



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS  $\alpha$  Y PP EN EL PÁNCREAS DE RATA EN EL  
DESARROLLO**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:**

**ZYANYA SARAI SANCHEZ SALAZAR**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR  
ZUBIRÁN**

**DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**Ciudad de México. Junio, 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## Agradecimientos académicos



**Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, de la división de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los donativos para la realización del proyecto CB-253222 y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por los donativos para el proyecto IN213114 otorgados a la Dra. Marcía Hiriart; de los cuales este trabajo forma parte.

Al CONACYT por otorgarme la beca de formación de posgrado de excelencia, inscrita bajo el número 894679.

Al CONACYT por la beca de ayudante de investigación que permitió el término de mi proyecto de tesis.

A la Dra. Marcia Hiriart por su excelente trabajo como mi tutora de la cual he aprendido muchísimo.

A la Dra. Myrian Velasco por sus asesorías respecto a mis dudas durante la realización de la parte experimental, así como de la redacción de esta tesis.

Al laboratorio AL-201, en especial a la M. en C. Jazmín García Morales por su ayuda inicial para el desarrollo de este tema de investigación.

A la Unidad de Imagenología del IFC, en especial a la Dra. Ruth Rincón Heredia por la facilitación de los equipos, su apoyo constante y asesorías en la toma de las micrografías.

A la Unidad de Histología del IFC, en especial a la M. en C. Sandra Daniela Rodríguez Montañó por el apoyo en la realización de los cortes histológicos y en la asesoría para la realización de las técnicas histológicas utilizadas en el presente trabajo.

## **Agradecimientos personales**

A Dios, pues mi fe en él me ha permitido continuar y no dejarme vencer aun cuando todo se torna gris, pues su amor es infinito.

A mis padres Salomé y José Luis, por ser mi apoyo constante en cada uno de mis proyectos y llenarme de confianza en mí misma. Los mejores padres que me pudo dar la vida.

A mis hermanas Cesia y Emma por ser mis mejores amigas en el mundo con quienes siempre puedo compartir hasta mis temores, dudas, alegrías y demás. Juntas somos dinamita.

A mis abuelitos Emma y Rodolfo, pues nunca se han perdido ningún momento importante para mí y siempre he estado en sus oraciones, haciéndome sentir especial a cada momento. Un beso al cielo "Lobo".

A mi tía Magdalena por siempre estar dispuesta a escucharme. Te quiero mucho.

A mi tío Pepe por siempre ser un referente para mí. Abracitos, donde quiera que estés, siempre te llevo en mi corazón.

A mi mejor amigo Sebastián, gracias por escucharme, apoyarme y abrazarme cuando lo necesito. No sé qué haría sin ti.

A mis amigos Iskra, Jean, Germán y Manuel por ayudarme a concentrarme y mejorar mi pensamiento analítico. Además de convertirse en amigos fundamentales y muy queridos por mi.

A Jean, en especial, por convertirte en una mano amiga tendida todo el tiempo en esta etapa compleja de la maestría, aligerando la carga, gracias corazón. Abrazo enorme.

A mis amigas Dani, Fer y Angie personas valiosas que me deja el posgrado. Gracias por su amistad y compañía, pero sobre todo por su apoyo en momentos difíciles.

## Dedicatoria

A mis padres y hermanas:  
Gracias por las risas, lágrimas, abrazos y todo.

Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere  
Debajo del cielo tiene su hora.  
Eclesiastés 3:1

Muchos pensamientos hay en el corazón del hombre;  
Más el consejo de Jehová permanecerá.  
Proverbios 19:21

Fíate de Jehová de todo tu corazón, y no estribes en tu prudencia.  
Reconócelo en todos tus caminos, y él enderezará tus veredas.  
Proverbios 3:5-6

Te haré entender, y te enseñaré el camino en que debes andar:  
Sobre ti fijaré mis ojos  
Salmos 32:8

## Índice

Abstract.....	1
Resumen.....	2
Abreviaturas .....	3
Introducción .....	4
Marco teórico .....	6
El páncreas y el islote pancreático.....	6
Desarrollo del páncreas y el islote pancreático.....	10
Las células alfa .....	16
Las células PP .....	18
Posible transdiferenciación de células alfa a pp .....	19
Ventanas críticas del desarrollo .....	20
Dimorfismo sexual .....	22
Marco teórico .....	24
Planteamiento del problema.....	26
Hipótesis .....	26
Objetivo general.....	27
Objetivos particulares .....	27
Diseño experimental .....	27
Modelo biológico.....	27
Disección del páncreas.....	27
Cortes en parafina .....	28
Inmunohistoquímicas en tejido en parafina .....	28
Toma de micrografías.....	29
Análisis estadístico .....	29
Resultados .....	30
Proporción de células beta .....	30
Proporción de células alfa .....	34
Proporción de células pp .....	37
Discusión .....	41
Conclusiones .....	48
Referencias bibliográficas .....	49





## Abstract

The pancreas is a gland that consists of two components: the exocrine, formed by acini and ducts, and the endocrine, formed by pancreatic islets located between the acini tissue, which represents 2% of the pancreas mass. The islets contain the following endocrine cells:  **$\beta$ -cells** (insulin),  **$\alpha$ -cells** (glucagon),  **$\delta$ -cells** (somatostatin), and **PP cells** (pancreatic polypeptide). These hormones regulate the nutrient homeostasis. The pancreas consists of a head that derives from a dorsal primordium and a body/tail derived from a ventral one. In earlier investigations carried out in our laboratory, we've observed that the proportion of  **$\alpha$ -cells** in the islets of the pancreatic head changes during the postnatal development in male rats. The reason behind these changes is unknown to us; however, it could be due to apoptosis, cell migration, or transdifferentiation from  **$\alpha$ -cells** to **PP cells**. Furthermore, there is no information about what occurs in female rats.

We extracted the pancreas of female and male Wistar's rats of 12, 20, 28 days of postnatal life and adults, then we made histological sections to analyze glucagon and pancreatic polypeptide in the islets with the immunostaining technique.

We found that in the islets of male and female rats, during postnatal development, the  $\alpha$  cell ratio decreased in islets of the pancreatic head, (males,  $6.6 \pm 5.9\%$  to  $0\%$  and female, from  $19 \pm 3\%$  to  $3.66 \pm 1.6\%$ ), until observing the distribution described in adult rats. Regarding the proportion of PP cells, it increased within the islets of the head (male rats from  $2.6 \pm 0.4\%$  to  $12.2 \pm 11.3\%$  and female rats from  $2006 \pm 0.61\%$  to  $13 \pm 6\%$ ).

Furthermore, we identified structural differences in the islets of both regions between male and female rats and differences in how changes in the postnatal development of the rats' pancreas occur. This is an evidence of dimorphism in this event.

## Resumen

El páncreas es una glándula con dos componentes: el exocrino, formado por acinos y conductos, y otro endocrino, formado por islotes pancreáticos ubicados entre el tejido acinar, los cuales representan el 2% del volumen total del páncreas. Los islotes contienen células endocrinas y son: **células  $\beta$**  (insulina), **células  $\alpha$**  (glucagon), **células  $\delta$**  (somatostatina), **células PP** (polipéptido pancreático). Las hormonas secretadas por estas células regulan la homeostasis de nutrientes. El páncreas presenta una cabeza que deriva de un primordio intestinal dorsal; y cuerpo/cola que deriva de un primordio ventral. En investigaciones previas de nuestro laboratorio observamos que la proporción de **células  $\alpha$**  dentro de los islotes de la cabeza pancreática se reduce durante el desarrollo posnatal en ratas macho. Desconocemos la causa de estos cambios, pero podría deberse a apoptosis, migración celular o transdiferenciación de **células  $\alpha$**  a **PP**. Además, no se sabe qué ocurre en las hembras.

Nuestra hipótesis es que durante el desarrollo posnatal de la etapa del destete (día 20) a la edad adulta, la proporción de las **células  $\alpha$**  en los islotes pancreáticos de la cabeza pancreática de ratas hembras mostrarán una disminución respecto al cuerpo cola, a su vez aumentando las células **PP en la cabeza**, similar a lo descrito en islotes de ratas macho.

Para probar lo anterior, extrajimos el páncreas de ratas hembras y machos de la cepa Wistar de 12, 20, 28 días de vida posnatal y adultas, de los cuales se realizaron cortes histológicos para analizar glucagon y polipéptido pancreático en los islotes con la técnica de inmunomarcaje.

Encontramos que en los islotes de ratas macho y hembra, durante el desarrollo posnatal, disminuye la proporción **celular  $\alpha$**  en islotes de cabeza pancreática, (machos,  $6.6 \pm 5.9\%$  a  $0\%$  y hembra, de  $19 \pm 3\%$  a  $3.66 \pm 1.6\%$ ), hasta observar la distribución descrita en ratas adultas. Respecto a la proporción de las **células PP aumenta** dentro de los islotes de la cabeza (ratas macho de  $2.6 \pm 0.4\%$  a  $12.2 \pm 11.3\%$  y ratas hembra de  $2.006 \pm 0.61\%$  a  $13 \pm 6\%$ ).

Por otra parte, un hallazgo importante fue que identificamos diferencias estructurales en los islotes de ambas regiones entre machos y hembras así como diferencias en el tiempo en que ocurren cambios en el desarrollo posnatal del páncreas de ratas, evidencia de un posible dimorfismo de este evento.

## Abreviaturas

ADP: Difosfato de adenosina

Arx: Aristaless-related homeobox, X-linked

ATP: Adenosin trifosfato

DAB: Diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato

GK: Glucocinasa

GLP 1: Peptido parecido al glucagon 1

GLUT 1: Transportador de Glucosa 1

GLUT 2: Transportador de Glucosa 2

GSIS: Secreción de insulina estimulada por glucosa

MPGF: Fragmento mayor de proglucagon

Ngn3: Neurogenina 3

Pax 4: Paired box gene 4

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

PC2: Convertasa de prohormonas 2

Pdx: Homeodominio 1 pancreático y duodenal

PP: Polipéptido pancreático

SNC: Suero normal de cabra

## Introducción

El páncreas es una glándula que presenta dos componentes, el exocrino o acinar, que está formado por acinos y conductos; y el endocrino, compuesto por los islotes pancreáticos ubicados entre el tejido acinar (Shih, Wang, y Sander 2013), que representa el 2% del volumen total (Tsuchitani, Sato, y Kokoshima 2016). Los islotes contienen diferentes células endocrinas, estas son: **células  $\beta$**  secretoras de insulina, **células  $\alpha$** , de glucagon, **células  $\delta$** , de somatostatina, **células PP**, de polipéptido pancreático. Las hormonas secretadas por las células presentes en los islotes regulan la homeostasis de nutrientes (Steiner et al. 2010).

Anatómicamente, el páncreas se divide en: cabeza, ubicada a lado del duodeno; el cuerpo, que se extiende del final de la cabeza hasta cerca del bazo; y la cola, ubicada en la parte final cercana al hilio del bazo (Tsuchitani, Sato, y Kokoshima 2016). Estas regiones derivan de un primordio dorsal (cabeza) y uno ventral (cuerpo/cola) durante el desarrollo embrionario (Gittes 2009). Dicha diferencia en el desarrollo conlleva a cambios en la composición celular de las regiones, tal es el caso de mayor número de islotes pancreáticos en la región cuerpo/cola respecto a la cabeza (Ling et al. 2013; Puri y Hebrok 2010).

Se conoce que la composición celular de los islotes es diferente entre especies (Steiner et al. 2010; Kim et al. 2009). En los murinos adultos, la distribución celular está bien definida dentro del islote (Elayat, el-Naggar, y Tahir 1995), se observan al centro las células  $\beta$  (60-80%) y en la periferia las células  $\alpha$  (15-20%),  $\delta$  (<10%) y PP (<1%), (Kim et al. 2009). Además, los islotes adultos son diferentes entre cabeza y cola del páncreas del mismo individuo, pues se observa que en la porción inferior de la cabeza hay islotes con abundantes **células PP**, que no se observan en el resto del órgano (Park y Bendayan 1992).

En un estudio previo en nuestro laboratorio donde se utilizaron ratas Wistar macho de edades 6, 12, 20, 28 días posnatales y adultos jóvenes, se analizó el porcentaje y la masa de células alfa y beta en los islotes pancreáticos de las diferentes regiones anatómicas del páncreas. Se observó que la proporción de las **células  $\alpha$**  dentro de

los islotes cambia durante el desarrollo posnatal en ratas: del día 6 a la edad adulta la masa **celular  $\alpha$**  aumenta en el cuerpo/cola pancreático; además en la cabeza pancreática, entre los días 6 y 20 las células  $\alpha$  están presentes en los islotes de esta región y para el día 28 disminuyen, mostrando una distribución similar a los islotes en ratas adultas donde ya no se observan estas células (Aguayo-Mazzucato et al. 2006).

En este trabajo, también se observó que alrededor del día 20 posnatal, fecha del destete en el bioterio, existe una resistencia a la insulina fisiológica, con niveles elevados de insulina y glucosa en plasma con respecto a los días posnatales previos (Aguayo-Mazzucato et al. 2006). Es necesario remarcar que el cambio en la dieta de la rata de leche, rica en lípidos, a una dieta omnívora, con un contenido alto de hidratos de carbono, no sucede de manera súbita, en realidad las crías comienzan a ingerir alimentos sólidos alrededor de la segunda semana posnatal y la ingesta de comida sólida aumenta con el tiempo y a su vez disminuye la ingesta de leche (Henning 1981). De manera interesante se observó que al día 28 posnatal, la resistencia a la insulina disminuye y la estructura y función de la célula beta es similar a la observada en adultos (Aguayo-Mazzucato et al. 2006).

Los mecanismos y procesos de maduración del páncreas endocrino aún no se conocen en su totalidad. El período, alrededor del día 20 se considera una ventana crítica del desarrollo (Aguayo-Mazzucato et al. 2006), la cual se define como el período donde el fenotipo tiene respuesta a factores ambientales teniendo como resultado efectos de por vida (Burggren y Mueller 2015). Estas observaciones realizadas en el trabajo citado y la propuesta del destete como una ventana crítica del desarrollo fue un trabajo pionero, pues no existían trabajos similares en ratas (Aguayo-Mazzucato et al. 2006).

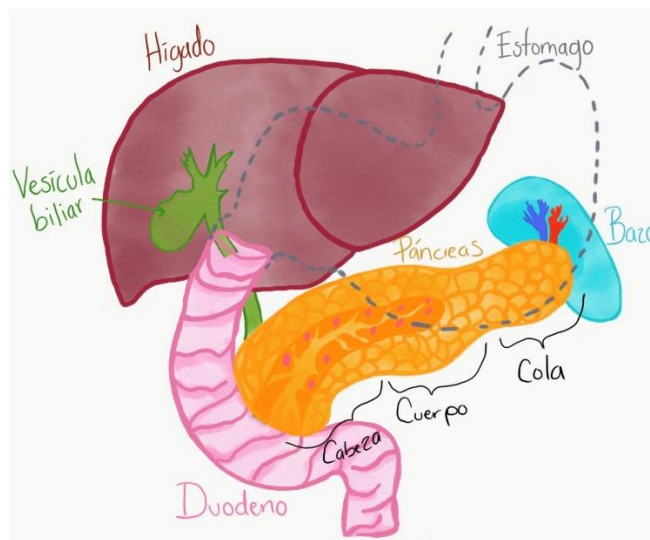
No se conoce la causa de los cambios en la proporción celular  $\alpha$ , pero se han propuesto algunos mecanismos relacionados a este cambio como procesos de apoptosis (Aguayo-Mazzucato et al. 2006), migración celular, incluso a transdiferenciación de **células  $\alpha$**  a **células PP** (Herrera et al. 1991). Estas últimas son el tipo celular menos estudiado (Aguayo-Mazzucato et al. 2006).

## Marco teórico

### El páncreas y el islote pancreático

En los mamíferos encontramos al páncreas dentro de la cavidad abdominal entre el bazo y el duodeno. Este órgano, de secreción mixta, formado por tejido exocrino y endocrino, participa en la homeostasis nutricional a partir de la secreción de enzimas y hormonas (Ben-Othman et al. 2013). El componente exocrino se conforma de acinos que excretan jugo pancreático hacia conductos, a través de los cuales llega al intestino (Jennings et al. 2015). El jugo contiene enzimas que participan en la digestión de proteínas y lípidos (Shih, Wang, y Sander 2013), tales como lipasas, proteasas y nucleasas (Ben-Othman et al. 2013).

El páncreas presenta una capa de tejido conectivo que lo recubre, con abundantes células mesoteliales, se observan tabiques finos que dividen a esta glándula en lóbulos (Olvera-Granados, Leo-Amador, y Hernández-Montiel 2008). Los lóbulos son el esplénico o dorsal, formado por el cuerpo y cola pancreáticos y el lóbulo duodenal o ventral, que es la cabeza del páncreas (Hiriart 2005), (ver Figura 1). Los términos cabeza, cuerpo y cola son utilizados para ubicar las regiones distal y proximal existentes en el páncreas (Slack 1995).

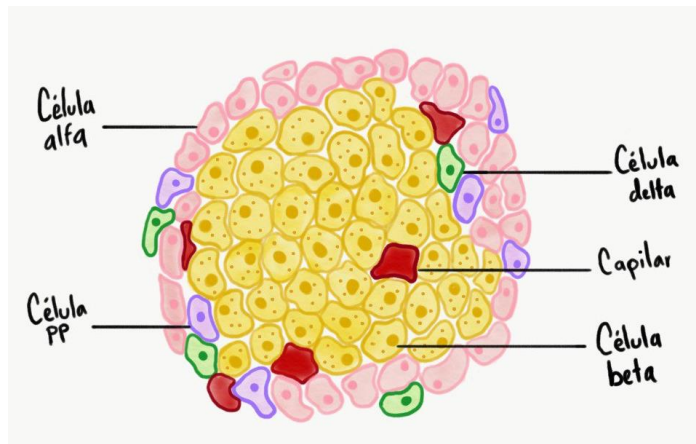


**Figura 1. Anatomía del páncreas maduro.** Esquema representativo de las regiones del páncreas. Imagen modificada de Shih, et al. 2013.

Respecto al tejido endocrino, está formado por los islotes pancreáticos delimitados por tejido conectivo reticular que continúa en el interior de los islotes en menor proporción (Olvera-Granados, Leo-Amador, y Hernández-Montiel 2008). Los islotes tienen un tamaño aproximado de 50 a 500  $\mu\text{m}$  y dentro de estos, podemos encontrar entre 50 a 300 células aproximadamente (Hiriart 2005). Están altamente vascularizados, lo que permite un mejor censo de los niveles de glucosa por las células endocrinas y a su vez asegura una respuesta secretora correcta (Cabrera et al. 2006). Las células que conforman los islotes son 4 tipos de células, las  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y PP que secretan glucagon, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático respectivamente (Collombat et al. 2006), (ver Figura 2). Las hormonas secretadas por estas células entran al torrente sanguíneo y tienen en sus órganos blancos diferentes funciones fisiológicas (Hiriart 2005).

