



Universidad de Valladolid

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGIA



PROYECTO FIN DE MÁSTER:

**PAPEL DE LAS CÉLULAS DELTA-PANCREÁTICAS EN EL METABOLISMO DE LA
GLUCOSA DURANTE LA GESTACIÓN**

PRESENTADO POR:

ARIANNA CAROLINA GONCALVES RAMIREZ

DIRIGIDO POR:

DRA. IRENE COZÁR CASTELLANO

DRA. BEATRIZ MERINO ANTOLÍN

ÍNDICE

Abreviaturas	3
Introducción	4
- El páncreas	4
- El factor de transcripción Homeobox 1 pancreático y duodenal (PDX1)	5
- Islote pancreático: Interrelación celular de distintos linajes endocrinos	5
- Células δ -pancreáticas	7
- Transdiferenciación celular en el islote pancreático	7
- Páncreas endocrino y embarazo	8
Hipótesis	9
Objetivos	9
Materiales y métodos	10
- Modelo animal	10
- Extracción de islotes pancreáticos de rata	10
- Tratamiento con hormonas	11
- Secreción hormonal de somatostatina	11
- Fijación y bloques	12
- Cortes histológicos	12
- Inmunofluorescencia	12
- Ensayo ELISA	14
- Almacenamiento	14
- Microscopía	14
- Análisis de imagen y estadístico	15
Resultados	16
Discusión	23
Conclusiones	25
Referencias	26

ABREVIATURAS

Sst	Somatostatina
Ins	Insulina
PDX1	Homeobox 1 pancreático y duodenal
Aa	Aminoácidos
Ssrt 1-5	Receptor de somatostatina 1-5
Prl	Prolactina
HPI	Lactógeno placentario humano
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
FBS	Suero fetal bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
PBS	Buffer fosfato salino
E ₂	17-β estradiol
LP	Lactógeno placentario
KRB	Buffer Krebs-Ringer modificado
NKX6.1	Proteína homeobox NKX6.1
NGN3	Neurogenina 3

INTRODUCCIÓN

El páncreas

El páncreas es un órgano mixto, cuya función exocrina representa la mayor parte de éste y se encarga de secretar los jugos pancreáticos necesarios para la digestión; también posee funciones endocrinas ejercidas por un conjunto de células que se agrupan formando islotes y que se entremezclan en el tejido exocrino.

Estos islotes pancreáticos, también conocidos como islotes de Langerhans, están conformados por 5 tipos de células, que, a pesar de secretar hormonas diferentes, logran interrelacionarse. La sinergia de sus funciones y la similitud en su funcionamiento parecen explicarse por la presencia de un progenitor celular común. Estas células son:

- α - pancreáticas, que secretan glucagón, y representan aproximadamente 20% del islote en roedor y 35% en humanos. ⁽¹⁾
- β - pancreáticas, que secretan insulina (Ins) y representan aproximadamente 75% del islote en roedor y 54% en humanos. ⁽¹⁾
- δ - pancreáticas, que secretan somatostatina (Sst) y representan aproximadamente 6% del islote en roedor y 11% en humanos. ⁽¹⁾
- ϵ - pancreáticas, que secretan grelina y representan aproximadamente 1% del islote en roedor y en humanos.
- χ -pancreáticas, que secretan el polipéptido pancreático y solo se encuentra en pequeñas proporciones en roedor y en humanos.

El desarrollo embrionario del páncreas se inicia mediante la especialización y proliferación de un pequeño grupo de células endodérmicas, que posterior a una secuencia de divisiones dan origen a los progenitores endocrinos. ⁽²⁾ **(Figura 1)**

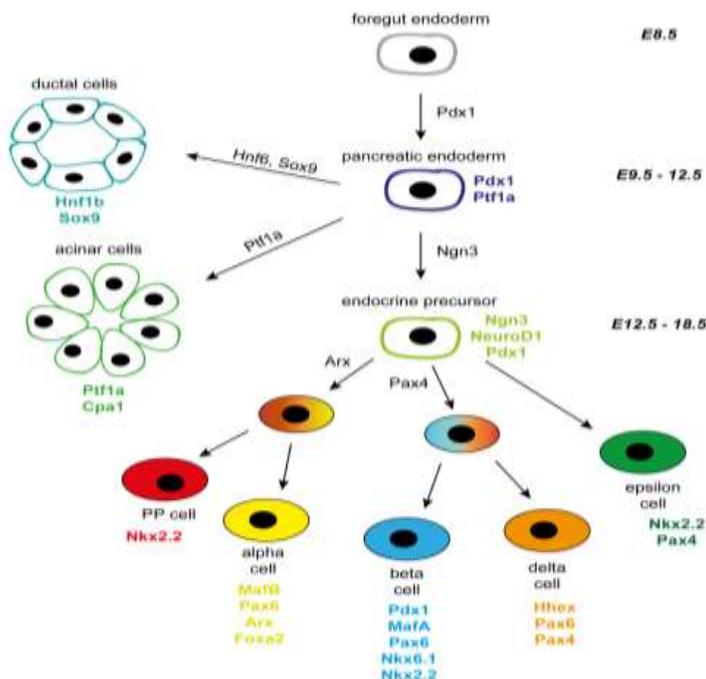


Figura 1. Esquema del desarrollo de las líneas celulares endocrinas en el islote pancreático (adaptado de referencia 21)

El factor de transcripción Homeobox 1 pancreático y duodenal (PDX1)

Los factores de transcripción son proteínas nucleares capaces de unirse al ADN y que se encargan de regular la expresión de genes, mediante la oclusión o no de secuencias de unión específicas; controlando así, el desarrollo de tipos celulares y patrones de desarrollo específico. Su activación está dada mediante diferentes mecanismos que pueden involucrar unión a ligando, interacciones proteína-proteína y fosforilación.⁽³⁾⁽⁴⁾

Las células progenitoras del islote pancreático, se caracterizan por la expresión de PDX1, proteína nuclear que consta de 282 aminoácidos (aa) y pertenece a la superfamilia de proteínas homeobox ipf-1/ xlhbox8. PDX1 es el primer factor de transcripción producido en el páncreas, ya que es necesario para la elaboración de las yemas pancreáticas emergentes y, por tanto, para la formación de islotes, acinos y conductos⁽⁵⁾, por lo que no es de extrañar que se necesiten altas cantidades de este factor de transcripción para el correcto desarrollo embrionario.

Los experimentos de rastreo de linaje muestran que todas las células pancreáticas tienen un mismo origen a partir de células progenitoras pancreáticas multipotentes, que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquiera de los 5 linajes endocrinos pancreáticos⁽⁶⁾; además el desarrollo del páncreas parece depender de varios factores de crecimiento que se cree que están, al menos en parte, controlados por PDX1⁽²⁾.

Cabe destacar que normalmente este factor se encuentra en cantidades mínimas en la mayoría de las células endocrinas adultas, exceptuando en las células β ⁽³⁾; además, se ha descrito que este factor cumple varias funciones a nivel de diferenciación, entre ellas la inducción del gen de insulina.⁽²⁾

Islote pancreático: Interrelación celular de distintos linajes endocrinos

La arquitectura del islote es específica de especie y depende de los requerimientos energéticos y hormonales de cada uno, estando determinada la arquitectura del islote por la distribución de las células no- β . En los ratones, estas células se encuentran inmediatamente adyacentes a los capilares rodeando el núcleo central β . En islotes de gran tamaño (y en humanos), los capilares penetran en el centro del islote y las células no- β aparecen dentro del núcleo β ⁽⁷⁾ **(Figura 2)**.

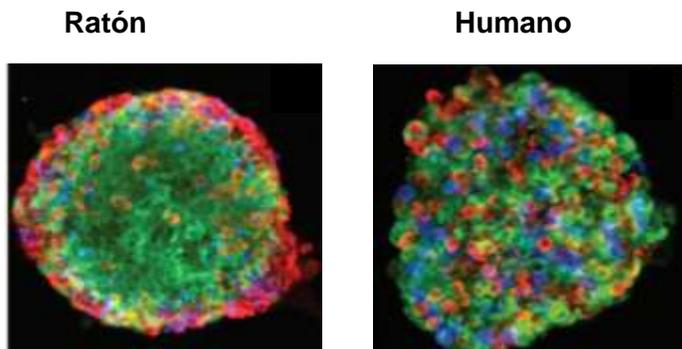


Figura 2. Inmunotinción y distribución celular de los islotes pancreáticos: insulina (verde) glucagón (rojo) somatostatina (azul) (adaptado de referencia 1)

Las células β representan la mayor población del islote pancreático y su principal función radica en el control de la glicemia; más específicamente, son las únicas capaces de disminuir los niveles de azúcar en sangre, pero también secretan otras hormonas que le ayudan a interrelacionarse con las células vecinas como la urocortina 3 que interviene en la activación de las células δ ante una hipersecreción de insulina⁽⁸⁾ (**Figura 3**).

La insulina se libera cuando el nivel de glucosa en sangre ronda los 7mM ya que concentraciones inferiores (por debajo de los 5 mM) estimulan la acción de hormonas proglucemiantes como el glucagón; que, a su vez, estimula a las células β .

Paradójicamente el glucagón es inhibido por la acción de productos inhibitorios derivados de células β sobre las células α (insulina, GABA, etc.); sin embargo, ninguno de estos factores inhibitorios, ha sido capaz de reconocerse como elemento principal de la inhibición; es aquí donde se introduce el concepto de una estimulación β -dependiente sobre las células δ , quienes secretando somatostatina, serían las responsables en la disminución de la secreción del glucagón durante la hiperglicemia postpandrial en un páncreas sano⁽⁸⁾.

