



Tesis Doctoral

**ADAPTACIONES DE LA CÉLULA α
PANCREÁTICA DURANTE EL FINAL DE LA
GESTACIÓN EN EL RATÓN: PAPEL DE LAS
HORMONAS GESTACIONALES**

Memoria presentada por

Cristina Quesada Candela

Para optar al grado de doctor

Dirigida por

Dr. Ivan Quesada Moll

Codirector Dr. Ángel Nadal Navajas

Programa de doctorado en bioingeniería

Instituto de Bioingeniería

Universidad Miguel Hernández de Elche

Elche 2019



Dr. **IVAN QUESADA MOLL**, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Universidad Miguel Hernández y Dr. **ANGEL NADAL NAVAJAS**, Catedrático de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “**Adaptaciones de la célula α pancreática durante el final de la gestación en el ratón: papel de las hormonas gestacionales**”, desarrollada dentro del Programa de Doctorado en Bioingeniería bajo nuestra dirección y cuya autora es **Dña. Cristina Quesada Candela**, se presenta en formato de Tesis Convencional, con los indicios de calidad siguientes:

Morphological and functional adaptations of pancreatic alpha-cells during late pregnancy in the mouse

Cristina Quesada-Candela, Eva Tudurí, Laura Marroquí, Paloma Alonso-Magdalena, Angel Nadal, Ivan Quesada

Metabolism, doi: 10.1016/j.metabol.2019.153963

Siendo el área temática de la ANEP de dicha tesis: *Biología Fundamental y de Sistemas*.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado, en Elche a

Director

IVAN QUESADA MOLL

Catedrático de Nutrición y
Bromatología

Dpto. Biología Aplicada

Universidad Miguel Hernández

Codirector

ÁNGEL NADAL NAVAJAS

Catedrático de Fisiología

Dpto. de Fisiología

Universidad Miguel Hernández



Instituto de Bioingeniería
UNIVERSITAS Miguel Hernández

Dr. **IVAN QUESADA MOLL**, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Universidad Miguel Hernández y Dr. **ANGEL NADAL NAVAJAS**, Catedrático de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “**Adaptaciones de la célula α pancreática durante el final de la gestación en el ratón: papel de las hormonas gestacionales**”, presentado por **Dña. Cristina Quesada Candela** para optar al grado de doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión en el Instituto de Bioingeniería, y que se encuentra en condiciones de ser defendido ante el tribunal correspondiente nombrado por esta universidad.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado, en Elche a

Director

IVAN QUESADA MOLL

Catedrático de Nutrición y
Bromatología

Dpto. Biología Aplicada

Universidad Miguel Hernández

Codirector

ÁNGEL NADAL NAVAJAS

Catedrático de Fisiología

Dpto. de Fisiología

Universidad Miguel Hernández



Dr. **JOSÉ MANUEL PÉREZ PÉREZ**, Coordinador del Programa de Doctorado en Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche por Resolución Rectoral 0169/17, de 1 de febrero de 2017:

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada **“Adaptaciones de la célula α pancreática durante el final de la gestación en el ratón: papel de las hormonas gestacionales”**, ha sido realizada por **Dña. Cristina Quesada Candela**, bajo la dirección de los Profesores Ivan Quesada Moll (director) y Ángel Nadal Navajas (codirector), y da su conformidad para que sea presentada a la Comisión de Estudios de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado, en Elche a



Financiación

La presente investigación fue financiada por las becas procedentes del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Agencia Estatal de Investigación (AEI), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y Generalitat Valenciana: BFU2017-86579-R y PROMETEO II/2015/016 concedidas al Dr. Ángel Nadal Navajas y BFU2016-77125-R concedida al Dr. Ivan Quesada Moll.



UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo de
Desarrollo Regional



ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
RESUMEN	19
ABSTRACT	21
INTRODUCCIÓN	23
1. PÁNCREAS ENDOCRINO. EL ISLOTE DE LANGERHANS	25
2. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	27
3. EL GLUCAGÓN: ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN EN LA CÉLULA α	31
3.1 Modelo acoplamiento estímulo-secreción en la célula α: papel del canal K_{ATP}	32
3.2 Modelo alternativo acoplamiento estímulo-secreción en la célula α: efecto hiperpolarizante de la glucosa y el retículo endoplásmico	34
4. ADAPTACIONES FISIOLÓGICAS DURANTE LA GESTACIÓN: CAMBIOS EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	36
5. LAS HORMONAS GESTACIONALES	38
5.1 Hormonas de la familia de la prolactina: lactógeno placentario y prolactina	39
5.2 Hormonas esteroideas: estradiol y progesterona	41
6. ADAPTACIONES DEL PÁNCREAS ENDOCRINO DURANTE LA GESTACIÓN: LA CÉLULA β	42
7. ADAPTACIONES DEL PÁNCREAS ENDOCRINO DURANTE LA GESTACIÓN: LA CÉLULA α	47
8. DIABETES MELLITUS GESTACIONAL: CONSECUENCIAS ADVERSAS PARA LA SALUD DE LA MADRE Y LA DESCENDENCIA	49
OBJETIVOS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	59
2. AISLAMIENTO DE ISLOTES DE LANGERHANS	59
3. IMAGEN DE CALCIO: MICROSCOPIA CONFOCAL	60
4. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN Y CONTENIDO DE GLUCAGÓN	62
4.1 Secreción estática de glucagón	62
4.2 Determinación de la secreción y contenido de glucagón	63
4.3 Cuantificación de la proteína total	63
5. DETERMINACIÓN DE VALORES SANGUÍNEOS	63

