



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID  
FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN BIOMEDICINA Y TERAPIAS AVANZADAS



**EFFECTO DEL AMBIENTE HORMONAL GESTACIONAL SOBRE  
LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS**  
*Gestational hormonal environment effect on pancreatic beta-cell function*

Autor/a:

**D<sup>a</sup>. María Llorente Grima**

Tutor/es:

**D<sup>a</sup>. Beatriz Merino Antolín**

**D. Borja Santirso Olivar**

**TÍTULO: Efecto del ambiente hormonal gestacional sobre la función de las células beta-pancreáticas**

**AUTOR/A: María Llorente Grima**

**TUTOR/ES: Beatriz Merino Antolín y Borja Santirso Olivar**

**ÁREA/DEPARTAMENTO: Departamento de Biología celular, Genética, Histología y Farmacología**

---

## **TRIBUNAL**

---

**PRESIDENTE: D<sup>a</sup>. Yolanda Bayón Prieto (Dpto. Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología)**

**SECRETARIO: D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Beatriz Durán Alonso (Dpto. Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología)**

**VOCAL: D<sup>a</sup>. Beatriz Merino Antolín (Dpto. Biología celular, Genética, Histología y Farmacología)**

**SUPLENTE 1: D<sup>a</sup>. Patricia Gallego Muñoz (Dpto. Biología celular, Genética, Histología y Farmacología)**

**SUPLENTE 2: D. Ricardo Usategui Martín (Dpto. Biología celular, Genética, Histología y Farmacología)**

---

---

**FECHA: 27/06/2025**

**CALIFICACIÓN:**

---

## RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico caracterizado por una hiperglicemia crónica. Si dicha hiperglicemia se detecta por primera vez durante el embarazo, hablamos de diabetes mellitus gestacional (DMG). Durante la gestación, para garantizar un correcto aporte de glucosa al feto, tienen lugar múltiples cambios metabólicos en la madre. Principalmente, se produce un aumento de la resistencia a insulina, cuya inadecuada compensación conduce a DMG y, en consecuencia, a un incremento en el riesgo de complicaciones en el embarazo y el feto. Para compensar esta resistencia a insulina, es necesario que el páncreas se adapte con la ayuda de diferentes hormonas materno-placentarias, como la prolactina (PRL), el lactógeno placentario (LP) o los estrógenos y la progesterona. Estas hormonas, entre las que destacan los estrógenos, en particular el  $17\beta$ -estradiol (E2), producen un aumento en la supervivencia de las células beta y en la síntesis y secreción de insulina, manteniendo la homeostasis de la glucosa durante el embarazo sano. Sin embargo, existe un estrógeno, denominado estetrol (E4), que únicamente se sintetiza durante el embarazo, en el hígado fetal y cuya función sobre las células beta-pancreáticas se desconoce. A través de un ensayo de viabilidad celular (MTT) y un ensayo de secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS), mostramos el efecto de un tratamiento con distintas concentraciones de E4 sobre células MIN6. En conjunto, los resultados revelan que E4 aumenta la viabilidad de estas células, así como su función, al favorecer la secreción de insulina en respuesta a glucosa.

### ***Palabras clave***

Diabetes mellitus gestacional, estradiol, estetrol, embarazo, células beta-pancreáticas, insulina.

---

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia. When such hyperglycemia is detected for the first time during pregnancy, it is called gestational diabetes mellitus (GDM). During pregnancy, multiple metabolic changes take place in the mother to ensure an adequate supply of glucose to the fetus. Mainly, there is an increase in insulin resistance, whose inadequate compensation leads to GDM and,

consequently, to an increased risk of complications in pregnancy and the fetus. To compensate for this insulin resistance, it is necessary for the pancreas to adapt helped by different maternal-placental hormones, such as prolactin (PRL), placental lactogen (PL) or estrogens and progesterone. These hormones, among which estrogens, in particular  $17\beta$ -estradiol (E2), produce an increase in beta-cell survival and insulin synthesis and secretion, maintaining glucose homeostasis during healthy pregnancy. However, there is an estrogen, called estetrol (E4), which is only synthesized during pregnancy, in the fetal liver and whose function on beta-pancreatic cells is unknown. Through a cell viability assay (MTT) and a glucose-stimulated insulin secretion assay (GSIS), we show the effect of a treatment with different concentrations of E4 on MIN6 cells. Together, the results reveal that E4 increases the viability of these cells, as well as their function, by promoting insulin secretion in response to glucose.

### **Keywords**

*Gestational diabetes mellitus, pregnancy, estetrol, pancreatic beta-cells, insulin.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora, Bea, por atreverse a dirigir este TFG y por el entusiasmo con el que lo ha afrontado en cada momento. Gracias por ser mi guía en este proceso.

A todos los compañeros del laboratorio, que siempre tienen una sonrisa para ofrecerme. Sobre todo, a ti, Borja, por tratarme como una más desde el primer momento.

A mis padres, por su esfuerzo y dedicación, pero, sobre todo, por confiar en mi incluso cuando yo no lo hacía.

A mis hermanos, que me acompañan siempre en cada paso que doy, aunque estemos lejos. Y, en especial, a ti, Belenchi, por leerte mis borradores, a pesar de que estuviesen “en japonés”, y por ser siempre mi plan favorito.

A Mariela, gracias por enseñarme que no todo es tan importante como parece, y gracias por tus chistes malos; siempre serás mi humorista favorita.

A ti, abuela, por tu bondad, por siempre tener un plato de comida que ofrecerme, por tus despedidas desde la ventana, y por tus abrazos, que curan el alma. Eres la definición de amor, abuela.

Por último, a vosotras chicas, Aitana y Jaleo, por hacer que me sienta siempre como en casa.

## ÍNDICE

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCCIÓN.....                                                                               | 1  |
| Impacto de la diabetes y la diabetes gestacional.....                                           | 1  |
| Regulación de la homeostasis de la glucosa. Adaptaciones metabólicas durante el embarazo.....   | 2  |
| Influencia de las hormonas materno-placentarias en las adaptaciones metabólicas.....            | 4  |
| Papel de los estrógenos en la regulación de la homeostasis de la glucosa materna.....           | 5  |
| Nuevos factores de origen fetal. El estetrol.....                                               | 6  |
| HIPÓTESIS.....                                                                                  | 8  |
| OBJETIVOS.....                                                                                  | 8  |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                      | 9  |
| Cultivo celular - Células MIN6.....                                                             | 9  |
| Siembra de células MIN6 .....                                                                   | 9  |
| Tratamientos celulares con E2 y E4:.....                                                        | 10 |
| Ensayo de viabilidad celular (MTT) .....                                                        | 10 |
| Glucose stimulated insulin secretion (GSIS) – Secreción de insulina estimulada por glucosa..... | 11 |
| Análisis estadístico.....                                                                       | 12 |
| RESULTADOS.....                                                                                 | 13 |
| DISCUSIÓN .....                                                                                 | 16 |
| CONCLUSIONES .....                                                                              | 18 |
| CONCLUSIONS.....                                                                                | 18 |
| REFERENCIAS .....                                                                               | 19 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Número total estimado de adultos (20-79 años) con diabetes en 2024, en la población mundial.....                                                              | 1  |
| <b>Figura 2.</b> Evolución de los requerimientos de insulina, así como de la sensibilidad a la misma en los tejidos periféricos maternos durante el embarazo y postparto. .... | 4  |
| <b>Figura 3.</b> Estructura química de los 4 estrógenos naturales principales producidos en la mujer (E1, E2, E3 y E4).....                                                    | 6  |
| <b>Figura 4.</b> Síntesis de E4 durante el embarazo.....                                                                                                                       | 7  |
| <b>Figura 5.</b> Cámara de Neubauer.....                                                                                                                                       | 10 |
| <b>Figura 6.</b> Esquema de ELISA tipo sándwich.....                                                                                                                           | 12 |
| <b>Figura 7.</b> Viabilidad de las células MIN 6 tras 24 horas con E2 (10 nM) y E4 (10 nM, 100 nM y 1 µM) y DMSO como control.....                                             | 13 |
| <b>Figura 8.</b> Viabilidad de las células MIN6 tras 48 horas con E2 (10 nM) y E4 (10 nM, 100 nM y 1 µM) y DMSO como control.. ....                                            | 14 |
| <b>Figura 9.</b> Secreción de insulina en respuesta a glucosa de células beta pancreáticas tratadas con E2 10 nM, E4 10 nM y E4 100 nM durante 24 horas. ....                  | 15 |