En los roedores, las células δ tienen una forma que recuerda a las neuronas, con procesos citoplasmáticos que le permiten interaccionar con las demás células del islote, de modo que forman un sincitio que recubren el islote. Sin embargo, en humanos estas células no poseen la morfología descrita en modelos murinos y se encuentran mayormente dispersas dentro del núcleo β ⁽⁸⁾⁽⁹⁾.

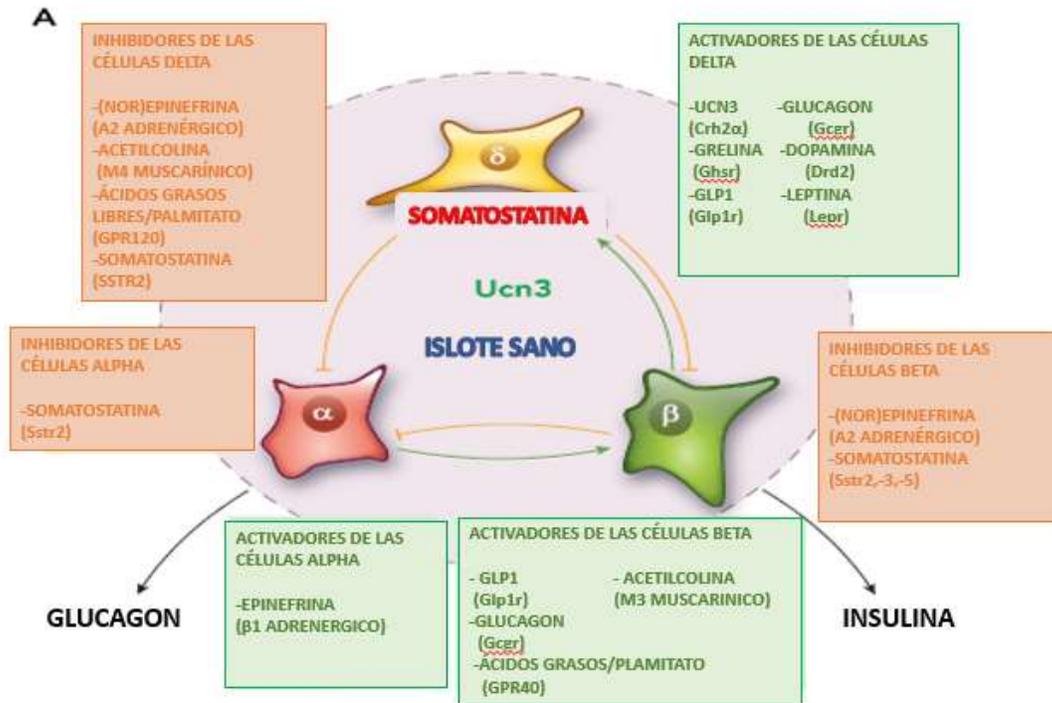


Figura 3. Interrelación de las células endocrinas pancreáticas (adaptado de referencia 8)

Células δ -pancreáticas

Las células δ representan aproximadamente un 6% del total del islote y su principal función es la secreción de la somatostatina. Péptido que se secreta como pre-pro-somatostina, rápidamente cortada en pro-somatostatina y posteriormente cortada en dos formas bioactivas (de 14 y 28 aa), siendo el principal producto de las células δ la forma de 14 aa.

En condiciones fisiológicas, la Sst cumple un papel de regulación de las células vecinas, principalmente inhibiéndolas (**Figura 3**); este mecanismo se lleva a cabo a través de 5 tipos de receptores diferentes (Sstr1-5), siendo la forma 2 la que más se expresa en las células α y la forma 3 la que más se expresa en las células β ⁽⁸⁾. Se cree que el mecanismo de inhibición de la Sst sobre las células β es un mecanismo robusto por el cual el organismo busca impedir el exceso de insulina y por ende la hipoglicemia.

Además de los efectos inhibidores de la Sst sobre la liberación de hormonas, algunos estudios apuntan a que esta hormona cumple un papel en la inhibición de la proliferación celular⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾ y la secreción de insulina en células de ratón y humano⁽¹²⁾.

En la actualidad hay pocos estudios sobre las células δ en el contexto de la diabetes, de los cuales podemos ver que en modelos murinos diabéticos existe una alteración inversamente proporcional con la masa β , aunque los autores no logran describir la razón de esta relación^(9,13-16). Sumado a esto, cabe resaltar que varios estudios demuestran la capacidad que tienen las células endocrinas del páncreas de distintos linajes para entrar en procesos de transdiferenciación⁽¹⁷⁻²¹⁾, algo curioso ya que células δ y β parecen compartir un precursor celular inmediato⁽²⁾.

Transdiferenciación celular en el islote pancreático

Se conoce con este nombre al proceso por el cual las células maduras comienzan a expresar factores de transcripción presentes en otras líneas celulares, lo que trae como consecuencia la reversión del estadio maduro para diferenciarse en células de otro linaje celular.

Como se ha descrito previamente, el factor de transcripción PDX1 es un elemento importante para la identidad de células β , por lo que suponemos que, si alguna célula no- β incrementa la expresión nuclear de este factor, podría indicar un cambio del linaje celular apuntando a la línea β . Esto debido a que en modelos murinos la pérdida de PDX1 causa que las células β comiencen a expresar factores de transcripción del linaje α , además que se ha reportado la asociación entre el aumento de células no- β y la desdiferenciación de células β ⁽²²⁻²³⁾.

Por otro lado, en algunos modelos in vitro se ha identificado la plasticidad de las células β del islote pancreático en diferenciarse a células α ⁽¹⁸⁾, pudiendo estar relacionado este evento a la aparición de hiperglucagonemia en diabetes.

Páncreas endocrino y embarazo

El embarazo es un proceso en el cual ocurren cambios fisiológicos que buscan establecer las condiciones óptimas para la supervivencia del nuevo ser; de entre estos cambios, es relevante destacar el papel que cumple el sistema endocrino. Se sabe que durante este proceso aumentan los requerimientos de energía causando un desequilibrio metabólico en la madre⁽²⁴⁾. Conforme progresa el embarazo, la sensibilidad a la insulina disminuye y aumentan los niveles de glucosa en sangre, causando una resistencia insulínica fisiológica⁽²⁵⁾; la cual, si progresa en el tiempo, puede generar lo que se conoce como diabetes gestacional. Se cree que esta insensibilización es producto del aumento de las hormonas placentarias como la prolactina (PRL), el cortisol y el lactógeno placentario humano (hPL). Sin embargo, no se ha demostrado un efecto directo de esta última sobre la sensibilidad a la insulina materna⁽²⁶⁾.

En la madre, el equilibrio entre la resistencia a la insulina y una reserva de células β hiperdinámicas aumentada, asegura un flujo constante de nutrientes hacia el feto hasta el final del embarazo. Luego, comenzando poco antes del parto y extendiéndose hasta el período posparto, la masa de células β se reduce a su tamaño previo⁽²⁶⁾.

La mayoría de los estudios sobre la arquitectura del islote durante el embarazo se han enfocado en la dinámica celular β ⁽²⁷⁻²⁹⁾; aunque se ha descrito un aumento de la proliferación y del área de células α durante la gestación, aun se sabe poco sobre lo que ocurre con las células no- β ⁽³⁰⁾.

Es por ello que, este estudio aborda el papel de las células δ en ratones gestantes, ya que se evidencia el desajuste metabólico que implica la gestación y su semejanza con lo ocurrido en la diabetes. A su vez, se estudia la expresión del factor de transcripción PDX1 en estas células, para estudiar la capacidad de transdiferenciación de las mismas en el contexto de la gestación.

HIPÓTESIS

La regulación paracrina de las células del islote es importante tanto en procesos fisiológicos como fisiopatológicos. En este estudio queremos investigar la importancia de las células δ productoras de somatostatina en la función del islote pancreático en el contexto de la gestación, como modelo de resistencia insulínica.

Por ello proponemos las siguientes hipótesis:

1. La expansión de la masa celular β -pancreática durante la gestación ocurre a expensas de una disminución de la masa celular δ -pancreática.
2. El proceso de compensación β - δ es producido, al menos en parte, por un proceso de transdiferenciación de células δ al linaje β .
3. El proceso de transdiferenciación de células δ a β está condicionado, parcialmente, por hormonas placentarias como estrógenos y/o lactógeno placentario.

OBJETIVOS

1. Estudiar el área y cantidad de células β en el grupo control y el grupo de ratonas gestantes.
2. Estudiar el área y cantidad de células δ en el grupo control y el grupo de ratonas gestante.
3. Estudiar la presencia de células doble positivo para insulina y somatostatina en el grupo control y el grupo de ratonas gestantes.
4. Estudiar la presencia de células δ , positivas para el factor de transcripción PDX1 en el grupo control y el grupo de ratonas gestantes.
5. Estudiar la implicación de las hormonas estradiol y lactógeno placentario en el proceso de transdiferenciación de somatostatina a insulina "ex vivo".

MATERIALES Y MÉTODOS

- Modelo animal

Se usaron ratonas C57B16J de 8 semanas de edad, divididos en un grupo de 5 controles y un grupo de 5 preñadas en estadio 14,5 *post coitum*; a quienes se les midió, anteriormente los niveles de glicemia utilizando un glucómetro, e insulinemia plasmática postprandial mediante ELISA, dando como resultado una media de 125 ± 3 mg/dl y $0,218 \pm 0,014$ ng/ml respectivamente para el grupo control y 126 ± 4 mg/dl y $1,219 \pm 0,337$ ng/ml respectivamente para el grupo de preñadas ($P < 0.01$ para las insulinas). Las ratonas preñadas son, por lo tanto, un modelo de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina.