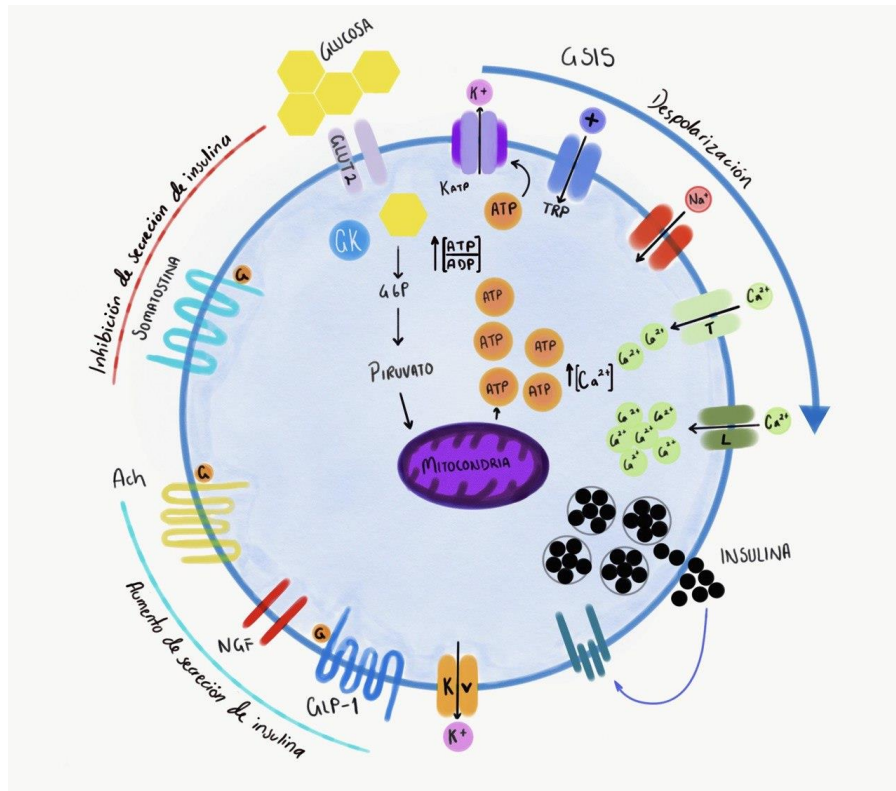
Existen diferencias en la arquitectura del islote entre especies y se ha propuesto que están relacionadas con los requerimientos especiales de cada especie a nivel hormonal (Brereton et al. 2015). No obstante, se observa un patrón en la mayoría de las especies, pues encontramos a las células  $\beta$  como el mayor componente celular presente en los islotes; por ejemplo, en los roedores existen 60 – 80% del total y en humanos se observan del 50 – 70% (Cabrera et al. 2006; Clark et al. 1988; Elayat, el-Naggar, y Tahir 1995; Steiner et al. 2010). Respecto a la distribución celular dentro del islote, en los roedores se observan a las células  $\beta$  al centro del islote, al resto de las células las observamos en la periferia y en menores proporciones de la siguiente forma: las  $\alpha$  representan un 20%, las  $\delta$  un 5% y, en menor proporción, cerca de un 2% a las células PP, que encontramos en su mayoría en los islotes ubicados en la porción inferior de la cabeza del páncreas (Slack 1995; Hiriart 2005).

En conjunto las hormonas secretadas por el islote participan fundamentalmente en la homeostasis de glucosa y el metabolismo celular. La insulina es secretada por las células  $\beta$  en respuesta a los cambios de concentración de glucosa; también tiene otros secretagogos como aminoácidos y grasas, neurotransmisores, hormonas y fármacos. Los principales órganos y tejidos blanco de esta hormona son el hígado, el músculo y el tejido adiposo (Hiriart et al. 2015), aunque hay receptores a esta hormona en todos los tejidos.



**Figura 2. Islote pancreático de rata.** En la imagen está representada la estructura y distribución celular dentro del islote pancreático de rata. Modificada de Hiriart 2005.





**Figura 3. Secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas.** La secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) depende de la activación de canales iónicos que se encuentran en la membrana celular. Modificado de Hiriart et al. 2015.

El mecanismo de secreción de insulina estimulado por glucosa (Ver figura 3) es el más estudiado; en condiciones de ayuno la concentración de glucosa es cercana a 5 ó 6 mM y el potencial de membrana de la célula es alrededor de -70 mV. Después de consumir alimentos, conocido como período postprandial, los niveles de glucosa aumentan sobre 7mM y ésta es transportada al interior de la célula  $\beta$  a través de los transportadores de glucosa GLUT2 en roedores o GLUT1 en humanos, en seguida la glucosa es fosforilada a glucosa 6 fosfato por la enzima glucocinasa (GK), (Prentki y Matschinsky 1987; M, Fm, y Sr 2013). La glucosa fosforilada entra a la ruta de la glucólisis, la cual tiene como producto final al piruvato, el cual es transportado al interior de la mitocondria donde continúa su oxidación atravesando por las rutas del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, lo que resulta en una aumento de la tasa ATP/ADP. Este incremento produce el cierre de los canales de potasio sensibles a

ATP ( $K_{ATP}$ ), los cuales regulan el potencial de membrana en reposo (Dunne y Petersen 1986; Dean y Matthews 1968).

La reducción del flujo hacia el exterior de los iones potasio y la actividad basal de los canales catiónicos no selectivos TRP producen una despolarización lenta de la membrana, hasta alcanzar el umbral de activación de los canales de sodio dependientes de voltaje y de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo T, que aumentan la despolarización de la membrana (Hiriart y Aguilar-Bryan 2008).

Cuando el potencial de membrana alcanza un valor de -20 mV, los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L se abren y entra calcio, como son los de más alta conductancia, se incrementa la concentración citoplasmática de iones de calcio, lo que estimula la exocitosis de gránulos que contienen insulina (Hiriart y Aguilar-Bryan 2008). Finalmente, en el proceso de repolarización de la membrana, participan los canales de potasio dependientes de voltaje y de canales dependientes de potasio sensibles a calcio (Rorsman y Ashcroft 2018).

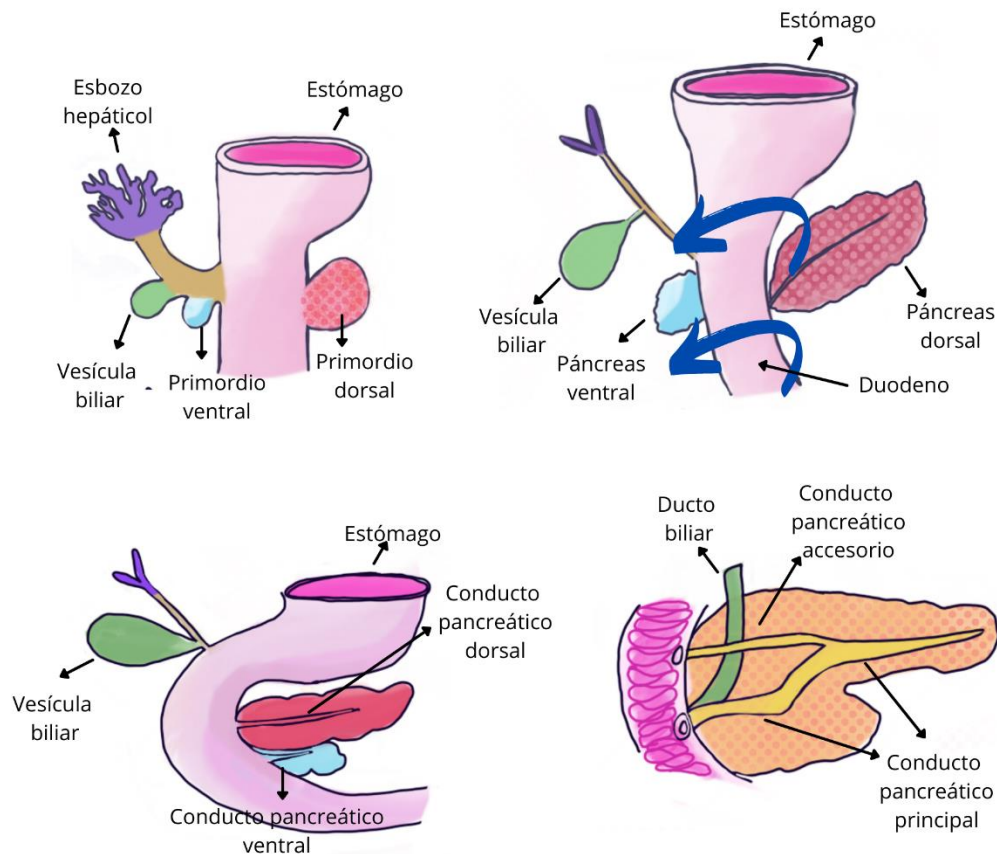
### Desarrollo del páncreas y el islote pancreático

Respecto a la formación del páncreas en la etapa embrionaria corresponde a una sucesión de eventos cronológicos altamente coordinados, puesto que todas las células del páncreas exocrinas, ductales y endocrinas tienen un origen común: provienen de células endodérmicas que se encuentran en la región duodenal superior (Gu, Dubauskaite, y Melton 2002). Los datos que a continuación se describen corresponden a lo descrito en roedores (ratas y ratones).

La morfogénesis del páncreas se puede subdividir en dos oleadas superpuestas de desarrollo conocidas como transición primaria y secundaria (ver Tabla 1). La transición primaria inicia con la evidencia inicial de la existencia del páncreas en roedores, lo que ocurre alrededor del día 9.5 E y en el caso de los humanos, en el día 26 E. En estos días, cuando en ambos organismos emergen dos yemas en lados opuestos del epitelio intestinal, una yema ventral y una dorsal, que contienen cientos de células (Shih, Wang, y Sander 2013).

Las yemas resultantes son distintas y asincrónicas debido a su posición respecto al endodermo, pues cada una recibe señales de los tejidos que las rodean (Jensen et al. 2000). La yema dorsal se desarrolla primero y está ubicada cerca de la notocorda y el intestino dorsal. Durante el desarrollo, se fusionan las aortas izquierda y derecha, las cuales son vesículas embriológicas que darán lugar a la formación de la aorta descendente, lo cual resulta en la separación de la yema dorsal y la notocorda, así como del intestino dorsal (Pictet et al. 1972). Cerca de 12 horas después de la formación de la yema dorsal en los murinos, comienza a surgir la yema ventral a partir de la región caudal de la evaginación hepática/biliar (Jensen et al. 2000). Aunque ambas yemas tienen un proceso de desarrollo morfológico similar, existen diferencias marcadas en el control molecular (Gittes 2009).

A continuación, las yemas crecen a lo largo del duodeno y estómago siguiendo un patrón de ramificación de la zona apical de la yema y se fusionan en un solo órgano alrededor del día 15 E en las ratas (Pictet et al. 1972), (ver figura 4). Los ductos pancreáticos surgen como resultado de la rotación del intestino y la elongación de la rama ventral y dorsal (Gittes 2009). De forma simultánea, ocurre un proceso de proliferación celular que aumenta el tamaño de las yemas pancreáticas, las cuales cambian a una forma tubular ramificada por un proceso denominado morfogénesis branquial (Pictet et al. 1972). Además, en esta etapa, el epitelio pancreático se encuentra rodeado por células mesenquimales (Shih, Wang y Sander 2013).



**Figura 4. Desarrollo embrionario del páncreas.** Los primordios dorsal y ventral se fusionan para formar a la glándula completa alrededor del día 15E en las ratas. Modificada de Sadler 2019.

En el caso específico de las ratas, se ha descrito que la transición secundaria ocurre a partir del día 15.5 E a la fecha de nacimiento en las ratas, el epitelio pancreático sigue creciendo y la ramificación aumenta, por lo que se convierte en una red tubular más compleja y ordenada. Durante esta fase se encuentran, además de las numerosas células positivas a glucagon, otras células endocrinas, especialmente las células  $\beta$  las cuales aumentan en gran cantidad (Gittes 2009). Además, se observan células acinares y ductales, acompañado de un aumento en la expresión de genes relacionados con enzimas acinares, el desarrollo de retículo endoplásmico rugoso y la formación de gránulos de zimógenos. Los niveles de insulina aumentan 300,000 veces entre el día 12 E y 20 E en las ratas, en comparación con un aumento de 1000 veces en el número de células beta (Pictet et al. 1972).

A diferencia de la insulina, la presencia del glucagon es temprana y se encuentra en concentraciones altas, aproximadamente 1000 veces más que la concentración de insulina. A medida que el páncreas crece, la concentración de glucagon disminuye (Pictet et al. 1972). Al final de la transición secundaria, el páncreas muestra una organización celular similar a la de un páncreas maduro, donde encontramos acúmulos de células acinares ubicadas cerca a la red ductal, además de agregados dispersos de células endocrinas por todo el órgano (Shih, Wang, y Sander 2013).

Tabla 1. Desarrollo del páncreas de rata. Modificado de Jensen 2004

	<b>Etapa - Día embrionario</b>	<b>Evento</b>	<b>Cambio morfológico</b>	<b>Regulación genética</b>
<b>Transición primaria</b>	Gastrulación (E6.5 - E7.5)	Formación capas germinativas	Formación de mesodermo y endodermo	Foxa2 en endodermo
	6-10 somitas (E10-E10.5)	Determinación y transición primaria	Intestino primitivo aplanado. Páncreas no visible. Contacto del endodermo con notocorda.	Isl1 expresado en mesénquima dorsal
	10-20 somitas (E 10.5-11)	Rotación del embrión	Cierre del tubo digestivo. Formación de aorta dorsal. Movimiento ventral del endodermo. Células del mesodermo forman el mesodermo esplácnico.	Isl1 e Isl2 en mesodermo. Activación de Pdx1. Expresión de HlxB9
	20-25 somitas (E11-11.5)	Protusión	Engrosamiento de las paredes dorsales y ventrales del intestino seguido por la protrusión dorsal. Mesodermo pancreático se acumula dorsalmente.	Activación Nkx6.1. Acúmulos de células positivas a glucagon. Expresión de ngn3

	26-30 somitas (E11.5)		Acumulación de mesodermo en la parte izquierda del intestino primitivo genera asimetría. Se estrecha la base de la protusión dorsal. Aparece protrusión ventral cerca de la protusión hepática.	Pitx2 involucrado en determinar derecha/izquierda del intestino primitivo.
	>30 somitas (E12-E12.5)		Continúa evaginación epitelial. Inicia ramificación. Índice de mitosis máximo en mesénquima. Inicia la invasión (50 somitas).	NeuroD, Ptf1a se expresan. Epitelio expresa E-cadherina y beta-catenina.
	E14	Ramificación visible	Separación de mesénquima y epitelio.	Hnf6 en el epitelio
	E15.5		Expresión baja de marcadores terminales como insulina, amilasa y CPA. Fusión del páncreas dorsal y ventral. Porcentaje alto de mesénquima que disminuye gradualmente por crecimiento epitelial. Vascularización.	Pax6 y NeuroD esparcidas. Notch 1,2, Hes1 en el epitelio.
Transición secundaria	E15	Transición secundaria	Diferenciación terminal de células beta y compartimientos exócrinos. Aparecen gránulos de zimógenos. Aparición esparcida de células beta maduras.	>100 veces la expresión de insulina y genes exócrinos. Pdx1, Nkx6.1, Nkx2.2 se restringen a células beta. Activación de Pax4. Pico de expresión de ngn3.
	E17-21	Isletogénesis	Células endocrinas se agregan en islotes, se alcanza la ultraestructura del páncreas exocrino.	Aparición de células delta (aprox. E15) y de células PP

			Órgano funcional al nacimiento.	
	P1-P30	Crecimiento	Incremento en masa de tejido. El alto porcentaje de células endocrinas en la fase posnatal tardía es sustituido por tejido conectivo el cual crece masivamente en este período y se organiza en acinos compactos.	Activación de tripsina y CPB (P1)

Respecto a las células endocrinas, éstas expresan un factor de transcripción llamado Neurogenina-3, que es necesario para definir a la población celular que se desarrollará como células endocrinas durante el proceso de desarrollo pancreático (Gu, Dubauskaite, y Melton 2002). Inicialmente encontramos a las células endocrinas dispersas entre el tejido acinar sin llegar a formar islotes y se encuentran en contacto con el lumen. Las células endocrinas pierden el fenotipo epitelial a través de la regulación a la baja del gen *pdx1* y pierden dicho contacto con el lumen y las células epiteliales. En los días siguientes, las células endocrinas se distribuyen a lo largo de los conductos y los vasos sanguíneos en un patrón lineal (Gittes 2009).

Existe una secuencia en la expresión de genes en las células endocrinas; el primer gen en expresarse es el gen proglucagon Gcg, seguido del gen de insulina el cual se expresa hasta la transición secundaria (Pictet et al. 1972) después somatostatina y finalmente el de polipéptido pancreático (Herrera 2000). Aun cuando las células positivas a glucagon son las primeras en ser observadas durante el desarrollo, se ha descartado que den origen a las células  $\beta$  (Herrera 2000).

Después de unos días, estas células que inicialmente se encontraban distribuidas de manera lineal se redistribuyen en agregados formando así los islotes pancreáticos (Gittes 2009).

Respecto a la grelina secretada por las células  $\epsilon$ , existe muy poca información debido a que la mayor secreción de esta hormona proviene de la mucosa gástrica

y la presencia de células  $\epsilon$  en el páncreas es prácticamente nula. De acuerdo a estudios previos se sabe que la grelina está presente en etapas fetales y en los primeros días después del nacimiento tanto en humanos como en murinos (Wierup et al. 2002).

### Las células alfa

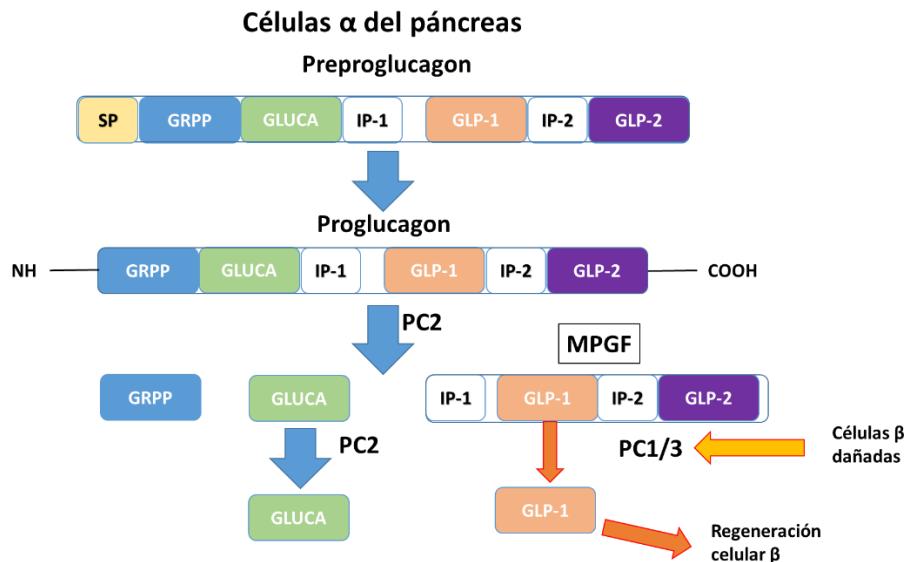
Dentro del islote de rata encontramos a estas células, que representan cerca del 20% del total de células, además que se localizan en la periferia del islote (Hiriart 2005). La primera evidencia de la existencia de las células  $\alpha$  pancreáticas la encontramos en 1923. Banting y Best observaron que al administrar el extracto total de páncreas para el tratamiento de animales y personas con diabetes, el efecto no era el esperado. Los niveles de glucosa no disminuían, en realidad aumentaban. Tiempo después, se dilucidó que esto sucedía por las acciones de una hormona que resultó ser el glucagon (Murlin et al. 1923). Sin embargo, fue hasta 1948 que se identificó a las células  $\alpha$  como las secretoras de glucagon (Sutherland y De Duve 1948) y se localizaron receptores para esta hormona en tejido hepático y no hepático, incluyendo a los islotes (Dunphy, Taylor, y Fuller 1998).