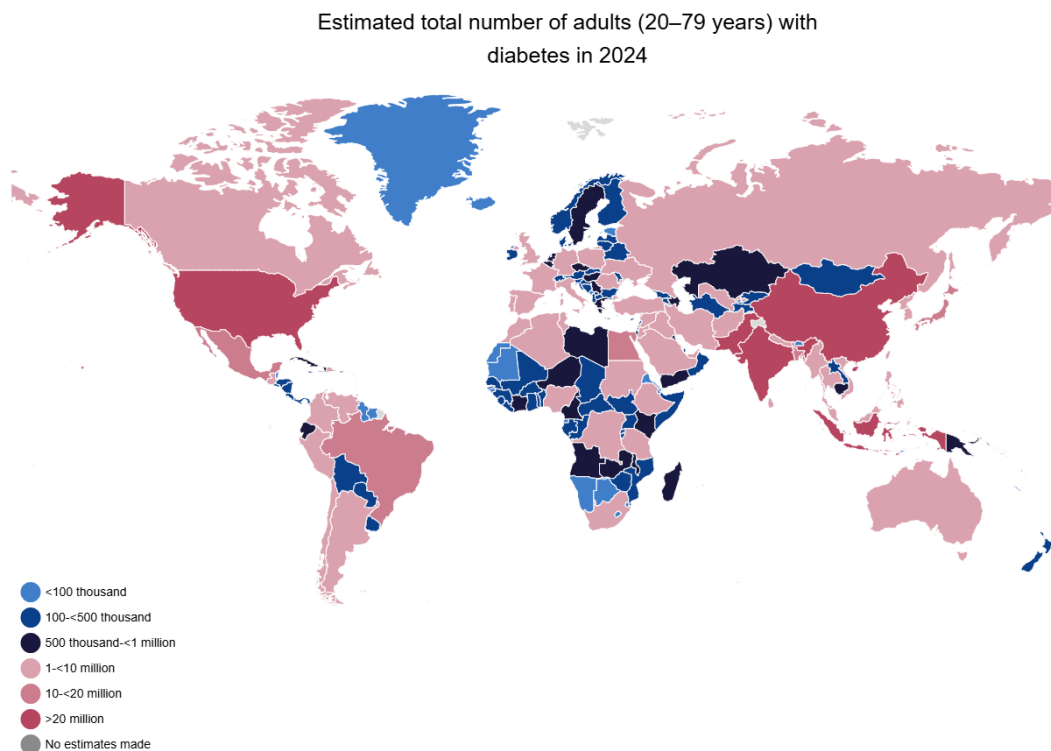
## ABREVIATURAS

- ❖ DM: Diabetes Mellitus
- ❖ DMG: Diabetes Mellitus Gestacional
- ❖ IL: Islotes de Langerhans
- ❖ PRL: Prolactina
- ❖ PL: Lactógeno Placentario
- ❖ GSIS: Secreción de insulina estimulada por glucosa
- ❖ E2: 17 $\beta$ -estradiol
- ❖ ER $\alpha$ : Receptor de Estrógenos  $\alpha$
- ❖ ER $\beta$ : Receptor de Estrógenos  $\beta$
- ❖ GPER: Receptor de Estrógenos Acoplado a Proteína G
- ❖ E1: Estrona
- ❖ E3: Estriol
- ❖ E4: Estetrol
- ❖ DMEM: Medio Eagle Modificado de Dulbecco
- ❖ FBS: Suero Fetal Bovino
- ❖ PBS: Tampón Fosfato Salino
- ❖ DMSO: Dimetilsulfóxido

## INTRODUCCIÓN

### ***Impacto de la diabetes y la diabetes gestacional.***

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico que se caracteriza por la presencia de una hiperglicemia crónica, como consecuencia principal de una secreción de insulina inadecuada o debido a una incapacidad de la insulina de realizar su acción. La DM puede llevar a comorbilidades graves como la hipertensión arterial, cardiopatías, ceguera o esteatohepatitis. Sin un tratamiento adecuado, la diabetes puede conducir al coma, e incluso la muerte en casos más graves. En 2024, la prevalencia de la diabetes alcanzó un 11,1% (**Figura 1**) y se documentaron 3,4 millones de muertes a causa de la misma (1). Se estima que un 43% de los adultos con diabetes no han sido diagnosticados (1). Existen varios tipos de DM, de entre los cuales destacan la DM tipo 1, tipo 2 y la gestacional (2).



**Figura 1.** Número total estimado de adultos (20-79 años) con diabetes en 2024, en la población mundial. Global [Internet]. Atlas de la diabetes. Disponible en: <https://diabetesatlas.org/es/data-by-location/global/> (1)

La diabetes mellitus gestacional (DGM) se define como una hiperglicemia detectada por primera vez en cualquier momento del embarazo (3). Se trata de un desorden

metabólico que resulta de la incapacidad de la madre para compensar la resistencia a insulina inducida durante el embarazo (4). Recientemente, la prevalencia de la DMG se ha visto incrementada al igual que la diabetes tipo 2 y la obesidad, en toda la población (5). La prevalencia global de la DMG es de hasta el 14,0% de los embarazos, sin embargo, varía con la edad, los criterios de diagnóstico y las características de la población, como la etnia o la prevalencia de diabetes tipo 2 en la población de base (6). Esta enfermedad se puede dividir en dos estadios; la hiperglicemia que se detecta antes de la semana 20 de embarazo se denomina diabetes gestacional temprana y aquella que se detecta a las 24-28 semanas de gestación se conoce como diabetes gestacional tardía (5).

La diabetes gestacional se asocia con un incremento en el riesgo de complicaciones del embarazo, como la muerte perinatal, hipoglicemia neonatal o parto prematuro (7), así como, en el riesgo de cesárea, macrosomía, parto prematuro, anomalías congénitas, hipertensión, muerte perinatal, preeclampsia, distocia de hombro e inducción del parto, entre otros. Además, se ha visto que estos riesgos son mayores en los casos de diabetes gestacional temprana (8). Por otra parte, el 10-31% de los casos de diabetes tipo 2 en mujeres que han tenido hijos se asocia con DMG previa (9).

### ***Regulación de la homeostasis de la glucosa. Adaptaciones metabólicas durante el embarazo.***

El páncreas es un órgano, con función tanto exocrina como endocrina, capaz de regular la homeostasis de la glucosa secretando hormonas como la insulina, el glucagón o la somatostatina, principalmente (10). La parte endocrina del órgano está formada por los Islotes de Langerhans (IL), que a su vez están compuestos por varios tipos celulares que segregan cada uno su propia hormona: células  $\alpha$  (glucagón), células  $\beta$  (insulina), células  $\delta$  (somatostatina), células  $\gamma$  (polipéptido pancreático) y células  $\epsilon$  (ghrelina) (11). La principal función de los IL es controlar los niveles de glucosa en sangre; tejidos como el sistema nervioso o el cerebro requieren un suministro constante y estable de glucosa: su principal fuente de energía.

Cuando aumentan los niveles de glucosa en sangre en la fase postprandial, se estimula la secreción de insulina en las células beta y se inhibe la secreción de glucagón en las células alfa (11). El aumento de insulina en sangre, tras la ingesta de glucosa, ejerce efectos en distintos tejidos, entre los que destacan el músculo esquelético (promueve la

utilización de glucosa), el tejido adiposo (suprime la lipólisis y aumenta la adipogénesis) y el hígado (aumenta la síntesis de glucógeno y disminuye la gluconeogénesis) (12) (13) (14). La insulina promueve la entrada de glucosa en estas células (13) y se encarga de dar lugar a una “respuesta anabólica integrada” según la disponibilidad de nutrientes (12).

