hunter AE, Cowing-Zitron C, Pound LD, et al. Urocortin3 mediates somatostatin-dependent negative feedback control of insulin secretion. Nat Med. julio de 2015;21(7):769-76.
10. Kaufmann JE, Irminger JC, Halban PA. Sequence requirements for proinsulin processing at the B-chain/C-peptide junction. Biochem J. 15 de septiembre de 1995;310(Pt 3):869-74.

11. Westermeier F, Sáez T, Arroyo P, Toledo F, Gutiérrez J, Sanhueza C, et al. Insulin receptor isoforms: an integrated view focused on gestational diabetes mellitus. *Diabetes Metabolism Res.* mayo de 2016;32(4):350-65.
12. Reyes JAO, Plancarte AA. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Rev Educ Bioquímica.* 2008;27(1):9-18.
13. Lee WH, Najjar SM, Kahn CR, Hinds TD. Hepatic insulin receptor: new views on the mechanisms of liver disease. *Metabolism.* 1 de agosto de 2023;145:155607.
14. Gao R, Acreman S, Ma J, Abdulkader F, Wendt A, Zhang Q.  $\alpha$ -cell electrophysiology and the regulation of glucagon secretion. *Journal of Endocrinology* [Internet]. 1 de agosto de 2023 [citado 11 de septiembre de 2023];258(2). Disponible en: <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/258/2/JOE-22-0295.xml>
15. Kleinert M, Sachs S, Habegger KM, Hofmann SM, Müller TD. Glucagon Regulation of Energy Expenditure. *Int J Mol Sci.* 30 de octubre de 2019;20(21):5407.
16. Brereton MF, Vergari E, Zhang Q, Clark A. Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? *J Histochem Cytochem.* agosto de 2015;63(8):575-91.
17. Huising MO, van der Meulen T, Huang JL, Pourhosseinzadeh MS, Noguchi GM. The Difference  $\delta$ -Cells Make in Glucose Control. *Physiology.* 1 de noviembre de 2018;33(6):403-11.
18. Arrojo e Drigo R, Jacob S, García-Prieto CF, Zheng X, Fukuda M, Nhu HTT, et al. Structural basis for delta cell paracrine regulation in pancreatic islets. *Nat Commun.* diciembre de 2019;10(1):3700.
19. Miranda C, Begum M, Vergari E, Briant LJB. Gap junction coupling and islet delta-cell function in health and disease. *Peptides.* 1 de enero de 2022;147:170704.
20. KRULICH L, DHARIWAL APS, MCCANN SM. Stimulatory and Inhibitory Effects of Purified Hypothalamic Extracts on Growth Hormone Release from Rat Pituitary in Vitro<sup>1</sup>. *Endocrinology.* 1 de octubre de 1968;83(4):783-90.
21. Guillemin R. Somatostatin. The beginnings, 1972. *Mol Cell Endocrinol.* 14 de mayo de 2008;286(1-2):3-4.
22. Barnett P. Somatostatin and Somatostatin Receptor Physiology. *ENDO.* 2003;20(3):255-64.

23. Stoyanova II, Gulubova MV. Immunocytochemical study on the liver innervation in patients with cirrhosis. *Acta Histochemica*. enero de 2000;102(4):391-402.
24. Makowska K. Changes in The Expression of Somatostatin (SOM) in Nerve Fibers of Gastrointestinal Mucosa in Dogs with Inflammatory Bowel Disease (IBD). *Medical Case Reports* [Internet]. 14 de febrero de 2019 [citado 25 de abril de 2023];5(1). Disponible en: <https://medical-case-reports.imedpub.com/abstract/changes-in-the-expression-of-somatostatin-som-in-nerve-fibers-of-gastrointestinal-mucosa-in-dogs-with-inflammatory-bowel-disease-ibd-24061.html>
25. Keast JR, Furness JB, Costa M. Somatostatin in human enteric nerves. Distribution and characterization. *Cell Tissue Res*. 1984;237(2):299-308.
26. Gonkowski S, Rychlik A, Calka J. Somatostatin as an Active Substance of Enteroendocrine Cells in the Canine Digestive Tract in Physiological Conditions and during Inflammatory Bowel Disease. *Eur J Inflamm*. 1 de septiembre de 2013;11(3):655-61.
27. Bosquet C, Castaño JP, Csaba Z, Culler M, Dournaud P, Epelbaum J, et al. Somatostatin receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *GtoPdb CITE* [Internet]. 16 de septiembre de 2019 [citado 29 de agosto de 2022];2019(4). Disponible en: <http://journals.ed.ac.uk/gtopdb-cite/article/view/3213>
28. Cendrós Carreras JM. Estudio farmacocinético de análogos de la somatostatina [Internet]. Universitat de Barcelona; 2006 [citado 18 de julio de 2023]. Disponible en: <https://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/41578>
29. Strowski MZ, Blake AD. Function and expression of somatostatin receptors of the endocrine pancreas. *Molecular and Cellular Endocrinology*. mayo de 2008;286(1-2):169-79.
30. Singh V, Brendel MD, Zacharias S, Mergler S, Jahr H, Wiedenmann B, et al. Characterization of Somatostatin Receptor Subtype-Specific Regulation of Insulin and Glucagon Secretion: An *in Vitro* Study on Isolated Human Pancreatic Islets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1 de febrero de 2007;92(2):673-80.
31. Somatostatin Receptor Subtype 5 Regulates Insulin Secretion and Glucose Homeostasis | *Molecular Endocrinology* | Oxford Academic [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://academic.oup.com/mend/article/17/1/93/2741803>