6. ESTUDIO HISTOLÓGICO	64
6.1 Inmunohistoquímica de glucagón en tejidos parafinados	65
6.2 Cuantificación del tamaño celular, masa y área de célula α	66
6.3 Proliferación de la célula α	67
6.4 Apoptosis de la célula α	67
6.5 Neogénesis de la célula α	68
6.6 Estudio de transdiferenciación	69
7. CULTIVO CELULAR DE α-TC1.9: EXPOSICIÓN A HORMONAS GESTACIONALES.	70
7.1 Estudio de proliferación: marcaje con BrdU	71
7.2 Secreción de glucagón en α-TC1.9	72
7.3 Obtención de ARN, RT-PCR y PCR cuantitativa	73
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
RESULTADOS	75
1. Las ratonas preñadas en el día de gestación G18.5 presentan una masa de célula α pancreática aumentada debido a un proceso de hipertrofia e hiperplasia	77
2. La proliferación de la célula α pancreática está aumentada en los islotes de Langerhans de las ratonas preñadas G18.5	79
3. La apoptosis en el proceso de expansión de la célula α pancreática durante la gestación	80
4. La neogénesis en el proceso de expansión de la célula α pancreática durante la gestación	82
5. La transdiferenciación en el proceso de expansión de la célula α pancreática durante la gestación	83
6. Valores hormonales en el día de gestación G18.5 en el ratón	84
7. La secreción de glucagón se encuentra alterada hacia el final de la gestación en las ratonas preñadas	86
8. La movilización de calcio al interior celular en respuesta a glucosa no se ve alterada durante la gestación	87
9. Las hormonas lactogénicas (PL y PRL) y el estradiol afectan a la proliferación en la línea celular secretora de glucagón α-TC1.9	89
10. La secreción de glucagón en la línea celular α-TC1.9 se encuentra alterada tras el tratamiento crónico con las hormonas gestacionales	91
11. La expresión del gen Gcg, precursor de glucagón, está disminuida en las células α-TC1.9 expuestas a estradiol	93
DISCUSIÓN	95
1. El páncreas endocrino durante la gestación	97

2. Adaptaciones morfológicas de la célula α pancreática durante la gestación.....	98
3. Las hormonas gestacionales PL, PRL y E_2 son potenciales reguladoras de la masa de célula α durante la preñez.....	100
4. Adaptaciones funcionales de la célula α pancreática durante la gestación.....	103
5. Papel de las hormonas gestacionales en las adaptaciones funcionales de la célula α durante la etapa final de la gestación.....	106
CONCLUSIONES.....	111
BIBLIOGRAFÍA.....	115
ANEXO.....	135
AGRADECIMIENTOS.....	177



ABREVIATURAS

ABC: *Avidin/biotine complex*. Complejo Avidina/Biotina.

ADP: *Adenosine diphosphate*. Adenosín Difosfato.

DNA: *Deoxyribonucleic acid*. Ácido desoxirribonucleico.

cDNA: *Complementary deoxyribonucleic acid*. Ácido desoxirribonucleico complementario.

Adr: *Adrenalin*. Adrenalina.

Akt: *Protein kinase B*. Proteína quinasa B.

AMPA: *α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*.

Ácido α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico.

AMPC: *Adenosin Monophosphate cyclic*. Adenosín Monofosfato Cíclico.

AMPK: *AMP-activated protein kinase*. Proteína quinasa activada por AMP.

RNA: *Ribonucleic acid*. Ácido ribonucleico.

mRNA: *Messenger Ribonucleic acid*. Ácido ribonucleico mensajero.

ATP: *Adenosine Triphosphate*. Adenosín Trifosfato.

BrdU: *5- Bromo-2- Deoxyuridine*. Bromodesoxiuridina.

BSA *Bovine Serum Albumin*. Albumina de suero bovino.

CREB: *C-AMPC response-element binding*. Elemento de respuesta acoplado a AMPC.

DAB: 3'-diaminobencidina.

DMEM: Dulbecco's Modified *Eagle medium*.

DMSO. *Dimethyl sulfoxide*. Dimetilsulfóxido.

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*. Ácido etildiaminotetracético.

ELISA: *Enzym Linked Immunoabsorbent Assay*.

ER α : *Estrogen receptor α* . Receptor de estrógenos α .

ER β : *Estrogen receptor β* . Receptor de estrógenos β .

E₂: *Estradiol*. Estradiol.

FOXO1: *Forkhead Box Protein O1*.

G: *Glucose*. Glucosa.

GDM: *Gestational Diabetes Mellitus*. Diabetes mellitus gestacional.

GDP: *Guanosine diphosphate*. Guanosín Difosfato.

GH: *Growth hormone*. Hormona de crecimiento.

GIP: *Gastric Inhibitor Polypeptide*. Polipéptido Inhibidor Gástrico

GLP-1: *Glucagon Like Peptide 1*. Péptido 1 similar al glucagón

GLUT-1: *Glucose Transporter 1*. Transportador de glucosa 1.

GLUT-2: *Glucose Transporter 2*. Transportador de glucosa 2.

GLUT-5: *Glucose Transporter 5*. Transportador de glucosa 5.

GLUT-7: *Glucose Transporter 7*. Transportador de glucosa 7.

GSIS: *Glucose stimulated insulin secretion*. Secreción de insulina estimulada por glucosa.

GTP: *Guanosin Triphosphate*. Guanosín Trifosfato.

OGTT: *Oral Glucose Tolerance Test*. Test oral de tolerancia a la glucosa.

G12.5: *Gestational day 12.5*. Día de gestación 12.5.

G15.5: *Gestational day 15.5*. Día de gestación 15.5.

G18.5: *Gestational day 18.5*. Día de gestación 18.5.

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*.

HGF: *Hepatocyte growth factor*. Factor de crecimiento de hepatocitos.

HGP: *Hepatic glucose production*. Producción hepática de glucosa.