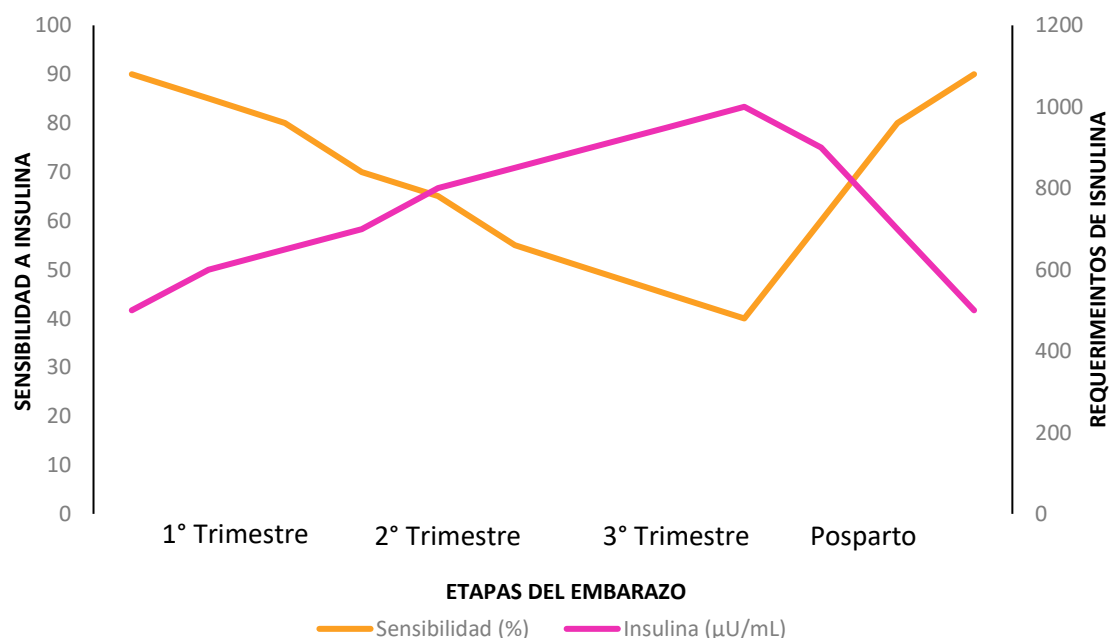
Por otra parte, el hígado se encarga de retirar un gran porcentaje de la insulina secretada para evitar una hiperinsulinemia que podría acarrear resistencia a la insulina en los tejidos periféricos (15). Se considera que un sujeto tiene resistencia a la insulina cuando requiere de mayor cantidad de insulina de lo normal para disminuir el nivel de glucosa en sangre (12).

Durante el embarazo, para el correcto desarrollo del feto es necesario que haya un flujo de nutrientes adecuado desde la madre. La glucosa es la principal fuente de energía para el feto (16) y el transporte de glucosa a través de la placenta depende directamente del gradiente de concentración entre la circulación materna y fetal (17).

En las primeras etapas del embarazo, las células beta pancreáticas del feto regulan este gradiente al mantener bajos los niveles de glucosa en la sangre fetal. Esto se debe principalmente a que estas células tienen una alta secreción basal de insulina (18). En etapas más avanzadas del embarazo, existe un fenómeno en el que el feto debido a su mayor desarrollo extrae más cantidad de glucosa de la sangre materna a través de la placenta, reduciendo los niveles de glucosa en la circulación materna y amenazando el gradiente de concentración (19). Para compensar esta situación, las hormonas secretadas por la placenta producen un aumento en la resistencia a la insulina de la madre y aumenta la producción hepática de glucosa, todo esto para garantizar un aporte suficiente de glucosa de la madre al feto (20).

Si esta resistencia a la insulina no se compensa, podría provocar una hiperglicemia e intolerancia a la glucosa en la madre (3) y un exceso de nutrientes para el feto, por tanto, es necesario que el páncreas materno se adapte. En ratones, se ha visto que la masa de células beta aumenta (por encima de un 50%), principalmente debido a la proliferación de células beta (21), así como la síntesis de insulina y su secreción estimulada por glucosa (22) (23). Se ha visto que en humanos al igual que en los ratones, el número de células beta y de islotes de Langerhans aumenta durante el embarazo (24) (25), además de la secreción de insulina, que aumenta de 2 a 3 veces en la madre para compensar esa menor sensibilidad a la misma (26) (**Figura 2**). Sin embargo, los mecanismos detrás de estas adaptaciones del páncreas se desconocen,

dato que los estudios en humanos son escasos debido a la dificultad de obtener muestras de páncreas de donantes embarazadas (27).



**Figura 2.** Evolución de los requerimientos de insulina, así como de la sensibilidad a la misma en los tejidos periféricos maternos durante el embarazo y postparto.

### ***Influencia de las hormonas materno-placentarias en las adaptaciones metabólicas.***

Todos estos cambios metabólicos que ocurren durante el embarazo y permiten aumentar la secreción de insulina y la expansión de células beta son posibles, entre otras cosas, gracias a la influencia de hormonas secretadas por la madre y la placenta, las más importantes serían la prolactina (PRL), el lactógeno placentario (PL) (familia de prolactina-hormona del crecimiento) o los estrógenos y la progesterona (hormonas esteroideas) (4).

Varios estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que el PL y la PRL incrementan la secreción de insulina, así como la proliferación y supervivencia de las células beta, a través de sus receptores (PRLR). Por otro lado, se ha visto que la PRL y el PL reducen el umbral de estimulación para la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) en estas células (28) (29). Además, la pérdida de la señalización por el PRLR, se ha visto relacionada con la aparición de DMG en ratones (30).

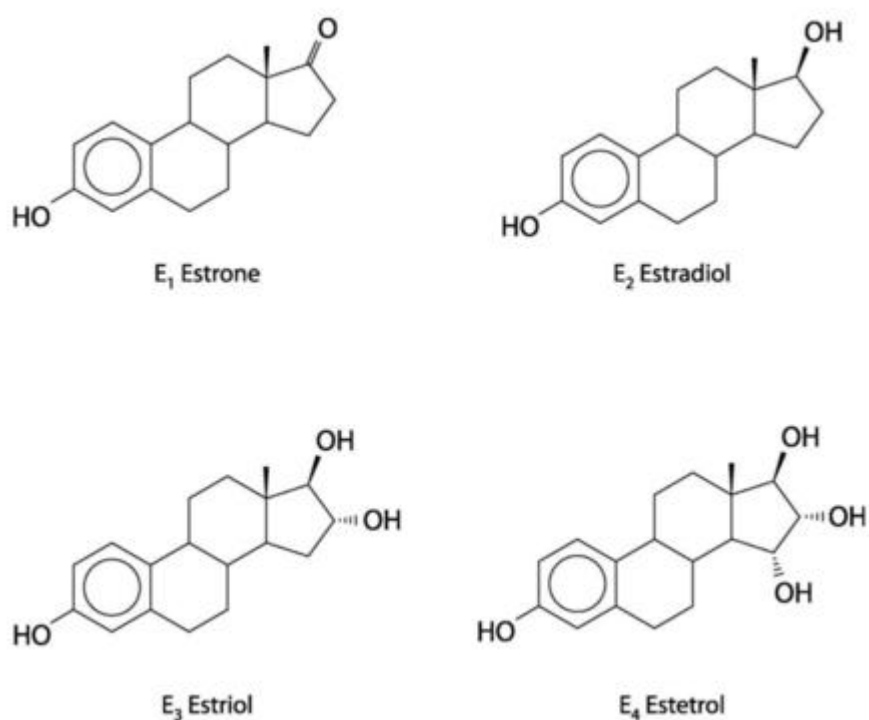
Por otra parte, la placenta es la fuente principal de hormonas esteroideas durante el embarazo, dichas hormonas son importantes en la adaptación del metabolismo materno para producir los cambios necesarios en la sensibilidad a insulina y el metabolismo de la glucosa (29). Los niveles de estrógenos y progesterona aumentan de forma significativa a medida que avanza el embarazo (31) y se ha comprobado en diferentes estudios que tiene impacto en la adaptación del páncreas endocrino durante el embarazo (29). Los estrógenos, en particular el 17 $\beta$ -estradiol (E2), y la progesterona previenen la apoptosis de células beta y aumentan la síntesis de insulina en el páncreas materno, así como su secreción en respuesta a glucosa, *in vivo* (29) (32) (33) (34) (35). Sin embargo, también se ha visto que, en presencia de PRL, la progesterona reduce la proliferación y supervivencia de células beta y la secreción de insulina, lo que indica que el efecto de la progesterona se opone a la estimulación provocada por los lactógenos (PL y PRL) en la etapa tardía del embarazo (29) (36). Con lo cual, ambas hormonas esteroideas también son esenciales para regular las adaptaciones metabólicas durante el embarazo sano y mantener la homeostasis de la glucosa.