32. Strowski MZ, Parmar RM, Blake AD, Schaeffer JM. Somatostatin Inhibits Insulin and Glucagon Secretion via Two Receptor Subtypes: An in Vitro Study of Pancreatic Islets from Somatostatin Receptor 2 Knockout Mice\*. *Endocrinology*. 1 de enero de 2000;141(1):111-7.
33. Brunicardi FC, Atiya A, Moldovan S, Lee TC, Fagan SP, Kleinman RM, et al. Activation of somatostatin receptor subtype 2 inhibits insulin secretion in the isolated perfused human pancreas. *Pancreas*. noviembre de 2003;27(4):e84-89.
34. Smith PA. N-Type Ca<sup>2+</sup>-Channels in Murine Pancreatic  $\beta$ -Cells Are Inhibited by an Exclusive Coupling with Somatostatin Receptor Subtype 1. *Endocrinology*. 1 de febrero de 2009;150(2):741-8.
35. Juliana CA, Chai J, Arroyo P, Rico-Bautista E, Betz SF, De León DD. A selective nonpeptide somatostatin receptor 5 agonist effectively decreases insulin secretion in hyperinsulinism. *J Biol Chem*. 11 de mayo de 2023;299(6):104816.
36. Leclair E, Liggins RT, Peckett AJ, Teich T, Coy DH, Vranic M, et al. Glucagon responses to exercise-induced hypoglycaemia are improved by somatostatin receptor type 2 antagonism in a rat model of diabetes. *Diabetologia*. 1 de agosto de 2016;59(8):1724-31.
37. Adamson SE, Li ZA, Hughes JW. Beta cell primary cilia mediate somatostatin responsiveness via SSTR3. *Islets*. 15(1):2252855.
38. Kumar U, Sasi R, Suresh S, Patel A, Thangaraju M, Metrakos P, et al. Subtype-selective expression of the five somatostatin receptors (hSSTR1-5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis. *Diabetes*. enero de 1999;48(1):77-85.
39. Raulf F, Pérez J, Hoyer D, Bruns C. Differential Expression of Five Somatostatin Receptor Subtypes, SSTR1-5, in the CNS and Peripheral Tissue. *Digestion*. 1994;55(3):46-53.
40. DiGruccio MR, Mawla AM, Donaldson CJ, Noguchi GM, Vaughan J, Cowing-Zitron C, et al. Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. *Molecular Metabolism*. 1 de julio de 2016;5(7):449-58.
41. Yang H, Yang L. Targeting cAMP/PKA pathway for glycemic control and type 2 diabetes therapy. *Journal of Molecular Endocrinology*. agosto de 2016;57(2):R93-108.

42. Smith PA, Sellers LA, Humphrey PPA. Somatostatin activates two types of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in MIN-6 cells. *J Physiol*. 1 de abril de 2001;532(Pt 1):127-42.
43. Jiang N, Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M. Somatostatin directly inhibits substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal dorsal horn in vitro. *Neuroscience Research*. 1 de septiembre de 2003;47(1):97-107.
44. de Weille JR, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M. Regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in insulinoma cells: activation by somatostatin and protein kinase C and the role of cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. abril de 1989;86(8):2971-5.
45. Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. Regulation and function of somatostatin receptors. *Journal of Neurochemistry*. 2004;89(5):1057-91.
46. Sakanaka C, Ferby I, Waga I, Bito H, Shimizu T. On the Mechanism of Cytosolic Phospholipase A2 Activation in CHO Cells Carrying Somatostatin Receptor: Wortmannin-Sensitive Pathway to Activate Mitogen-Activated Protein Kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 30 de noviembre de 1994;205(1):18-23.
47. Bito H, Mori M, Sakanaka C, Takano T, Honda Z, Gotoh Y, et al. Functional coupling of SSTR4, a major hippocampal somatostatin receptor, to adenylate cyclase inhibition, arachidonate release and activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Journal of Biological Chemistry*. 29 de abril de 1994;269(17):12722-30.
48. Dickerson MT, Dadi PK, Zaborska KE, Nakhe AY, Schaub CM, Dobson JR, et al. Gi/o protein-coupled receptor inhibition of beta-cell electrical excitability and insulin secretion depends on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activation. *Nat Commun*. 29 de octubre de 2022;13(1):6461.
49. Zamponi GW, Currie KPM. Regulation of CaV2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta*. julio de 2013;1828(7):1629-43.
50. Gromada J, Høy M, Buschard K, Salehi A, Rorsman P. Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic  $\alpha$ -cells by Gi2-dependent activation of calcineurin and depriving of secretory granules. *J Physiol*. 1 de septiembre de 2001;535(Pt 2):519-32.
51. Redecker P, Cetin Y. Rodent pancreatic islet cells contain the calcium-binding proteins calcineurin and calretinin. *Histochemistry and Cell Biology*. 4 de agosto de 1997;108(2):133-9.

52. Madsen K, Friis UG, Gooch JL, Hansen PB, Holmgaard L, Skøtt O, et al. Inhibition of calcineurin phosphatase promotes exocytosis of renin from juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* enero de 2010;77(2):110-7.
53. Castillo Bennett J, Roggero CM, Mancifesta FE, Mayorga LS. Calcineurin-mediated Dephosphorylation of Synaptotagmin VI Is Necessary for Acrosomal Exocytosis\*. *Journal of Biological Chemistry.* 20 de agosto de 2010;285(34):26269-78.
54. Theodoropoulou M, Stalla GK. Somatostatin receptors: From signaling to clinical practice. *Frontiers in Neuroendocrinology.* agosto de 2013;34(3):228-52.
55. Kailey B, van de Bunt M, Cheley S, Johnson PR, MacDonald PE, Gloyn AL, et al. SSTR2 is the functionally dominant somatostatin receptor in human pancreatic  $\beta$ - and  $\alpha$ -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1 de noviembre de 2012;303(9):E1107-1116.
56. Rai U, Thrimawithana TR, Valery C, Young SA. Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: Current view and potential applications. *Pharmacology & Therapeutics.* 1 de agosto de 2015;152:98-110.
57. Periferakis A, Tsigas G, Periferakis AT, Badarau IA, Scheau AE, Tampa M, et al. Antitumoral and Anti-inflammatory Roles of Somatostatin and Its Analogs in Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst).* 27 de noviembre de 2021;2021:1840069.
58. Rodríguez-Álvarez FJ, Jiménez-Mora E, Caballero M, Gallego B, Chiloeches A, Toro MJ. Somatostatin activates Ras and ERK1/2 via a G protein  $\beta\gamma$ -subunit-initiated pathway in thyroid cells. *Mol Cell Biochem.* enero de 2016;411(1-2):253-60.
59. War SA, Kumar U. Coexpression of human somatostatin receptor-2 (SSTR2) and SSTR3 modulates antiproliferative signaling and apoptosis. *Journal of Molecular Signaling.* 2012;7:5.
60. Hasskarl J, Kaufmann M, Schmid HA. Somatostatin receptors in non-neuroendocrine malignancies: the potential role of somatostatin analogs in solid tumors. *Future Oncology.* julio de 2011;7(7):895-913.
61. Ganz MB, Pachter JA, Barber DL. Multiple receptors coupled to adenylate cyclase regulate Na-H exchange independent of cAMP. *J Biol Chem.* 5 de junio de 1990;265(16):8989-92.