Morfológicamente una célula  $\alpha$  presenta cerca de 7000 gránulos de glucagon (Barg et al. 2000) que son vesículas densas, algunas de ellas con un halo pálido opaco a los electrones al ser observados con microscopía electrónica (Deconinck, Potvliege, y Gepts 1971), con un tamaño de aproximadamente 200 nm (Göpel et al. 2004).

Respecto al glucagon, se trata de una hormona antagonista de la insulina y tiene un efecto catabólico, pues estimula la producción de glucosa hepática en períodos de ayuno, activando la gluconeogénesis y la glucogenolisis que resulta en un aumento de la producción hepática de glucosa lo que contrarresta la hipoglucemia de ese período (Quesada et al. 2008). En condiciones postprandiales, la secreción de glucagon se ve disminuida. Este control sucede a nivel transcripcional, en el que la insulina regula a la baja la expresión del gen de glucagon (Philippe, Morel, y Cordier-Bussat 1995).



Como se observa en la figura 5, el glucagon es sintetizado a partir del preproglucagon, un precursor con 178 aminoácidos y en su estructura madura tiene 29 aminoácidos. Aunque el glucagon es producido por las células  $\alpha$  y en menor medida en el estómago, podemos encontrar al preproglucagon en las células L-del intestino y células del sistema nervioso central (Kieffer y Francis Habener 1999). El procesamiento postraduccional de esta prohormona da origen a diferentes péptidos tales como glucagon, GLP1 (péptido similares a glucagon 1) y GLP2 (péptido similares a glucagon 2) y depende completamente del tejido en el que se encuentra (Mojsov et al. 1986).



**Figura 5. Mecanismo de maduración de proglucagon en el islote.** La producción de glucagon inicia con el preproglucagon del cual se escinde el péptido señal (SP) en el retículo endoplásmico de la célula. El proglucagon se ancla a la convertasa de prohormonas 2 (PC2) resultando en la producción de glucagon (GLUCA) y de polipéptido pancreático relacionado con la glicentina (GRPP), mientras que los péptidos similares a glucagon (GLPs) y los péptidos intervinientes 1 y 2 (IP 1 e IP2), se quedan en el fragmento mayor de proglucagon (MPGF) inactivo. Se han observado señales paracrinas de la célula  $\beta$  en condiciones de daño que activan la convertasa de prohormonas 1/3 en células  $\alpha$  no maduras, permitiendo la producción de GLP-1. Se ha identificado un rol importante de GLP-1 en la regeneración de las células  $\beta$ . (Modificado de Stanojevic y Habener 2015)

El procesamiento postraduccional del preproglucagon ocurre a través de la acción de las convertasas de prohormonas (PC) conocidas como PC2 y PC1/3 (Mojsov

1986). No obstante, estas PCs son diferentes dependiendo del tipo celular. En el caso de las células  $\alpha$  pancreáticas, la convertasa presente es la PC2 que favorece la producción de glucagón, como se muestra en la figura 5 (Dey et al. 2005). Además de glucagón se ha detectado una producción mínima de GLP1 por parte de las células  $\alpha$  en situaciones como hiperplasia de células  $\alpha$  y diabetes, entre otras (Stanojevic y Habener 2015).

### Las células PP

De todas las células presentes en el islote pancreático, las células PP corresponden a las de menor proporción; por ejemplo, en el islote de las ratas representan aproximadamente <5%, mientras que en los islotes de humanos se sabe que son <2% (Clark et al. 1988; Stefan et al. 1982; Sundler, Håkanson, y Larsson 1977). Dichas células son secretoras de polipéptido pancreático, el cual tiene 36 aminoácidos. Este péptido fue identificado por primera vez en 1974 en el páncreas de aves (Kimmel, Hayden, y Pollock 1975; L.-I. Larsson, Sundler, y Håkanson 1975), después fue identificado en mamíferos en células totalmente distintas de las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  (L.-I. Larsson, Sundler, y Håkanson 1975; Tm y Re 1974).

Las células PP presentan una morfología alargada y una distribución particular dentro del islote que depende de la especie descrita; en las ratas se observan en la periferia del islote entre las células  $\alpha$  y  $\delta$ ; en cambio, en los humanos, las células PP están alineadas con los capilares del islote (Brereton et al. 2015). Estas células presentan gránulos secretores unidos a la membrana, los cuales son heterogéneos en tamaño a diferencia de los presentes en las células  $\alpha$  (Holzer, Reichmann, y Farzi 2012).

A su vez los islotes que presentan células PP se encuentran mayoritariamente en la cabeza del páncreas (Rahier et al. 1983; Stefan et al. 1982; Wang et al. 2013), en las ratas, los islotes ricos en células PP están ubicados en el lóbulo que está unido al duodeno y al conducto biliar (Rahier et al. 1983; Stefan et al. 1982). Una característica particular de los islotes ubicados en la cabeza pancreática es que

contienen un número nulo o reducido de células  $\alpha$  (Hellman, Wallgren, y Hellerström 1962).

Se desconoce el papel específico del polipéptido pancreático o como interactúa dentro del islote, no obstante, se considera como un elemento importante en el eje páncreas - intestino - cerebro (Holzer, Reichmann, y Farzi 2012), pues en conjunto al aumento del tono vagal, elevación de la glucosa plasmática y la distensión gástrica, se activa a los receptores Y5 del páncreas y Y4 de las neuronas del tronco encefálico y del hipotálamo, dos áreas del cerebro relacionadas con la regulación del apetito, sin embargo, se desconoce la vía de regulación (Batterham et al. 2003). Estos receptores se sabe que median la acción de PP, entre otros péptidos y son miembros de los receptores acoplados a proteínas G, que como respuesta degradan adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) induciendo respuestas inhibitorias (Giménez Palop y Caixàs 2009). Además se propone que el PP podría estar regulado por agentes colinérgicos, y bloqueado por inhibidores colinérgicos, o sea está regulado de manera local por la red nerviosa entérica (Field, Chaudhri, y Bloom 2010; Schwartz 1983).

También ha sugerido que el PP puede tener participación en el metabolismo y la expresión de grelina gástrica, así como de otros péptidos hipotalámicos (Tm y Re 1974; Adrian et al. 1982; Hazelwood 1993; Asakawa et al. 2003).

### Posible transdiferenciación de células alfa a PP

En los tejidos, encontramos que las células presentan una identidad estable la cual es una característica resultante de un proceso de diferenciación. La estabilidad celular depende de la regulación genética, así como por mecanismos epigenéticos, que permiten que existan patrones de expresión génica específica respecto a los tejidos de los cuales forman parte y a su vez ésta estabilidad es heredable, en las células lo que resulta en tejidos funcionales (Holliday 2006).

No obstante, existen ejemplos en la naturaleza que evidencian que existen condiciones bajo las cuales la identidad de una célula puede ser alterada. En 1962, Gurdon describió por primera vez que algunas células totalmente diferenciadas

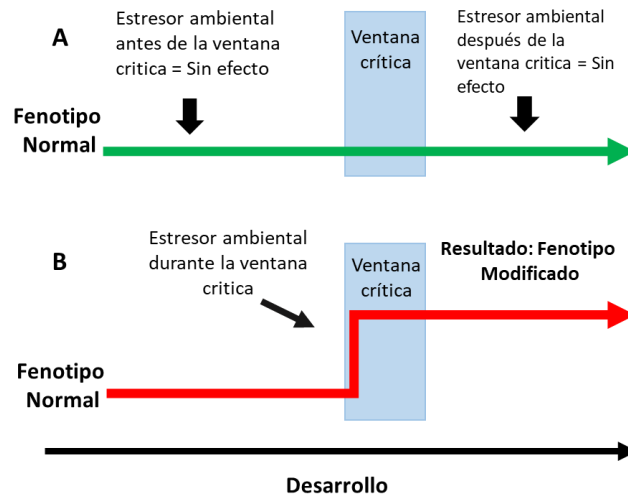
adquirían las propiedades de células con alto nivel de plasticidad celular, similares a las células troncales (Gurdon 1962). A partir de estas observaciones, se clasificó a esta plasticidad celular en dos categorías principales: desdiferenciación y transdiferenciación (Raff 2003). La primera se refiere a una reversión de una célula diferenciada a una célula similar a la célula desdiferenciada; en cuanto a la transdiferenciación, se trata de células maduras de un tipo que se convierten a otro distinto (Jopling, Boue, y Belmonte 2011).

De acuerdo a estudios previos, se han identificado ambos fenómenos en el páncreas. Por ejemplo, las células  $\alpha$  pueden transdiferenciarse a células  $\beta$  ante una disminución extrema de células  $\beta$  (Thorel et al. 2010). En cuanto al proceso de desdiferenciación también lo encontramos en las células  $\beta$ , las cuales pueden regresar a un estado similar a células troncales las cuales después adquieren un fenotipo similar a las células  $\alpha$  (Talchai et al. 2012).

Los casos antes descritos en el páncreas ocurren en un ambiente patológico, sin embargo, el mecanismo de transdiferenciación se ha propuesto como parte de los mecanismos que forman parte del proceso de desarrollo embrionario en condiciones normales. La idea surge de un evento particular respecto a las células endocrinas; desde etapas tempranas del desarrollo es posible localizar a la hormona glucagon (Rall et al. 1973). Sumado a esto, algunos trabajos sugieren que existe colocalización de glucagon y otras hormonas en células endocrinas (Rall et al. 1973; Alpert, Hanahan, y Teitelman 1988; Herrera et al. 1991). Por ello, se ha propuesto que es a partir de las células  $\alpha$  derivan el resto de células endocrinas (Herrera 2000).

### Ventanas críticas del desarrollo

En la fisiología comparativa, las ventanas críticas del desarrollo se definen como el período durante el cual el desarrollo normal es vulnerable a factores externos e internos, los cuales resultan en cambios permanentes (Burggren 1998; Nijland, Ford, y Nathanielsz 2008; Loebrich y Nedivi 2009) y pueden traducirse en afecciones en algún órgano o bien en procesos metabólicos (Ver Figura 6).



**Figura 6. Representación gráfica de las ventanas críticas del desarrollo y sus consecuencias. Modificado de Burggren y Mueller 2015.**

Un ejemplo en concreto es la predisposición a la diabetes y a la obesidad; diferentes estudios han establecido una relación entre estas enfermedades y eventos ocurridos durante ventanas críticas en el desarrollo fetal o en la infancia temprana que afectan directamente al tejido endocrino pancreático. Esto se observó en un estudio realizado con crías de rata de 4 días posnatales, las cuales fueron alimentadas por 20 días con sustituto lácteo con alto contenido en hidratos de carbono (HC) o alto contenido en lípidos (que imita a la leche materna de rata). Al grupo que fue alimentado con la fórmula alta en carbohidratos, en la etapa adulta desarrollaron hiperinsulinemia, la cual afecta la lipogénesis y a su vez conlleva a la obesidad (Hiremagalur et al. 1993).

Además la hiperinsulinemia en condiciones de obesidad está relacionada con dos eventos en el páncreas: la hiperplasia y la hipertrofia (L. Larsson, Boder, y Shaw 1977; Shino et al. 1973). Las investigaciones que han demostrado este fenómeno establecen que cuando las crías de rata son alimentadas con dietas hipercalóricas después del destete, la masa celular  $\beta$ , así como el contenido pancreático de insulina, aumentan comparadas con las ratas control. Teniendo en cuenta que en esa generación de ratas presentan hiperinsulinemia, obesidad e intolerancia a la glucosa, los efectos no se restringen únicamente a esta generación, sino que puede

ser transmitida a la siguiente generación a través de las ratas hembras sin importar que exista un cambio a una dieta normal probablemente por un mecanismo epigenético (Laychock, Vadlamudi, y Patel 1995; Vadlamudi, Kalhan, y Patel 1995).

Además, en el caso particular del páncreas de rata, el desarrollo del tejido endocrino de este órgano ocurre en etapas fetales tardías y en etapas neonatales (James Petrik et al. 2001). Algunos de los eventos que forman parte del desarrollo del tejido endocrino son: la replicación celular y muerte celular programada. Ésta última ocurre aproximadamente en las 2 primeras semanas de la vida posnatal (Finegood, Scaglia, y Bonner-Weir 1995; J. Petrik et al. 1998; Scaglia et al. 1997). Por esta razón es que presenta una ventana crítica susceptible a cambios en la dieta (James Petrik et al. 2001).

### Dimorfismo sexual

Existen diferencias a nivel morfológico y fisiológico que caracterizan y diferencian a los dos sexos de una misma especie, a esto se le conoce como dimorfismo sexual. Están presentes desde etapas tempranas del desarrollo debido a factores genéticos y señales hormonales que continúan aun después de la pubertad (Mauvais-Jarvis, Arnold, y Reue 2017). Las diferencias existentes entre machos y hembras son resultado de 3 eventos: 1) el número y tipo de cromosomas sexuales; 2) la testosterona en etapa perinatal con efectos en el aparato reproductor y la organización de circuitos neuronales; y 3) la actividad de las hormonas gonadales después de la pubertad (Gannon et al. 2018).

No obstante, el dimorfismo sexual no ha sido considerado como un parámetro dentro de la mayoría de los trabajos de investigación a pesar de conocer las diferencias en la homeostasis de glucosa entre sexos. En humanos se ha establecido que las mujeres normoglucémicas presentan concentraciones de glucosa en plasma menores, glucosa plasmática más altas después de 2 horas de la prueba de tolerancia oral a glucosa (Sicree et al. 2008) y mayor sensibilidad a la insulina que los hombres (Nuutila et al. 1995). A pesar de ello, los estudios realizados en células  $\beta$  de roedores se enfocan en mayor parte en las ratas macho

debido a que tienen un fenotipo más acentuado respecto a la diabetes mellitus (Gannon et al. 2018).

Otra característica que difiere entre machos y hembras es la composición celular de los islotes pancreáticos de una misma especie. Tal es el caso de los pollos macho, cuyos islotes ubicados en la región ventral del páncreas tienen una mayor masa celular  $\beta$  respecto a los pollos hembra y los pollos hembra y, a su vez tienen islotes con células endocrinas combinadas en el lóbulo esplénico del páncreas, algo que no sucede en pollos macho (Parchami y Kusha 2015). También podemos encontrar estas diferencias en humanos, donde a partir de biopsias se describió que las mujeres tienen un 6% en promedio más células  $\beta$  que los hombres (Marchese et al. 2015).

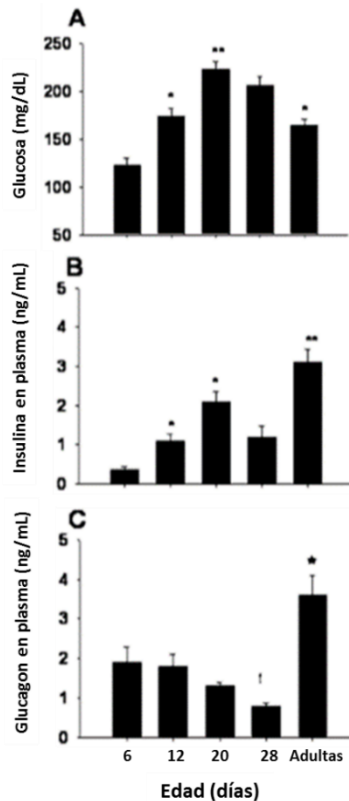
Por lo anterior, surge la necesidad de realizar estudios con un enfoque más amplio, considerando al dimorfismo sexual como parte de las variables de estudio.

## Marco teórico

En un trabajo de investigación realizado previamente en nuestro laboratorio, analizaron la maduración funcional de los islotes pancreáticos, así como los cambios morfológicos de éstos mismos durante el primer mes de vida de la rata. Este período fue descrito como una ventana crítica del desarrollo pues ocurren varios cambios o procesos biológicos como el nacimiento, la lactancia, el destete que conlleva a un cambio en la dieta de estos animales: inicialmente, tienen una alimentación que se basa en leche materna rica en lípidos; una vez que ocurre el destete, su dieta es exclusivamente omnívora y el contenido de carbohidratos es mayor. Todos estos procesos biológicos antes mencionados son fuerzas impulsoras de la maduración funcional del páncreas (Aguayo-Mazzucato et al. 2006).

En este trabajo utilizamos ratas macho de 6, 12, 20, 28 días posnatales, así como ratas adultas jóvenes (2 meses). Dentro de los hallazgos obtenidos en ese trabajo, observaron que los niveles de glucosa iban aumentando hasta el día 20 posnatal, a partir de ese día hasta la edad adulta estos niveles disminuyeron (ver figura 7). Algo similar ocurre con los niveles de insulina total: para el día 20 posnatal llegaron a una concentración máxima y fueron disminuyendo, al día 28 ya eran valores similares a los encontrados en adultos, como observamos en la figura 6. Respecto a la concentración de glucagon, éste fue disminuyendo progresivamente del día 6 al día 28 posnatal, como podemos observar en la figura 6C.

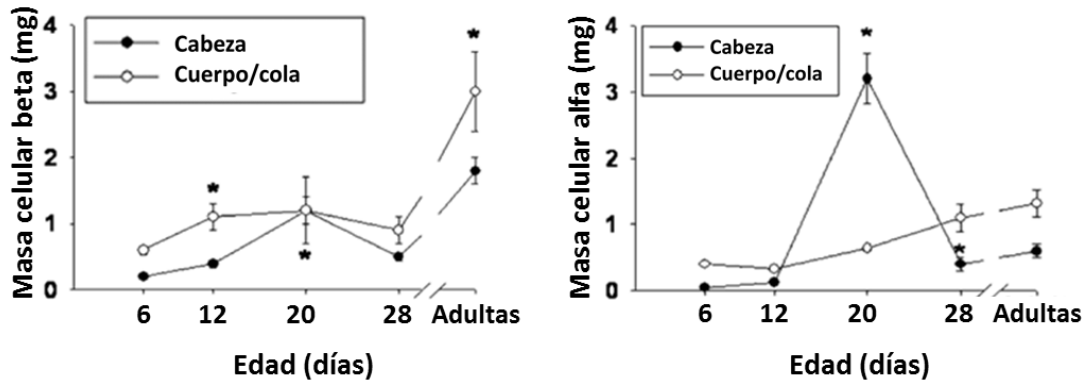




**Figura 7. Niveles de glucosa, glucagon e insulina en diferentes edades en ratas macho Wistar.** Se muestran las edades de 6, 12, 20, 28 posnatales y adultas. Modificado de Aguayo-Mazzucato et al. 2006.