INS: *Insulin*. Insulina.

Jak2: *Januse kinase 2*. Quinasa Janus 2.

KATP: *ATP-sensitive potassium channel*. Canal de potasio sensible a ATP.

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*. Proteína quinasa activada por mitógeno.

OMS: Organización Mundial de la salud.

PL: *Placental lactogen*. Lactógeno placentario.

PRL: *Prolactin*. Prolactina.

PRLr: *Prolactin receptor*. Receptor de prolactina.

P: *Progesterone*. Progesterona.

PanCK: *Pan-Cytokeratin*. Pancitoqueratina.

PAS: *Protein Kinase per-arnt-sim*.

PBS: *Phosphate buffered saline*. Tampón Fosfato Salino.

PCNA: *Proliferating cell nuclear antigen*.

PC-2: *Proprotein convertase-2*. Proconvertasa-2

PC-3: *Proprotein convertase-3*. Proconvertasa-3.

Pdx1: *Pancreatic and duodenal homebox-1*.

PGC-1 a: *Peroxisome proliferator-activated receptor-g coactivator*.

PI3K: *Phosphoinositide13-kinase*. Fosfoinositol3-quinasa.

PKA: *Protein kinase A*. Proteína Quinasa A.

PLC: *Phospholipase C*. Fosfolipasa C.

PP: *Pancreatic Polipeptide*. Polipéptido pancreático.

Pyr: *Pyruvate*. Piruvato.

RIA: *Radioimmunoassay*. Radioinmunoensayo.

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*. Medio Roswell Park Memorial Institute.

SA-HRP: *Streptavidin*. Estreptavidina.

SEM: *Standard error of mean*. Error estándar de la media.

SERCA: *sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*.

SNARE: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*.

SOC: *Store-Operated Channels*

Src: *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*

STAT: *Signal transducer and activator of transcription 5*. Transductor de la Señal y

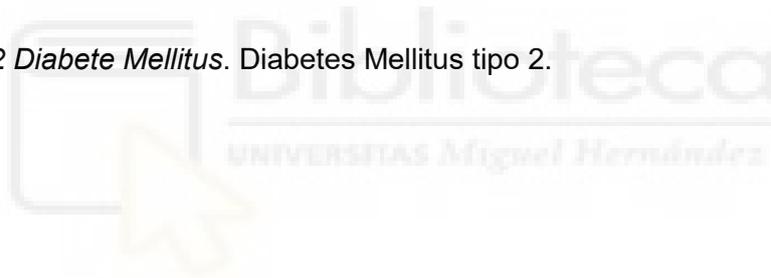
Activador de la Transcripción 5

TdT: *Terminal deoxynucleotidyl transferase*. Desoxinucleotidil transferasa terminal.

Tph 1: *Tryptophan hydroxylase 1*. Enzima triptófano hidroxilasa 1

TUNEL: *Terminal desoxinucleotidyl transferasa dUTP nick end labeling*

T2DM: *Type 2 Diabete Mellitus*. Diabetes Mellitus tipo 2.



RESUMEN

El embarazo representa un gran reto metabólico para la madre. El desarrollo de una resistencia a la insulina fisiológica en tejidos periféricos hacia el final de la gestación, requiere múltiples adaptaciones por parte de los islotes de Langerhans para preservar la normoglucemia. Estas adaptaciones, muy bien caracterizadas en las células β pancreáticas, implican un aumento de la función y de la masa de este tipo celular, con el fin de mantener un equilibrio energético y de nutrientes óptimo entre la madre y el feto. Sin embargo, a pesar de la importancia de las células α en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, así como de los estudios publicados que parecen vincular alteraciones en la secreción de glucagón con el desarrollo de la diabetes gestacional, el conocimiento sobre las posibles adaptaciones de las células α pancreáticas y su regulación durante el embarazo es virtualmente inexistente.

Para investigar las características morfo-funcionales de las células α pancreáticas durante el embarazo, se utilizaron ratonas C57BL/6 preñadas, y ratonas no preñadas como control. Inicialmente, se estudiaron las adaptaciones morfológicas *in vivo* en diferentes etapas de la gestación (día gestacional (G): 12.5, 15.2 y 18.5). Dado que la mayor parte de cambios significativos a nivel morfológico se observaron en el día de gestación G18.5, se decidió finalmente centrar el estudio en esta etapa de la gestación que correspondería con el final de la gestación en el ratón. Además, se llevó a cabo el aislamiento de islotes de Langerhans frescos para los estudios *ex vivo*. Para los análisis *in vitro*, se utilizó la línea celular secretora de glucagón (α -TC1.9) para evaluar el papel potencial de las hormonas gestacionales en la regulación de estas adaptaciones. Para estudiar las características morfológicas se realizaron experimentos de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica, mientras que para las características funcionales se determinaron los niveles de hormonas plasmáticas mediante ELISA, la secreción estática de glucagón y el contenido empleando también la técnica de ELISA, la señalización de calcio intracelular para estudiar alteraciones en el acoplamiento estímulo-secreción mediante microscopía confocal y la expresión génica del mRNA de glucagón mediante PCR cuantitativa.