### ***Papel de los estrógenos en la regulación de la homeostasis de la glucosa materna.***

En los islotes pancreáticos, el 17 $\beta$ -estradiol (E2) juega un papel fundamental en la regulación de la síntesis y secreción de insulina, así como de la supervivencia de las células beta (37). E2 actúa a través del receptor de estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ , por sus siglas en inglés) y de receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER, por sus siglas en inglés) aumentando la síntesis y secreción de insulina (32) (38). Además, junto con el receptor de estrógenos  $\beta$  (ER $\beta$ , por sus siglas en inglés), también promueve la supervivencia de células beta y su proliferación (32) (38). Estos efectos permiten la adaptación del páncreas a estados de resistencia a insulina, como es el caso del embarazo (39).

Aunque el E2 es el estrógeno más activo durante el embarazo, existen otros estrógenos circulantes entre la madre y el feto que difieren en su función y origen, como son la estrona (E1), el estriol (E3) y el estetrol (E4). La estructura química de cada uno de estos estrógenos se puede observar en la **Figura 3**. La E1 es el estrógeno menos abundante en las mujeres en edad fértil, sin embargo, es predominante en las mujeres postmenopáusicas. Se produce principalmente en el tejido graso y en menor medida en el ovario y la placenta (40). Durante el embarazo, la E1 sirve como reservorio/precursor de otros estrógenos más activos como el E2 y ayuda a preparar al organismo para los cambios hormonales que tienen lugar (41). El E3 es el principal estrógeno que produce

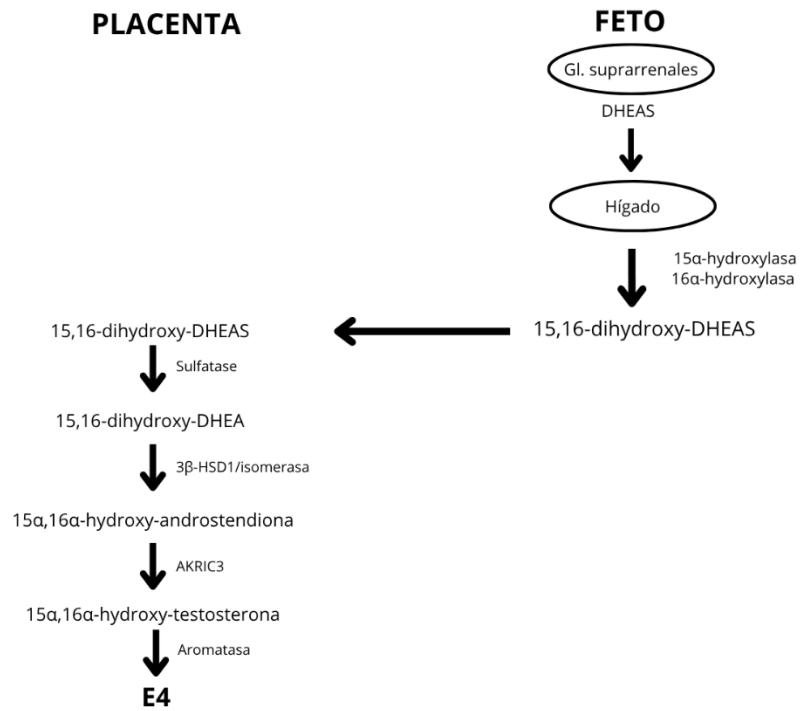
la placenta y puede alcanzar una concentración hasta mil veces mayor que fuera del embarazo, donde los niveles son prácticamente indetectables (42) (43). El E3 es necesario para el correcto desarrollo fetal, concretamente, se ha visto que tiene crucial importancia en el desarrollo de los órganos reproductivos y del encéfalo (44). Además, el E3 tiene un papel esencial en la preparación del útero para el parto (45). De todos estos estrógenos, el único que solo está presente durante el embarazo es el E4 (46) y su función sobre los receptores de estrógenos y las células beta-pancreáticas es una incógnita.



**Figura 3.** Estructura química de los 4 estrógenos naturales principales producidos en la mujer (E1, E2, E3 y E4). Physiopedia [Internet]. Estrogen. Disponible en: <https://www.physio-pedia.com/Estrogen> (47)

### **Nuevos factores de origen fetal. El estetrol.**

El E4 es una hormona exclusiva del embarazo, ya que tiene su origen en el hígado fetal. Se trata de una molécula estrogénica que se sintetiza desde la semana 9 de embarazo, y alcanza la circulación materna a través de la placenta (**Figura 4**) (46). Al contrario que otras hormonas esteroideas, el efecto del E4 sobre las células beta-pancreáticas durante el embarazo se desconoce. El hecho de que el E4 sea una hormona esteroidea nos lleva a pensar que podría tener un papel en las adaptaciones de las células beta pancreáticas durante la gestación.



**Figura 4.** Síntesis de E4 durante el embarazo. (DHEA = dehydroepiandrosterone; DHEAS= DHEA sulfate; 3 $\beta$ -HSD=3 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase; AKR = aldo-keto reductase)

## **HIPÓTESIS**

E4 es un factor gestacional que regula la adaptación de las células beta pancreáticas durante el embarazo.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar el impacto de E4 *in vitro* sobre el metabolismo de células beta pancreáticas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Evaluar la viabilidad de células beta pancreáticas (MIN6) en respuesta a un tratamiento con E4.
2. Analizar la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) de las células beta pancreáticas (MIN6) tratadas con E4.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Cultivo celular - Células MIN6***

Para estos experimentos se usó la línea celular inmortalizada derivada de un insulinoma de ratón MIN6. Dichas células sintetizan y secretan insulina en respuesta a la glucosa y, por tanto, son un modelo muy utilizado en el estudio de la Diabetes por la comunidad científica y adecuado para la realización del presente estudio.

Las células utilizadas se mantuvieron en medio completo de crecimiento con la siguiente composición: Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), al que se añadió D-Glucosa (25 mM) y L-Glutamina (0,75 mM), además de, Suero Fetal Bovino (FBS) al 15%, Piruvato Sódico (1 mM), antibióticos (100 µl/mL de Estreptomicina y 100 µl/mL de Penicilina) y 2-Mercaptoetanol (0,05mM).

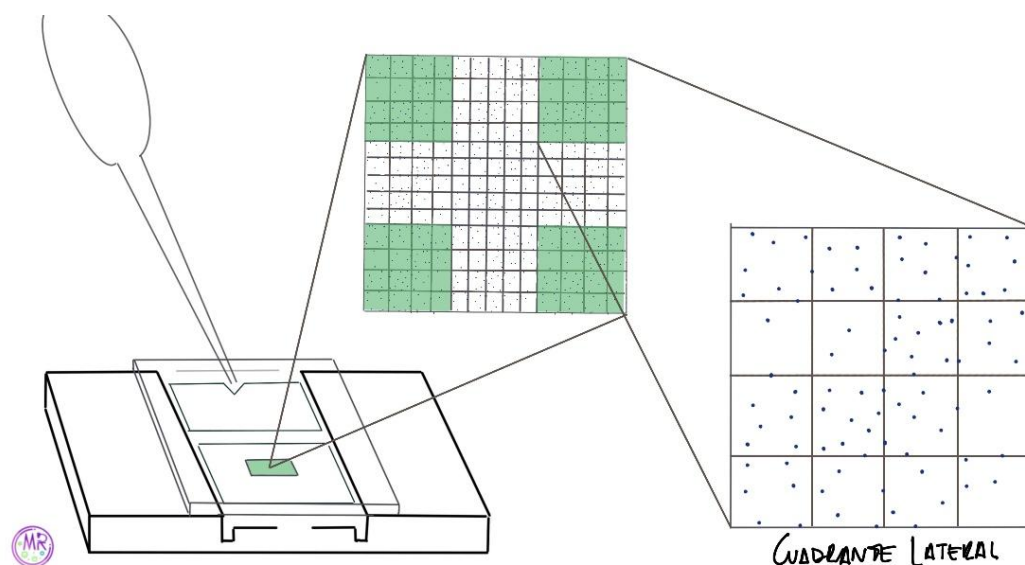
Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad y fueron cultivadas en Flasks ventilados de 75 cm<sup>2</sup>.