Para saber si existía una relación entre la composición celular del islote y los cambios en las hormonas estudiadas (glucagon e insulina), se realizaron inmunohistoquímicas para analizar a la población celular  $\alpha$  y  $\beta$  presentes en los islotes del páncreas, ubicados en la cabeza o en el cuerpo y cola pancreáticos. Respecto a la masa celular  $\beta$ , encontraron que ésta aumenta del día 6 al 20, tanto en islotes que se encuentran en la cabeza pancreática como en el cuerpo-cola pancreático, hasta alcanzar los valores observados en adultos, como se muestra en la figura 8.

En cuanto a la población celular  $\alpha$ , observaron que en el cuerpo y cola del páncreas aumenta del día 6 a la edad adulta. Respecto a la cabeza se observó un aumento de esta masa celular del día 6 al 20; sin embargo, para el día 28 disminuyó drásticamente y muestra valores similares a los de los adultos (ver figura 7).



**Figura 8. Cambios en la masa celular alfa y beta en las diferentes regiones pancreáticas de ratas macho Wistar.** Se muestran los cambios respecto a las edades de 6, 12, 20, 28 y adultas. Modificado de Aguayo-Mazzucato et al. 2006.

Los cambios en la masa celular  $\alpha$  y  $\beta$  descritos durante la etapa de destete en condiciones normales de desarrollo indican que se trata de una ventana crítica (Aguayo-Mazzucato et al. 2006). Además, las observaciones sobre cambios estructurales durante el desarrollo, muestran dos patrones distintos entre la cabeza y el cuerpo-cola pancreáticos, lo cual podría estar relacionado con su origen embriológico distinto (Slack 1995).

### Planteamiento del problema

Los islotes de ratas macho durante el desarrollo posnatal muestran diferencias en la proporción de **células  $\alpha$**  entre la cabeza y cuerpo/cola; esto no se observa en adultos, en los que las **células  $\alpha$**  se encuentran únicamente o mayoritariamente en islotes ubicados en el cuerpo y cola pancreáticos. En el presente trabajo se investigó si esta diferencia se presenta también en las hembras, y se analizó la presencia y localización de células PP a diferentes edades.

### Hipótesis

Durante el desarrollo posnatal alrededor de la etapa del destete (día 20) a la edad adulta, la proporción de las **células  $\alpha$**  en los islotes pancreáticos de ratas hembra mostrarán una disminución en la cabeza pancreática respecto al cuerpo cola,

aumentando las células **PP** en la cabeza, de manera similar a lo observado en los islotes de las ratas macho.

### Objetivo general

Evaluar la distribución y proporción de las **células  $\alpha$**  y **PP** de islotes en cabeza y cuerpo/cola del páncreas de rata, durante el desarrollo posnatal en hembras y machos.

### Objetivos particulares

En ratas hembras y machos de 12, 20, 28 días de vida posnatal y adultas de 2 meses:

1. Medir la proporción de área inmunorreactiva de glucagon y polipéptido pancreático presentes en islotes ubicados en dos regiones del páncreas cabeza y cuerpo/cola.
2. Comparar las áreas inmunorreactivas de  **$\alpha$**  y **PP** entre machos y hembras.

### Diseño experimental

#### Modelo biológico

Para este proyecto se utilizaron ratas, hembras y machos, de la cepa *Wistar* con edades de 12, 20, 28 días de vida posnatal y adultas, en condiciones de bioterio, esto es 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y con agua y comida *ad libitum*. Estas ratas fueron destetadas alrededor del día 20 posnatal. Todos los procedimientos en animales fueron realizados de acuerdo con las reglas del Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (**CICUAL**) del Instituto de Fisiología Celular, UNAM (**Número de protocolo: MHU269-15**).

#### Dissección del páncreas

Para la obtención del páncreas, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (40 mg/kg). Una vez obtenido el páncreas se dividió en cabeza y cuerpo/cola. Cada sección fue pesada y registrada en bitácora.

Las ratas después fueron sacrificadas por dislocación cervical.

### Cortes en parafina

El tejido extraído fue fijado en paraformaldehído al 4% en PBS durante 24 h a temperatura ambiente, después fue deshidratado en alcohol e incluido en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor en microtomo. Se realizaron 4 laminillas de la cabeza pancreática y 4 laminillas del cuerpo-cola pancreática. Éstas se realizaron de la siguiente forma: dos laminillas consecutivas con dos cortes cada una, desechando 200 µm del tejido y realizando 2 laminillas más consecutivas con dos cortes cada una.

### Inmunohistoquímicas en tejido en parafina

Se utilizaron los cortes en parafina para inmunofluorescencias triples, evaluando tanto a las células  $\alpha$ ,  $\beta$ , PP, así como los núcleos. Las laminillas fueron enumeradas del 1 al 4, las correspondientes a los números 1 y 3 se evaluaron a las células  $\beta$  y pp. En cuanto a los números 2 y 4 se evaluaron a las células  $\alpha$  y  $\beta$ . En todos los casos se tiñeron a los núcleos con DAPI.

Para realizar las inmunofluorescencias e inmunohistoquímicas, los cortes se desparafinaron en un horno a 60°C durante 15 minutos y después se rehidrataron con Xilol y alcohol en concentraciones decrecientes (Xilol, 100%, 98%, 85%, 70% y 50%). El tejido fue permeabilizado con solución perforante bloqueadora, la cual contiene tritón X-100 al 0.3%, suero normal de cabra (SNC) al 2% en solución salina de fosfatos 1X durante 45 min, a temperatura ambiente.

A continuación, se incubaron los anticuerpos primarios contra insulina y glucagon o insulina y polipéptido pancreático durante la noche a 4°C en cámara húmeda. La titulación de los anticuerpos fue: insulina 1:5000 (cobayo), polipéptido pancreático 1:100 (cabra Pancreatic Polypeptide/PP Antibody NB100-1793 Novus Bio) y glucagon 1:500 (ratón, monoclonal anti-glucagon Clone K79bB10 G 2654, Sigma).

Para la detección del anticuerpo primario de insulina, se utilizó un anticuerpo secundario anti-cobayo biotinilado (1:100) por 1 hora y 30 minutos. Después del

tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X, en seguida se incubó el complejo avidina-biotina durante 1 h a temperatura ambiente, la marca inmunorreactiva fue revelada con diaminobenzidina.

En el caso del glucagon fue revelado usando un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC (1:100), incubado por 1 hora a temperatura ambiente. En cuanto a las células PP se utilizó un anticuerpo anti-cabra acoplado a FITC, incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se usó 4,6-diamino 2-indol (DAPI) para marcar núcleos. Las incubaciones se llevan a cabo en cámara húmeda.

### Toma de micrografías

Se procedió a tomar fotografías utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM6000B de la Unidad de Imagenología de la UNAM, con una cámara conectada a los objetivos. Se utilizó el canal de luz visible para diaminobenzidina (insulina - 461 nm de emisión), el canal verde para FITC (glucagon y polipéptido pancreático, 495 nm de absorción- 519 nm de emisión) y canal azul para DAPI (núcleos, 358nm de absorción – 461 nm de emisión).

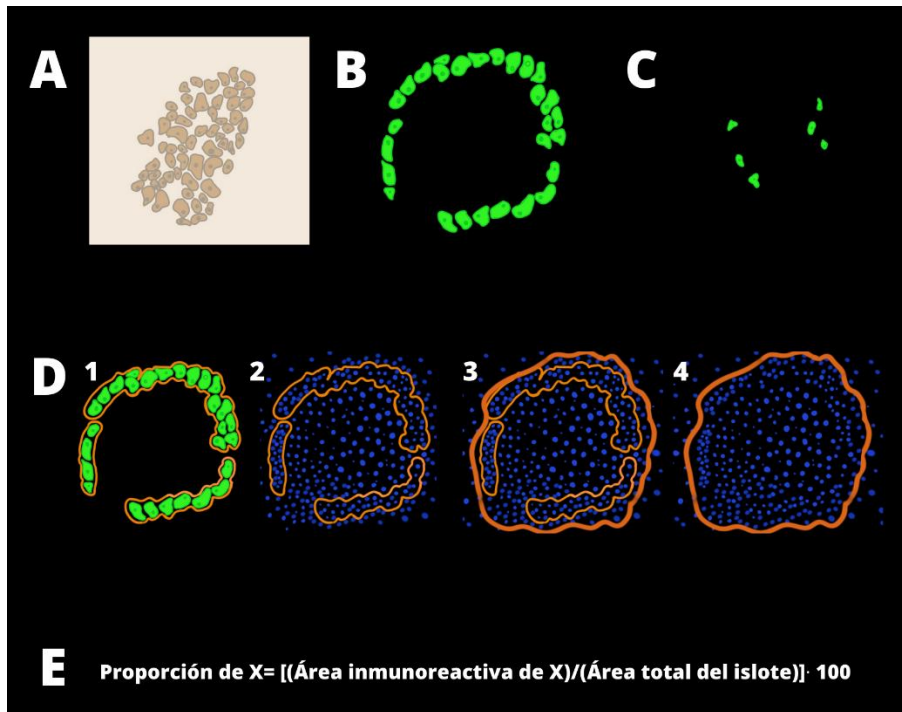
Las imágenes obtenidas se analizaron con Fiji Image J. En las imágenes se midieron las áreas inmunorreactivas de insulina, polipéptido pancreático o glucagon, así como un estimado del número de células presentes en cada área a través del conteo de núcleos con la señal de DAPI y el área total del islote. Cada dato fue registrado en una base de datos.

### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó la herramienta GraphPad Prism y los datos se analizaron con la prueba de ANOVA de 2 vías a través de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los resultados están expresados como media más/menos el error estándar.

## Resultados

A partir de las micrografías obtenidas en el microscopio de epifluorescencia se midieron las áreas inmunorreactivas a insulina, glucagon y PP, así como el área total del islote. Los datos obtenidos se registraron en una base de datos, los cuales fueron analizados como se explica a continuación en el esquema.



**Figura 9. Método de medición de las áreas inmunorreactivas.** Se muestra una representación del marcaje de insulina (A) revelado con diaminobenzidina, glucagon (B) con FITC y polipéptido pancreático (C) con FITC. (D) La metodología para el análisis de las micrografías, (1) fue medir en cada micrografía el área inmunorreactiva, (2) para después contrastar con los núcleos marcados y (3) el área total del islote vs el área inmunorreactiva. En el número 4 observamos el islote total sin la marca del área inmunorreactiva. Las áreas fueron obtenidas en pixeles y después transformadas a micras. (E) Se realizó este cálculo para obtener la proporción de células inmunorreactivas a la insulina, glucagon o polipéptido pancreático dentro del área total del islote.

### Proporción de células beta

El análisis de los resultados obtenidos con el método explicado en la figura 9 se muestra en la figura 10, donde encontramos pocas diferencias significativas respecto al área inmunorreactiva a insulina entre hembras y machos. La primera diferencia es a los 12 días de nacimiento donde se observa que los islotes de hembras ubicados en la cabeza pancreática tienen una proporción celular menor

( $56.9 \pm 2.4\%$ ) en comparación a los machos ( $69 \pm 1\%$ ), sin diferencias significativas en la región del cuerpo-cola (en machos  $63.9 \pm 1.7\%$  y en hembras  $59.5 \pm 2.2\%$ ).

En la etapa de 20 días posnatales los datos no muestran diferencias significativas entre machos y hembras o entre regiones pancreáticas del mismo sexo. En la cabeza pancreática, los machos tienen una proporción celular  $\beta$  de  $56.3 \pm 2.14\%$  y las hembras de  $57.85 \pm 3.54\%$ . Respecto a la proporción observada en el cuerpo-cola pancreática los machos tienen  $63.7 \pm 1.7\%$  y la proporción en hembras es de  $58.2 \pm 1.2\%$ .

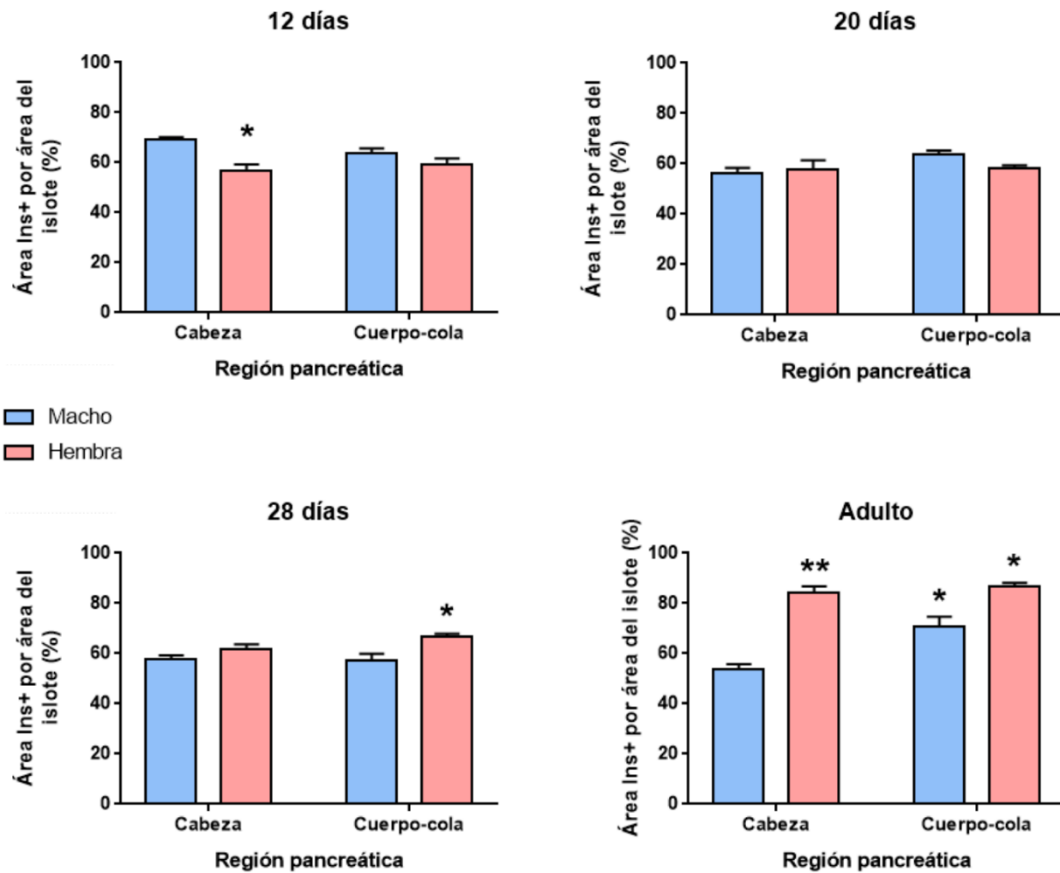
La segunda diferencia significativa está a los 28 días posnatales: los machos presentan en el cuerpo-cola una proporción de  $57.36 \pm 2.58\%$ , la cual es menor frente a la observada en el cuerpo-cola pancreática  $66.8 \pm 1.13\%$  de ratas hembra. No existen diferencias en la cabeza pancreática entre machos ( $57.84 \pm 1.54\%$ ) y hembras ( $61.8 \pm 1.9\%$ ).

El último grupo que muestra diferencias significativas son las ratas adultas. En los islotes ubicados en el cuerpo-cola pancreática de ratas macho hay una proporción celular de células  $\beta$  con un valor de  $70.6 \pm 4\%$  mayor a la que existe en los islotes de la cabeza pancreática de  $53.7 \pm 2.1\%$ .

Dentro de este mismo grupo observamos diferencias significativas al comparar las proporciones celulares de células  $\beta$  de machos y hembras en ambas regiones pancreáticas. En hembras, la cabeza pancreática presenta una proporción de  $84.1 \pm 2.7\%$ , que es significativamente mayor que la observada en machos  $53.7 \pm 2.1\%$ . Además, en el caso de la región pancreática cuerpo y cola, las hembras tienen una proporción de  $87 \pm 1\%$ , con un valor significativamente mayor frente al que existe en machos de  $70.6 \pm 4.05\%$ .

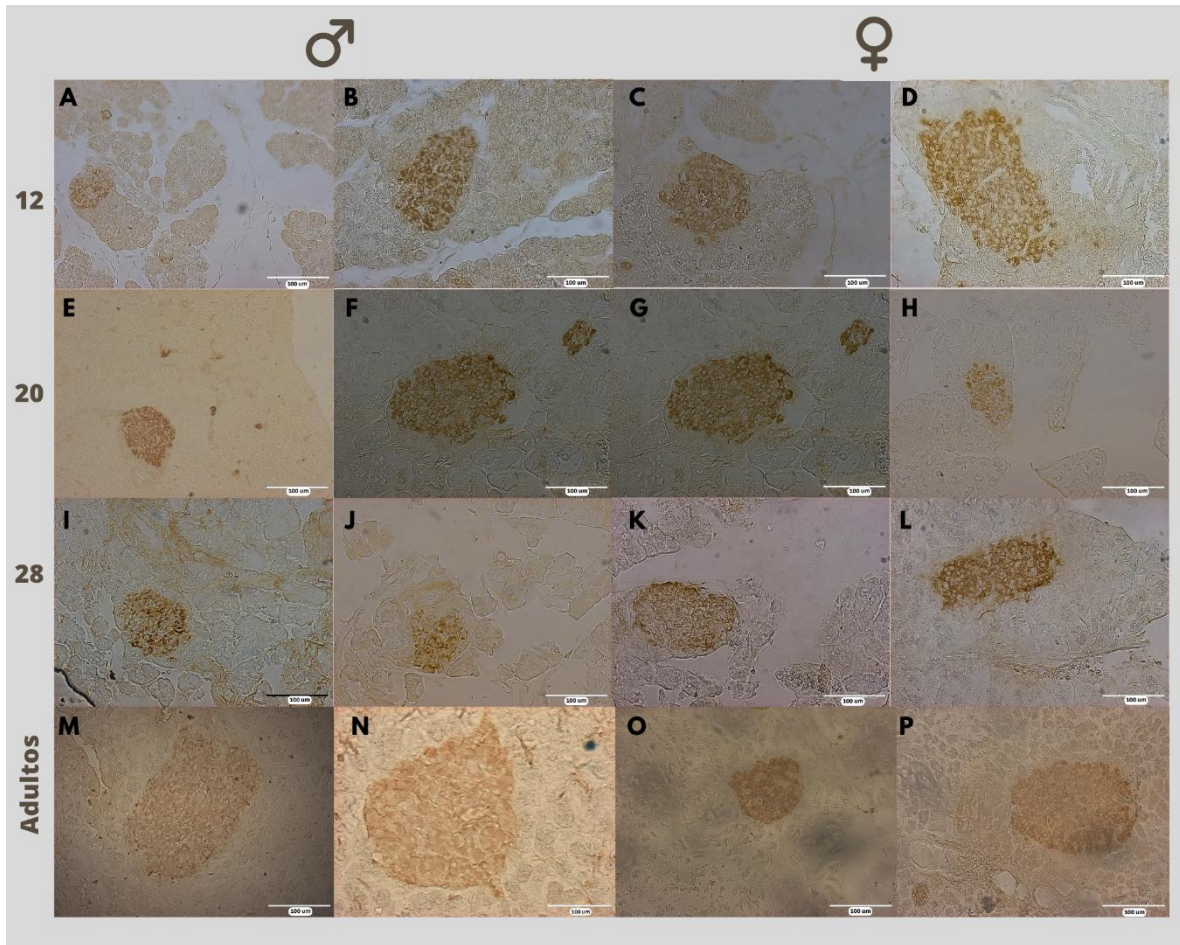
En la figura 11, se muestran fotos representativas del área inmunorreactiva a insulina de islotes de ratas de 12 día posnatales macho (A y B) y hembra (C y D), 20 días posnatales macho (E y F) y hembra (G y H) y 28 días posnatales macho (I y J) y hembra (K y L), así como de ratas adultas macho (M y N) y hembra (O y P). La primera imagen corresponde a un islote ubicado en la cabeza pancreática,

mientras la segunda imagen pertenece a un islote ubicado en el cuerpo-cola pancreática. Las células positivas a insulina se observan de color marrón ya que la marca fue revelada con diaminobenzidina.