En cuanto a las adaptaciones morfológicas en las ratonas preñadas G18.5, los resultados obtenidos muestran un aumento estadísticamente significativo del área y masa de células α así como hipertrofia celular. Estos cambios en la masa se asociaron también a un aumento en la proliferación. No se encontraron cambios en la apoptosis de células α , neogénesis ductal o transdiferenciación entre células α y β , en

comparación con los controles. Por otro lado, los experimentos *in vitro* en la línea celular α -TC1.9 sugieren que el lactógeno placentario y la prolactina pueden participar en la expansión de las células α , promoviendo un aumento en la proliferación, mientras que el estradiol actuaría de forma opuesta. Por lo que respecta a la función de la célula α durante la gestación, también observamos diversos cambios significativos. En el día gestacional G18.5, las ratonas preñadas presentan una marcada hipoglucagonemia, en comparación con las ratonas control. Además, la secreción *in vitro* de glucagón presentó una inhibición en presencia de niveles bajos de glucosa (0.5 mM) en los islotes recién aislados de estos animales. Igualmente, el contenido de glucagón en los islotes se vio afectado negativamente. El tratamiento *in vitro* durante 8 días con las hormonas gestacionales (PL, PRL y E₂) produjo efectos similares en las células α -TC1.9, disminuyendo la liberación de glucagón a 0.5 mM G. Estos resultados indicarían un posible papel de estas hormonas en la regulación de la función de las células α durante el embarazo. Además, la expresión del gen del mRNA de glucagón se vio afectada en las células α -TC1.9 tratadas con E₂, revelando una vez más, la posible participación de esta hormona en particular, en los cambios adaptativos de las células α durante la gestación.

En conclusión, las células α pancreáticas presentan importantes adaptaciones tanto morfológicas como funcionales hacia el final de la gestación en ratones, potencialmente mediadas por las hormonas gestacionales. Estas adaptaciones podrían contribuir al mantenimiento de una homeostasis normal de la glucosa, impidiendo el establecimiento de un ambiente hiperglucémico que podría favorecer al desarrollo de diabetes mellitus gestacional.

ABSTRACT

Pregnancy represents a major metabolic challenge for the mother. The development of a physiologic insulin resistance requires multiple adaptations in the islets of Langerhans to preserve a normoglycaemic state. These adaptations are very well characterized in the pancreatic beta-cells and involve an enhancement of both function and cellular mass to maintain an optimal energetic and nutrient balance between the mother and the fetus. However, despite the importance of the alpha-cells in the maintenance of glucose homeostasis and the studies that link changes in these cells to the development of gestational diabetes, the knowledge about the potential adaptations of the alpha-cell and its regulation during pregnancy is scarce.

To investigate the morphofunctional features of pancreatic alpha-cells during pregnancy, we used pregnant C57BL/6 mice and non-pregnant mice as controls. Initially, the *in vivo* morphological adaptations were studied at different gestational days: G12.5, G15.5 and G18.5). Keeping in mind that, most of the morphological changes took place at G18.5, we finally decided to focus the present study on this gestational stage in particular, the late pregnancy in mice. In addition, freshly isolated islets of Langerhans were obtained to perform the *ex vivo* experiments. For the *in vitro* analysis, the glucagon-secreting α -cell line α -TC1.9 was used to assess the potential role of pregnancy hormones in the regulation of these adaptations. For the analysis of the morphological features, we performed immunohisto- and immunocytochemical experiments, while the study of the functional features was performed by different approaches: plasma hormone levels, glucagon secretion and glucagon content were measured by ELISA, calcium signaling to study alterations in the stimulus-secretion coupling was recorded using confocal microscopy and glucagon mRNA gene expression was measured by quantitative PCR experiments.

Pregnant mice at G18.5 exhibited augmented alpha-cell area and mass as well as cell hypertrophy. This change in cell mass was also associated with increased proliferation. No changes in alpha-cell apoptosis, ductal neogenesis, or alpha-to-beta transdifferentiation were found compared with controls. The experiments with the α -TC1.9 cell line suggested that placental lactogen and prolactin may be involved in the expansion of the alpha-cell, promoting an increase in proliferation, while estradiol reduce the proliferation rate. At G18.5, pregnant mice presented hypoglucagonaemia compared to controls. Additionally, *in vitro* glucagon secretion at low glucose levels (0.5 mM) was impaired in freshly isolated islets from these animals. Glucagon content was also found

to be reduced. Treatment for 8 days with the pregnancy hormones (PL, PRL and E₂) produced similar effects in α -TC1.9 cells, decreasing glucagon release at 0.5 mM G, further indicating a possible role for these hormones in the regulation of alpha-cell function during pregnancy. Moreover, glucagon mRNA gene expression was impaired in α -TC1.9 cells treated with E₂, revealing the potential involvement of this particular hormone in the adaptive changes in alpha-cells during gestation.

In conclusion, pancreatic alpha-cells present several morphological and functional adaptations during late pregnancy in mice, potentially mediated by pregnancy hormones. These adaptations may contribute to the maintenance of a normal glucose homeostasis, preventing a hyperglycemic milieu, which could promote the development of gestational diabetes mellitus.





Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

INTRODUCCIÓN

1. PÁNCREAS ENDOCRINO. EL ISLOTE DE LANGERHANS.

El páncreas es un órgano peritoneal mixto, compuesto de una porción exocrina y una endocrina. La porción exocrina está formada por tejido glandular acinar, los llamados acinos pancreáticos, encargados de secretar el jugo gástrico al duodeno, fundamental para la digestión de los alimentos. Por otro lado, la porción endocrina formada por los islotes de Langerhans es la encargada de la homeostasis de la glucosa y supone entre un 1-2% del volumen total del órgano.