- Extracción de islotes pancreáticos de rata

Para la extracción de islotes se usaron ratas Sprague Dawley hembra de 8 semanas de edad, fueron sacrificadas mediante inhalación de isoflurano. Se realizó corte abdominal a través de línea media. Se descubrieron los planos inferiores y posteriormente se inyectó a través del conducto pancreático 10 ml de colagenasa (1,7mg/ml):

- Hanks 1X (SIGMA RNBH0989) 0.03%NaHCO₃ (filtrado bajo esterilidad).

Se extrajeron los páncreas mediante corte y se depositaron en tubos falcon de 50 ml.

Se colocaron los tubos en baño a 37°C durante 15 minutos, y posterior a ese tiempo se pasaron a hielo para detener la reacción de digestión y se completó el tubo con solución Hanks-FBS hasta llegar 15ml.

- Hanks 1X 10% Suero fetal bovino (FBS)

Se dieron unos toques con el vortex y se centrifugó a 1.000rpm y 37°C por 2 minutos. Una vez acabado, se desechó el sobrenadante y se repitió lo anterior dos veces más.

Se desechó sobrenadante, se completó con solución Hanks-FBS hasta llegar a los 10 ml, se resuspendió con el vortex y se filtró con un colador en nuevos tubos. Se centrifugó 1.000rpm y 37°C y por 2 minutos.

Se retiró el sobrenadante, y se añadió 10 ml de Histopaque (Sigma 10771) y se pasó por vortex. Posteriormente de forma lenta y continua se añadió 10 ml de solución Hanks 1X, y se generó un gradiente de densidades. Se centrifugó a 2.800rpm y 10°C durante 20 minutos sin freno, para no romper el gradiente.

Posterior a esto, se retiró la interfase con una pipeta y se puso en un nuevo tubo, que se completó con solución Hanks 1X hasta 30 ml y se centrifugó 1.000 rpm y 37°C durante 2 minutos (se repitió el lavado una segunda vez).

Se realizaron tres pasos de sedimentación; en el primero se desechó el sobrenadante y se completó con solución Hanks 1X hasta completar 25 ml, se voltearon suavemente los tubos tres veces y se dejó descansar por 2 minutos. En el segundo y tercer paso se desecharon

10 ml de sobrenadante y se completó con 10 ml de solución Hanks 1X nueva, se voltearon los tubos tres veces y se dejó descansar 2 minutos.

Cuando se terminó la tercera sedimentación, se desechó 10 ml de sobrenadante y se sustituyó con 10 ml de medio para islotes (11 mM glucosa) a 37°C. Se resuspendió los islotes y se pasaron a placas de Petri.

Una vez en las placas y bajo lupa, se seleccionaron los islotes y se pasaron a eppendorf.

En los eppendorf se desechó el medio, y se lavó con 400 µl de medio para islotes sin rojo fenol y con FBS despojado de carbón (16mM glucosa). Una vez lavado, se desechó sobrenadante y se vertió 1 ml del mismo medio para resuspender y sembrar.

Se sembraron 3 ml en cada placa Corning sin tratar 35mm x 10mm poliestireno.

- Tratamiento con Hormonas

Se separaron los islotes en 4 grupos y las hormonas se diluyeron en dimetilsulfóxido (DMSO) 10⁻⁵%⁽³¹⁾:

- Control: DMSO en medio para islotes 16 mM glucosa, FBS sin carbono activo.
- Grupo tratado con lactógeno placentario (LP): LP 0,5% (Prospec Cyt-511-b) en solución final del grupo control.
- Grupo tratado con estrógenos (E₂): 17β-estradiol 0,27% (Sigma SLCF1943) en DMSO.
- Grupo tratado con estrógeno y lactógeno placentario: LP 0,5% en solución final del grupo tratado con E₂.

El tratamiento se dejó en incubadora durante 48 horas.

- Secreción hormonal de somatostatina

Se transfirieron los islotes, previamente tratados con E₂, LP y E₂ + LP, a insertos para cultivos celulares (25 islotes según condición) con 300 µl de medio RPMI.

Se desechó el medio, sin dañar los islotes, y se lavó con medio RPMI.

Se añadió 400 µl de buffer modificado Krebs-Ringer (KRB) a 1mM glucosa en cada inserto y se incubó a 37°C por 1 Hora.

Se desechó el medio y se echó 400µl de KRB a 1nM y a 20 mM según condición, por quintuplicado, y se incubó a 37°C por 1 hora.

Se recogió el sobrenadante con cuidado de no dañar los islotes en eppendorf y se congeló hasta realizar ELISA

Se añadió 100 µl de etanol ácido a los insertos que contenían el pellet y se congelaron

- Fijación y bloques

- Fijación

Se sacaron los islotes según condición y se centrifugaron durante 2 minutos, 1.000rpm a temperatura ambiente.

Se desechó sobrenadante, se completó con buffer fosfato (PBS) y se centrifugó nuevamente (como en el paso anterior).

Se desechó sobrenadante, se echó 1µl de formalina y se dejó actuar por 2 h y se centrifugó.

Se lavó con PBS y se centrifugó nuevamente.

- Bloques de Histogel

En termobloque previamente calentado a 70°C se calentaron alícuotas de Histogel (Thermo HG-4000-012) y se vertió 300µl en cada muestra, previamente se desechó el PBS.

Se colocaron 20 µl de Affigel (Biorad 153-7301) en los eppendorf y se centrifugó a 3.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se enfrió a 4°C por 1 hora para que solidificase.

Se cortó el cono del gel, dejando la sección con los islotes, y se dejó en PBS hasta incluir en parafina.

- Bloques de Parafina

Se deshidrató con alcoholes de concentraciones crecientes 20 minutos cada uno (70%-100%) y posteriormente 20 minutos en xileno (2 veces) en agitador.

Se calentó la parafina líquida a 70°C.

Se dejó cada muestra en un molde lleno de parafina, durante 1 hora.

Se pasaron los islotes al molde definitivo y se rellenó con nueva parafina líquida.

Se dejó enfriar para realizar los cortes.

- Cortes histológicos

Los tejidos pancreáticos fueron previamente obtenidos por cirugía y fijados en parafina y conservados a temperatura ambiente hasta la obtención de los cortes; hechos estos con microtomo a un grosor de 5µM. Los cortes se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

- Inmunofluorescencia

Se realizaron protocolos para tinción de las hormonas somatostatina, insulina y el factor de transcripción PDX1.

1. Tinción somatostatina/insulina en páncreas de ratón

Se sumergieron los portas en xileno por 15 minutos, posteriormente se pasaron por alcoholes de concentraciones decrecientes 10 minutos cada uno (100%-70%) y se pasaron 5 minutos por PBS (2 veces).

Se bloqueó durante 1 hora, en caja húmeda y a temperatura ambiente, con 100µl de solución de bloqueo (1% BSA + 0.2% NGS en PBS).

Después del bloqueo, se aplicó el anticuerpo primario y se dejó toda la noche a 4°C.

Para preparar el anticuerpo primario:

- Anti-somatostatina de rat (Abcam AB30788) dilución 1/50.
- Anti-insulina de guinea pig (Abcam AB7842) dilución 1/50.

Al día siguiente, se dejó 15 minutos a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS a 5 minutos cada lavado.

Se aplicó anticuerpo secundario 30 minutos. Para preparar anticuerpo secundario:

- Alexa 594 anti-rat (Invitrogen A11007) dilución 1/1.000 (Rojo).
- Alexa 488 anti-guinea pig (Invitrogen A11073) dilución 1/1.000 (Verde).

Se hicieron 3 lavados con PBS, 5 minutos cada lavado.

Se montaron portas con medio de montaje Fluoroshield with Dapi (Sigma).

2. Tinción somatostatina/PDX1⁽³²⁾ en páncreas de ratón.

Se sumergieron los portas en xileno durante 15 minutos, posteriormente se pasó por alcoholes decrecientes 10 minutos cada uno (100%-70%), y se pasó 5 minutos por PBS (2 veces).

Para los islotes de rata, los alcoholes (95%-70%) se dejaron por 3 minutos.

Se realizó desenmascaramiento del antígeno, para mejorar el reconocimiento del anticuerpo, en hervidor por 40 minutos en citrato sódico 10mM pH6.

Se lavó 1 vez con PBS, por 5 minutos.

Se bloqueó durante 1 hora, en caja húmeda y a temperatura ambiente, con 100 µl de solución de bloqueo PBS Tween 0,2% + FBS 3%

Después del bloqueo, se aplicó el anticuerpo primario y se dejó toda la noche a 4°C.

Para preparar el anticuerpo primario:

- Anti-somatostatina de rat (Abcam AB30788) dilución de 1/50.
- Anti-PDX1 de guinea pig (Abcam AB47308) dilución 1/200.

Ambos anticuerpos se diluyeron en solución PBS Tween 0,2% +FBS 1,5%

Al día siguiente, se dejó 15 minutos a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS, 5 minutos cada lavado.

Se aplicó anticuerpo secundario 30 minutos. Para preparar anticuerpo secundario:

- Alexa 594 anti-rat (Invitrogen A11007) dilución 1/1.000 (Rojo).
- Alexa 488 anti-guinea pig (Invitrogen A11073) dilución 1/1.000 (Verde).

Ambos anticuerpos se diluyeron en Solución PBS Tween 0,2% +FBS 1,5%

Se hicieron 3 lavados con PBS, 5 minutos cada lavado.

Se montaron con medio de montaje Fluoroshield with Dapi (Sigma).