**Figura 10. Proporción celular  $\beta$  dentro de los islotes de ratas en las regiones pancreáticas cabeza y cuerpo/cola.** Se observan islotes pertenecientes a ratas hembra y macho de A) 12 días, B) 20 días, C) 28 días posnatales y D) Adultos. (Machos n= 4 y Hembras n= 4). \*p<0.05, \*\*p<0.005.





**Figura 11. Micrografías de áreas inmunoreactivas a insulina.** En la figura observamos micrografías representativas del marcaje de insulina revelado con diaminobenzidina en tejido pancreático perteneciente a rata de 12 días posnatales, macho (A y B) y hembra (C y D); rata de 20 días posnatales, macho (E y F) y hembra (G y H); rata de 28 días posnatales, macho (I y J) y hembra (K y L); finalmente ratas adultas, macho (M y N) y hembra (O y P). La primera micrografía de cada individuo corresponde a un islote de la cabeza pancreática y la segunda micrografía a un islote del cuerpo-cola pancreática. La escala marcada en las micrografías es de 100  $\mu\text{m}$ .

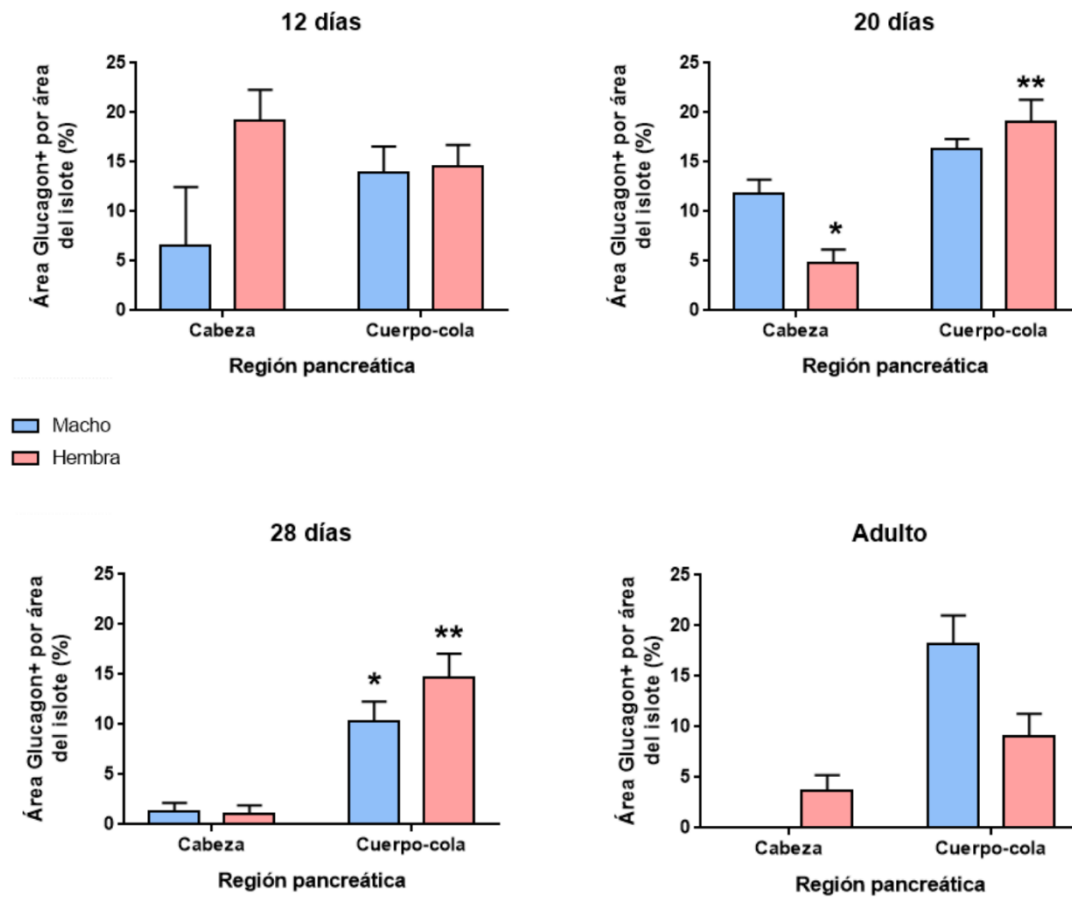
### Proporción de células $\alpha$

El glucagon fue el siguiente péptido a analizar en cortes histológicos de páncreas de rata. Como podemos ver en la figura 12 las áreas inmunorreactivas al glucagon a los 12 días posnatales no presentan diferencias significativas entre sexos o entre regiones pancreáticas, donde en machos en la cabeza pancreática tienen una proporción de  $6.6 \pm 5.9\%$  y en el cuerpo y cola  $14 \pm 3\%$ , mientras las hembras presentaron  $19 \pm 3\%$  en la cabeza y  $14.6 \pm 2.2\%$  en el cuerpo y cola.

La siguiente edad estudiada fue la de 20 días posnatales, en la que sí existen diferencias significativas. La primera está en la proporción células positivas al glucagon en islotes ubicados en la cabeza pancreática, en la que los machos tienen una proporción de  $11.8 \pm 1.4\%$  cuando las hembras presentan una proporción de  $4.8 \pm 1.4\%$ , es decir menor proporción de células positivas al glucagon en los islotes de la cabeza pancreática.

La segunda diferencia significativa se encuentra al comparar las proporciones de células positivas al glucagon entre los islotes que se encuentran en la cabeza pancreática y los ubicados en el cuerpo cola de las ratas hembra; aquí observamos que en la cabeza presentan  $4.8 \pm 1.4\%$  y en el cuerpo cola pancreático  $19.1 \pm 2.2\%$ , en esta última región las células son tres veces más abundantes. No hay diferencias significativas entre las regiones en machos, pues los valores son cercanos: en la cabeza observamos  $11.8 \pm 1.4\%$  y en el cuerpo cola  $16.4 \pm 1\%$ .

Durante la etapa de 28 días posnatales, encontramos diferencias significativas en las proporciones de células positivas al glucagon entre los diferentes sexos de la rata. Como vemos en la figura 13 C, los islotes que se encuentran en la cabeza pancreática de machos presentan una proporción menor de células positivas al glucagon  $1.3 \pm 0.8\%$  respecto a la que hay en los islotes del cuerpo cola que tiene un valor de  $10.3 \pm 2.0\%$ . Cuando observamos a los islotes de la cabeza pancreática, la proporción de células positivas al glucagon es menor con un valor de  $1.1 \pm 0.8\%$ , al compararse con la proporción que se encuentra en el cuerpo cola pancreático que es de  $14.7 \pm 2.4\%$ , es decir que se observa algo similar en machos como en hembras.

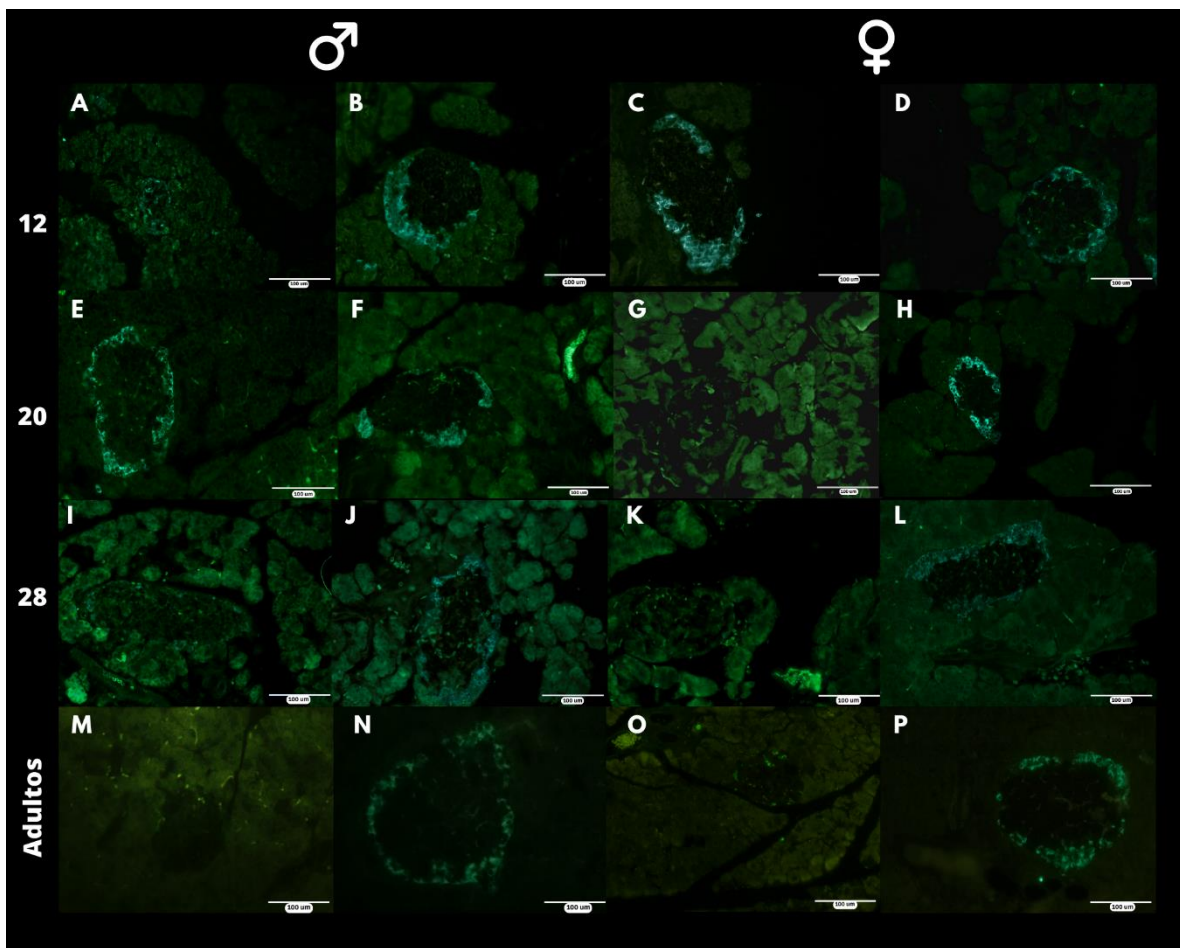


**Figura 12. Proporción celular  $\alpha$  dentro del islote de ratas en las regiones pancreáticas cabeza y cuerpo/cola.** Se observan hembras y machos de A) 12 días, B) 20 días y C) 28 días posnatales. (Machos= 4 y Hembras n= 4). \*p<0.05, \*\*p<0.005.

Además, un dato importante se encuentra al comparar lo obtenido a los 28 días posnatales con los datos que tenemos de la edad de 20 días posnatal. Las gráficas nos muestran una reducción de la proporción de células positivas al glucagon dentro de los islotes de la cabeza pancreática, pues en la edad de 20 días posnatal en machos hay una proporción de  $11.8 \pm 1.4\%$  y a los 28 días  $1.35 \pm 0.8\%$ , siendo una reducción significativa. Esto también se observa en hembras en las que a los 20 días posnatales tenían una proporción de  $4.8 \pm 1.35\%$  para tener  $1.1 \pm 0.8\%$  a los 28 días.

Finalmente, en las ratas adultas no observamos diferencias significativas entre machos y hembras o regiones pancreáticas. Las proporciones observadas de células positivas al glucagon en machos son de 0% en islotes de la cabeza pancreática y  $18.1 \pm 2.9\%$  en los islotes del cuerpo/cola; por otro lado, las hembras presentan  $3.7 \pm 1.6\%$  en la cabeza pancreática y en el cuerpo cola la proporción fue de  $9.1 \pm 2.2\%$ .

Podemos observar que en los islotes de rata macho ubicados en la cabeza pancreática no hay áreas inmunoreactivas al glucagon (0%), pero en las hembras sí hay ( $3.66 \pm 1.58\%$ ). Esto se puede observar en las micrografías de la figura 13, en las letras M y O (islotes ubicados en la cabeza pancreática en rata macho y hembra respectivamente).



**Figura 13. Micrografías de áreas inmunoreactivas a glucagon.** En la figura observamos micrografías representativas del marcaje de glucagon con FITC en tejido pancreático perteneciente a ratas de 12 días



posnatales, macho (A y B) y hembra (C y D); ratas de 20 días posnatales, macho (E y F) y hembra (G y H); ratas de 28 días posnatales, macho (I y J) y hembra (K y L); finalmente ratas adultas, macho (M y N) y hembra (O y P). La primera micrografía de cada individuo es un islote de la cabeza pancreática y la segunda micrografía de un islote del cuerpo-cola pancreática. La escala marcada en las micrografías es de 100  $\mu\text{m}$ .

### Proporción de células PP

El polipéptido pancreático ocupa un área reducida del área total del islote, lo que se confirma con los datos representados en las gráficas de la figura 14 (A, B y C), en los que observamos que, en las edades de 12, 20 y 28 días posnatales la proporción de este péptido es menor al 10% del total del área del islote.

En el marcaje de polipéptido pancreático observamos diferencias significativas desde los 12 días posnatales, donde en los machos la proporción de células positivas para éste péptido dentro de los islotes de la cabeza pancreática es de  $2.6 \pm 0.4\%$  mientras que la observada en los islotes ubicados en el cuerpo cola pancreático es de  $0.4 \pm 0.3\%$ . Esto mismo ocurre en las hembras, el tejido pancreático analizado arrojó que los islotes de la cabeza presentan una proporción de células positivas al polipéptido pancreático de  $2 \pm 0.6\%$ , comparado con los islotes del cuerpo cola pancreático que es de  $0.08 \pm 0.08\%$ . En ambos casos, tenemos que los islotes de la cabeza son los que presentan la mayor proporción positiva para el área de polipéptido pancreático (ver figura 14 A).

Para el día 20 posnatal (ver figura 14 B), observamos este mismo comportamiento pues los islotes ubicados en la cabeza pancreática son los que presentan una proporción mayor de polipéptido pancreático respecto a los islotes del cuerpo cola. En este caso los valores que observamos en los machos son  $6.17 \pm 0.95\%$  en cabeza y  $0.1 \pm 0.04\%$  en cuerpo cola pancreático, lo que marca la primera diferencia significativa del grupo. Los valores que obtuvimos en las hembras fueron  $1.6 \pm 0.81\%$  en la cabeza pancreática y  $0.25 \pm 0.2\%$  en el cuerpo pancreático.

La segunda diferencia significativa en este grupo la encontramos al comparar la proporción del área del polipéptido pancreático en los islotes en la cabeza pancreática entre machos y hembras. Los machos tienen una proporción del área

de polipéptido pancreático mayor ( $6.17 \pm 0.95\%$ ), respecto a la observada en las hembras ( $1.6 \pm 0.81\%$ ), esto es tres veces mayor en machos.

Al día 28 posnatal los islotes de la cabeza pancreática de los machos presentan una proporción con un valor de  $4.13 \pm 0.34\%$  y los islotes del cuerpo cola  $0.31 \pm 0.17\%$ . En las hembras los islotes de la cabeza tienen una proporción de  $6.25 \pm 0.86\%$  y los del cuerpo cola de  $0.45 \pm 0.18\%$ . Esto muestra que hay diferencia significativa comparando los islotes de la cabeza pancreática, es mayor la proporción observada en las hembras respecto a la de los machos (ver figura 14C).

Es importante recalcar que, si comparamos con los datos observados del día 20, las hembras aumentan casi cuatro veces la proporción de polipéptido pancreático para el día 28 (de  $1.6 \pm 0.8\%$  a  $6.3 \pm 0.9\%$ ) (figura 14 B y C).

A continuación, los gráficos correspondientes a los adultos (ver figura 14 D) muestran que los únicos islotes con polipéptido pancreático son los ubicados en la cabeza pancreática tanto en ratas macho ( $12.1 \pm 11.3\%$ ), como en ratas hembra ( $12.9 \pm 5.8\%$ ). Además, podemos observar un aumento de la proporción del área correspondiente a células positivas a polipéptido pancreático del día 28 posnatal a la etapa adulta en las ratas de ambos sexos.

Finalmente, en las edades de 12, 20 y 28 días posnatales, los islotes ubicados en el cuerpo y cola pancreática llegan a presentar células positivas a polipéptido pancreático, lo que no sucede en la etapa adulta.