En su tesis doctoral del año 1869, el médico alemán Paul Langerhans describió la apariencia microscópica de pequeños grupos dispersos de células entre las células acinares en el páncreas de conejo. Pero no fue hasta el año 1893, cuando Edouard Laguesse llamó a estos clusters de células “islotes de Langerhans” en honor a su descubridor. Fue este investigador, el primero en postular una función endocrina de estos grupos celulares en el control de los niveles de glucosa en sangre. Se trata de estructuras altamente vascularizadas y que reciben una importante inervación del sistema nervioso autónomo, tanto simpático como parasimpático. El islote pancreático está compuesto por distintos tipos celulares, cada uno de ellos encargado de la secreción de una hormona distinta. La célula beta (β), sintetiza y secreta insulina, constituye el tipo celular más numeroso, representando cerca del 60% del islote en humanos y hasta el 80% en roedores. La célula alfa (α), produce y secreta glucagón, representa el segundo tipo celular más abundante, pudiendo alcanzar el 45% en humanos, mientras que en roedores supone alrededor de un 20%. Estos datos sugieren una mayor relevancia de este tipo celular en el islote humano. La célula delta (δ), encargada de sintetizar y secretar somatostatina, supone entre un 3-10% del total de células. El resto del islote se compone de dos tipos celulares minoritarios, la célula PP, que secreta el polipéptido pancreático (3-5%) y la célula épsilon (ϵ), que secreta el polipéptido grelina, siendo este último el grupo menos numeroso (menos del 1%), aunque constituye una población importante durante el desarrollo fetal (Wierup *et al.*, 2004).

En cuanto a la citoarquitectura de los islotes de Langerhans, encontramos diferencias entre especies. En los islotes de roedores, encontramos un cuerpo central en el islote, formado por las células β y los demás tipos celulares minoritarios distribuidos por la periferia. En los islotes humanos, encontramos los distintos tipos celulares dispersos, dispuestos de manera heterogénea dentro del islote (Figura 1) (Arrojo e Drigo *et al.*, 2015). Estas variaciones en la citoarquitectura del islote, en la proporción y distribución diferenciada de los distintos tipos celulares entre humanos y roedores,

podrían implicar cambios importantes a nivel de regulación paracrina y en la comunicación intercelular dentro del islote. Se ha observado que existe una importante variación en el porcentaje de células β que presentan uniones homotípicas (contacto de células del mismo tipo), siendo de un 71 % en roedores frente a un 29 % en humanos. En estos últimos, las uniones mayoritarias son las heterotípicas (contacto entre distintos tipos de células) (Cabrera *et al.*, 2006).

Por otra parte, también encontramos diferencias en cuanto a la inervación por parte del sistema autónomo. En los islotes de roedores, la inervación por parte del sistema autónomo se compone de una serie de fibras simpáticas rodeando los mismos, mientras que las fibras parasimpáticas están distribuidas en la parte central del islote, suministrando acetilcolina a las células β . Por su parte en los islotes de humanos, las fibras simpáticas están asociadas a los vasos sanguíneos de los mismos, mientras que las parasimpáticas son escasas, siendo las células α las encargadas de liberar acetilcolina a las células β y δ (Arrojo e Drigo *et al.*, 2015, Bonner-Weir and Orci, 1982).

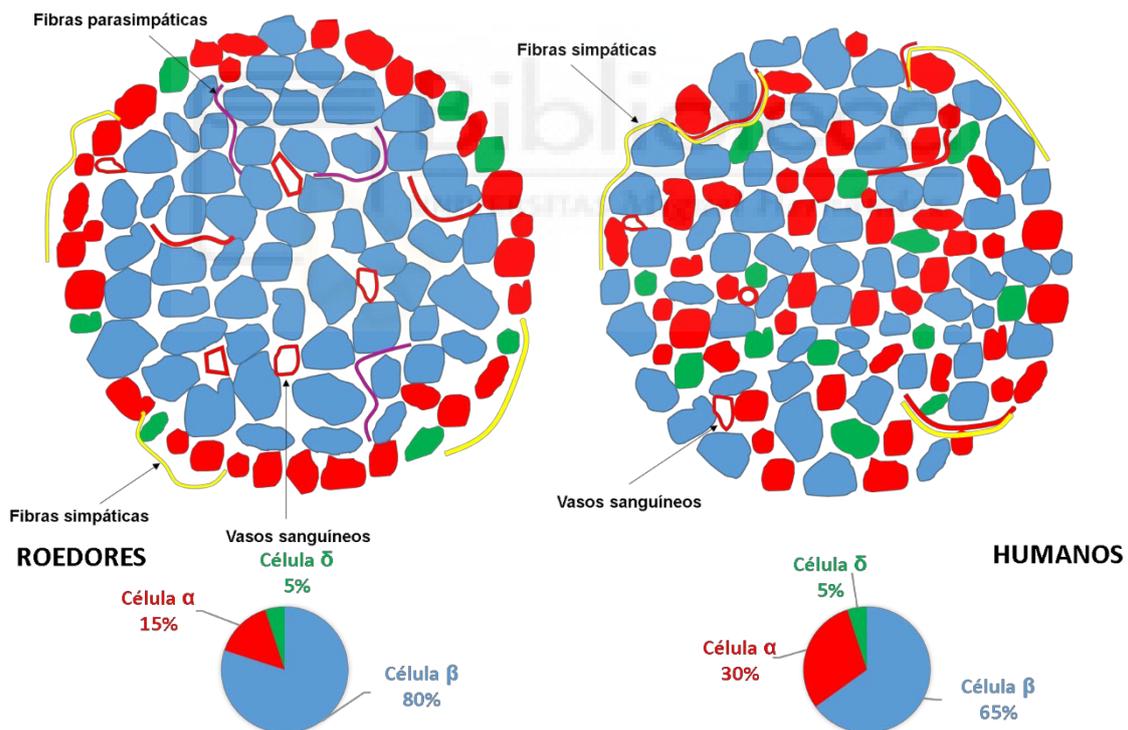


Figura 1: Citoarquitectura diferencial de los islotes de Langerhans de roedores y primates. En roedores, los islotes están compuestos por un núcleo central o "core" de células β , rodeadas por un manto de células α y δ . Por el contrario, los islotes de primates no humanos y humanos, presentan una distribución heterogénea de los distintos tipos celulares. Modificada de Arrojo e Drigo *et al.*, 2015.