62. Li N, Yang Z, Li Q, Yu Z, Chen X, Li JC, et al. Ablation of somatostatin cells leads to impaired pancreatic islet function and neonatal death in rodents. *Cell Death Dis.* 7 de junio de 2018;9(6):682.
63. Dominguez Gutierrez G, Kim J, Lee AH, Tong J, Niu J, Gray SM, et al. Gene Signature of the Human Pancreatic  $\epsilon$  Cell. *Endocrinology.* 30 de octubre de 2018;159(12):4023-32.
64. Sakata N, Yoshimatsu G, Kodama S. Development and Characteristics of Pancreatic Epsilon Cells. *Int J Mol Sci.* 16 de abril de 2019;20(8):1867.
65. Saito D, Nakagawa Y, Sato T, Fukunaka A, Pereye OB, Maruyama N, et al. Establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay for mouse pancreatic polypeptide clarifies the regulatory mechanism of its secretion from pancreatic  $\gamma$  cells. *PLoS One.* 17 de agosto de 2022;17(8):e0269958.
66. Kim W, Fiori JL, Shin YK, Okun E, Kim JS, Rapp PR, et al. Pancreatic Polypeptide Inhibits Somatostatin Secretion. *FEBS Lett.* 25 de agosto de 2014;588(17):3233-9.
67. Zhu W, Tanday N, Flatt PR, Irwin N. Pancreatic polypeptide revisited: Potential therapeutic effects in obesity-diabetes. *Peptides.* 1 de febrero de 2023;160:170923.
68. Pedragosa Badia X, Stichel J, Beck-Sickinger A. Neuropeptide Y receptors: how to get subtype selectivity. *Frontiers in Endocrinology [Internet].* 2013 [citado 21 de diciembre de 2023];4. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2013.00005>
69. Boel E, Schwartz TW, Norris KE, Fiil NP. A cDNA encoding a small common precursor for human pancreatic polypeptide and pancreatic icosapeptide. *EMBO J.* abril de 1984;3(4):909-12.
70. Berger C, Zdziebło D. Glucose transporters in pancreatic islets. *Pflugers Arch.* 2020;472(9):1249-72.
71. Ampofo E, Nalbach L, Menger MD, Laschke MW. Regulatory Mechanisms of Somatostatin Expression. *International Journal of Molecular Sciences.* enero de 2020;21(11):4170.
72. Montminy M, Brindle P, Arias J, Ferreri K, Armstrong R. Regulation of somatostatin gene transcription by cAMP. *Ciba Found Symp.* 1995;190:7-20; discussion 20-25.

73. Li Q, Cui M, Yang F, Li N, Jiang B, Yu Z, et al. A cullin 4B-RING E3 ligase complex fine-tunes pancreatic  $\delta$  cell paracrine interactions. *J Clin Invest*. 30 de junio de 2017;127(7):2631-46.
74. Koop H, Arnold R. Serotonergic control of somatostatin and gastrin release from the isolated rat stomach. *Regul Pept*. septiembre de 1984;9(1-2):101-8.
75. Movahed M, Louzada RA, Blandino-Rosano M. Enhanced dynorphin expression and secretion in pancreatic beta-cells under hyperglycemic conditions. *Molecular Metabolism*. 1 de febrero de 2025;92:102088.
76. 197-OR: Dynorphin, a Novel Paracrine Factor That Regulates Insulin Secretion | Diabetes | American Diabetes Association [Internet]. [citado 18 de octubre de 2023]. Disponible en: [https://diabetesjournals.org/diabetes/article/72/Supplement\\_1/197-OR/149792/197-OR-Dynorphin-a-Novel-Paracrine-Factor-That](https://diabetesjournals.org/diabetes/article/72/Supplement_1/197-OR/149792/197-OR-Dynorphin-a-Novel-Paracrine-Factor-That)
77. Josefsen K, Buschard K, Sørensen LR, Wøllike M, Ekman R, Birkenbach M. Glucose stimulation of pancreatic beta-cell lines induces expression and secretion of dynorphin. *Endocrinology*. octubre de 1998;139(10):4329-36.
78. Ahrén B. Effects of beta-endorphin, met-enkephalin, and dynorphin A on basal and stimulated insulin secretion in the mouse. *Int J Pancreatol*. septiembre de 1989;5(2):165-78.
79. Cetin Y. Immunohistochemistry of beta-neoendorphin and dynorphin in the endocrine pancreas of rat and man. *Histochemistry*. 1985;83(4):369-73.
80. Jacobson DA, Cho J, Landa LR, Tamarina NA, Roe MW, Buxbaum JD, et al. Downstream regulatory element antagonistic modulator regulates islet prodynorphin expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. septiembre de 2006;291(3):E587-595.
81. Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, Das PK, Yin Y, Albu M, et al. The Human Transcription Factors. *Cell*. febrero de 2018;172(4):650-65.
82. Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol*. diciembre de 1997;29(12):1305-12.
83. Holland AM, Hale MA, Kagami H, Hammer RE, MacDonald RJ. Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 17 de septiembre de 2002;99(19):12236-41.