Los pases celulares se realizaron una vez la confluencia de las células alcanzaba el 70-80%, siguiendo una dilución 1:3. Para resuspender las células, primero se eliminó el medio de cultivo del Flask, para, a continuación, lavar con 5mL de Tampón Fosfato Salino 1X (PBS). Tras retirar el PBS, se añadieron 2 mL de Tripsina al Flask. Se dejó actuar la tripsina durante 5 minutos, dentro del incubador. Tras la incubación, las células se levantaron mecánicamente y posteriormente la acción de la tripsina se neutralizó con 10 mL de medio completo. El nuevo pasé se sembró siguiendo la proporción de dilución 1:3.

### ***Siembra de células MIN6***

Para realizar la siembra de células para llevar a cabo los ensayos de viabilidad celular (MTT) se utilizaron placas tratadas de 96 pocillos. En cada pocillo se sembró un total de 100.000 células en un volumen de 100 µL.

Para contar las células se utilizó una cámara de Neubauer (**Figura 5**). Se diluyó una muestra de células en medio de cultivo (dilución 1:3). En la cámara, se cargó el volumen indicado (10 µL) y se observaron las cuatro cuadrículas al microscopio. Se contaron todas las células de los 4 cuadrantes, teniendo en cuenta las células que tocaban únicamente los bordes externos de la cuadrícula. Una vez contadas las células, se dividió el resultado entre 4 para obtener la media y, puesto que el volumen de cada cuadrante es de 0,1 mm<sup>3</sup> se multiplicó la media por 10.000 para obtener el número de células por mililitro. Por último, se multiplicó por el factor de dilución correspondiente (3 en este caso).



**Figura 5.** Cámara de Neubauer. Miró MRR. Recuento de LEUCOCITOS en HEMOCITÓMETRO [Internet]. El Laboratorio de Marrodmir. 2024. Disponible en: <https://marrodmir.com/recuento-de-leucocitos-en-hemocitometro/>

#### **Tratamientos celulares con E2 y E4:**

Una vez sembradas las células en la placa, se llevó a cabo el tratamiento de las células con las diferentes condiciones del estudio. Primero se quitó el medio de crecimiento con rojo fenol, se lavó con 100  $\mu$ L de PBS y, por último, se añadieron los tratamientos correspondientes. Las células se trataron durante 24 o 48 horas con las siguientes condiciones experimentales: DMSO (1\*10<sup>-4</sup>%), E2 10 nM, E4 10 nM y E4 100 nM y E4 1  $\mu$ M.

#### **Ensayo de viabilidad celular (MTT)**

Una vez realizados los tratamientos se realizó el ensayo de viabilidad celular mediante la técnica MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro). En primer lugar, se retiró el medio de cada pocillo y después, se añadieron 100  $\mu$ L de MTT al 10% (v/v) en cada uno de ellos. La placa se incubó a 37° y 5% CO<sub>2</sub> durante 3 horas.

Una vez transcurridas las 3 horas, se retiró el medio y se disolvieron los cristales de formazán en 100  $\mu$ L de DMSO. Una vez realizada la resuspensión de forma homogénea, se leyó la placa a 562 nm en un lector de absorbancia.

Para calcular la viabilidad celular se tomó como el 100% la media de los controles de cada experimento y se realizó una cuantificación relativa de las distintas condiciones.

### ***Glucose stimulated insulin secretion (GSIS) – Secreción de insulina estimulada por glucosa***

Se midió la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS, por sus siglas en inglés) en las células MIN-6 (200.000 células por pocillo) pretratadas durante 24 horas con las siguientes condiciones: Control (DMSO), E2 10nM, E4 10nM y E4 100nM. Se realizaron los experimentos en dos pases celulares diferentes con 3-6 réplicas experimentales por cada condición.

Para realizar este ensayo se preincubaron las células durante 30 minutos en medio HBSS (composición: 500 mL de H<sub>2</sub>O miliQ; NaCl 125 mM; KCl 5,9 mM; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,28 mM; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1,2 mM; pH ajustado a 7,4; complementado con 0,1% de BSA libre de ácidos grasos.) sin glucosa, y posteriormente se sometieron a dos concentraciones distintas de glucosa durante 30 minutos de forma seriada: baja glucosa (3 mM) y alta glucosa (16 mM), en medio HBSS) y se recogieron los sobrenadantes para posteriormente medir la concentración de insulina de los mismos mediante ELISA siguiendo las instrucciones del kit comercial (mouse ultra sensitive Crystal Chem). Las células fueron lisadas con 100 ul de Etanol ácido (composición: 70% de CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH; 10% de HCl en H<sub>2</sub>O) para obtener el contenido intracelular, que se almacenó a -20°C. Para la normalización de los experimentos se midió el DNA procedente de los pocillos lisados con etanol ácido. Se realizaron al menos dos mediciones utilizando un Nanodrop de alta sensibilidad.

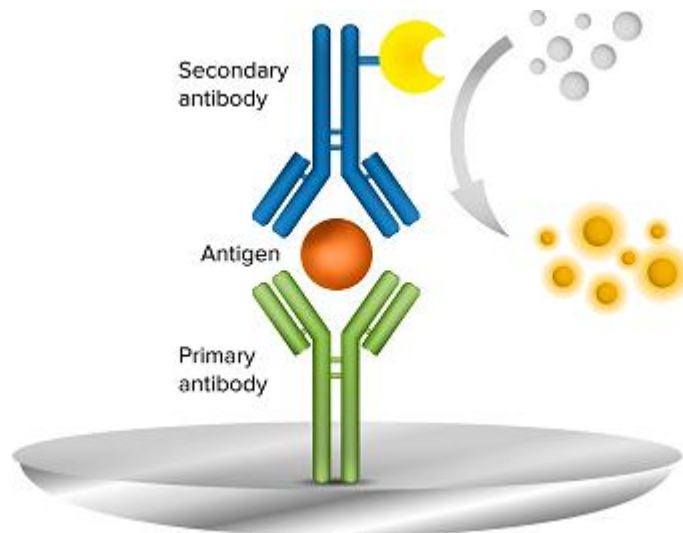
#### ***Ensayo inmunoenzimático tipo ELISA:***

Para determinar los niveles de insulina en los sobrenadantes de los cultivos celulares obtenidos tras el ensayo GSIS, se utilizó un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA (**Figura 6**). En este estudio se emplearon kits ELISA de tipo "sándwich", lo que implica el uso de dos anticuerpos altamente específicos que reconocen epítomos distintos de la misma proteína, lo que confiere al ensayo una alta eficacia y sensibilidad en la detección de la insulina.

En nuestro procedimiento, las placas ya vienen recubiertas con un primer anticuerpo específico contra el antígeno. Sobre estos pocillos se deposita la muestra que contiene la insulina (antígeno), junto con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa, y se incuba durante 2 horas. De este modo, cada molécula de insulina queda unida por un anticuerpo que la fija a la base del pocillo y por otro que la marca.

Tras la incubación, los pocillos se lavan seis veces para eliminar el material no unido, incluyendo el anticuerpo marcado sobrante. A continuación, se añade el sustrato 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y se incuba durante 30 minutos, lo que genera una

reacción enzimática detectable. Finalmente, se añade una solución ácida que detiene la reacción, permitiendo obtener una señal colorimétrica. Esta se mide mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm, utilizando un lector de microplacas (HEALES, China).