En definitiva, y a pesar de las diferencias entre especies, los diversos tipos celulares del islote están organizados de tal modo que permite una adecuada y precisa relación y comunicación entre todas ellos, posiblemente debida a cascadas de señalización autocrinas, paracrinas y endocrinas, funcionando el islote como un mini-órgano. Gracias a su organización celular única, los islotes de Langerhans son capaces de cumplir su cometido fisiológico de manera satisfactoria, adaptándose en todo momento a los constantes cambios metabólicos, dados por los cambios en la demanda energética, manteniendo unos niveles óptimos de glucosa circulantes (Arrojo e Drigo *et al.*, 2015).

2. HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.

La Real Academia Española (RAE) define homeostasis como el conjunto de fenómenos de autorregulación, que conducen al mantenimiento de la constancia en la composición y propiedades del medio interno de un organismo. Basándonos en esta definición, podemos decir que la homeostasis de la glucosa engloba el conjunto de procesos de autorregulación necesarios para mantener unos adecuados niveles de glucosa en sangre, dentro de un rango de concentración estrecho que asegure la mayor constancia posible. Para que este fenómeno suceda, los mecanismos de regulación implicados deben actuar de forma rápida y precisa, para hacer frente a los desafíos metabólicos que se presentan a lo largo del día. De este modo, la homeostasis de la glucosa se basa en un sistema de autorregulación por retroalimentación negativa en el que están implicadas las hormonas producidas y secretadas por las distintas subpoblaciones celulares que componen el islote de Langerhans. Dentro de estos tipos celulares destacan dos especialmente, las células β productoras de la hormona insulina y las células α productoras de la hormona glucagón.

La historia de ambas hormonas comenzó a la vez, en el año 1921, cuando F. Banting y C. Best analizaron los primeros extractos de páncreas procedentes de perro, observando que la hipoglucemia inducida por insulina venía precedida de una hiperglucemia transitoria que atribuyeron a un efecto secundario a la liberación de epinefrina. Sin embargo, no fue hasta el año 1923, cuando se sugirió que este efecto hiperglucemiante era debido a un “contaminante” al que llamaron glucagón, siendo en el año 1948 cuando se estableció que las células α , eran la fuente del mismo. Años más tarde, con la implementación del RIA (radioinmunoensayo) de glucagón, fue posible comenzar a investigar la fisiología de esta hormona así como su implicación en distintas enfermedades y desórdenes (Gromada *et al.*, 2007). Este desfase temporal en el estudio y conocimiento de la fisiología de ambos tipos celulares y sus correspondientes

hormonas es debido a que, a pesar de la importancia de las células α y la secreción de glucagón en la regulación de la glucemia, la célula β ha centrado la atención de los investigadores pues su disfunción es un eje principal en la fisiopatología de la diabetes.

Las células β pancreáticas son las encargadas de producir y secretar la insulina en respuesta a una elevación de los niveles de glucosa en sangre. La insulina es una hormona proteica compuesta por 51 aminoácidos, que consta de dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro intercatenarios. La insulina ejerce su acción sobre diversos tejidos diana como son el músculo, hígado y tejido adiposo. En el músculo, la insulina promueve la captación de glucosa desde el torrente sanguíneo al aumentar la translocación de transportadores de glucosa a la membrana celular, estimulando a su vez la glucogenogénesis. En el hígado, la insulina reduce la producción hepática de glucosa (HGP), al inhibir, por medio de la activación de la vía Akt, el factor de transcripción FOXO1, encargado de la gluconeogénesis en los hepatocitos (Schwartz *et al.*, 2013). En el tejido adiposo, por una parte promueve la lipogénesis estimulando la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos, al mismo tiempo que presenta efectos anti-lipolíticos. La glucosa constituye el principal estímulo de activación de la célula β , célula eléctricamente excitable con un patrón oscilatorio característico. Cuando la concentración de glucosa extracelular aumenta, se incrementa la frecuencia oscilatoria de la célula β . Así, a bajas concentraciones de glucosa (≤ 5 mM), el potencial de membrana de este tipo celular se encuentra en valores negativos (aproximadamente -70 mV), la célula β está inactiva y la secreción de insulina es baja (niveles basales). Por el contrario, cuando la concentración de glucosa aumenta, la célula se despolariza hasta alcanzar un valor umbral del potencial de membrana (-55 mV a -50 mV), en el que se disparan potenciales de acción, que llevan a señales intracelulares de calcio que promueven la secreción de insulina (Rorsman *et al.*, 2011). En todo este proceso tiene un papel preponderante el canal de potasio sensible a ATP (K_{ATP}). El aumento de la concentración de glucosa y el metabolismo de la misma en el interior celular (entrada mediada por el transportador GLUT2), hace que aumente la razón ATP/ADP, con lo que se reduce la actividad del canal K_{ATP} y así el flujo de salida de K^+ . Este hecho produce la despolarización progresiva de la membrana plasmática, con la consiguiente apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y aumento de la concentración intracelular de calcio. Esta elevación del calcio intracelular resulta en un aumento la secreción de insulina, ya que la exocitosis de los gránulos de esta hormona es fundamentalmente dependiente de calcio (Rorsman *et al.*, 2012).