84. Vinogradova TV, Sverdlov ED. PDX1: A unique pancreatic master regulator constantly changes its functions during embryonic development and progression of pancreatic cancer. *Biochemistry Moscow*. agosto de 2017;82(8):887-93.
85. McKinnon CM, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia*. 1 de octubre de 2001;44(10):1203-14.
86. Dassaye R, Naidoo S, Cerf ME. Transcription factor regulation of pancreatic organogenesis, differentiation and maturation. *Islets*. 24 de septiembre de 2015;8(1):13-34.
87. Zhang J, McKenna LB, Bogue CW, Kaestner KH. The diabetes gene *Hhex* maintains  $\delta$ -cell differentiation and islet function. *Genes Dev*. 15 de abril de 2014;28(8):829-34.
88. Lenz A, Lenz G, Ku HT, Ferreri K, Kandeel F. Islets from human donors with higher but not lower hemoglobin A1c levels respond to gastrin treatment in vitro. *PLoS One*. 20 de agosto de 2019;14(8):e0221456.
89. The Role of ARX in Human Pancreatic Endocrine Specification. *PLOS ONE*. 3 de diciembre de 2015;10(12):e0144100.
90. Simpson MT, Venkatesh I, Callif BL, Thiel LK, Coley DM, Winsor KN, et al. The tumor suppressor HHEX inhibits axon growth when prematurely expressed in developing central nervous system neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 1 de septiembre de 2015;68:272-83.
91. Panzer J. Delta cell reprogramming during mouse pregnancy. (2019) Publicly Accessible Tud Qucosa <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:14-qucosa2-337230>
92. Honzawa N, Fujimoto K. The Plasticity of Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Metabolites*. 2 de abril de 2021;11(4):218.
93. Basile G, Kulkarni RN, Morgan NG. How, When, and Where Do Human  $\beta$ -Cells Regenerate? *Curr Diab Rep*. 27 de junio de 2019;19(8):48.
94. Hudish LI, Reusch JEB, Sussel L.  $\beta$  Cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 129(10):4001-8.
95. Villalba A, Gitton Y, Aiello V, Toupin M, Mazaud-Guittot S, Chédotal A, et al. Imaging human pancreatic endocrinogenesis during early prenatal life. *Diabetes*. 27 de noviembre de 2024;db240641.

96. Hill TG, Hill DJ. The Importance of Intra-Islet Communication in the Function and Plasticity of the Islets of Langerhans during Health and Diabetes. *Int J Mol Sci.* 6 de abril de 2024;25(7):4070.
97. Lee MYY, Guessoum O, El-Mekoussi H, Conery M, Manduchi E, Schug J, et al. Single-cell multiome analysis supports  $\alpha$ -to- $\beta$  transdifferentiation in human pancreas [Internet]. *bioRxiv*; 2025 [citado 25 de febrero de 2025]. p. 2025.02.14.638309. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2025.02.14.638309v1>
98. Chera S, Baronnier D, Ghila L, Cigliola V, Jensen JN, Gu G, et al. Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic  $\delta$ -cells into insulin producers. *Nature.* octubre de 2014;514(7523):503-7.
99. Druelle N, Vieira A, Shabro A, Courtney M, Mondin M, Rekima S, et al. Ectopic expression of Pax4 in pancreatic  $\delta$  cells results in  $\beta$ -like cell neogenesis. *J Cell Biol.* 4 de diciembre de 2017;216(12):4299-311.
100. Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. Pancreatic  $\beta$  Cell Dedifferentiation as a Mechanism of Diabetic  $\beta$  Cell Failure. *Cell.* septiembre de 2012;150(6):1223-34.
101. Schaffer AE, Taylor BL, Benthuisen JR, Liu J, Thorel F, Yuan W, et al. Nkx6.1 Controls a Gene Regulatory Network Required for Establishing and Maintaining Pancreatic Beta Cell Identity. *PLoS Genet.* 31 de enero de 2013;9(1):e1003274.
102. Ben-Othman N, Vieira A, Courtney M, Record F, Gjernes E, Avolio F, et al. Long-Term GABA Administration Induces Alpha Cell-Mediated Beta-like Cell Neogenesis. *Cell.* enero de 2017;168(1-2):73-85.e11.
103. Li J, Casteels T, Frogne T, Ingvorsen C, Honoré C, Courtney M, et al. Artemisinin Target GABAA Receptor Signaling and Impair  $\alpha$  Cell Identity. *Cell.* 12 de enero de 2017;168(1-2):86-100.e15.
104. Piran R, Lee SH, Li CR, Charbono A, Bradley LM, Levine F. Pharmacological induction of pancreatic islet cell transdifferentiation: relevance to type I diabetes. *Cell Death Dis.* julio de 2014;5(7):e1357-e1357.
105. Briant LJB, Reinbothe TM, Spiliotis I, Miranda C, Rodriguez B, Rorsman P.  $\delta$ -cells and  $\beta$ -cells are electrically coupled and regulate  $\alpha$ -cell activity via somatostatin. *J Physiol.* 15 de enero de 2018;596(2):197-215.
106. Swisa A, Avrahami D, Eden N, Zhang J, Feleke E, Dahan T, et al. PAX6 maintains  $\beta$  cell identity by repressing genes of alternative islet cell types. *J Clin Invest.* 127(1):230-43.

107. Diedisheim M, Oshima M, Albagli O, Huldt CW, Ahlstedt I, Clausen M, et al. Modeling human pancreatic beta cell dedifferentiation. *Mol Metab.* 8 de febrero de 2018;10:74-86.
108. Taylor BL, Liu FF, Sander M. Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. *Cell Rep.* 26 de septiembre de 2013;4(6):1262-75.
109. Plesner A, ten Holder JT, Verchere CB. Islet Remodeling in Female Mice with Spontaneous Autoimmune and Streptozotocin-Induced Diabetes. Fiorina P, editor. *PLoS ONE.* 7 de agosto de 2014;9(8):e102843.
110. Alán L, Olejár T, Cahová M, Zelenka J, Berková Z, Smětáková M, et al. Delta Cell Hyperplasia in Adult Goto-Kakizaki (GK/MoITac) Diabetic Rats. *Journal of Diabetes Research.* 2015;2015:1-16.
111. Gallego FQ, Sinzato YK, Miranda CA, Iessi IL, Dallaqua B, Volpato GT, et al. Pancreatic islet response to diabetes during pregnancy in rats. *Life Sciences.* 1 de diciembre de 2018;214:1-10.
112. Yoneda S, Uno S, Iwahashi H, Fujita Y, Yoshikawa A, Kozawa J, et al. Predominance of  $\beta$ -Cell Neogenesis Rather Than Replication in Humans With an Impaired Glucose Tolerance and Newly Diagnosed Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1 de mayo de 2013;98(5):2053-61.
113. Cinti F, Bouchi R, Kim-Muller JY, Ohmura Y, Sandoval PR, Masini M, et al. Evidence of  $\beta$ -Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* marzo de 2016;101(3):1044-54.
114. Diabetes [Internet]. [citado 6 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/diabetes>
115. Home, Resources, diabetes L with, Acknowledgement, FAQs, Contact, et al. IDF Diabetes Atlas | Tenth Edition [Internet]. [citado 12 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://diabetesatlas.org/>
116. Gregory GA, Robinson TIG, Linklater SE, Wang F, Colagiuri S, de Beaufort C, et al. Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* octubre de 2022;10(10):741-60.
117. Wang H, Li N, Chivese T, Werfalli M, Sun H, Yuen L, et al. IDF Diabetes Atlas: Estimation of Global and Regional Gestational Diabetes Mellitus Prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group's Criteria. *Diabetes Research and Clinical Practice* [Internet]. 1 de enero de 2022 [citado 6 de diciembre de 2023];183. Disponible en:

[https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227\(21\)00409-5/fulltext](https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(21)00409-5/fulltext)

118. Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest.* 3 de enero de 2012;122(1):4-12.
119. Kothegala L, Miranda C, Singh M, Krieger JP, Gandasi NR. Somatostatin Containing  $\delta$ -Cell Number Is Reduced in Type-2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences.* enero de 2023;24(4):3449.
120. Folli F, La Rosa S, Finzi G, Davalli AM, Galli A, Dick EJ, et al. Pancreatic islet of Langerhans' cytoarchitecture and ultrastructure in normal glucose tolerance and in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab.* septiembre de 2018;20:137-44.
121. Riahi Y, Kogot-Levin A, Kadosh L, Agranovich B, Malka A, Assa M, et al. Hyperglucagonaemia in diabetes: altered amino acid metabolism triggers mTORC1 activation, which drives glucagon production. *Diabetologia.* octubre de 2023;66(10):1925-42.
122. Braun M. The Somatostatin Receptor in Human Pancreatic  $\beta$ -Cells. En: *Vitamins & Hormones* [Internet]. Elsevier; 2014 [citado 27 de agosto de 2022]. p. 165-93. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128001745000077>
123. Arneth B, Arneth R, Shams M. Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci.* 18 de mayo de 2019;20(10):2467.
124. Guasch-Ferré M, Hruby A, Toledo E, Clish CB, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, et al. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care.* 14 de abril de 2016;39(5):833-46.
125. Morze J, Wittenbecher C, Schwingshackl L, Danielewicz A, Rynkiewicz A, Hu FB, et al. Metabolomics and Type 2 Diabetes Risk: An Updated Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. *Diabetes Care.* 1 de abril de 2022;45(4):1013-24.
126. Gar C, Rottenkolber M, Prehn C, Adamski J, Seissler J, Lechner A. Serum and plasma amino acids as markers of prediabetes, insulin resistance, and incident diabetes. *Crit Rev Clin Lab Sci.* enero de 2018;55(1):21-32.
127. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, et al. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care.* enero de 2023;46(Suppl 1):S19-40.

128. Redondo MJ, Steck AK, Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. mayo de 2018;19(3):346-53.
129. Noble JA. Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*. 1 de noviembre de 2015;64:101-12.
130. Primavera M, Giannini C, Chiarelli F. Prediction and Prevention of Type 1 Diabetes. *Frontiers in Endocrinology* [Internet]. 2020 [citado 7 de octubre de 2023];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2020.00248>
131. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 1 de enero de 2008;41(1):11-8.
132. Immunomodulating Therapies in Type 1 Diabetes | Johns Hopkins Diabetes Guide [Internet]. [citado 7 de octubre de 2023]. Disponible en: [https://www.hopkinsguides.com/hopkins/view/Johns\\_Hopkins\\_Diabetes\\_Guide/547160/all/Immunomodulating\\_Therapies\\_in\\_Type\\_1\\_Diabetes?refer=true](https://www.hopkinsguides.com/hopkins/view/Johns_Hopkins_Diabetes_Guide/547160/all/Immunomodulating_Therapies_in_Type_1_Diabetes?refer=true)
133. EZNT8 - Overview: Zinc Transporter 8 (ZnT8) Antibody, Serum [Internet]. [citado 7 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/overview/64926>
134. Type 1 Symptoms | ADA [Internet]. [citado 6 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://diabetes.org/about-diabetes/type-1>
135. Ali O. Genetics of type 2 diabetes. *World J Diabetes*. 15 de agosto de 2013;4(4):114-23.
136. Tinajero MG, Malik VS. An Update on the Epidemiology of Type 2 Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. septiembre de 2021;50(3):337-55.
137. Zhou Z, Sun B, Yu D, Zhu C. Gut Microbiota: An Important Player in Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Cell Infect Microbiol*. 15 de febrero de 2022;12:834485.
138. Beulens JWJ, Pinho MGM, Abreu TC, den Braver NR, Lam TM, Huss A, et al. Environmental risk factors of type 2 diabetes—an exposome approach. *Diabetologia*. 1 de febrero de 2022;65(2):263-74.
139. Sulfonylureas and meglitinides in the treatment of type 2 diabetes mellitus - UpToDate [Internet]. [citado 10 de enero de 2024]. Disponible en: <https://uptodate.publicaciones.saludcastillayleon.es/contents/sulfonylureas-and-meglitinides-in-the-treatment-of-type-2-diabetes->

mellitus?search=sulfunilureas&anchor=H4067348528&language=en-US&source=preview#H4067348528

140. Lv W, Wang X, Xu Q, Lu W. Mechanisms and Characteristics of Sulfonylureas and Glinides. CTMC. 22 de enero de 2020;20(1):37-56.
141. Metiglinide Analogues. En: LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012 [citado 15 de enero de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548161/>
142. Mata Cases M. Metformina y diabetes mellitus tipo 2. Aten Primaria. 1 de marzo de 2008;40(3):147-53.
143. Flory J, Lipska K. Metformin in 2019. JAMA. 21 de mayo de 2019;321(19):1926-7.
144. Foretz M, Guigas B, Viollet B. Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential. Nat Rev Endocrinol. 2 de mayo de 2023;1-17.
145. Sanabria HD, Lavallo Cobo A, Sanabria HD, Lavallo Cobo A. Metformina: ¿Debería ser la primera opción terapéutica en el paciente con diabetes de alto riesgo? Revista argentina de cardiología. marzo de 2021;89(1):59-66.
146. Marathe CS, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M. Relationships Between Gastric Emptying, Postprandial Glycemia, and Incretin Hormones. Diabetes Care. mayo de 2013;36(5):1396-405.
147. Australian Journal of General Practice [Internet]. [citado 10 de enero de 2024]. GLP1RA therapy in type 2 diabetes. Disponible en: <https://www1.racgp.org.au/ajgp/2022/july/glp1ra-therapy-in-type-2-diabetes>
148. Shaefer CF, Kushner P, Aguilar R. User's guide to mechanism of action and clinical use of GLP-1 receptor agonists. Postgraduate Medicine. 6 de noviembre de 2015;127(8):818-26.
149. Nauck MA, Quast DR, Wefers J, Meier JJ. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes – state-of-the-art. Mol Metab. 14 de octubre de 2020;46:101102.
150. Gilbert MP, Pratley RE. GLP-1 Analogs and DPP-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Therapy: Review of Head-to-Head Clinical Trials. Front Endocrinol (Lausanne). 3 de abril de 2020;11:178.