3. Tinción somatostatina en islotes de rata

Se sumergieron las placas en xylene por 15 minutos, posteriormente se pasaron por alcoholes de concentraciones decrecientes: etanol 100% por 10 minutos y el resto (95%-70%) durante 3 minutos y 5 minutos en PBS (dos veces).

Se realizó desenmascaramiento del antígeno, para mejorar el reconocimiento del anticuerpo, en hervidor por 20 minutos en citrato sódico 10mM pH6.

El resto del procedimiento fue igual que para los páncreas de ratón.

- Ensayo ELISA

La determinación de los niveles hormonales de Sst se realizó según protocolo comercial de Phoenix pharmaceuticals, inc. EK-060-03.

- Almacenamiento

Las muestras ya teñidas se guardan en carpeta cerrada y se dejan a 4°C hasta el momento de la visualización con el microscopio.

- Microscopía

Se utilizó microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse Ni-E) con filtros para las longitudes de onda respectivas de los colores rojo, verde y azul. Se observaron los tejidos a 20X.

- Análisis de imagen y estadístico

Se utilizó el software NIS-elements para fotografiar las zonas fluorescentes deseadas de la muestra. Se utilizó el programa ImageJ para realizar la cuantificación de área y número de células de los islotes pancreáticos. A su vez también se analizó la presencia de células con doble tinción somatostatina+/insulina + (color rojo y verde) y la presencia de células de somatostatina con núcleos PDX1+.

Se utilizó el programa Microsoft Excel como base de datos y el programa Graphpad Prism 8 para la realización de gráficos y pruebas estadísticas. Para este estudio se utilizó la prueba T de Student para comparar dos muestras y el One way Anova para la comparación de más de dos muestras, se consideró como significancia estadística una $P < 0,05$.

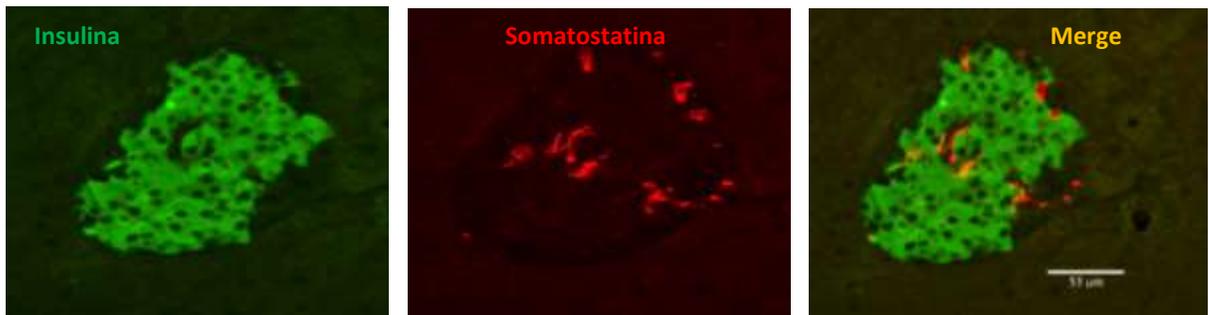
RESULTADOS

- Disminución del área celular correspondiente a somatostatina y aumento del correspondiente a insulina

Se realizaron las tinciones correspondientes para cada grupo (n=5 ratonas control y 5 ratonas preñadas) y a través de microscopía con epifluorescencia se fotografiaron los islotes pancreáticos (154 islotes para el grupo control y 130 islotes para el grupo preñado) teñidos para somatostatina e insulina (**Figura 4**).

Se realizó la cuantificación de área β y δ dentro del islote pancreático en ambas situaciones estudiadas (**Figura 5**).

A



B

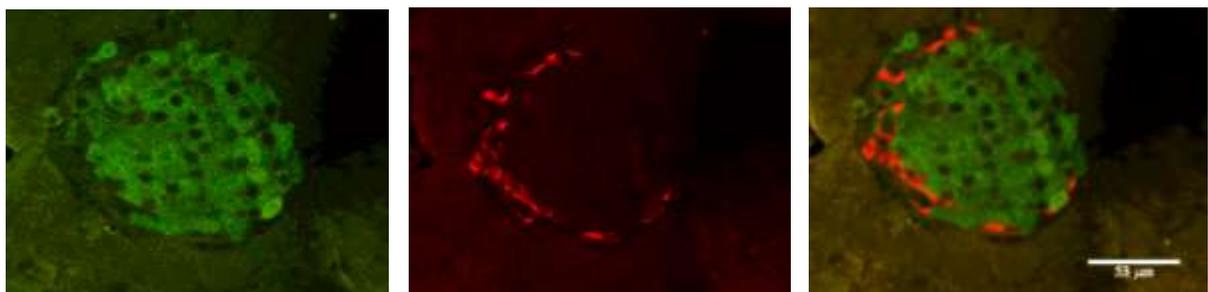


Figura 4. Tinción por inmunofluorescencia de islotes pancreáticos. (A) Ratona control. (B) Ratona preñada. Nótese la disminución del territorio rojo (somatostatina).

Se halló una diferencia significativa ($P < 0,0001$) mediante la prueba T de Student para el aumento del área β en los islotes de ratonas preñadas (**Figura 5C**), así como también una disminución de área δ , en este mismo grupo de estudio (**Figura 5E**). Posteriormente se estudió el número de células correspondientes para cada hormona, encontrándose un aumento significativo ($P < 0,005$) de células β (**Figura 5D**) y una disminución no significativa ($P < 0,15$) de células δ (**Figura 5F**), en el grupo de ratonas preñadas. A su vez se realizaron las ratios de ambas cuantificaciones (**Figura 5A y 5B**).

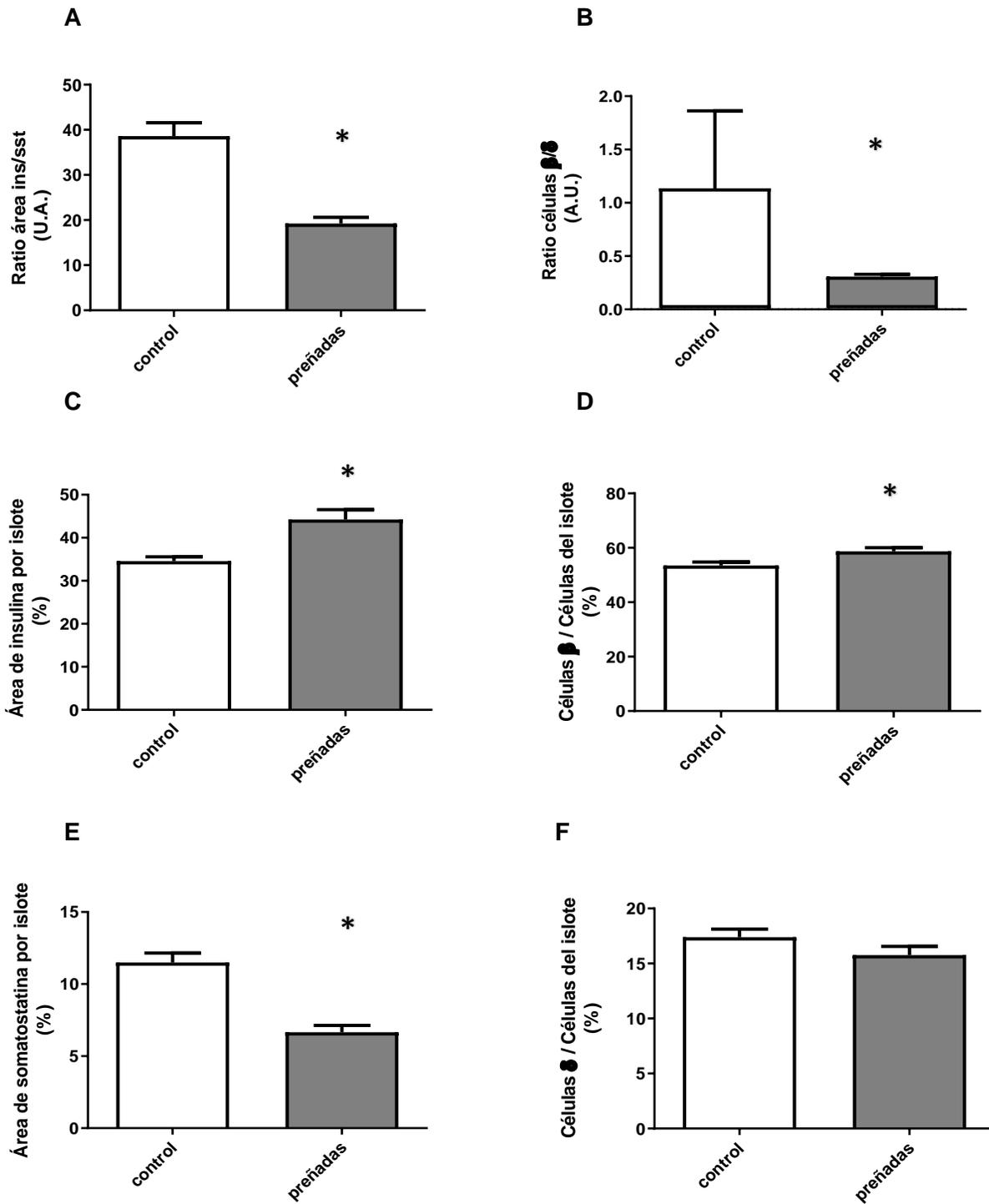


Figura 5. Cuantificación del área y el número de células β y δ . **(A)** Promedio del área β dividido entre el área δ (μm). **(B)** Promedio del número de células β entre el promedio de células δ . **(C, E)** Diferencia entre el promedio de área de la hormona encontrado en ambos grupos de estudio. **(D, F)** Diferencia entre el promedio del número de células encontrado en ambos grupos de estudio. Datos representados con media y error estándar y analizados con T de student. * $P < 0,05$.