Por su parte, las células α pancreáticas son las encargadas de producir y secretar la hormona glucagón. Se trata de una hormona proteica más pequeña, de tan sólo 29

aminoácidos, de acción contraria a la de la insulina, cuyo principal estímulo para su secreción es la bajada de los niveles de glucosa en sangre. El glucagón actúa sobre tejidos periféricos, fundamentalmente en el hígado, estimulando acciones opuestas a la insulina. A nivel hepático, el glucagón estimula la producción de glucosa promoviendo la gluconeogénesis y la glucogenólisis, provocando así la liberación de glucosa al torrente sanguíneo (Gromada *et al.*, 2007). Por su parte, en el tejido adiposo, promueve el catabolismo lipídico, mediante la hidrólisis de triglicéridos (lipólisis) y la β -oxidación de ácidos grasos (Longuet *et al.*, 2008). Todos estos mecanismos de regulación mediados por las células α y β , tienen como objetivo restaurar los niveles de glucosa basal a una situación conocida como normoglucemia tras un desafío metabólico (hiperglucemia o hipoglucemia) (Figura 2).

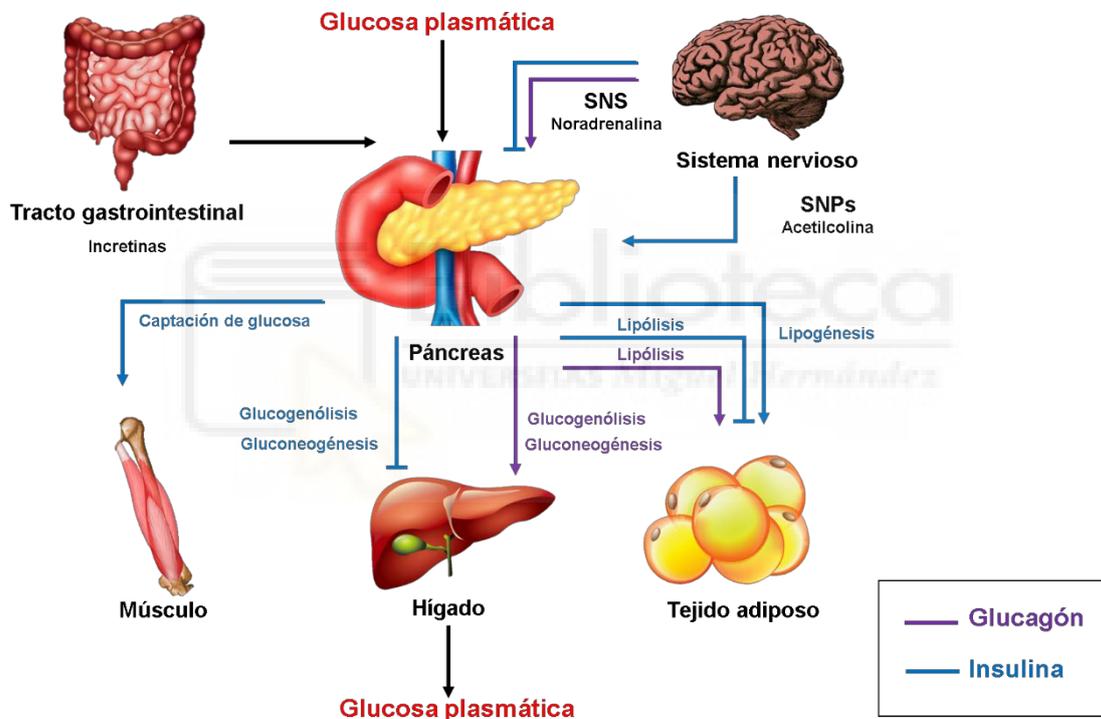


Figura 2: Homeostasis de la glucosa. Esquema que representa la regulación de los niveles de glucosa en sangre por parte de las hormonas glucagón e insulina producidas por las células alfa y beta, respectivamente. SNS (Sistema Nervioso Central), SNP (Sistema Nervioso Autónomo), Incretinas (entre las que encontramos GLP-1, GIP, entre otras).

A su vez, además de los principales efectores, insulina y glucagón, existen otros elementos que intervienen en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. La hormona somatostatina, producida por tejidos neuronales y endocrinos, incluidas las

células δ pancreáticas, tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción tanto de insulina como de glucagón. Esta inhibición podría ser a nivel local, a través de la red microcirculatoria del islote (en este caso estaríamos hablando de una regulación endocrina), y/o a través del intersticio celular (en este caso se trataría de una regulación paracrina) (Gromada *et al.*, 2007). Otros participantes en la regulación de la homeostasis de la glucosa serían las incretinas, entre las que destacamos el polipéptido inhibitorio gástrico (GIP) y el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1). Ambas disminuyen la secreción de glucagón, así como promueven la secreción de insulina (Deacon, 2007). Como ya hemos mencionado anteriormente, los islotes de Langerhans son estructuras con una gran inervación del sistema nervioso autónomo, especialmente por fibras simpáticas y parasimpáticas que penetran profundamente en el islote e intervienen en la regulación de la secreción hormonal dentro del mismo. El sistema nervioso simpático es activado en situaciones de hipoglucemia, provocando la liberación de norepinefrina así como de otros neurotransmisores y neuropéptidos en el islote, estimulando la secreción de glucagón por parte de las células α . Estos a su vez producen la inhibición de la secreción de insulina y somatostatina por parte de las células β y δ , respectivamente. Por su parte, la activación del sistema nervioso parasimpático estimula la secreción de insulina por parte de las células β , así como la liberación de somatostatina y PP. Esto es debido en gran parte a la activación de receptores muscarínicos por la acetilcolina (Rodríguez-Díaz and Caicedo, 2013).