151. Nanjan MJ, Mohammed M, Prashantha Kumar BR, Chandrasekar MJN. Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. *Bioorganic Chemistry*. 1 de abril de 2018;77:548-67.
152. Long N, Le Gresley A, Wren SP. Thiazolidinediones: An In-Depth Study of Their Synthesis and Application to Medicinal Chemistry in the Treatment of Diabetes Mellitus. *ChemMedChem*. 7 de junio de 2021;16(11):1717-36.
153. Research C for DE and. FDA Drug Safety Communication: Updated FDA review concludes that use of type 2 diabetes medicine pioglitazone may be linked to an increased risk of bladder cancer. FDA [Internet]. 2 de septiembre de 2019 [citado 26 de enero de 2024]; Disponible en: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-updated-fda-review-concludes-use-type-2-diabetes-medicine-pioglitazone>
154. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios [Internet]. 2020 [citado 26 de enero de 2024]. Pioglitazona: resultados de la evaluación europea sobre su posible asociación con el cáncer de vejiga. Disponible en: [https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumanos-3/seguridad-1/2011/ni-muh\\_13-2011/](https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumanos-3/seguridad-1/2011/ni-muh_13-2011/)
155. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios [Internet]. 2023 [citado 26 de enero de 2024]. Nota informativa de la AEMPS sobre rosiglitazona (Avandia®, Avaglim®, Avandamet®): suspensión de comercialización. Disponible en: [https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumanos-3/seguridad-1/2010/ni\\_2010-12\\_rosiglitazona/](https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumanos-3/seguridad-1/2010/ni_2010-12_rosiglitazona/)
156. Pérez López G, González Albarrán O, Cano Megías M. Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2): de la glucosuria renal familiar al tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Nefrología*. 1 de noviembre de 2010;30(6):618-25.
157. Fonseca-Correa JI, Correa-Rotter R. Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors Mechanisms of Action: A Review. *Front Med (Lausanne)*. 20 de diciembre de 2021;8:777861.
158. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 26 de octubre de 2018;19(11):3342.
159. Baz B, Riveline JP, Gautier JF. ENDOCRINOLOGY OF PREGNANCY: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects. *European Journal of Endocrinology*. febrero de 2016;174(2):R43-51.

160. Catalano PM. Obesity, Insulin Resistance and Pregnancy Outcome. *Reproduction* (Cambridge, England). septiembre de 2010;140(3):365.
161. Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR, Calles J, Roman NM, Amini SB, et al. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1 de enero de 1993;264(1):E60-7.
162. Ryan EA, Enns L. Role of Gestational Hormones in the Induction of Insulin Resistance\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. agosto de 1988;67(2):341-7.
163. Ellerbrock J, Spaanderman B, van Dronghelen J, Mulder E, Lopes van Balen V, Schiffer V, et al. Role of Beta Cell Function and Insulin Resistance in the Development of Gestational Diabetes Mellitus. *Nutrients*. 13 de junio de 2022;14(12):2444.
164. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, et al. 15. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care*. 12 de diciembre de 2022;46(Supplement\_1):S254-66.
165. de Ginecología SE, Embarazo GE de D y. Diabetes mellitus y embarazo. *Guía de práctica clínica actualizada 2021. Progresos de Obstetricia y Ginecología*. 2022;65(1):35-41.
166. Calle M de la. Efectos de la diabetes gestacional sobre la madre y el niño [Internet]. *Revista Diabetes*. 2022 [citado 29 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.revistadiabetes.org/tratamiento/gestacional/efectos-de-la-diabetes-gestacional-sobre-la-madre-y-el-nino/>
167. Salvía MD, Alvarez E, Cerqueira MJ. \*Servicio Neonatología. Institut Clínic de Ginecología, Obstetrícia y Neonatologia. Hospital Clínic. Barcelona. \*\*Servicio Obstetricia Hospitals Vall d'Hebron.
168. Johns EC, Denison FC, Norman JE, Reynolds RM. Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. noviembre de 2018;29(11):743-54.
169. Hoffman LS, Fox TJ, Anastasopoulou C, Jialal I. Maturity Onset Diabetes in the Young. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 29 de enero de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532900/>

170. Rickels LG and MR. Pancreatogenic (Type 3c) Diabetes. Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base [Internet]. 1 de septiembre de 2015 [citado 29 de enero de 2024]; Disponible en: <https://pancreapedia.org/reviews/pancreatogenic-type-3c-diabetes>
171. Hart PA, Bellin MD, Andersen DK, Bradley D, Cruz-Monserrate Z, Forsmark CE, et al. Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. noviembre de 2016;1(3):226-37.
172. Gallo M, Ruggeri RM, Muscogiuri G, Pizza G, Faggiano A, Colao A. Diabetes and pancreatic neuroendocrine tumours: Which interplays, if any? *Cancer Treatment Reviews*. junio de 2018;67:1-9.
173. Popoviciu MS, Paduraru L, Nutas RM, Ujoc AM, Yahya G, Metwally K, et al. Diabetes Mellitus Secondary to Endocrine Diseases: An Update of Diagnostic and Treatment Particularities. *Int J Mol Sci*. 11 de agosto de 2023;24(16):12676.
174. Lee SH, Park SY, Choi CS. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes Metab J*. enero de 2022;46(1):15-37.
175. Guo S. Insulin Signaling, Resistance, and the Metabolic Syndrome: Insights from Mouse Models to Disease Mechanisms. *J Endocrinol*. febrero de 2014;220(2):T1-23.
176. Chen G, Liu C, Xue Y, Mao X, Xu K, Liu C. Molecular mechanism of pancreatic  $\beta$ -cell adaptive proliferation: studies during pregnancy in rats and in vitro. *Endocr*. 1 de abril de 2011;39(2):118-27.
177. Khalid M, Alkaabi J, Khan MAB, Adem A. Insulin Signal Transduction Perturbations in Insulin Resistance. *Int J Mol Sci*. 10 de agosto de 2021;22(16):8590.
178. Inaishi J, Saisho Y. Beta-Cell Mass in Obesity and Type 2 Diabetes, and Its Relation to Pancreas Fat: A Mini-Review. *Nutrients*. 16 de diciembre de 2020;12(12):3846.
179. Choi K, Kim YB. Molecular Mechanism of Insulin Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes. *Korean J Intern Med*. junio de 2010;25(2):119-29.
180. Stožer A, Hojs R, Dolensšek J. Beta Cell Functional Adaptation and Dysfunction in Insulin Resistance and the Role of Chronic Kidney Disease. *Nephron*. 16 de enero de 2019;143(1):33-7.