- Aumento de células bihormonales

Debido a este hallazgo, nos preguntamos cual podía ser la razón de esta disminución, por lo que decidimos cuantificar la cantidad de células que presentasen tinción positiva para ambas hormonas. (n=5 ratones para cada grupo; 154 islotes para el grupo control y 130 islotes para el grupo de preñadas).

Se tomaron como células positivas aquellas que presentasen color rojo y verde alrededor de un núcleo definido (**Figura 6**).

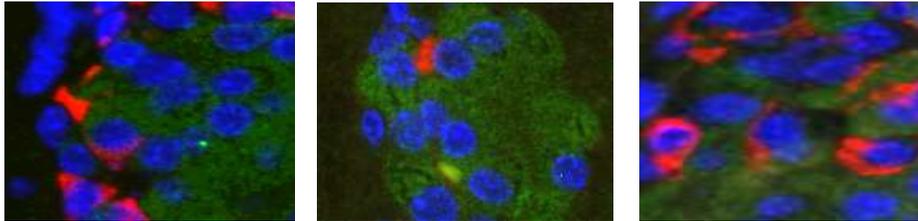


Figura 6. Imágenes representativas de células positivas para somatostatina e insulina.

Al realizar la estadística, se encontró un aumento en el porcentaje de células que presentaban la doble tinción en el grupo de preñadas con respecto al grupo control (P<0,0001) (**Figura 7**).

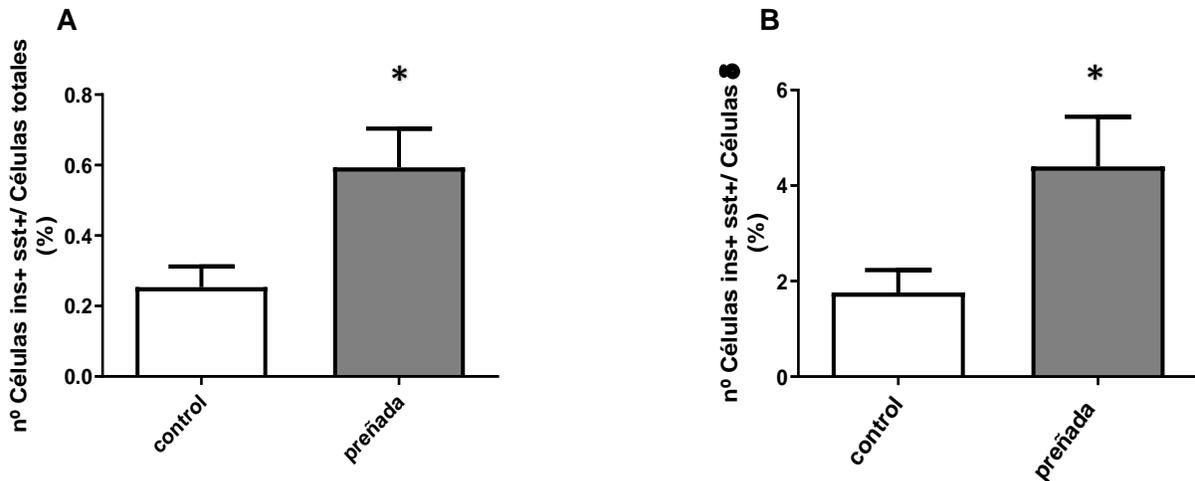


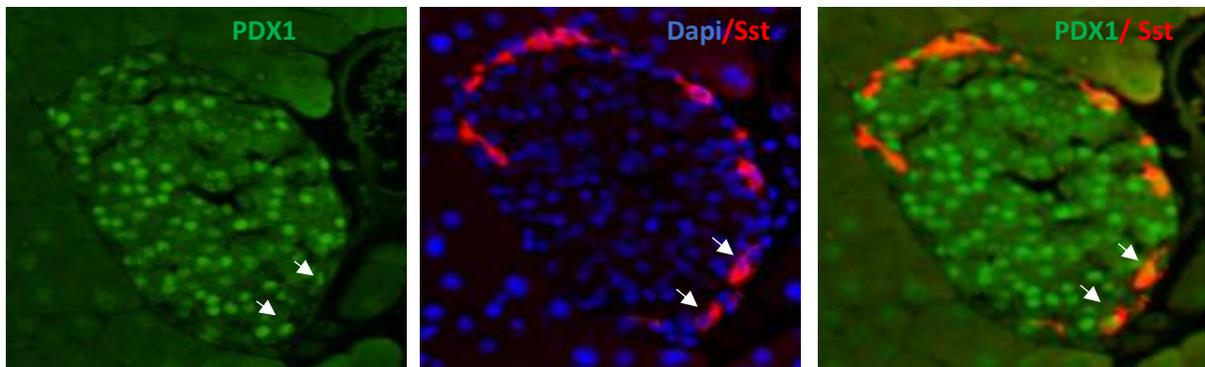
Figura 7. (A) Número de células doble positivas dividida entre el número de células totales del islote. (B) Número de células doble positivas dividida entre el número de células δ del islote. Datos representados con media y error estándar y analizados con T de student. *P<0,05.

- Presencia de células δ con expresión de PDX1

Con estos resultados nos planteamos si la razón de la disminución de células productoras de somatostatina en el grupo de preñadas podría ser debido a algún proceso de transdiferenciación, ya que según la bibliografía consultada era una posibilidad^(10, 11, 12); por lo tanto, se llevó a cabo la tinción para el factor de transcripción PDX1 y somatostatina (n=5 para ambos grupos; 164 islotes para el grupo control y 100 islotes para el grupo de preñadas) (**Figura 8**).

Se tomaron como células positivas, aquellas que presentaban núcleo verde (PDX1) rodeado de un citoplasma rojo (somatostatina).

A



B

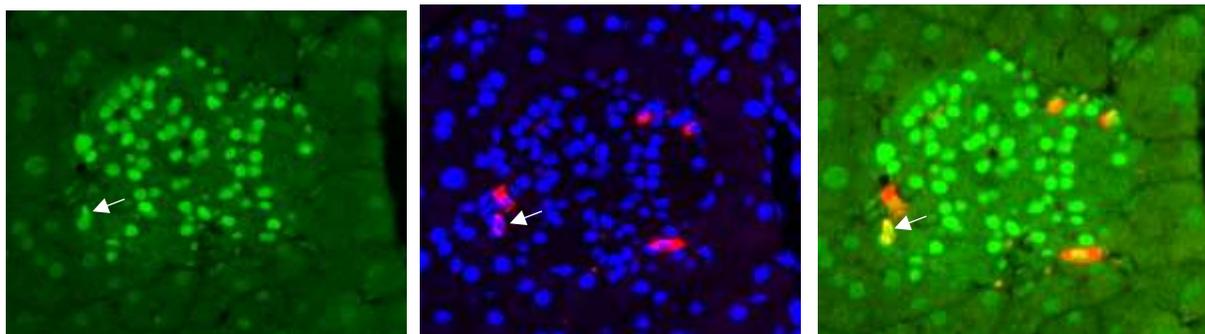


Figura 8. Tinción por inmunofluorescencia de islotes pancreáticos. **(A)** Ratona control. **(B)** Ratona preñada.

Al procesar los datos y aplicar la estadística, encontramos que hay un aumento del porcentaje de células δ que presentaban PDX1 en el grupo de preñadas ($P= 0,02$) con respecto al grupo control, aunque el promedio de células positivas para cada tinción por islote parece también aumentar en el grupo de preñadas, no llega a la significancia estadística ($P=0,1$) (**Figura 9**).

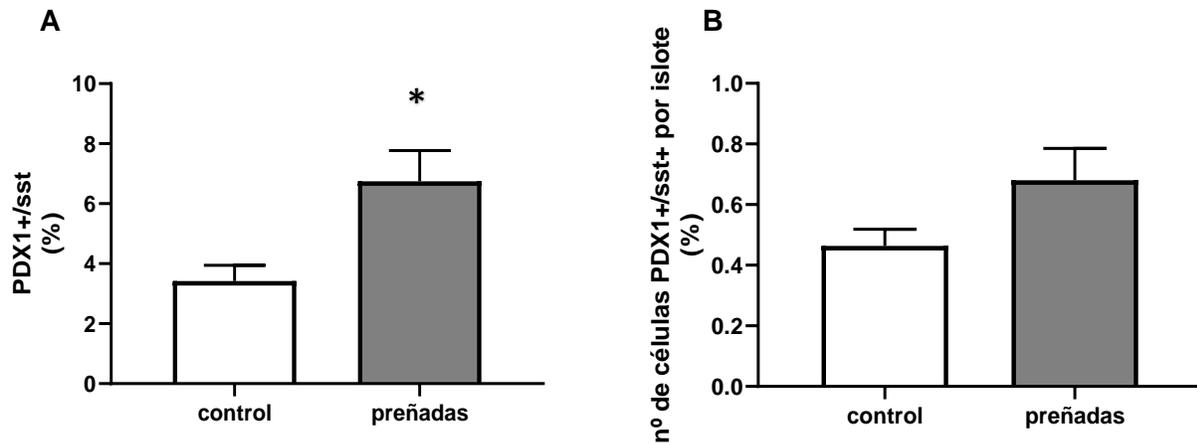


Figura 9. (A) Porcentaje total de células positivas para PDX1+ y SST+ **(B)** Promedio de número de células positivas para PDX1+ y SST+ por islote. Datos representados con media y error estándar y analizados con T de student. * $P < 0,05$.