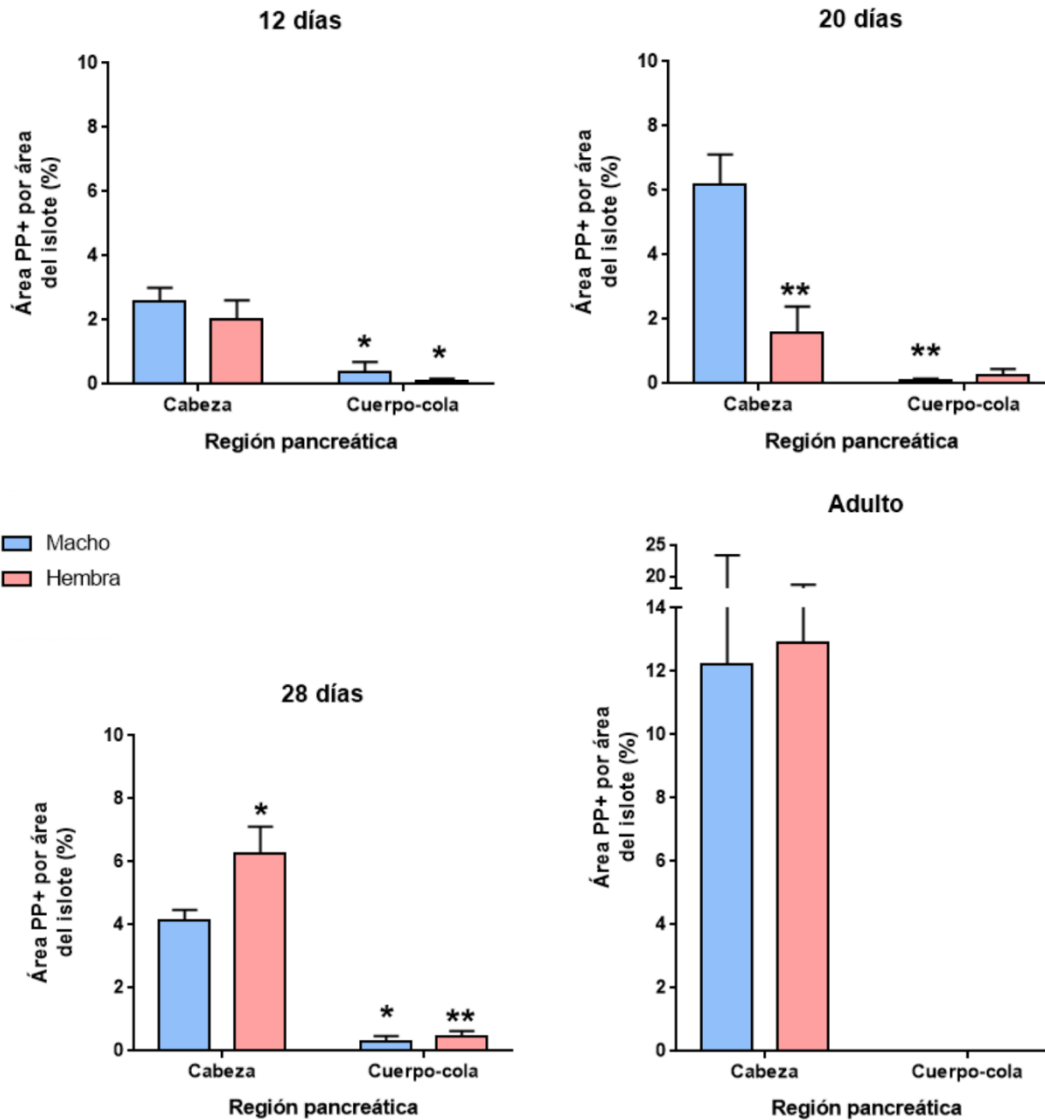
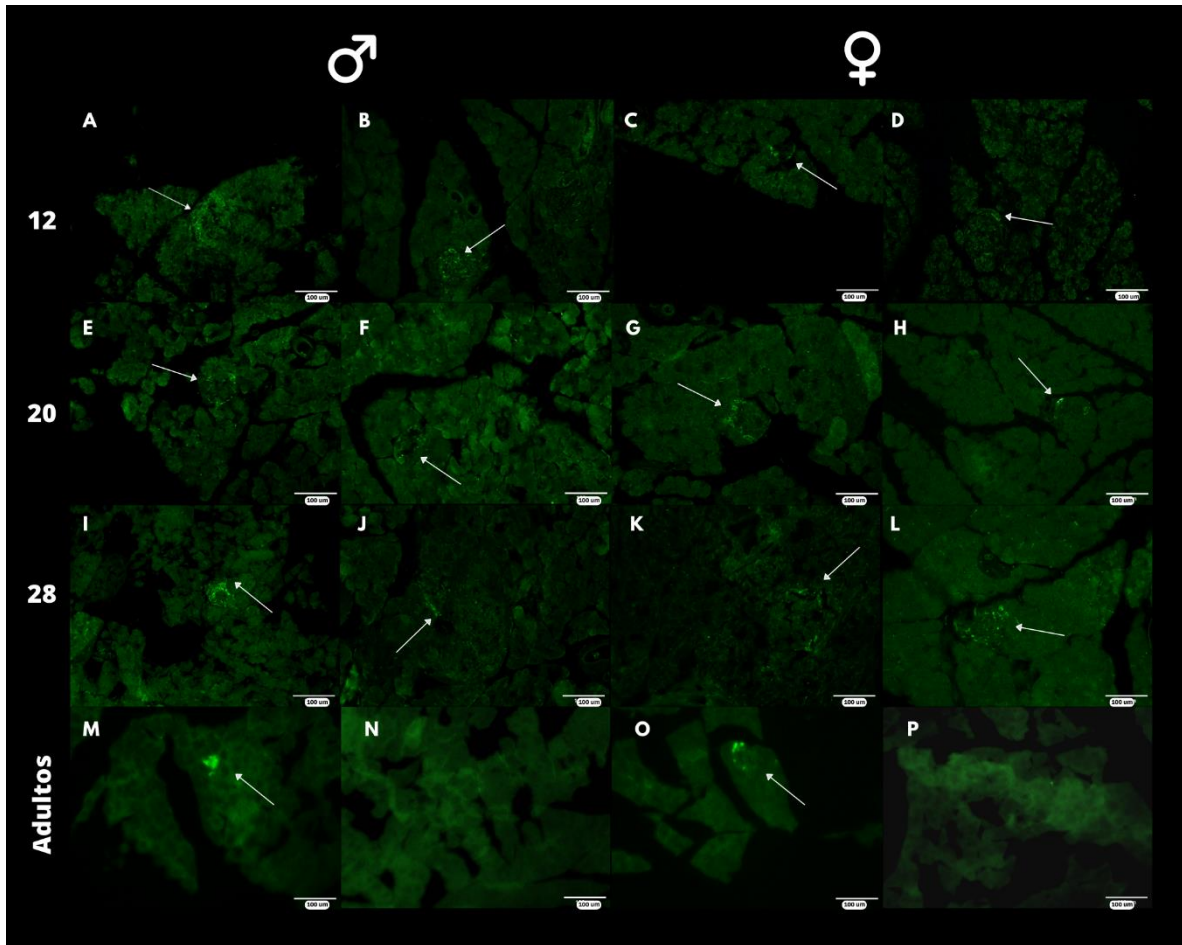


Figura 14. Proporción celular pp dentro del islote de ratas en las regiones pancreáticas cabeza y cuerpo/cola. Se observan hembras y machos de A) 12 días, B) 20 días y C) 28 días posnatales. (machos n= 4 y hembras n= 4). \*p=0.0001



**Figura 15. Micrografías de áreas inmunoreactivas a polipéptido pancreático.** En la figura se señalan con una flecha en micrografías representativas el marcaje de polipéptido pancreático con FITC en tejido pancreático perteneciente a ratas de 12 días posnatales, macho (A y B) y hembra (C y D); ratas de 20 días posnatales, macho (E y F) y hembra (G y H); ratas de 28 días posnatales, macho (I y J) y hembra (K y L); finalmente ratas adultas, macho (M y N) y hembra (O y P). La primera micrografía de cada individuo es un islote de la cabeza pancreática y la segunda micrografía de un islote del cuerpo y cola pancreática. Escala de 100  $\mu\text{m}$ .



## Discusión

En el presente trabajo, evaluamos la distribución y proporción de las **células  $\alpha$  y pp** de islotes ubicados en cabeza y cuerpo/cola del páncreas de ratas macho y hembra, en diferentes edades posnatales. Esto permitió hacer mediciones de forma progresiva de las áreas de glucagon y polipéptido pancreático dentro de los islotes del páncreas, a lo largo del desarrollo posnatal.

El desarrollo del páncreas se ha descrito como una serie de eventos altamente regulados y coordinados, lo que supone que el desarrollo ocurre tal como se describe en una misma especie de forma indistinta, sin importar el sexo. Sin embargo, al menos en embriones de mamíferos, machos y hembras, es posible observar diferencias en tasa de crecimiento y metabolismo previo a la diferenciación gonadal (Mittwoch 1993; Burgoyne et al. 1995). Incluso a partir de ratones transgénicos que portaban el cromosoma X marcado con la proteína verde fluorescente (EGFP), compararon los patrones de expresión genética entre blastocistos de ratones machos y hembras con análisis de microarreglos. A partir de este estudio fue posible describir 591 genes expresados diferencialmente entre ratones macho y hembra, de los cuales al menos 4 son genes relacionados al sexo (Kobayashi et al. 2006).

Se ha propuesto que existen genes expresados que se encuentran en los cromosomas sexuales Y y X, que tienen un papel importante en el crecimiento del embrión previo a la implantación, acelerando o retardando el desarrollo (Gutiérrez-Adán et al. 2006). Por ello, si existen diferencias antes de la implantación, es altamente probable que exista dimorfismo sexual en el desarrollo de órganos como el páncreas, lo que podría ser observado incluso en el desarrollo posnatal.

Durante mucho tiempo la arquitectura de los islotes pancreáticos ha sido tema de interés y continúa siendo un área de investigación poco entendida, la mayor parte de estudios realizados en islotes pancreáticos se han concentrado en las células  $\beta$  y  $\alpha$ , en principio por su importante y fundamental participación dentro de la regulación de glucosa de un organismo, así como por ser las células de mayor

cantidad dentro de los islotes (Gao et al. 2014). Sin embargo, las células de menor presencia como las  $\delta$  o las PP han sido un tanto olvidadas. A partir de algunas investigaciones se reconoció la importancia de estas células en la comunicación intracelular de los islotes (Piran et al. 2014; Puri y Hebrok 2010) y se han descrito el orden de aparición de estas células durante el desarrollo de los islotes, las primeras en ser observadas son las células tipo  $\alpha$ , después las tipo  $\beta$ , en seguida las tipo  $\delta$  y finalmente las PP (Pictet et al. 1972; Herrera 2000).

Pero la arquitectura de los islotes muestra cambios a lo largo del desarrollo posnatal hasta que alcanzan la edad adulta. De acuerdo a lo descrito en el trabajo de Aguayo-Mazzucato en 2006, donde marcaron glucagon e insulina en islotes de la cabeza y cuerpo cola pancreática de ratas macho, encontraron cambios de la población celular alfa, esta disminuye con el tiempo en los islotes ubicados en la cabeza, hasta los 28 días posnatales cuando se muestra una distribución celular similar a la observada en las ratas adultas (Aguayo-Mazzucato et al. 2006).

Las primeras células en ser analizadas fueron las  $\beta$ . Como podemos observar en la figura 10, la distribución de la masa celular  $\beta$  se encuentra al centro de los islotes en ratas macho y hembra, congruente con lo descrito en otros trabajos realizados de la citoarquitectura del islote pancreático (Brereton et al. 2015). Además, pudimos corroborar que son estas células las de mayor proporción respecto al área total del islote en todas las edades. Como podemos observar en la figura 10 en los islotes de la cabeza y cuerpo y cola pancreática, las células  $\beta$  que se observan de color marrón representan desde el  $57 \pm 2.35\%$  al  $69.1 \pm 1.01\%$  en proporción al total del área del islote que concuerda con datos descritos de la composición del islote en los murinos (Elayat, el-Naggar, y Tahir 1995).

Encontramos diferencias significativas al comparar a los islotes de los machos y las hembras respecto a la proporción de células positivas a insulina. Desde el día 12 posnatal, observamos que al menos en la cabeza pancreática de las ratas hembra, la proporción de masa celular  $\beta$  es menor respecto a los machos. Esta diferencia no permanece por mucho tiempo, pues a los 20 días se observan valores similares entre machos y hembras. Nuevamente a los 28 días encontramos diferencias en la

proporción de la masa celular  $\beta$ , donde los islotes del cuerpo cola pancreática de ratas hembra, tienen una proporción mayor que los islotes de machos de la misma región.

En la edad adulta observamos que las diferencias entre sexos son más claras, las hembras presentan proporciones de células  $\beta$ , mayores que las que hay en los islotes de los machos en ambas regiones anatómicas. Este dato es importante, pues a pesar de existir estudios respecto a la citoarquitectura del islote, se trata de estudios realizados sin un enfoque de dimorfismo sexual. En algunos estudios realizados sobre la homeostasis de la glucosa se han observado datos que sugieren que hay efectos directos sobre los procesos metabólicos relacionados con el sexo (Gannon et al. 2018).

Dentro de las diferencias encontradas en la homeostasis de glucosa por sexo, están las diferencias en la respuesta a pruebas orales de tolerancia a glucosa; en estas pruebas se reportó que las mujeres tienen niveles de glucosa menores en ayuno y mayor concentración de glucosa después de dos horas de la prueba de tolerancia a glucosa (Sicree et al. 2008). Además, la sensibilidad a glucosa también es diferente dependiendo del sexo, ya que, en las comparaciones entre hombres y mujeres de la misma edad, se ha observado que las mujeres presentan una masa menor del músculo esquelético y mayor masa de tejido adiposo, mayor número de ácidos grasos libres en circulación y mayor contenido lipídico entre los miocitos. Dichas características en conjunto podrían llevar a una resistencia a la insulina mayor en mujeres que en hombres, pero esto no sucede así, pues las mujeres son más sensibles a insulina que los hombres (Frias et al. 2001).

Otro dato interesante es que se ha descrito mayores niveles plasmáticos de insulina y de péptido C postprandiales, incluso el índice de disposición de insulina es mayor en mujeres que en hombres, lo que se traduce en una mayor secreción de insulina (Basu et al. 2006). Esto podría explicarse por la posible participación sobre la secreción de insulina de los estrógenos que se encuentran en circulación en las mujeres (Mauvais-Jarvis, Arnold, y Reue 2017), aunque no es claro el mecanismo por el cual están regulado. Como parte de nuestros hallazgos, en la rata hembra

existe una proporción de masa celular  $\beta$  mayor en los islotes pancreáticos en ambas zonas del páncreas, quizá esta diferencia estructural del islote podría formar parte de las condiciones que permiten estas diferencias encontradas en el metabolismo de glucosa por sexo.

En cuanto a las células  $\alpha$ , pudimos observar que nuestros resultados son similares a los descritos en el artículo de Aguayo-Mazzucato, los islotes ubicados en la cabeza pancreática de la rata macho, muestra una restructuración de la masa celular  $\alpha$  durante el desarrollo pancreático, donde al día 12 posnatal los islotes de la cabeza pancreática muestran áreas positivas a glucagon, situación no observada en la rata macho adulta. Al día 20 la proporción de la masa celular  $\alpha$  aumenta de un  $6.6 \pm 5.9\%$  a  $11.8 \pm 1.4\%$  y disminuye al día 28 a una proporción de  $1.35 \pm 0.8\%$ . Este último dato muestra una estructura del islote más parecida a un islote de rata adulta (Aguayo-Mazzucato et al. 2006).

Pero en las hembras ocurre algo diferente en los islotes de la cabeza pancreática. A los 12 días, el porcentaje de proporción de células  $\alpha$  es de  $19.2 \pm 3.1\%$ , éste disminuye al día 20 ( $4.8 \pm 1.35\%$ ) y disminuye nuevamente al día 28 ( $1.1 \pm 0.8\%$ ). Sorpresivamente, en la edad adulta, los islotes de la región de la cabeza pancreática de las hembras, a diferencia de los machos, muestran algunas áreas inmunoreactivas a glucagon. Respecto a la proporción de células  $\alpha$  en los islotes del cuerpo y cola pancreática durante el desarrollo posnatal, en los machos no hay cambios y en las hembras se observa una reducción de la proporción de células  $\alpha$ . Entonces, estructuralmente los islotes de las hembras presentan un área menor de células positivas al glucagon que los islotes de los machos.

No existen reportes sobre diferencias a nivel histológico en los islotes, en relación al sexo, pero se sabe que existe diferencia en la respuesta al estado hipoglucémico entre hombres y mujeres, donde la secreción de glucagón en hipoglucemia inducida por insulina es mayor en hombres que en mujeres. De manera contrastante en los ratones ocurre al revés, la secreción de glucagón en un estado glucopénico es mayor en hembras que en machos (Davis et al. 1993; Karlsson, Scheurink, y Ahrén 2002). De acuerdo a Horie y colaboradores, en mujeres sanas japonesas, se

observa que después de administrar una carga de glucosa, presentan una mayor supresión de la secreción de glucagon en comparación con los hombres (Horie et al. 2018).

El mecanismo que resulta en las diferencias en la secreción de acuerdo al sexo no ha sido descrito. Se ha propuesto que podría estar relacionado con diferencias en la activación autónoma o en la regulación de la respuesta de las células  $\alpha$  (Gannon et al. 2018). Tomando en cuenta nuestros hallazgos, donde la masa celular de células  $\alpha$  de las ratas hembra es menor en comparación con las ratas macho, surge la pregunta de si existe correlación con la secreción de glucagon en un estado de hipoglucemia.

Respecto a las células PP, observamos un aumento durante el desarrollo posnatal hasta alcanzar la edad adulta en los islotes de la cabeza pancreática de las ratas macho, las cuales a los 12 días inician con una proporción de  $2.6 \pm 0.4\%$  y alcanzan  $12.2 \pm 11.3\%$  en edad adulta. Esto mismo ocurre en islotes de cabeza pancreática de ratas hembra que a los 12 días presentan  $2 \pm 0.6\%$  y en edad adulta  $12.9 \pm 5\%$ .

Además, los islotes del cuerpo y cola pancreático, muestran una proporción mínima a los 12, 20 y 28 días posnatales en machos ( $0.37 \pm 0.31\%$ ;  $0.1 \pm 0.04\%$ ;  $0.30 \pm 0.17$ ) y hembras ( $0.09 \pm 0.08\%$ ;  $0.24 \pm 0.20\%$ ;  $0.45 \pm 0.18$ ), algo que también podemos observar en islotes del cuerpo y cola pancreática de humanos adultos; incluso las proporciones respecto al área total del islote también son pequeñas como la de rata (se reportan datos de  $0.02 \pm 0.01\%$  -  $0.02 \pm 0.008\%$ ) (Wang et al. 2013).

En la edad adulta, los islotes del cuerpo y cola ya no presentan células PP; únicamente encontramos a estas células en islotes ubicados en la cabeza pancreática y dispersas entre el tejido exocrino de esta misma zona, como sucede en el tejido humano (Orci et al. 1978; Gersell, Gingerich, y Greider 1978; Malaisse-Lagae et al. 1979; Rahier et al. 1983). Se ha asociado la presencia de las células PP dentro de los islotes de la cabeza pancreática con la diferencia del origen embriológico. Puesto que la cabeza deriva de la yema ventral mientras que el

cuerpo-cola deriva de una yema dorsal, las diferencias en los factores que participan en el desarrollo de cada yema permitiría las diferencias histológicas entre la cabeza y el cuerpo y cola pancreáticas (Malaisse-Lagae et al. 1979; Paulin y Dubois 1978).

Además, en los adultos observamos que el error estándar es muy grande en la proporción celular PP de las ratas macho ( $12.2 \pm 11.3\%$ ). Esto mismo sucede en las ratas hembra ( $12.9 \pm 5.8\%$ ), lo que demuestra que hay un alto grado de variabilidad entre individuos respecto al área que pueden ocupar las células PP dentro de los islotes. Por otra parte, aun cuando la cabeza pancreática es considerada como un área pancreática rica en PP, no encontramos en todos los islotes de esta región a dichas células.