**Figura 6.** Esquema de ELISA tipo sándwich. Molecular devices.  
<https://es.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa> (48)

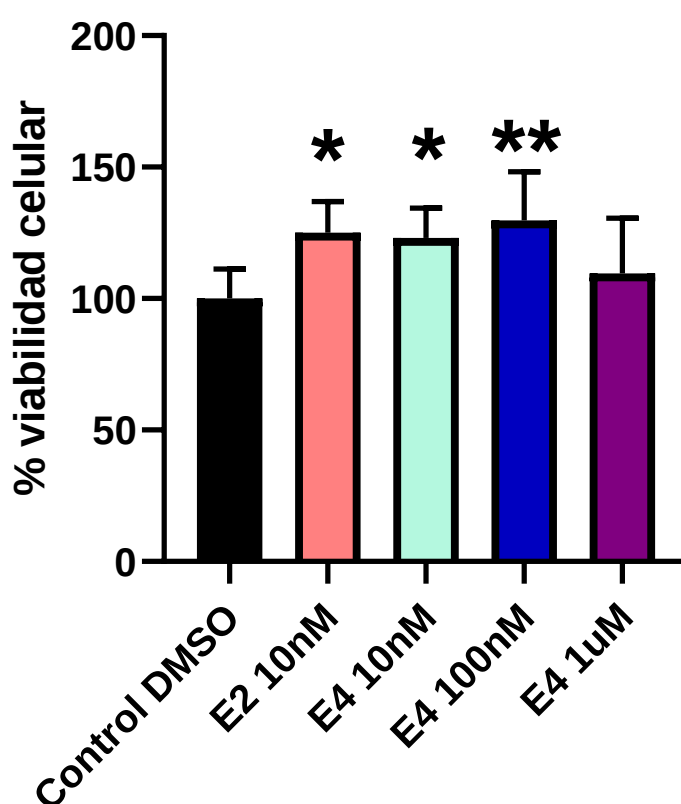
### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el paquete de software Graphpad 9 comprobando inicialmente la normalidad de las muestras, tras lo que se aplicó un ANOVA one way para comparar los diferentes grupos experimentales con la condición control. En el caso de los ensayos en los que consideramos dos variables, se realizó un análisis ANOVA two way. La potencia estadística se consideró: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

## RESULTADOS

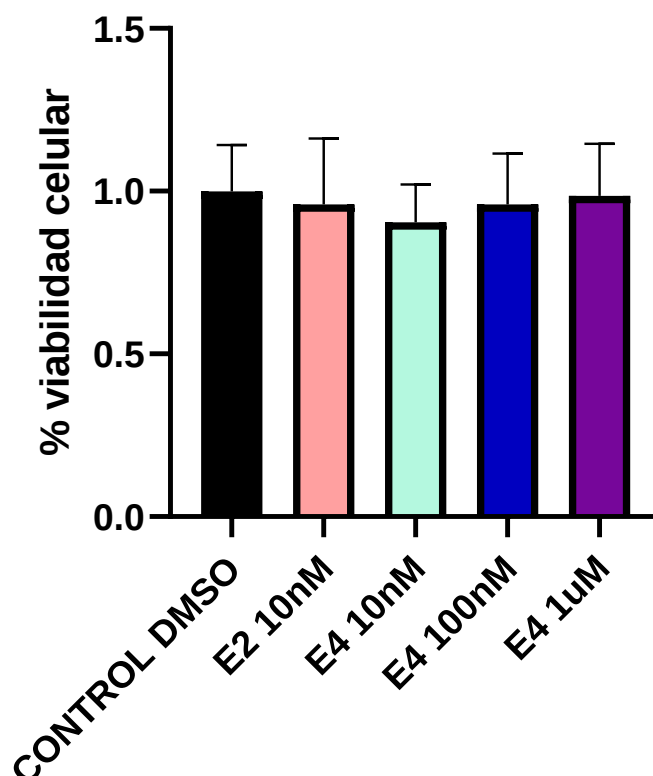
### 1. E4 aumenta la viabilidad celular en células beta pancreáticas tras 24 horas de tratamiento.

Se comprobó la viabilidad de las células beta pancreáticas tras 24 horas de tratamiento *in vitro* con E2 10 nM, E4 10 nM y E4 100 nM. En la **Figura 7**, se observa como la viabilidad de las células MIN6 aumenta de manera significativa con E2 y E4 a concentraciones de 10 nM y 100 nM. No se vieron efectos significativos para la concentración 1  $\mu$ M.



**Figura 7.** Viabilidad de las células MIN 6 tras 24 horas con E2 (10 nM) y E4 (10 nM, 100 nM y 1  $\mu$ M) y DMSO como control. Dos ensayos experimentales independientes (4 réplicas por ensayo). ANOVA 2 WAY. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Para ver si el efecto de los estrógenos se limitaba a las 24 horas o podía ser mayor, aumentamos el tiempo de tratamiento a 48 horas y realizamos otro ensayo de viabilidad (**Figura 8**). En este caso, no se ve ninguna diferencia significativa en cuanto al metabolismo de las células con respecto al control.



**Figura 8.** Viabilidad de las células MIN6 tras 48 horas con E2 (10 nM) y E4 (10 nM, 100 nM y 1  $\mu$ M) y DMSO como control. Dos ensayos experimentales independientes (4 réplicas por ensayo). ANOVA 2 WAY. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

## **2. E4 aumenta la función de las células beta pancreáticas in vitro tras 24 horas de tratamiento.**

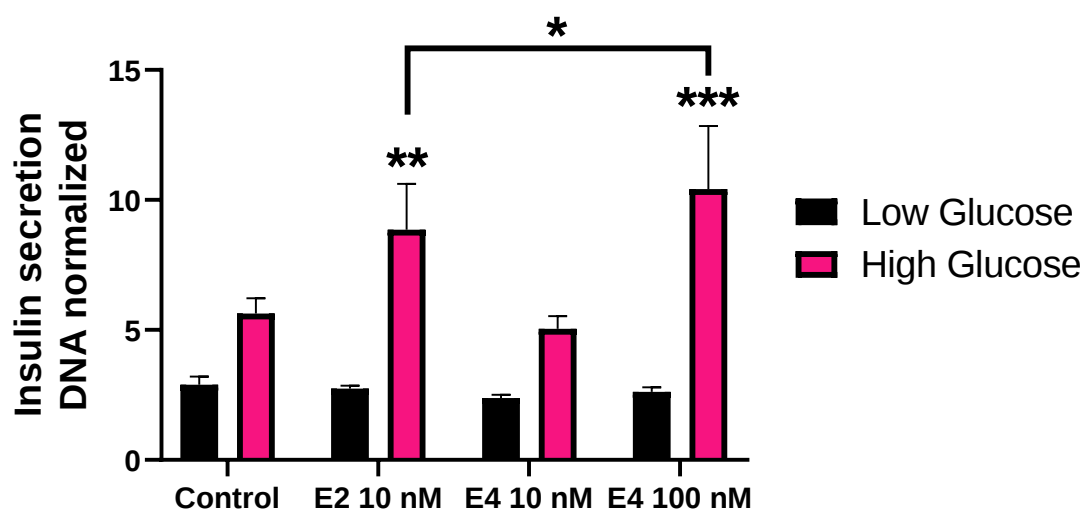
El siguiente paso de nuestro estudio fue comprobar si el aumento en la viabilidad celular tras 24 horas de tratamiento se debía a un aumento de la función de las células beta, es decir, en su capacidad de secretar insulina en respuesta a glucosa (**Figura 9a**). En este caso, se trataron las células con E2 10 nM, E4 10 nM y E4 100 nM, además del control con DMSO. Se excluyó el tratamiento con E4 1  $\mu$ M, ya que no se detectaron efectos sobre la viabilidad celular.

Los resultados muestran la respuesta fisiológica esperada en las células control, secretando más del doble de insulina en respuesta a alta glucosa. En cuanto a los tratamientos, se observó un incremento en la secreción de insulina en respuesta a glucosa aumentado de forma muy significativa tras el tratamiento con E2 y el tratamiento con E4 100nM. Además, se observó un aumento también significativo en el incremento de secreción de insulina provocado tras el tratamiento con E4 100 nM comparado con E2 10 nM. Constatando que E4 es capaz de mejorar la función de las células beta como

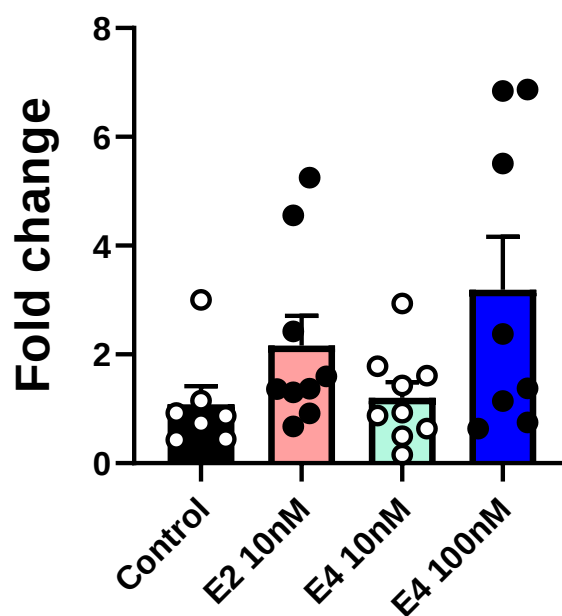
ya se había comprobado en otros estudios con E2 10 nM.