- Disminución del área y número de células de somatostatina posterior a 48 h de tratamiento hormonal

Ya que durante el embarazo la secreción de hormonas gonadotrópicas está aumentada, se pensó en tratar islotes de rata con diferentes hormonas de esa índole, pensando que alguna de ellas pudiese ser la responsable de la disminución δ que se ha encontrado durante todos los experimentos; así pues, se utilizó un modelo de hiperglicemia para emular un estado de diabetes gestacional, y se decidió probar con el estradiol (E_2) que es el estrógeno que la placenta produce en mayor cantidad durante embarazo⁽³³⁾ y el lactógeno placentario (LP) que es una hormona producida únicamente en el embarazo y que parece tener influencia en la resistencia insulínica de la madre durante la gestación. A su vez se comprobó si la suma de ambas hormonas podría generar cambios con respecto a lo que podrían causar las hormonas de forma individual.

Se formaron 4 grupos de tratamiento ($n = 4$ ratas) y se incubaron con las respectivas condiciones durante 48 horas, después de fijar los islotes se procedió a realizar la tinción para somatostatina y fotografiar (control= 61 islotes, E_2 =105 islotes, LP= 60 islotes, $E_2 + LP$ = 77 islotes) (**Figura 10**).

Al procesar los datos y aplicar la estadística, se encontró que el área y el número de células de somatostatina parece disminuir de forma significativa en el grupo tratado con estradiol ($P = 0,002$) al igual que el grupo tratado con la mezcla de $E_2 + LP$ ($P = 0,002$) con respecto al grupo control (**Figura 11**); el grupo tratado con lactógeno placentario presenta una ligera disminución tanto de área como en número de células, pero no llega a la significancia estadística.

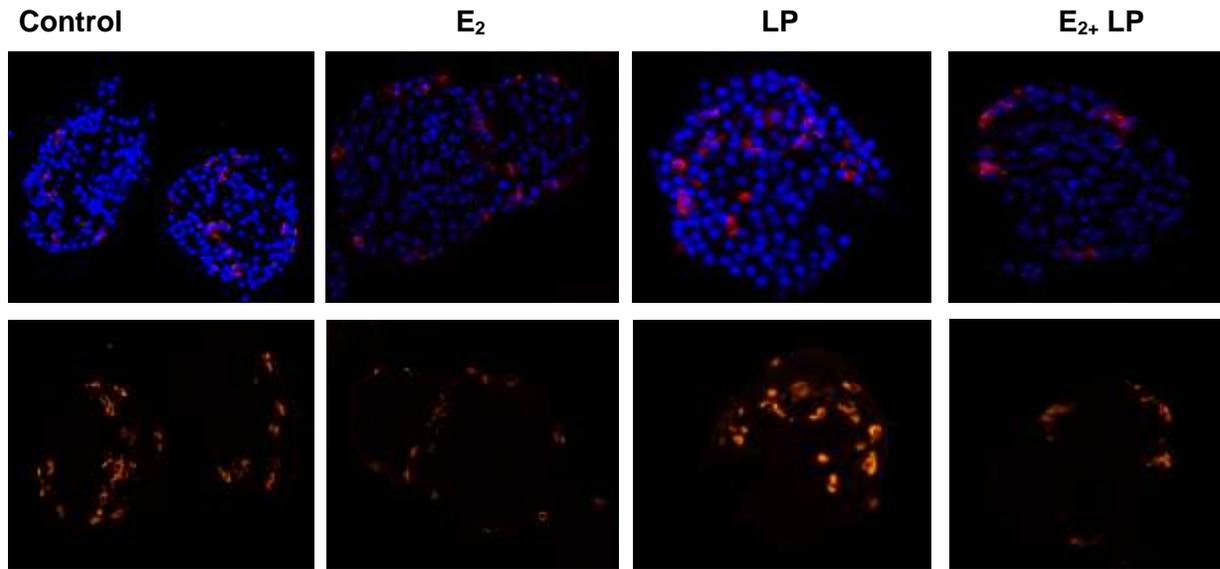


Figura 10. Tinción por inmunofluorescencia de los islotes de rata tratados con las hormonas E_2 y LP. En rojo la tinción de somatostatina y en azul la tinción de núcleos con Dapi.

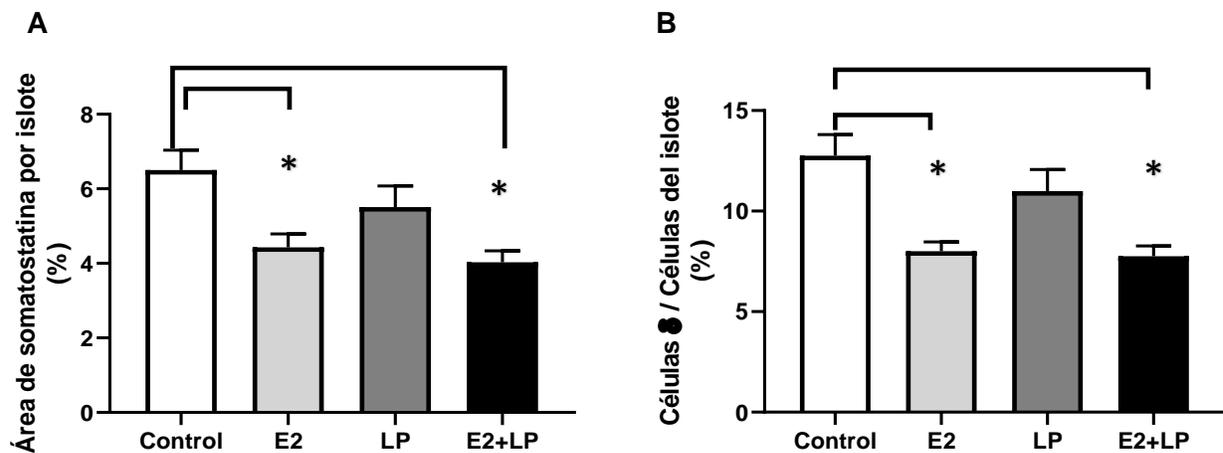


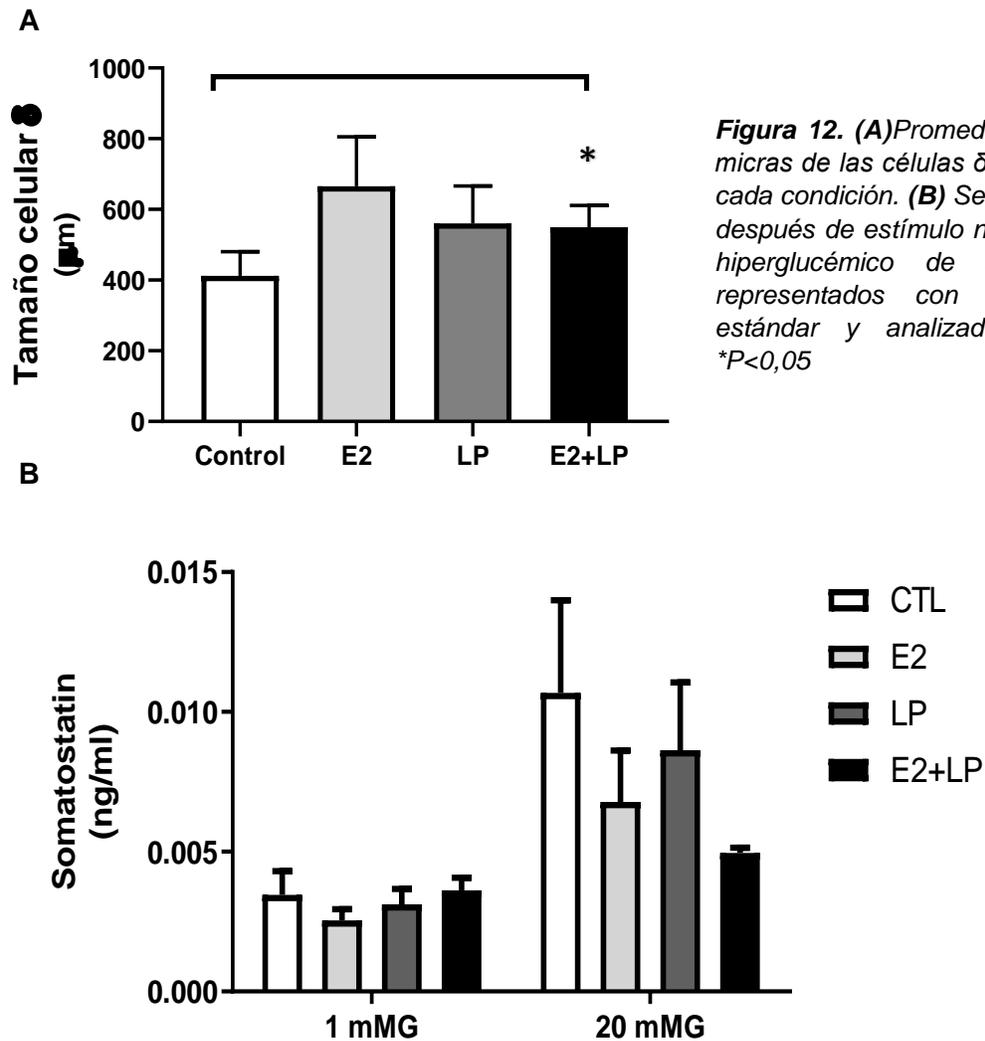
Figura 11. (A) Promedio del área de somatostatina dividida por el área del islote encontrado en los diferentes tratamientos. (B) Promedio del número de células δ dividida por el número de células totales del islote. Datos representados con media y error estándar y analizados con Anova. * $P < 0,05$.