181. Irlles E, Ñeco P, Lluesma M, Villar-Pazos S, Santos-Silva JC, Vettorazzi JF, et al. Enhanced glucose-induced intracellular signaling promotes insulin hypersecretion: Pancreatic beta-cell functional adaptations in a model of genetic obesity and prediabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 15 de marzo de 2015;404:46-55.
182. Insulin Resistance Is Accompanied by Increased Fasting Glucagon and Delayed Glucagon Suppression in Individuals With Normal and Impaired Glucose Regulation | Diabetes | American Diabetes Association [Internet]. [citado 14 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/65/11/3473/17158/Insulin-Resistance-Is-Accompanied-by-Increased>
183. Sharma A, Varghese RT, Shah M, Man CD, Cobelli C, Rizza RA, et al. Impaired Insulin Action Is Associated With Increased Glucagon Concentrations in Nondiabetic Humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 6 de noviembre de 2017;103(1):314-9.
184. Kumar R, Balhuizen A, Amisten S, Lundquist I, Salehi A. Insulinotropic and antidiabetic effects of 17 $\beta$ -estradiol and the GPR30 agonist G-1 on human pancreatic islets. *Endocrinology*. julio de 2011;152(7):2568-79.
185. Handgraaf S, Dusaulcy R, Visentin F, Philippe J, Gosmain Y. 17- $\beta$  Estradiol regulates proglucagon-derived peptide secretion in mouse and human  $\alpha$ - and L cells. *JCI Insight*. 5 de abril de 2018;3(7):e98569.
186. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Quesada I, Ropero AB. The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 25 de mayo de 2009;304(1-2):63-8.
187. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquié M, Gauthier BR, et al. Pancreatic Insulin Content Regulation by the Estrogen Receptor ER $\alpha$ . *PLoS One*. 30 de abril de 2008;3(4):e2069.
188. Sharma G, Prossnitz ER. Mechanisms of Estradiol-Induced Insulin Secretion by the G Protein-Coupled Estrogen Receptor GPR30/GPER in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Endocrinology*. agosto de 2011;152(8):3030-9.
189. Liebmann M, Asuaje Pfeifer M, Grupe K, Scherneck S. Estradiol (E2) Improves Glucose-Stimulated Insulin Secretion and Stabilizes GDM Progression in a Prediabetic Mouse Model. *Int J Mol Sci*. 15 de junio de 2022;23(12):6693.
190. Tal R, Taylor HS. Endocrinology of Pregnancy. En: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editores. *Endotext*

[Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [citado 29 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278962/>

191. Sibiak R, Jankowski M, Gutaj P, Mozdziak P, Kempisty B, Wender-Ożegowska E. Placental Lactogen as a Marker of Maternal Obesity, Diabetes, and Fetal Growth Abnormalities: Current Knowledge and Clinical Perspectives. *J Clin Med*. 16 de abril de 2020;9(4):1142.
192. Pirchio R, Graziadio C, Colao A, Pivonello R, Auriemma RS. Metabolic effects of prolactin. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 27 de septiembre de 2022;13:1015520.
193. Shrivastava V, Lee M, Lee D, Pretorius M, Radford B, Makkar G, et al. Beta cell adaptation to pregnancy requires prolactin action on both beta and non-beta cells. *Sci Rep*. 14 de mayo de 2021;11:10372.
194. Goyvaerts L, Lemaire K, Arijs I, Auffret J, Granvik M, Van Lommel L, et al. Prolactin Receptors and Placental Lactogen Drive Male Mouse Pancreatic Islets to Pregnancy-Related mRNA Changes. *PLoS One*. 27 de marzo de 2015;10(3):e0121868.
195. Lombardo MF, De Angelis F, Bova L, Bartolini B, Bertuzzi F, Nano R, 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):250-8.
196. Fleenor D, Petryk A, Driscoll P, Freemark M. Constitutive Expression of Placental Lactogen in Pancreatic  $\beta$  Cells: Effects on Cell Morphology, Growth, and Gene Expression. *Pediatr Res*. enero de 2000;47(1):136-136.
197. Rassie K, Giri R, Joham AE, Teede H, Mousa A. Human Placental Lactogen in Relation to Maternal Metabolic Health and Fetal Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 9 de diciembre de 2022;23(24):15621.
198. Catalano PM. Trying to understand gestational diabetes. *Diabet Med*. marzo de 2014;31(3):273-81.
199. Baeyens L, Hindi S, Sorenson RL, German MS.  $\beta$ -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes Obes Metab*. septiembre de 2016;18:63-70.
200. Parsons A, Clark T, Sorenson L. of Islets of Langerhans to Pregnancy: Islet Cell Proliferation and Insulin Secretion with the Onset of Placental Lactogen. :8.
201. Quesada-Candela C, Tudurí E, Marroquí L, Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal Á. Morphological and functional adaptations of pancreatic alpha-cells