Vemos que la secreción de insulina llega a triplicarse con E4 100 nM en condiciones de alta glucosa con respecto a baja glucosa (**Figura 9b**). Esto lo convierte en el grupo con el mayor aumento relativo en la secreción de insulina, por delante de E2, donde dicha secreción se duplica.

**A**



**B**



**Figura 9.** Secreción de insulina en respuesta a glucosa de células beta pancreáticas tratadas con E2 10 nM, E4 10 nM y E4 100 nM durante 24 horas. Los datos se presentan en la gráfica (A) como cantidad de insulina (ng/mL) normalizada por la cantidad de ADN (ng/mL). 2 ensayos experimentales independientes (3-6 réplicas por ensayo). ANOVA 2 WAY. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

## DISCUSIÓN

El E2 es considerado el estrógeno más activo e importante en la mujer. Durante el embarazo, su concentración aumenta considerablemente ayudando, entre otras cosas, a mantener la homeostasis de la glucosa. Esta hormona fomenta la supervivencia de células beta y aumenta la síntesis de insulina en las mismas (32). E4 es un estrógeno de estructura muy parecida al E2, que se sintetiza por el hígado fetal, lo que hace que sólo esté presente durante la gestación. Los estudios sobre la función fisiológica de este estrógeno son limitados y se desconoce el efecto sobre las células beta del páncreas endocrino. Además, se sabe que este E4 es un estrógeno más débil en su acción que E2, motivo por el cual, en el presente estudio, hemos considerado evaluar concentraciones más altas de esta hormona que las descritas para estudios *in vitro* de E2 en la regulación de las células beta pancreáticas (34) (47) (48). Con el fin de esclarecer los posibles efectos del E4 sobre las células beta, en este estudio, se realizó un ensayo de viabilidad celular, además de un ensayo específico de función (GSIS), en un modelo de células beta-pancreáticas de insulinoma de ratón (MIN6), tratadas con diferentes concentraciones de estos estrógenos.

Los resultados revelaron que E4 tiene acción regulatoria sobre las células beta pancreáticas MIN6. En primer lugar, Este estrógeno aumenta la viabilidad celular tras 24 horas de tratamiento *in vitro*. Hemos observado que E4 a 100 nM consigue efectos incluso más significativos que E2 a 10 nM. Este efecto podría deberse a un aumento en la proliferación o supervivencia de las células o a un aumento en su función. También hemos observado que los efectos se pierden tras 48 horas de tratamiento lo que podría indicar que la acción de E4 sobre las células beta alcanza su pico máximo a las 24 horas *in vitro*, más allá de las cuales las células no son capaces de responder al compuesto.

A través del ensayo de secreción de insulina en respuesta a glucosa (GSIS), constatamos que este efecto de E4 sobre las células beta se debe, al menos en parte, a un aumento de función. En presencia de E4 (100 nM), las células secretan mayor cantidad de insulina que en condiciones control. Este efecto es incluso mayor que el observado con E2 (10 nM), que ya está descrito en literatura anterior (49). Sin embargo, no observamos diferencias en la concentración 10 nM, en la que sí habíamos constatado un efecto positivo en la viabilidad celular. Este hecho pone de manifiesto que quizá el efecto de E4 sobre las células beta pancreáticas no se restrinja únicamente a la capacidad de secretar insulina. Sería necesario ampliar el estudio para comprobarlo.

Por otra parte, la concentración de E4 en la circulación materna en las semanas 20-27 de embarazo es de 1-2 ng/mL (3,3,-6,6 nM) y de 2,2-5 ng/mL (7,2-16,4 nM) a término (50). Asimismo, la concentración de E4 en el plasma fetal es de hasta 12 veces mayor

que en la sangre materna (50), lo cual podría significar que E4 actúa principalmente sobre los tejidos fetales y no tanto sobre los maternos. De hecho, se ha planteado en estudios previos que E4 puede ser un mecanismo de protección del feto frente a E2, de tal manera que estaría uniéndose a algunos de los receptores de estrógenos disponibles en las células evitando la unión de E2 y de esta forma minimizando su efecto. E2 es el estrógeno más activo y algunos autores han planteado que podría ser perjudicial en el desarrollo fetal si no se modula su señalización (51) (52) (53) (54) (55) (56).

Como se puede ver en el ensayo de GSIS, la potencia de E4 para aumentar la secreción de insulina en respuesta a glucosa es menor que la de E2 (ya que a la misma concentración solo vemos efecto en células tratadas con E2). Teniendo en cuenta que los niveles circulantes de E4 en el feto son mayores que en la madre, la acción de E4 podría ser importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa intra-fetal. Esto se ve respaldado por el aumento significativo de secreción de insulina en respuesta a glucosa observado tras el tratamiento con E4 100 nM.

Este estudio revela nuevos aspectos muy interesantes respecto al papel del ambiente hormonal gestacional sobre células beta-pancreáticas, abriendo la puerta a nuevas hipótesis, E4 estaría involucrado en la regulación del páncreas endocrino fetal, siendo un nuevo factor importante a estudiar en el contexto de la maduración del páncreas prenatal.

Aunque nuestros hallazgos son consistentes, tienen limitaciones y sería conveniente, realizar más experimentos para aumentar el tamaño muestral y con ello la potencia estadística. Además, no debemos olvidar que estamos trabajando con células en cultivo que no siempre imitan con precisión la fisiología, por lo que podría ser interesante analizar los efectos de E4 en un tejido pancreático real en próximos estudios.

En definitiva, E4 es un estrógeno que sólo está presente durante el embarazo y hemos demostrado por primera vez, que puede tener impacto en la viabilidad y función de las células beta-pancreáticas. Ahora bien, dicho impacto puede ser diferente según la concentración de E4, que a su vez también se encuentra en distintas concentraciones en la circulación materna y fetal. Se requieren altas concentraciones de E4 para que su impacto sobre la secreción de insulina de las células beta-pancreáticas se asemeje o incluso supere el de E2.

Por tanto, E4 podría estar involucrado en la regulación de la viabilidad y la función de las células beta pancreáticas en el páncreas fetal.

Nuestras observaciones abren una nueva vía para estudiar el impacto del estetrol en el desarrollo del páncreas endocrino fetal durante la gestación, una etapa crucial para el establecimiento de su correcta función tras el nacimiento.

## **CONCLUSIONES**

- 1. E4 aumenta la viabilidad de las células beta pancreáticas *in vitro*.**
- 2. E4 regula la función de las células beta pancreáticas *in vitro*, mejorando la secreción de insulina en respuesta a glucosa.**

## **CONCLUSIONS**

- 1. E4 increases pancreatic beta-cell viability in vitro.**
- 2. E4 increases pancreatic beta-cell function in vitro, enhancing insulin secretion in response to glucose.**

## REFERENCIAS

1. Global [Internet]. Atlas de la diabetes.
2. Antar SA, Ashour NA, Sharaky M, Khattab M, Ashour NA, Zaid RT, et al. Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1 de diciembre de 2023;168:115734.
3. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. enero de 2009;32(Suppl 1):S62-7.
4. Salazar-Petres ER, Sferruzzi-Perri AN. Pregnancy-induced changes in  $\beta$ -cell function: what are the key players? *The Journal of Physiology*. 2022;600(5):1089-117.
5. Sweeting A, Wong J, Murphy HR, Ross GP. A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus. *Endocr Rev*. 26 de septiembre de 2022;43(5):763-93.
6. 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 Res Clin Pract*. enero de 2022;183:109050.
7. Immanuel J, Simmons D. Screening and Treatment for Early-Onset Gestational Diabetes Mellitus: a Systematic Review and Meta-analysis. *Current Diabetes Reports*. 2017;17(11).
8. Hannah W, Bhavadharini B, Beks H, Deepa M, Anjana RM, Uma R, et al. Global burden of early pregnancy gestational diabetes mellitus (eGDM): A systematic review. *Acta Diabetol*. marzo de 2022;59(3):403-27.
9. Cheung NW, Byth K. Population health significance of gestational diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(7):2005-9.
10. Hu C, Chen Y, Yin X, Xu R, Yin C, Wang C, et al. Pancreatic endocrine and exocrine signaling and crosstalk in physiological and pathological status. *Sig Transduct Target Ther*. 14 de febrero de 2025;10(1):1-30.
11. Campbell JE, Newgard CB. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. febrero de 2021;22(2):142-58.
12. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*. octubre de 2018;98(4):2133-223.