- Aumento del tamaño celular δ como compensación metabólica

Lo siguiente que se estudió fue si las células δ de los islotes tratados diferían en cuanto a su tamaño respecto a los del control. Se dividió el número de células encontrado para cada islote y se dividió entre su respectiva área. Los resultados reportaron un aumento del

tamaño en las tres condiciones estudiadas con respecto al control, aunque solo fue significativa la condición de E₂+LP (P=0,037) (**Figura 12A**).

Para comprobar el efecto funcional de la disminución de la masa δ , se incubaron los islotes previamente tratados con las condiciones hormonales anteriores, a 1mM de glucosa y a 20mM de glucosa para estimular la secreción de somatostatina y comprobar si se encontraba alterada. Al aplicar la estadística se observa como la secreción se encuentra disminuida con respecto al control (n=1 por quintuplicado, 25 islotes por condición) (**Figura 12B**). Indicando que los resultados histológicos acaban produciendo un efecto fisiológico, al disminuir la cantidad de somatostatina secretada.



DISCUSIÓN

El principal hallazgo de nuestro estudio es que las ratonas gestantes muestran una disminución del área y del número de células δ , que es inversamente proporcional a los valores en célula β , estos resultados están en línea con *Brereton et al*⁽⁹⁾ que muestra una disminución de células β mientras que las células no- β tienden a aumentar (específicamente el modelo de diabetes tipo 1 y el modelo de ratones con mutación en canales de K^+ que presentan aumento de células secretoras de somatostatina).

Nuestros hallazgos también coinciden con lo mostrado por *Alán et al*⁽¹⁴⁾, donde en modelos de ratas Goto-Kakizaki con diabetes inducida, presentaban mayor cantidad de células δ con respecto a ratas Wistar (control) de la misma edad, y que conforme envejecían esta diferencia aumentaba. Así mismo, *Plesner et al*⁽¹³⁾ consiguió que en ratonas NOD (ratonas diabéticas no obesas), conforme se iba instaurando la diabetes, el área celular y la masa β disminuían con respecto a las ratonas Balb/c (control) de la misma edad, mientras que el área y masa celular δ aumentaban. Al tratar el segundo grupo con estreptozotocina (fármaco que induce la muerte celular de las células β mediante daño al ADN por alquilación y produce diabetes), se encontraron valores similares al primer modelo, y al cuantificar proliferación en el modelo con diabetes inducida y el modelo NOD se encontró que existía un aumento en la proliferación celular δ . Esto parece demostrar la relación que existe entre las células endocrinas del islote pancreático y nos hace plantearnos la existencia de algún mecanismo de regulación para ambas poblaciones celulares (β y δ). Recordando que tanto células β como δ tienen un origen celular común, sería lógico que dicho mecanismo existiese.

En el embarazo el aumento de hormonas placentarias como el lactógeno placentario y los estrógenos causan un reajuste en la fisiología materna, al ser estos factores, entre otros, los causantes de la resistencia insulínica, es lógico pensar que durante la gestación deben existir cambios a nivel del mayor centro productor de insulina, la célula β . Existen estudios que demuestran la influencia que tienen los estrógenos para aumentar la proliferación β ⁽³⁴⁾, por lo que no sería extraño pensar que hay una disminución de las células no- β , para compensar el aumento de células productoras de insulina. Así mismo, el embarazo funciona como modelo fisiológico de resistencia insulínica y, por ende, de predisposición para sufrir diabetes. Por lo tanto, cabría pensar que los resultados hallados en estos modelos de gestación pueden ser extrapolables al proceso de desarrollo de la diabetes tipo 2. De modo que nos preguntamos, ¿qué hace que haya una disminución celular δ y un aumento β en estos modelos?

Esta pregunta parece responderse con nuestro siguiente hallazgo, el aumento de células positivas para la tinción de insulina y una disminución para la tinción de somatostatina en las ratonas gestantes; esto nos hizo pensar en si podría estar ocurriendo algún proceso de transdiferenciación, lo que cobró relevancia al encontrar un aumento significativo de células δ que presentaban tinción positiva para PDX1 en este grupo. No sería extraño que un proceso como éste ocurriese ya que en la bibliografía se encuentran diferentes estudios como el de *Gu et al*⁽³⁵⁾, quien al bloquear el receptor de glucagón en ratones con diabetes tipo 1 encontraba un aumento de células β , con colocalización de somatostatina y péptido C, sugiriendo conversión de δ a β . Del mismo modo, *Piran et al*⁽²⁰⁾ sugiere que durante el desarrollo de diabetes tipo 1 existe un eje de transdiferenciación α - β - δ , ya que encontró

colocalización de somatostatina y NKX6.1 que es otro factor de transcripción importante para la identidad celular β .

Nuestros resultados *ex vivo*, en los islotes aislados de ratas no preñadas, sometidos a un entorno hiperglucémico y tratados con E_2 , LP y la mezcla E_2+LP replicaban los resultados hallados en los experimentos previos. Como no se encontraron diferencias entre el grupo tratado con E_2 y el grupo tratado con la mezcla de E_2+LP , nos atrevemos a decir que el E_2 es, al menos en parte, el causante de la disminución celular δ encontrada en estos modelos. No se tienen estudios sobre el efecto de los estrógenos en estas células; sin embargo, si se encuentra descrito en células β , donde la hormona parece estimular la supervivencia y proliferación celular⁽³²⁾. E_2 podría ser un agente determinante en este proceso, y más si tenemos en cuenta la relación inversamente proporcional β - δ que parece encontrarse en todos los modelos murinos estudiados. Ya que *Mauvais-Jarvis et al.* encontró que los estrógenos inducían neogénesis de células β por activación de PDX1 o NGN3 nos planteamos la posibilidad de que el estradiol esté generando procesos de transdiferenciación celular, así como los encontrados en los páncreas de ratonas gestantes⁽³⁶⁾.

Es curioso resaltar que, a pesar de que se haya evidenciado una disminución de células δ , parece que el remanente sufre un proceso de expansión que no se encuentra en el grupo control. *Arrojo e Drigo et al*⁽¹⁵⁾ demostró que, en ratones con dieta alta en calorías, que presentaban daño en la secreción de somatostatina y desorganización en la respuesta celular δ , estas células presentaban cambios morfológicos y filopodios más alargados con respecto a los ratones en dieta control, de modo que nos hace pensar que nuestros hallazgos pueden estar relacionados a un mecanismo de adaptación ante la incapacidad de responder ante la insulina.

Al cuantificar la secreción de somatostatina se comprobó que en las condiciones donde hay disminución de área y células δ (E_2 y E_2+LP) también hay menor secreción de la hormona. Estos resultados confirman el efecto funcional de nuestros hallazgos histológicos.

La dinámica intracelular dentro del islote aún no se ha terminado de comprender. Nuestros hallazgos sugieren que durante el embarazo ocurren procesos de adaptación mediante los cuales se logra suplir los requerimientos energéticos de dicha etapa. Los resultados encontrados en la bibliografía, más los resultados encontrados en nuestros experimentos, hacen pensar que dicho mecanismo busca asegurar la cantidad de células β y por lo tanto de insulina; ya que, como lo muestra *Brereton et al*⁽⁹⁾ en las situaciones donde hay disminución de éstas hay aumento de células δ , y *Plesner et al*⁽¹³⁾ lo confirma al demostrar la proliferación de las últimas en los modelos tratados con estreptozotocina; sin embargo, lo contrario sucede cuando existe algún aumento de células β . De modo que nos preguntamos ¿las células δ funcionan como mecanismo de emergencia dispuesto a actuar cuando las células β fallan?

Nuestros hallazgos muestran que en presencia de un entorno gestacional hay disminución de células δ al igual que lo encontrado en los modelos de diabetes tipo 2⁽⁹⁾; con esto nos atrevemos a decir que el aumento de células δ , encontrado en los modelos con deficiencia celular β , surge como medida para obtener un pool de células que puedan transformarse en células β para suplir la demanda de insulina; esto explicaría el por qué cuando hay mayor cantidad de células β hay menor células δ y viceversa.^(9,13,14)

Aunque al no contar con un estudio de trazado de linaje solo podemos asumir estos resultados como válidos debido a la positividad encontrada para las diferentes tinciones.

Nuestros hallazgos coinciden con los encontrados por *Guardado-Mendoza et al* ⁽³⁷⁾ quien encontró en primates no humanos con diabetes tipo 2 una disminución de las células δ y de la secreción de somatostatina; no obstante, difieren con respecto al motivo de esta disminución, la muerte celular ⁽³⁰⁾. Al encontrar que también hay una disminución en las células β , lo que es contrario a todo lo encontrado en la bibliografía consultada para diabetes tipo 2 y un aumento en la apoptosis de dichas células con respecto a los controles, es probable que sus resultados fueran producto de algún tipo de estrés celular en el grupo de diabéticos.

El embarazo es un buen modelo de resistencia insulínica fisiológico, que puede ser utilizado para estudiar varios de los cambios que ocurren durante el desarrollo de la diabetes tipo 2. Si pudiéramos asegurar que en la diabetes se presentan patrones celulares como los encontrados durante este estudio, se podría actuar sobre los procesos celulares de cada población del páncreas para disminuir la carga a la que se someten las células β y a su vez controlar aquellos factores dentro del ambiente glucolipotóxico que sean capaces de mediar estas conversiones. Finalmente, este estudio sirve como evidencia para demostrar la importancia de las células δ del islote pancreático que hasta ahora habían sido subestimadas.