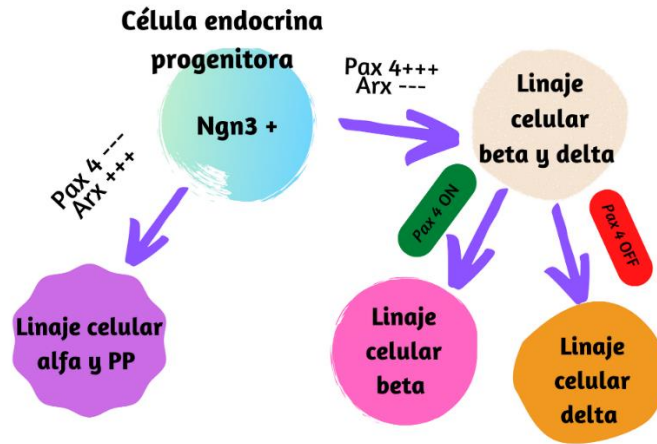
De acuerdo a Wang y colaboradores, que analizaron la distribución de células PP cuantitativamente en el páncreas humano, la región rica en estas células es la porción de la cabeza pancreática conocida como el proceso uncinado, (en los humanos, porción del páncreas posterior a la vena mesentérica y mitad de la cabeza del páncreas) (Wang et al. 2013). Debido a que los cortes histológicos que utilizamos en el presente trabajo fueron realizados de manera longitudinal, los islotes que pudimos observar con el marcaje de las células PP con FITC no se concentraban en el área del proceso uncinado, lo que explica la variación en la proporción del área ocupada por las células PP.

Al mismo tiempo, el trabajo de Wang y colaboradores remarca que es importante considerar el proceso de la unión de la yema ventral con la yema dorsal, pues para que esto ocurra el intestino gira  $270^\circ$  en contra de las manecillas del reloj y finalmente se unen ambas yemas. Sin embargo, existen variaciones en el grado de rotación del intestino lo que deriva en crecimientos anormales y mal posicionamiento de las yemas previo a la fusión, dando como resultado el alargamiento de la cabeza pancreática (por hipoplasia o aplasia). Estas variantes explican las diferencias entre individuos respecto a la proporción de células PP dentro de los islotes (Wang et al. 2013).

Al comparar los datos de las células  $\alpha$  y las células PP, observamos que tanto en machos como en hembras disminuye la presencia de células alfa y aumentan las células PP en los islotes de cabeza pancreática. Si bien podría ser indicador de una transdiferenciación, no podemos afirmar o descartar que las células  $\alpha$  se convierten en células PP en el desarrollo posnatal.

Lo que sabemos es que existe un marcador, el *Ngn3*, que se expresa en las células que adquieren el fenotipo de célula endocrina, pero no es claro si el destino de estas mismas células ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y PP) está relacionado con otros mecanismos previos o inmediatos a la expresión de *Ngn3* (Nair y Hebrok 2015; Rieck, Bankaitis, y Wright 2012). Además de este marcador existen otros factores que participan en la especificación celular que incluyen genes como *Nkx 2.2*, *Pax 4*, *Pdx1* (Ahlgren et al. 1998; Mansouri, St-Onge, y Gruss 1999; Collombat et al. 2003; 2005) y el gen *Arx* de descubrimiento más reciente ubicado en el cromosoma X (Collombat et al. 2003).

De acuerdo a la dinámica descrita de *Arx* y *Pax4* durante el desarrollo temprano del páncreas, la expresión de *Arx* permite la diferenciación de las células  $\alpha$  y PP, mientras que el apagado de *Arx* y encendido del gen *Pax4* favorecen la diferenciación de células  $\beta$  y  $\delta$  (Collombat et al. 2003). Esto sugiere que las células  $\alpha$  y PP pertenecen a un linaje celular que presenta similitudes durante la especificación de estas células endocrinas, lo que no descarta que este proceso ocurra incluso en el desarrollo posnatal.



**Figura 16. Rol competitivo de Pax4 y Arx en la determinación de las células endocrinas.** El encendido de Pax4 permite la especificación de la línea celular  $\beta/\delta$  y la supresión de Pax4 y encendido de Arx permiten el desarrollo de la línea celular  $\alpha$ /PP. Modificado de Gittes 2009.

Finalmente, al analizar los datos en la figura 13 podemos observar diferencias entre machos y hembras respecto a la proporción celular PP dentro de los islotes de la cabeza pancreática. Los datos graficados pertenecientes a ratas macho y los que corresponden a las ratas hembra, indican un retraso respecto al tiempo en el aumento de la proporción celular PP en los islotes de la cabeza pancreática de las ratas hembra. Esto podría ser evidencia de un posible dimorfismo en el desarrollo posnatal del páncreas. No existen datos de otros autores que hagan referencia a los cambios estructurales de los islotes respecto a las células PP durante el desarrollo posnatal del páncreas.

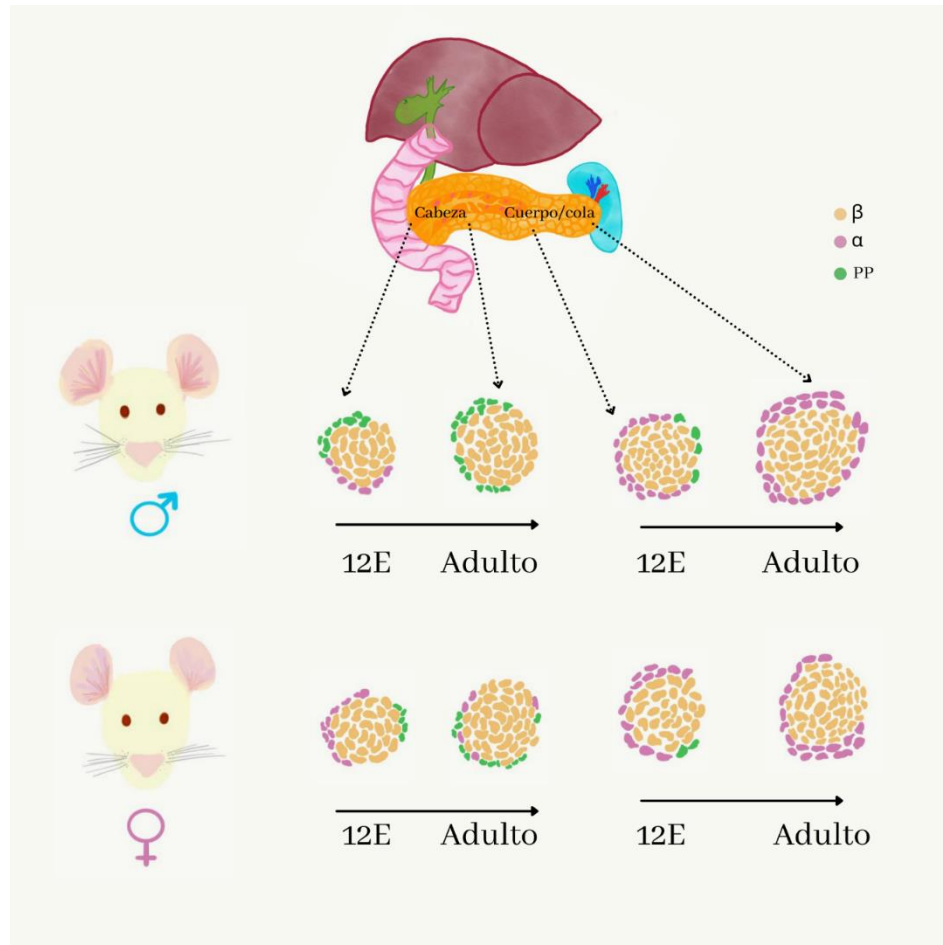
## Conclusiones

Con el análisis histológico del páncreas, podemos resumir los hallazgos más importantes en los siguientes puntos:

- La estructura de los islotes sufre cambios durante el desarrollo posnatal.
- En los islotes de la cabeza pancreática de ratas macho y hembra, durante el desarrollo posnatal, disminuye la proporción celular  $\alpha$  hasta observar la distribución descrita en las ratas adultas.
- La proporción de las células PP dentro de los islotes de la cabeza van en aumento a lo largo del desarrollo posnatal.



- El aumento en la proporción de las células PP durante el desarrollo posnatal muestra que estos cambios suceden en tiempos más largos en las hembras.
- La estructura de los islotes de ratas adultas muestra diferencias entre machos y hembras, en los tres tipos celulares estudiados ( $\alpha$ ,  $\beta$  y PP), evidencia de dimorfismo en estas estructuras, que podría estar relacionado con las diferencias metabólicas entre machos y hembras.



**Figura 17. Resumen gráfico de hallazgos.** Los islotes pancreáticos de las ratas de machos y hembras muestran diferencias durante el desarrollo posnatal y en la vida adulta, lo que indica un posible dimorfismo desde etapas muy tempranas.

## Referencias bibliográficas

Adrian, T. E., P. Mitchenere, G. Sagor, y S. R. Bloom. 1982. «Effect of Pancreatic Polypeptide on Gallbladder Pressure and Hepatic Bile Secretion». *The American Journal of Physiology* 243 (3): G204-207. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1982.243.3.G204>.

- Aguayo-Mazzucato, Cristina, Carmen Sanchez-Soto, Victoria Godinez-Puig, Gabriel Gutiérrez-Ospina, y Marcia Hiriart. 2006. «Restructuring of Pancreatic Islets and Insulin Secretion in a Postnatal Critical Window». *PLoS ONE* 1 (1).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000035>.
- Ahlgren, Ulf, Jörgen Jonsson, Lena Jonsson, Karin Simu, y Helena Edlund. 1998. « $\beta$ -Cell-specific inactivation of the mouse *Ip1/Pdx1* gene results in loss of the  $\beta$ -cell phenotype and maturity onset diabetes». *Genes & Development* 12 (12): 1763-68.
- Alpert, Susan, Douglas Hanahan, y Gladys Teitelman. 1988. «Hybrid Insulin Genes Reveal a Developmental Lineage for Pancreatic Endocrine Cells and Imply a Relationship with Neurons». *Cell* 53 (2): 295-308. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90391-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90391-1).
- Asakawa, Akihiro, Akio Inui, Hideki Yuzuriha, Naohiko Ueno, Goro Katsuura, Mineko Fujimiya, Masayuki A. Fujino, Akira Nijjima, Michael M. Meguid, y Masato Kasuga. 2003. «Characterization of the Effects of Pancreatic Polypeptide in the Regulation of Energy Balance». *Gastroenterology* 124 (5): 1325-36. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00216-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00216-6).
- Barg, S, J Galvanovskis, S O Göpel, P Rorsman, y L Eliasson. 2000. «Tight coupling between electrical activity and exocytosis in mouse glucagon-secreting alpha-cells.» *Diabetes* 49 (9): 1500. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.9.1500>.
- Basu, Rita, Chiara Dalla Man, Marco Campioni, Ananda Basu, George Klee, Gianna Toffolo, Claudio Cobelli, y Robert A. Rizza. 2006. «Effects of Age and Sex on Postprandial Glucose Metabolism: Differences in Glucose Turnover, Insulin Secretion, Insulin Action, and Hepatic Insulin Extraction». *Diabetes* 55 (7): 2001-14. <https://doi.org/10.2337/db05-1692>.
- Batterham, R. L., C. W. Le Roux, M. A. Cohen, A. J. Park, S. M. Ellis, M. Patterson, G. S. Frost, M. A. Ghatei, y S. R. Bloom. 2003. «Pancreatic Polypeptide Reduces Appetite and Food Intake in Humans». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88 (8): 3989-92.  
<https://doi.org/10.1210/jc.2003-030630>.
- Ben-Othman, Nouha, Monica Courtney, Anhdira Vieira, Anja Pfeifer, Noémie Druelle, Elisabet Gjernes, Biljana Faurite, Fabio Avolio, y Patrick Collombat. 2013. «From Pancreatic Islet Formation to Beta-Cell Regeneration». *Diabetes Research and Clinical Practice* 101 (1): 1-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.01.013>.
- Brereton, Melissa F., Elisa Vergari, Quan Zhang, y Anne Clark. 2015. «Alpha-, Delta- and PP-Cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-Ordination?» *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 63 (8): 575-91.  
<https://doi.org/10.1369/0022155415583535>.
- Burggren, Warren W. 1998. «Studying Physiological Development: Past, Present and Future». En .  
<https://doi.org/10.29812/BBNTNU.199812.0001>.
- Burggren, Warren W., y Casey A. Mueller. 2015. «Developmental Critical Windows and Sensitive Periods as Three-Dimensional Constructs in Time and Space». *Physiological and Biochemical Zoology* 88 (2): 91-102. <https://doi.org/10.1086/679906>.
- Burgoyne, P. S., A. R. Thornhill, S. Kalmus Boudrean, S. M. Darling, C. E. Bishop, E. P. Evans, Blanche Capel, et al. 1995. «The genetic basis of XX-XY differences present before gonadal sex differentiation in the mouse». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 350 (1333): 253-61. <https://doi.org/10.1098/rstb.1995.0159>.
- Cabrera, Over, Dora M. Berman, Norma S. Kenyon, Camillo Ricordi, Per-Olof Berggren, y Alejandro Caicedo. 2006. «The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (7): 2334-39. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510790103>.

- Clark, A., C. A. Wells, I. D. Buley, J. K. Cruickshank, R. I. Vanhegan, D. R. Matthews, G. J. Cooper, R. R. Holman, y R. C. Turner. 1988. «Islet Amyloid, Increased A-Cells, Reduced B-Cells and Exocrine Fibrosis: Quantitative Changes in the Pancreas in Type 2 Diabetes». *Diabetes Research (Edinburgh, Scotland)* 9(4): 151-59.
- Collombat, Patrick, Jacob Hecksher-Sørensen, Vania Broccoli, Jens Krull, Ilaria Ponte, Tabea Mundiger, Julian Smith, Peter Gruss, Palle Serup, y Ahmed Mansouri. 2005. «The Simultaneous Loss of Arx and Pax4 Genes Promotes a Somatostatin-Producing Cell Fate Specification at the Expense of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cell Lineages in the Mouse Endocrine Pancreas». *Development* 132 (13): 2969-80. <https://doi.org/10.1242/dev.01870>.
- Collombat, Patrick, Jacob Hecksher-Sørensen, Palle Serup, y Ahmed Mansouri. 2006. «Specifying Pancreatic Endocrine Cell Fates». *Mechanisms of Development* 123 (7): 501-12. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2006.05.006>.
- Collombat, Patrick, Ahmed Mansouri, Jacob Hecksher-Sørensen, Palle Serup, Jens Krull, Gerard Gradwohl, y Peter Gruss. 2003. «Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development». *Genes & Development* 17 (20): 2591-2603. <https://doi.org/10.1101/gad.269003>.
- Davis, S. N., A. D. Cherrington, R. E. Goldstein, J. Jacobs, y L. Price. 1993. «Effects of Insulin on the Counterregulatory Response to Equivalent Hypoglycemia in Normal Females». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 265 (5): E680-89. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.265.5.E680>.
- Dean, P. M., y E. K. Matthews. 1968. «Electrical Activity in Pancreatic Islet Cells». *Nature* 219 (5152): 389-90. <https://doi.org/10.1038/219389a0>.
- Deconinck, J. F., P. R. Potvliege, y W. Gepts. 1971. «The Ultrastructure of the Human Pancreatic Islets». *Diabetologia* 7(4): 266-82. <https://doi.org/10.1007/BF01211879>.
- Dey, Arunangsu, Gregory M. Lipkind, Yves Rouillé, Christina Norrbom, Jeffrey Stein, Chunling Zhang, Raymond Carroll, y Donald F. Steiner. 2005. «Significance of Prohormone Convertase 2, PC2, Mediated Initial Cleavage at the Proglucagon Interdomain Site, Lys70-Arg71, to Generate Glucagon». *Endocrinology* 146(2): 713-27. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1118>.
- Dunne, Mark J., y Ole H. Petersen. 1986. «Intracellular ADP Activates K<sup>+</sup> Channels That Are Inhibited by ATP in an Insulin-Secreting Cell Line». *FEBS Letters* 208 (1): 59-62. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)81532-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)81532-0).
- Dunphy, Jillian L, Russel G Taylor, y Peter J Fuller. 1998. «Tissue Distribution of Rat Glucagon Receptor and GLP-1 Receptor Gene Expression1This Work Was Supported by a Grant from the Crohn's and Colitis Foundation of America.1». *Molecular and Cellular Endocrinology* 141 (1): 179-86. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00096-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00096-3).
- Elayat, A A, M M el-Naggar, y M Tahir. 1995. «An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets.» *Journal of Anatomy* 186 (Pt 3): 629-37.
- Field, Benjamin C. T., Owais B. Chaudhri, y Stephen R. Bloom. 2010. «Bowels Control Brain: Gut Hormones and Obesity». *Nature Reviews Endocrinology* 6(8): 444-53. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.93>.
- Finegood, Diane T., Luisa Scaglia, y Susan Bonner-Weir. 1995. «Dynamics of  $\beta$ -Cell Mass in the Growing Rat Pancreas: Estimation With a Simple Mathematical Model». *Diabetes* 44 (3): 249-56. <https://doi.org/10.2337/diab.44.3.249>.
- Frias, J. P., G. B. Macaraeg, J. Ofrecio, J. G. Yu, J. M. Olefsky, y Y. T. Kruszynska. 2001. «Decreased Susceptibility to Fatty Acid-Induced Peripheral Tissue Insulin Resistance in Women». *Diabetes* 50 (6): 1344-50. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.6.1344>.

- Gannon, Maureen, Rohit N. Kulkarni, Hubert M. Tse, y Franck Mauvais-Jarvis. 2018. «Sex Differences Underlying Pancreatic Islet Biology and Its Dysfunction». *Molecular Metabolism*, Sex and Gender Differences in Metabolism (2018), 15 (septiembre): 82-91. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.017>.
- Gao, Tao, Brian McKenna, Changhong Li, Maximilian Reichert, James Nguyen, Tarjinder Singh, Chenghua Yang, et al. 2014. «Pdx1 maintains  $\beta$ -cell identity and function by repressing an  $\alpha$ -cell program». *Cell metabolism* 19 (2): 259-71. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.002>.
- Gersell, Deborah J., Ronald L. Gingerich, y Marie H. Greider. 1978. «Regional Distribution and Concentration of Pancreatic Polypeptide in the Human and Canine Pancreas». *Diabetes* 28 (1): 11-15. <https://doi.org/10.2337/diab.28.1.11>.
- Giménez Palop, Olga, y Assumpta Caixàs. 2009. «Péptido YY: una nueva estrategia para el tratamiento de la obesidad». *Endocrinología y Nutrición* 56 (1): 1-3. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(09\)70186-X](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(09)70186-X).
- Gittes, George K. 2009. «Developmental Biology of the Pancreas: A Comprehensive Review». *Developmental Biology* 326 (1): 4-35. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.024>.
- Göpel, Sven, Quan Zhang, Lena Eliasson, Xiao-Song Ma, Juris Galvanovskis, Takahiro Kanno, Albert Salehi, y Patrik Rorsman. 2004. «Capacitance Measurements of Exocytosis in Mouse Pancreatic  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\delta$ -Cells within Intact Islets of Langerhans». *The Journal of Physiology* 556 (3): 711-26. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.059675>.
- Gu, Guoqiang, Jolanta Dubauskaite, y Douglas A. Melton. 2002. «Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors». *Development* 129 (10): 2447.
- Gurdon, J. B. 1962. «The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles». *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 10 (4): 622.
- Gutiérrez-Adán, A, M Perez-Crespo, R Fernandez-Gonzalez, Ma Ramirez, P Moreira, B Pintado, P Lonergan, y D Rizos. 2006. «Developmental Consequences of Sexual Dimorphism During Pre-Implantation Embryonic Development». *Reproduction in Domestic Animals* 41 (s2): 54-62. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00769.x>.
- Hazelwood, Robert L. 1993. «The Pancreatic Polypeptide (PP-Fold) Family: Gastrointestinal, Vascular, and Feeding Behavioral Implications». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 202 (1): 44-63. <https://doi.org/10.3181/00379727-202-43511G>.
- Hellman, Bo, Arne Wallgren, y Claes Hellerström. 1962. «Two Types of Islet  $\alpha$  Cells in Different Parts of the Pancreas of the Dog». *Nature* 194 (4834): 1201-2. <https://doi.org/10.1038/1941201a0>.
- Henning, S. J. 1981. «Postnatal Development: Coordination of Feeding, Digestion, and Metabolism». *The American Journal of Physiology* 241 (3): G199-214. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1981.241.3.G199>.
- Herrera, P.L. 2000. «Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages». *Development* 127 (11): 2317.
- Herrera, P.L., J. Huarte, F. Sanvito, P. Meda, L. Orci, y J.D. Vassalli. 1991. «Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene». *Development* 113 (4): 1257.
- Hiremagalur, B. K., S. Vadlamudi, G. L. Johanning, y M. S. Patel. 1993. «Long-Term Effects of Feeding High Carbohydrate Diet in Pre-Weaning Period by Gastrostomy: A New Rat Model for Obesity». *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 17 (9): 495-502.