13. Norton L, Shannon C, Gastaldelli A, DeFronzo RA. Insulin: The master regulator of glucose metabolism. *Metabolism*. abril de 2022;129:155142.
14. Zierler KL, Rabinowitz D. Effect of Very Small Concentrations of Insulin on Forearm Metabolism. Persistence of Its Action on Potassium and Free Fatty Acids without Its Effect on Glucose\*. *J Clin Invest*. mayo de 1964;43(5):950-62.
15. Del Prato S, Leonetti F, Simonson DC, Sheehan P, Matsuda M, DeFronzo RA. Effect of sustained physiologic hyperinsulinaemia and hyperglycaemia on insulin secretion and insulin sensitivity in man. *Diabetologia*. 1 de octubre de 1994;37(10):1025-35.
16. Jr WWH. Energy and substrate requirements of the placenta and fetus. *Proceedings of the Nutrition Society*. agosto de 1991;50(2):321-36.
17. Baumann MU, Deborde S, Illsley NP. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocr*. 1 de octubre de 2002;19(1):13-22.
18. Baeyens L, Hindi S, Sorenson RL, German MS.  $\beta$ -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes Obes Metab*. septiembre de 2016;18 Suppl 1(Suppl 1):63-70.
19. Nolan CJ, Proietto J. The feto-placental glucose steal phenomenon is a major cause of maternal metabolic adaptation during late pregnancy in the rat. *Diabetologia*. octubre de 1994;37(10):976-84.
20. Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*. diciembre de 2007;50(4):938-48.
21. Ackermann AM, Gannon M. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol*. febrero de 2007;38(1-2):193-206.
22. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology*. marzo de 1992;130(3):1459-66.
23. Sorenson RL, Brelje TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res*. junio de 1997;29(6):301-7.
24. Van Assche FA, Aerts L, De Prins F. A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. noviembre de 1978;85(11):818-20.
25. Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, et al. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia*. octubre de 2010;53(10):2167-76.

26. Powe CE, Presley LPH, Locascio JJ, Catalano PM. Augmented insulin secretory response in early pregnancy. *Diabetologia*. agosto de 2019;62(8):1445-52.
27. Ernst S, Demirci C, Valle S, Velazquez-Garcia S, Garcia-Ocaña A. Mechanisms in the adaptation of maternal  $\beta$ -cells during pregnancy. *Diabetes Manag (Lond)*. 1 de marzo de 2011;1(2):239-48.
28. Sorenson RL, Brelje TC. Prolactin Receptors Are Critical to the Adaptation of Islets to Pregnancy. *Endocrinology*. 1 de abril de 2009;150(4):1566-9.
29. Napso T, Yong HEJ, Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri AN. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation. *Front Physiol*. 2018;9:1091.
30. Banerjee RR, Cyphert HA, Walker EM, Chakravarthy H, Peiris H, Gu X, et al. Gestational Diabetes Mellitus From Inactivation of Prolactin Receptor and MafB in Islet  $\beta$ -Cells. *Diabetes*. agosto de 2016;65(8):2331-41.
31. Costrini NV, Kalkhoff RK. Relative effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion. *J Clin Invest*. mayo de 1971;50(5):992-9.
32. Merino B, García-Arévalo M. Chapter Two - Sexual hormones and diabetes: The impact of estradiol in pancreatic  $\beta$  cell. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 1 de enero de 2021;359:81-138.
33. Wong WPS, Tiano JP, Liu S, Hewitt SC, Le May C, Dalle S, et al. Extranuclear estrogen receptor- $\alpha$  stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 de julio de 2010;107(29):13057-62.
34. 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.
35. Tiano JP, Delghingaro-Augusto V, Le May C, Liu S, Kaw MK, Khuder SS, et al. Estrogen receptor activation reduces lipid synthesis in pancreatic islets and prevents  $\beta$  cell failure in rodent models of type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 1 de agosto de 2011;121(8):3331-42.
36. Sorenson RL, Brelje TC, Roth C. Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology*. 1 de noviembre de 1993;133(5):2227-34.

37. Ma W, Chen X, Cerne R, Syed SK, Ficorilli JV, Cabrera O, et al. Catechol estrogens stimulate insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells via activation of the transient receptor potential A1 (TRPA1) channel. *J Biol Chem*. 22 de febrero de 2019;294(8):2935-46.
38. 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.
39. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Ropero AB, Quesada I. The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *J Physiol*. 1 de noviembre de 2009;587(Pt 21):5031-7.
40. Prueba de estrógeno: Prueba de laboratorio de MedlinePlus [Internet].
41. Salvador Z. ¿Qué son los estrógenos? - Tipos, funciones y fármacos. Reproducción Asistida ORG [Internet]. 4 de septiembre de 2023.
42. Lappano R, Rosano C, De Marco P, De Francesco EM, Pezzi V, Maggiolini M. Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 14 de mayo de 2010;320(1):162-70.
43. Tal R, Taylor HS. Endocrinology of Pregnancy. En: Feingold KR, Ahmed SF, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, et al., editores. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000.
44. Zhou Y, Gu B, Brichant G, Singh JP, Yang H, Chang H, et al. The steroid hormone estriol (E3) regulates epigenetic programming of fetal mouse brain and reproductive tract. *BMC Biol*. 2 de mayo de 2022;20:93.
45. Albrecht ED, Pepe GJ. Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *Int J Dev Biol*. 2010;54(2-3):397-408.
46. Holinka CF, Diczfalusy E, Coelingh Bennink HJT. Estetrol: a unique steroid in human pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. mayo de 2008;110(1-2):138-43.
47. Kooptiwut S, Wanchai K, Semprasert N, Srisawat C, Yenchitsomanus P thai. Estrogen attenuates AGTR1 expression to reduce pancreatic  $\beta$ -cell death from high glucose. *Sci Rep*. 30 de noviembre de 2017;7:16639.
48. Ropero AB, Fuentes E, Rovira JM, Ripoll C, Soria B, Nadal A. Non-genomic actions of  $17\beta$ -oestradiol in mouse pancreatic  $\beta$ -cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase. *J Physiol*. 1 de diciembre de 1999;521(Pt 2):397-407.

49. Costrini NV, Kalkhoff RK. Relative effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion. *J Clin Invest.* mayo de 1971;50(5):992-9.
50. Pasqualini JR, Kincl FA. CHAPTER 3 - Hormone Production and Concentrations During Pregnancy in Humans and in Other Mammalian Species. En: Pasqualini JR, Kincl FA, editores. *Production, Concentration and Metabolism During Pregnancy* [Internet]. Amsterdam: Pergamon; 1985. p. 173-334.
51. Gérard C, Blacher S, Communal L, Courtin A, Tskitishvili E, Mestdagt M, et al. Estetrol is a weak estrogen antagonizing estradiol-dependent mammary gland proliferation. 1 de enero de 2015.
52. Duan CC, Li C, He YC, Xu JJ, Shi CY, Hu HT, et al. Oocyte exposure to supraphysiological estradiol during ovarian stimulation increased the risk of adverse perinatal outcomes after frozen-thawed embryo transfer: a retrospective cohort study. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease.* agosto de 2020;11(4):392-402.
53. Meng Y, Lv PP, Ding GL, Yu TT, Liu Y, Shen Y, et al. High Maternal Serum Estradiol Levels Induce Dyslipidemia in Human Newborns via a Hepatic HMGCR Estrogen Response Element. *Sci Rep.* 11 de mayo de 2015;5:10086.
54. Gérard C, Mestdagt M, Tskitishvili E, Communal L, Gompel A, Silva E, et al. Combined estrogenic and anti-estrogenic properties of estetrol on breast cancer may provide a safe therapeutic window for the treatment of menopausal symptoms. *Oncotarget.* 19 de mayo de 2015;6(19):17621-36.
55. Hu XL, Feng C, Lin XH, Zhong ZX, Zhu YM, Lv PP, et al. High maternal serum estradiol environment in the first trimester is associated with the increased risk of small-for-gestational-age birth. *J Clin Endocrinol Metab.* junio de 2014;99(6):2217-24.
56. Wang HH, Zhou CL, Lv M, Yang Q, Li JX, Hou M, et al. Prenatal High Estradiol Exposure Induces Sex-Specific and Dietarily Reversible Insulin Resistance Through Decreased Hypothalamic INSR. *Endocrinology.* 1 de enero de 2018;159(1):465-76.