CONCLUSIONES:

1. Durante la gestación, en roedor, disminuye el área y el número de células δ productoras de somatostatina en el páncreas.
2. Las células δ se reprograman para producir insulina en su lugar, debido a las demandas metabólicas del embarazo.
3. Este proceso está causado, al menos en parte, por el aumento en los niveles de estradiol, el cual inducirá un proceso de transdiferenciación δ - β

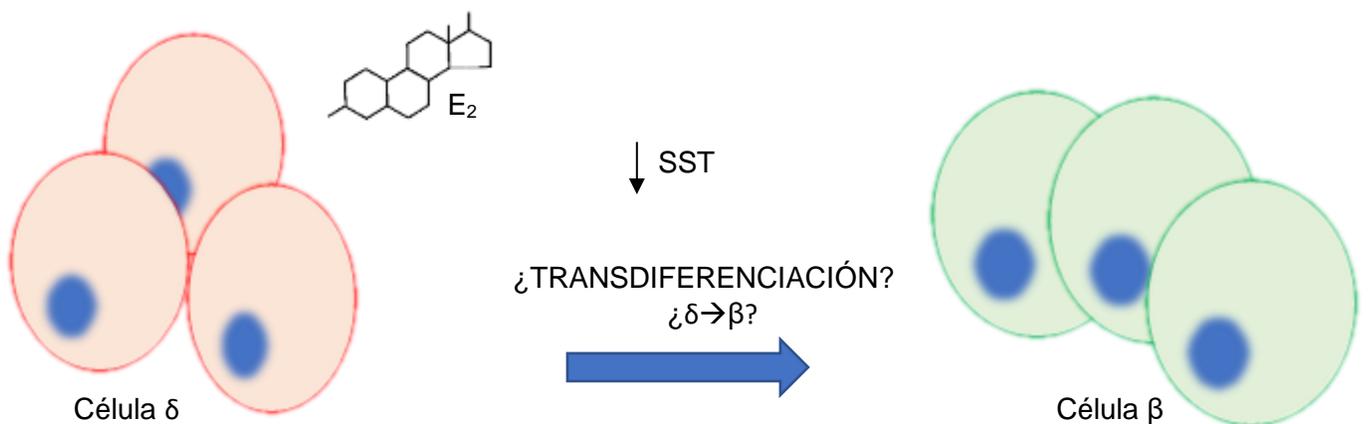


Figura 14. Representación esquemática de las conclusiones planteadas.

REFERENCIAS

1. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 2005 Sep;53(9):1087–97.
2. Hui H, Perfetti R. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *Eur J Endocrinol.* 2002 Feb 1;129–41.
3. Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, Das PK, Yin Y, Albu M, et al. The Human Transcription Factors. *Cell.* 2018 Feb 8;172(4):650–65.
4. Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Dec;29(12):1305–12.
5. Holland AM, Hale MA, Kagami H, Hammer RE, MacDonald RJ. Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proc Natl Acad Sci.* 2002 Sep 17;99(19):12236–41.
6. Vinogradova TV, Sverdlov ED. PDX1: A unique pancreatic master regulator constantly changes its functions during embryonic development and progression of pancreatic cancer. *Biochem Mosc.* 2017 Aug;82(8):887–93.
7. Brereton MF, Iberl M, Shimomura K, Zhang Q, Adriaenssens AE, Proks P, et al. Reversible changes in pancreatic islet structure and function produced by elevated blood glucose. *Nat Commun.* 2014 Dec;5(1):4639.
8. Huising MO, van der Meulen T, Huang JL, Pourhosseinzadeh MS, Noguchi GM. The Difference δ -Cells Make in Glucose Control. *Physiology.* 2018 Nov 1;33(6):403–11.
9. Brereton MF, Vergari E, Zhang Q, Clark A. Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? *J Histochem Cytochem.* 2015 Aug;63(8):575–91.
10. Reubi JC, Schonbrunn A. Illuminating somatostatin analog action at neuroendocrine tumor receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2013 Dec;34(12):676–88.
11. Yoshitomi H, Fujii Y, Miyazaki M, Nakajima N, Inagaki N, Seino S. Involvement of MAP kinase and c-fos signaling in the inhibition of cell growth by somatostatin. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 1997 May 1;272(5):E769–74.
12. Vivot K, Moullé VS, Zarrouki B, Tremblay C, Mancini AD, Maachi H, et al. The regulator of G-protein signaling RGS16 promotes insulin secretion and β -cell proliferation in rodent and human islets. *Mol Metab.* 2016 Oct;5(10):988–96.
13. Plesner A, ten Holder JT, Verchere CB. Islet Remodeling in Female Mice with Spontaneous Autoimmune and Streptozotocin-Induced Diabetes. Fiorina P, editor. *PLoS ONE.* 2014 Aug 7;9(8):e102843.

14. Alán L, Olejár T, Cahová M, Zelenka J, Berková Z, Smětáková M, et al. Delta Cell Hyperplasia in Adult Goto-Kakizaki (GK/MoITac) Diabetic Rats. *J Diabetes Res*. 2015;2015:1–16.
15. Arrojo e Drigo R, Jacob S, García-Prieto CF, Zheng X, Fukuda M, Nhu HTT, et al. Structural basis for delta cell paracrine regulation in pancreatic islets. *Nat Commun*. 2019 Dec;10(1):3700.
16. Chera S, Baronnier D, Ghila L, Cigliola V, Jensen JN, Gu G, et al. Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic δ -cells into insulin producers. *Nature*. 2014 Oct;514(7523):503–7.
17. Abouna S, Old RW, Pelengaris S, Epstein D, Ifandi V, Sweeney I, et al. Non- β -cell progenitors of β -cells in pregnant mice. *Organogenesis*. 2010 Apr;6(2):125–33.
18. Spijker HS, Ravelli RBG, Mommaas-Kienhuis AM, van Apeldoorn AA, Engelse MA, Zaldumbide A, et al. Conversion of Mature Human b-Cells Into Glucagon- Producing a-Cells. :10.
19. Thorel F, Népote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, et al. Conversion of adult pancreatic α -cells to β -cells after extreme β -cell loss. *Nature*. 2010 Apr;464(7292):1149–54.
20. Piran R, Lee S-H, Li C-R, Charbono A, Bradley LM, Levine F. Pharmacological induction of pancreatic islet cell transdifferentiation: relevance to type I diabetes. *Cell Death Dis*. 2014 Jul;5(7):e1357–e1357.
21. Julia Panzer. Delta cell reprogramming during mouse pregnancy. (2019) Publicly Accessible Tud Qucosa Dissertations <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:14-qucosa2-337230>
22. Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. Pancreatic β Cell Dedifferentiation as a Mechanism of Diabetic β Cell Failure. *Cell*. 2012 Sep;150(6):1223–34.
23. Gao T, McKenna B, Li C, Reichert M, Nguyen J, Singh T, et al. Pdx1 Maintains β Cell Identity and Function by Repressing an α Cell Program. *Cell Metab*. 2014 Feb;19(2):259–71.
24. Baz B, Riveline J-P, Gautier J-F. ENDOCRINOLOGY OF PREGNANCY: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects. *Eur J Endocrinol*. 2016 Feb;174(2):R43–51.
25. Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR, Calles J, Roman NM, Amini SB, et al. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 1993 Jan 1;264(1):E60–7.
26. Ryan EA, Enns L. Role of Gestational Hormones in the Induction of Insulin Resistance*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988 Aug;67(2):341–7.
27. Baeyens L, Hindi S, Sorenson RL, German MS. β -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes Obes Metab*. 2016 Sep;18:63–70.

28. Parsons A, Clark T, Sorenson L. of Islets of Langerhans to Pregnancy: Islet Cell Proliferation and Insulin Secretion with the Onset of Placental Lactogen. :8.
29. Rieck, Sebastian, "The Generation of Fully Functional β -Cells by Proliferation: Lessons from Pregnancy and HNF4 α " (2011). Publicly Accessible Penn Dissertations. 984. <http://repository.upenn.edu/edissertations/984>
30. Quesada-Candela C, Tudurí E, Marroquí L, Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal Á. Morphological and functional adaptations of pancreatic alpha-cells during late pregnancy in the mouse. *Metab - Clin Exp* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Jun 22];102. Available from: [https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495\(19\)30176-3/abstract](https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495(19)30176-3/abstract)
31. Ropero AB, Fuentes E, Rovira JM, Ripoll C, Soria B, Nadal A. Non-genomic actions of 17 α -oestradiol in mouse pancreatic α -cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase. *J Physiol*. :11.
32. Carrasco M. Contribución de los factores GATA a la organogénesis pancreática y a la función del páncreas adulto. 2016 [cited 2021 Jun 22]; Available from: <https://digital.csic.es/handle/10261/166157>
33. Rodríguez-Cortés YM, Mendieta-Zerón H. La placenta como órgano endocrino compartido y su acción en el embarazo normoevolutivo. *Rev Med E Investig*. 2014 Jan 1;2(1):28–34.
34. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Quesada I, Ropero AB. The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 May 25;304(1–2):63–8.
35. Gu L, Cui X, Lang S, Wang H, Hong T, Wei R. Glucagon receptor antagonism increases mouse pancreatic δ -cell mass through cell proliferation and duct-derived neogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 May;512(4):864–70.
36. Mauvais-Jarvis F. Role of Sex Steroids in β Cell Function, Growth, and Survival. *Trends Endocrinol Metab*. 2016 Dec;27(12):844–55.
37. Guardado Mendoza R, Perego C, Finzi G, La Rosa S, Capella C, Jimenez-Ceja LM, et al. Delta cell death in the islet of Langerhans and the progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes in non-human primates (baboon, *Papio hamadryas*). *Diabetologia*. 2015 Aug;58(8):1814–26.