- Hiriart, Marcia. 2005. «El páncreas endocrino». En *Fisiología Médica*, 1a ed., 443-60. México: México Manual Moderno.
- Hiriart, Marcia, y Lydia Aguilar-Bryan. 2008. «Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295 (6): E1298-1306. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90493.2008>.
- Hiriart, Marcia, Myrian Velasco, Carlos Manlio Díaz-García, Carlos Larqué, Carmen Sánchez-Soto, Alondra Albarado-Ibañez, Juan Pablo Chávez-Maldonado, Alicia Toledo, y Neivys García-Delgado. 2015. «Pancreatic  $\beta$  Cells in Metabolic Syndrome». En *Islets of Langerhans*, editado por Md. Shahidul Islam, 817-44. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6686-0\\_27](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6686-0_27).
- Holliday, Robin. 2006. «Epigenetics: A Historical Overview». *Epigenetics* 1 (2): 76-80. <https://doi.org/10.4161/epi.1.2.2762>.
- Holzer, Peter, Florian Reichmann, y Aitak Farzi. 2012. «Neuropeptide Y, Peptide YY and Pancreatic Polypeptide in the Gut–Brain Axis». *Neuropeptides*, 30 years of NPY research, 46 (6): 261-74. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.08.005>.
- Horie, Ichiro, Norio Abiru, Mami Eto, Ayaka Sako, Junya Akeshima, Tomoe Nakao, Yomi Nakashima, et al. 2018. «Sex differences in insulin and glucagon responses for glucose homeostasis in young healthy Japanese adults». *Journal of Diabetes Investigation* 9 (6): 1283-87. <https://doi.org/10.1111/jdi.12829>.
- Jennings, Rachel E., Andrew A. Berry, James P. Strutt, David T. Gerrard, y Neil A. Hanley. 2015. «Human pancreas development». *Development* 142 (18): 3126. <https://doi.org/10.1242/dev.120063>.
- Jensen, Jan. 2004. «Gene Regulatory Factors in Pancreatic Development». *Developmental Dynamics* 229 (1): 176-200. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10460>.
- Jensen, Jan, Erna Engholm Pedersen, Philip Galante, Jacob Hald, R. Scott Heller, Makoto Ishibashi, Ryoichiro Kageyama, Francois Guillemot, Palle Serup, y Ole D. Madsen. 2000. «Control of Endodermal Endocrine Development by Hes-1». *Nature Genetics* 24 (1): 36-44. <https://doi.org/10.1038/71657>.
- Karlsson, Sven, Anton J. W. Scheurink, y Bo Ahrén. 2002. «Gender Difference in the Glucagon Response to Glucopenic Stress in Mice». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282 (1): R281-88. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2002.282.1.R281>.
- Kieffer, Timothy James, y Joel Francis Habener. 1999. «The Glucagon-Like Peptides». *Endocrine Reviews* 20 (6): 876-913. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.6.0385>.
- Kim, Abraham, Kevin Miller, Junghyo Jo, German Kilimnik, Pawel Wojcik, y Manami Hara. 2009. «Islet architecture». *Islets* 1 (2): 129-36. <https://doi.org/10.4161/isl.1.2.9480>.
- Kimmel, J. R., L. J. Hayden, y H. G. Pollock. 1975. «Isolation and Characterization of a New Pancreatic Polypeptide Hormone.» *Journal of Biological Chemistry* 250 (24): 9369-76.
- Kobayashi, Shin, Ayako Isotani, Nathan Mise, Masamichi Yamamoto, Yoshitaka Fujihara, Kazuhiro Kaseda, Tomoko Nakanishi, et al. 2006. «Comparison of Gene Expression in Male and Female Mouse Blastocysts Revealed Imprinting of the X-Linked Gene, RhoX5/Pem, at Preimplantation Stages». *Current Biology* 16 (2): 166-72. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.071>.
- Larsson, LI, GB Boder, y WN Shaw. 1977. «Changes in the islets of langerhans in the obese Zucker rat». *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 36 (6): 593—598.

- Larsson, L.-I., F. Sundler, y R. Håkanson. 1975. «Immunohistochemical Localization of Human Pancreatic Polypeptide (HPP) to a Population of Islet Cells». *Cell and Tissue Research* 156 (2): 167-71. <https://doi.org/10.1007/BF00221800>.
- Laychock, S. G., S. Vadlamudi, y M. S. Patel. 1995. «Neonatal rat dietary carbohydrate affects pancreatic islet insulin secretion in adults and progeny». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 269 (4): E739-44. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.269.4.E739>.
- Ling, Qi, Xiao Xu, Shu-Sen Zheng, y Holger Kalthoff. 2013. «The Diversity between Pancreatic Head and Body/Tail Cancers: Clinical Parameters and in Vitro Models». *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 12 (5): 480-87. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(13\)60076-4](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(13)60076-4).
- Loebrich, Sven, y Elly Nedivi. 2009. «The Function of Activity-Regulated Genes in the Nervous System». *Physiological Reviews* 89 (4): 1079-1103. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2009>.
- M, Prentki, Matschinsky Fm, y Madiraju Sr. 2013. «Metabolic Signaling in Fuel-Induced Insulin Secretion.» *Cell Metabolism* 18 (2): 162-85. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.018>.
- Malaisse-Lagae, F., Y. Stefan, J. Cox, A. Perrelet, y L. Orci. 1979. «Identification of a lobe in the adult human pancreas rich in pancreatic polypeptide». *Diabetologia* 17 (6): 361-65. <https://doi.org/10.1007/BF01236270>.
- Mansouri, Ahmed, Luc St-Onge, y Peter Gruss. 1999. «Role of Pax Genes in Endoderm-Derived Organs». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 10 (4): 164-67. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(98\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(98)00133-7).
- Marchese, Enza, Caitlin Rodeghier, Rebecca S. Monson, Benjamin McCracken, Tingqi Shi, Wesley Schrock, Joan Martellotto, Jose Oberholzer, y Kirstie K. Danielson. 2015. «Enumerating  $\beta$ -Cells in Whole Human Islets: Sex Differences and Associations With Clinical Outcomes After Islet Transplantation». *Diabetes Care* 38 (11): e176-77. <https://doi.org/10.2337/dc15-0723>.
- Mauvais-Jarvis, Franck, Arthur P. Arnold, y Karen Reue. 2017. «A Guide for the Design of Pre-Clinical Studies on Sex Differences in Metabolism». *Cell Metabolism* 25 (6): 1216-30. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.033>.
- Mittwoch, U. 1993. «Blastocysts prepare for the race to be male». *Human Reproduction* 8 (10): 1550-55. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137889>.
- Mojsov, S., G. Heinrich, I. B. Wilson, M. Ravazzola, L. Orci, y J. F. Habener. 1986. «Preproglucagon Gene Expression in Pancreas and Intestine Diversifies at the Level of Post-Translational Processing». *The Journal of Biological Chemistry* 261 (25): 11880-89.
- Murlin, John R., Harry D. Clough, C. B. F. Gibbs, y Arthur M. Stokes. 1923. «Aqueous Extracts of Pancreas I. Influence on the Carbohydrate Metabolism of Depancreatized Animals». *Journal of Biological Chemistry* 56 (1): 253-96.
- Nair, Gopika, y Matthias Hebrok. 2015. «Islet Formation in Mice and Men: Lessons for the Generation of Functional Insulin-Producing  $\beta$ -Cells from Human Pluripotent Stem Cells». *Current Opinion in Genetics & Development*, Developmental mechanisms, patterning and organogenesis, 32 (junio): 171-80. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.03.004>.
- Nijland, Mark J., Stephen P. Ford, y Peter W. Nathanielsz. 2008. «Prenatal Origins of Adult Disease». *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 20 (2): 132-38. <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e3282f76753>.
- Nuutila, P., M. J. Knuuti, M. Maki, H. Laine, U. Ruotsalainen, M. Teras, M. Haaparanta, O. Solin, y H. Yki-Jarvinen. 1995. «Gender and Insulin Sensitivity in the Heart and in Skeletal Muscles:

- Studies Using Positron Emission Tomography». *Diabetes* 44 (1): 31-36.  
<https://doi.org/10.2337/diab.44.1.31>.
- Olvera-Granados, Claudia Patricia, Guillermo Enrique Leo-Amador, y Hebert Luis Hernández-Montiel. 2008. «Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración?» *Boletín médico del Hospital Infantil de México* 65 (4): 306-24.
- Orci, Lelio, Francine Malaisse-Lagae, Dany Baetens, y Alain Perrelet. 1978. «PANCREATIC-POLYPEPTIDE-RICH REGIONS IN HUMAN PANCREAS». *The Lancet* 312 (8101): 1200-1201.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)92181-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)92181-5).
- Parchami, Ali, y Sanaz Kusha. 2015. «Effect of sex on histomorphometric properties of Langerhans islets in native chickens». *Veterinary research forum : an international quarterly journal* 6 (4): 327—330.
- Park, In-Sun, y Moïse Bendayan. 1992. «Coexistence of Glucagon and Pancreatic Polypeptide in Human and Rat Pancreatic Endocrine Cells». *Endocrine Pathology* 3 (3): 134-43.  
<https://doi.org/10.1007/BF02921354>.
- Paulin, C., y P. M. Dubois. 1978. «Immunohistochemical Identification and Localization of Pancreatic Polypeptide Cells in the Pancreas and Gastrointestinal Tract of the Human Fetus and Adult Man». *Cell and Tissue Research* 188 (2): 251-57.  
<https://doi.org/10.1007/BF00222634>.
- Petrik, J., E. Arany, T. J. McDonald, y D. J. Hill. 1998. «Apoptosis in the Pancreatic Islet Cells of the Neonatal Rat Is Associated with a Reduced Expression of Insulin-like Growth Factor II That May Act as a Survival Factor». *Endocrinology* 139 (6): 2994-3004.  
<https://doi.org/10.1210/endo.139.6.6042>.
- Petrik, James, Malathi Srinivasan, Ravikumar Aalinkel, Stephen Coukell, Edith Arany, Mulchend S. Patel, y David J. Hill. 2001. «A Long-Term High-Carbohydrate Diet Causes an Altered Ontogeny of Pancreatic Islets of Langerhans in the Neonatal Rat». *Pediatric Research* 49 (1): 84-92. <https://doi.org/10.1203/00006450-200101000-00019>.
- Philippe, Jacques, Corinne Morel, y Martine Cordier-Bussat. 1995. «Islet-Specific Proteins Interact with the Insulin-Response Element of the Glucagon Gene». *Journal of Biological Chemistry* 270 (7): 3039-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.7.3039>.
- Pictet, Raymond L., William R. Clark, Robert H. Williams, y William J. Rutter. 1972. «An Ultrastructural Analysis of the Developing Embryonic Pancreas». *Developmental Biology* 29 (4): 436-67. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(72\)90083-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(72)90083-8).
- Piran, R., S.-H. Lee, C.-R. Li, A. Charbono, L. M. Bradley, y F. Levine. 2014. «Pharmacological Induction of Pancreatic Islet Cell Transdifferentiation: Relevance to Type I Diabetes». *Cell Death & Disease* 5 (7): e1357-e1357. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.311>.
- Prentki, M., y F. M. Matschinsky. 1987. «Ca<sup>2+</sup>, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion». *Physiological Reviews* 67 (4): 1185-1248.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.1987.67.4.1185>.
- Puri, Sapna, y Matthias Hebrok. 2010. «Cellular Plasticity within the Pancreas— Lessons Learned from Development». *Developmental cell* 18 (3): 342-56.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.005>.
- Quesada, Ivan, Eva Tudurí, Cristina Ripoll, y Ángel Nadal. 2008. «Physiology of the Pancreatic  $\alpha$ -Cell and Glucagon Secretion: Role in Glucose Homeostasis and Diabetes». *Journal of Endocrinology* 199 (1): 5-19. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0290>.
- Raff, Martin. 2003. «Adult Stem Cell Plasticity: Fact or Artifact?» *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19 (1): 1-22.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.143037>.

- Rahier, J., J. Wallon, S. Loozen, A. Lefevre, W. Gepts, y J. Haot. 1983. «The Pancreatic Polypeptide Cells in the Human Pancreas: The Effects of Age and Diabetes». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 56 (3): 441-44. <https://doi.org/10.1210/jcem-56-3-441>.
- Rall, Leslie B., Raymond L. Pictet, Robert H. Williams, y William J. Rutter. 1973. «Early Differentiation of Glucagon-Producing Cells in Embryonic Pancreas: A Possible Developmental Role for Glucagon\*». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (12 Pt 1-2): 3478-82.
- Rieck, Sebastian, Eric D. Bankaitis, y Christopher V. E. Wright. 2012. «Lineage Determinants in Early Endocrine Development». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Nutrient Sensing Pancreas Development, 23 (6): 673-84. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.06.005>.
- Rorsman, Patrik, y Frances M. Ashcroft. 2018. «Pancreatic  $\beta$ -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men». *Physiological Reviews* 98 (1): 117-214. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2017>.
- Sadler, T.W. 2019. *Langman. Embriología médica*. 14va ed. EUA: LWW.
- Scaglia, L, C J Cahill, DT Finegood, y S Bonner-Weir. 1997. «Apoptosis Participates in the Remodeling of the Endocrine Pancreas in the Neonatal Rat». *Cell Death* 138 (4): 6.
- Schwartz, Thue W. 1983. «Pancreatic Polypeptide: A Hormone Under Vagal Control». *Gastroenterology* 85 (6): 1411-25. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(83\)80027-4](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(83)80027-4).
- Shih, Hung Ping, Allen Wang, y Maike Sander. 2013. «Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29 (1): 81-105. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122405>.
- Shino, A., T. Matsuo, H. Iwatsuka, y Z. Suzuoki. 1973. «Structural changes of pancreatic islets in genetically obese rats». *Diabetologia* 9 (5): 413-21. <https://doi.org/10.1007/BF01239438>.
- Sicree, R. A., P. Z. Zimmet, D. W. Dunstan, A. J. Cameron, T. A. Welborn, y J. E. Shaw. 2008. «Differences in Height Explain Gender Differences in the Response to the Oral Glucose Tolerance Test— the AusDiab Study». *Diabetic Medicine* 25 (3): 296-302. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2007.02362.x>.
- Slack, J.M. 1995. «Developmental biology of the pancreas». *Development* 121 (6): 1569.
- Stanojevic, Violeta, y Joel F. Habener. 2015. «Evolving Function and Potential of Pancreatic Alpha Cells». *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 29 (6): 859-71. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.10.002>.
- Stefan, Yolande, Lelio Orci, Francine Malaisse-Lagae, Alain Perrelet, Yogesh Patel, y Roger H. Unger. 1982. «Quantitation of Endocrine Cell Content in the Pancreas of Nondiabetic and Diabetic Humans». *Diabetes* 31 (8): 694-700. <https://doi.org/10.2337/diab.31.8.694>.
- Steiner, Donald J., Abraham Kim, Kevin Miller, y Manami Hara. 2010. «Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition». *Islets* 2 (3): 135-45.
- Sundler, F., R. Håkanson, y L.-I. Larsson. 1977. «Ontogeny of Rat Pancreatic Polypeptide (PP) Cells». *Cell and Tissue Research* 178 (3): 303-6. <https://doi.org/10.1007/BF00218694>.
- Sutherland, E. W., y C. De Duve. 1948. «Origin and Distribution of the Hyperglycemic-Glycogenolytic Factor of the Pancreas». *The Journal of Biological Chemistry* 175 (2): 663-74.
- Talchai, Chutima, Shouhong Xuan, Hua V. Lin, Lori Sussel, y Domenico Accili. 2012. «Pancreatic  $\beta$  Cell Dedifferentiation as a Mechanism of Diabetic  $\beta$  Cell Failure». *Cell* 150 (6): 1223-34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.029>.
- Thorel, Fabrizio, Virginie Népote, Isabelle Avril, Kenji Kohno, Renaud Desgraz, Simona Chera, y Pedro L. Herrera. 2010. «Conversion of Adult Pancreatic  $\alpha$ -Cells to  $\beta$ -Cells after Extreme  $\beta$ -Cell Loss». *Nature* 464 (7292): 1149-54. <https://doi.org/10.1038/nature08894>.



- Tm, Lin, y Chance Re. 1974. «Candidate Hormones of the Gut. VI. Bovine Pancreatic Polypeptide (BPP) and Avian Pancreatic Polypeptide (APP).» *Gastroenterology* 67 (4): 737-38.
- Tsuchitani, Minoru, Junko Sato, y Hiroko Kokoshima. 2016. «A comparison of the anatomical structure of the pancreas in experimental animals». *Journal of Toxicologic Pathology* 29 (3): 147-54. <https://doi.org/10.1293/tox.2016-0016>.
- Vadlamudi, S., S. C. Kalhan, y M. S. Patel. 1995. «Persistence of metabolic consequences in the progeny of rats fed a HC formula in their early postnatal life». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 269 (4): E731-38. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.269.4.E731>.
- Wang, Xiaojun, Mark C. Zielinski, Ryosuke Misawa, Patrick Wen, Tian-Yuan Wang, Cheng-Zhang Wang, Piotr Witkowski, y Manami Hara. 2013. «Quantitative Analysis of Pancreatic Polypeptide Cell Distribution in the Human Pancreas». *PLOS ONE* 8 (1): e55501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055501>.
- Wierup, N, H Svensson, H Mulder, y F Sundler. 2002. «The Ghrelin Cell: A Novel Developmentally Regulated Islet Cell in the Human Pancreas». *Regulatory Peptides* 107 (1-3): 63-69. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(02\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(02)00067-8).