- during late pregnancy in the mouse. *Metabolism - Clinical and Experimental* [Internet]. 1 de enero de 2020 [citado 22 de junio de 2021];102. Disponible en: [https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495\(19\)30176-3/abstract](https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495(19)30176-3/abstract)
202. Szlapinski SK, Bennett J, Strutt BJ, Hill DJ. Increased alpha and beta cell mass during mouse pregnancy is not dependent on transdifferentiation. *Exp Biol Med* (Maywood). marzo de 2021;246(5):617-28.
203. Eghlidi DH, Haley GE, Noriega NC, Kohama SG, Urbanski HF. Influence of Age and 17 $\beta$ -Estradiol on Kisspeptin, Neurokinin B, and Prodynorphin Gene Expression in the Arcuate-Median Eminence of Female Rhesus Macaques. *Endocrinology*. agosto de 2010;151(8):3783-94.
204. Wittmann W, Schunk E, Rosskothien I, Gaburro S, Singewald N, Herzog H, et al. Prodynorphin-Derived Peptides Are Critical Modulators of Anxiety and Regulate Neurochemistry and Corticosterone. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. febrero de 2009;34(3):775.
205. McLaughlin JP, Marton-Popovici M, Chavkin C. Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. *J Neurosci*. 2 de julio de 2003;23(13):5674-83.
206. Massaly N, Morón JA, Al-Hasani R. A Trigger for Opioid Misuse: Chronic Pain and Stress Dysregulate the Mesolimbic Pathway and Kappa Opioid System. *Front Neurosci* [Internet]. 7 de noviembre de 2016 [citado 12 de marzo de 2024];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2016.00480/full>
207. 30 years of dynorphins--new insights on their functions in neuropsychiatric diseases - PubMed [Internet]. [citado 12 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19481570/>
208. Preuss UW, Winham SJ, Biernacka JM, Geske JR, Bakalkin G, Koller G, et al. PDYN rs2281285 variant association with drinking to avoid emotional or somatic discomfort. *PLoS One*. 2013;8(11):e78688.
209. Ortega MA, Fraile-Martínez O, García-Montero C, Sáez MA, Álvarez-Mon MA, Torres-Carranza D, et al. The Pivotal Role of the Placenta in Normal and Pathological Pregnancies: A Focus on Preeclampsia, Fetal Growth Restriction, and Maternal Chronic Venous Disease. *Cells*. 6 de febrero de 2022;11(3):568.
210. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 5 de marzo de 2015;370(1663):20140066.

211. Kumar P, Magon N. Hormones in pregnancy. *Niger Med J.* 2012;53(4):179-83.
212. Abdel-Halim SM, Guenifi A, Efendić S, Östenson C -G. Both somatostatin and insulin responses to glucose are impaired in the perfused pancreas of the spontaneously noninsulin-dependent diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats. *Acta Physiologica Scandinavica.* junio de 1993;148(2):219-26.
213. Vergari E, Denwood G, Salehi A, Zhang Q, Adam J, Alrifaiy A, et al. Somatostatin secretion by Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in pancreatic delta cells. *Nat Metab.* enero de 2020;2(1):32-40.
214. Sekido T, Nishio S ichi, Ohkubo Y, Sekido K, Kitahara J, Miyamoto T, et al. Repression of insulin gene transcription by indirect genomic signaling via the estrogen receptor in pancreatic beta cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2019;55(4):226-36.
215. Song L, Xia W, Zhou Z, Li Y, Lin Y, Wei J, et al. Low-level phenolic estrogen pollutants impair islet morphology and  $\beta$ -cell function in isolated rat islets. *Journal of Endocrinology.* noviembre de 2012;215(2):303-11.
216. Owens GL, Lawrence KM, Jackson TR, Crosbie EJ, Sayan BS, Kitchener HC, et al. Urocortin suppresses endometrial cancer cell migration via CRFR2 and its system components are differentially modulated by estrogen. *Cancer Med.* 21 de enero de 2017;6(2):408-15.
217. Haeger P, Andrés ME, Forray MI, Daza C, Araneda S, Gysling K. Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  Differentially Regulate the Transcriptional Activity of the Urocortin Gene. *J Neurosci.* 3 de mayo de 2006;26(18):4908-16.
218. Watanabe K, Nemoto T, Akira S, Takeshita T, Shibasaki T. Estrogens downregulate urocortin 2 expression in rat uterus. *Journal of Endocrinology.* 1 de diciembre de 2013;219(3):269-78.
219. Giamouridis D, Gao P, Lai N, Tan Z, Kim P, Guo T, et al. Effects of Urocortin 2 Versus Urocortin 3 Gene Transfer on Left Ventricular Function and Glucose Disposal. *JACC: Basic to Translational Science.* 1 de abril de 2018;3:249-64.
220. Squillacioti C, Pelagalli A, Liguori G, Mirabella N. Urocortins in the mammalian endocrine system. *Acta Vet Scand.* 4 de octubre de 2019;61:46.
221. Yang JA, Stires H, Belden WJ, Roepke TA. The Arcuate Estrogen-Regulated Transcriptome: Estrogen Response Element–Dependent and –Independent Signaling of ER $\alpha$  in Female Mice. *Endocrinology.* 4 de enero de 2017;158(3):612-26.

222. Yang JA, Mamounis KJ, Yasrebi A, Roepke TA. Regulation of gene expression by 17 $\beta$ -estradiol in the arcuate nucleus of the mouse through ERE-dependent and ERE-independent mechanisms. *Steroids*. marzo de 2016;107:128-38.
223. Gottsch ML, Navarro VM, Zhao Z, Glidewell-Kenney C, Weiss J, Jameson JL, et al. Regulation of Kiss1 and Dynorphin Gene Expression in the Murine Brain by Classical and Nonclassical Estrogen Receptor Pathways. *J Neurosci*. 22 de julio de 2009;29(29):9390-5.
224. Hermansen K. Enkephalins and the Secretion of Pancreatic Somatostatin and Insulin in the Dog: Studies *in Vitro* \*. *Endocrinology*. septiembre de 1983;113(3):1149-54.
225. van Tienhoven R, Kracht MJL, van der Slik AR, Thomaidou S, Wolters AHG, Giepmans BNG, et al. Presence of immunogenic alternatively spliced insulin gene product in human pancreatic delta cells. *Diabetologia*. 2023;66(5):884-96.
226. Chung JY, Ma Y, Zhang D, Bickerton HH, Stokes E, Patel SB, et al. Pancreatic islet cell type-specific transcriptomic changes during pregnancy and postpartum. *iScience*. 21 de abril de 2023;26(4):106439.