La pérdida de la capacidad homeostática del organismo para mantener los valores de glucemia plasmática dentro de un rango estable conlleva el desarrollo de alteraciones metabólicas, de entre las cuales la diabetes mellitus es la más relevante. El principal signo clínico de la diabetes mellitus consiste en una elevación persistente de los niveles de glucosa en sangre; la hiperglucemia crónica no controlada provocaría efectos glucotóxicos multiorgánicos severos que perjudicarían progresivamente la calidad de vida del paciente, siendo los cuales potencialmente letales a largo plazo. La etiología clásica de la patología diabética considera principalmente causas relacionadas con la ineficiente señalización de la insulina a nivel periférico (insensibilidad o resistencia a insulina), la insuficiente secreción de insulina en el páncreas, o ambas. En función de su etiología y fisiopatología, la diabetes mellitus se ha clasificado en cuatro subgrupos principales: diabetes mellitus tipo 1 (T1DM), diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), diabetes asociada al embarazo o diabetes mellitus gestacional (GDM), y la diabetes tipo MODY (del acrónimo en inglés Maturity Onset Diabetes of the Young). La diabetes tipo 1 está caracterizada por una insuficiencia de insulina debida a un ataque autoinmune dirigido de forma específica contra las células β del islote. Esto conlleva la destrucción extensiva

del único tipo celular con capacidad insulino secretora del organismo (Eizirik *et al.*, 2009). Por otro lado, el desarrollo de la diabetes tipo 2 implica la participación combinada de múltiples factores cuya contribución particular puede variar dependiendo del individuo. Sin embargo, podemos decir que la diabetes tipo 2 resulta del efecto combinado de ciertas variables ambientales (alimentación, sedentarismo, etc.) con cierta predisposición genética del individuo (Kahn *et al.*, 2006). En cualquier caso, la resistencia a la insulina que tiene lugar en tejidos periféricos que participan en la homeostasis de la glucosa y su interacción con la respuesta de las células β pancreáticas a esta situación, juega un papel clave en la aparición y desarrollo de intolerancia a la glucosa y la diabetes tipo 2. Cuando la variable medioambiental de riesgo para el desarrollo de hiperglucemia es el embarazo, hablamos de diabetes gestacional. Se trata de un tipo particular de T2DM cuya característica principal es que debuta por primera vez durante el embarazo, resolviéndose tras el parto. A pesar del papel central que ha venido teniendo la insulina y disfunción de la célula β en la etiología de la diabetes tipo 1 y 2, a día de hoy existe una aceptación generalizada de que la desregulación de la célula α y la señalización de glucagón pueden contribuir significativamente al desarrollo de la patología diabética (Gromada *et al.*, 2018, Hughes *et al.*, 2018, Yu *et al.*, 2008), estableciéndose una potencial nueva diana terapéutica para el tratamiento de la diabetes.

3. EL GLUCAGÓN: ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN EN LA CÉLULA α .

En el acoplamiento estímulo-secreción de la célula α mediado por glucosa podemos encontrar cuatro fases claramente diferenciadas. En primer lugar, la captación y el metabolismo de la glucosa mediada por transportadores de membrana GLUT-1 introducen la glucosa al citosol de las células α . Dadas las características bioquímicas de la célula α , el metabolismo de la glucosa se da principalmente por la ruta glucolítica anaeróbica. Esta característica las diferencia de las células β , porque aunque ambas presentan glucoquinasa, las beta presentan una alta eficiencia mitocondrial, con lo que su metabolismo es preferentemente aeróbico (Schuit *et al.*, 1997, Sekine *et al.*, 1994). El resultado del metabolismo de la glucosa en la célula α son pequeños aumentos de la concentración de ATP citosólico, esenciales para que se produzcan las siguientes fases del acoplamiento estímulo-secreción, regulación de la actividad eléctrica y generación de potenciales de acción, que desencadenarían señales intracelulares de calcio y finalmente la exocitosis de glucagón.

En los últimos tiempos se han propuesto diversos modelos que intentan explicar el acoplamiento estímulo-secreción en la célula α . A pesar de las diferencias existentes entre ambos modelos, está demostrado que a bajas concentraciones de glucosa se generan potenciales de acción por la apertura de canales de calcio y sodio en la célula α , desencadenando señales intracelulares de calcio que estimulan la exocitosis, siendo ésta máxima en ausencia de glucosa (Nadal *et al.*, 1999, Quesada *et al.*, 1999). Un aumento de las concentraciones de glucosa es capaz de inhibir este proceso, encontrando la inhibición máxima en torno a 6-8 mM glucosa (Vieira *et al.*, 2007). A pesar de que la célula α presenta diversos tipos de canales de calcio, como son los tipo N, T, L y P/Q, recientes estudios parecen indicar que los canales implicados en el acoplamiento estímulo-secreción mediado por glucosa son preferentemente los de tipo T, L y P/Q (Briant *et al.*, 2016, Gylfe, 2016).

3.1 Modelo acoplamiento estímulo-secreción en la célula α : papel del canal K_{ATP} .

Este primer modelo de acoplamiento estímulo-secreción en la célula α pancreática es el propuesto por Ashcroft y Rorsman (Ashcroft and Rorsman, 2013), donde los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}), presentan un papel clave. Este modelo se basa en el principio de que a niveles bajos de glucosa, la mayoría de los canales K_{ATP} estarían cerrados debido a que el metabolismo de las células α sería capaz de generar una concentración de ATP suficiente para promover el cierre de gran parte de la población de canales. De hecho, la afinidad de los canales K_{ATP} por el ATP en célula α es mayor que en célula beta (Leung *et al.*, 2005). Como resultado de este bloqueo, el potencial de membrana se sitúa en un nivel en el que se dispararían potenciales de acción (alrededor de -60 mV) (Figura 3). Los canales de calcio tipo T serían los responsables de generar los potenciales de acción, despolarizando la membrana hasta alcanzar los -30mV, umbral de activación de los canales de sodio, que actuarían potenciando la despolarización de la membrana, con la consiguiente apertura de los canales tipo L y canales tipo P/Q. Estos últimos serían fundamentales para que se produzca la secreción de glucagón mediante la exocitosis de sus gránulos, ya que estos se encuentran muy cerca de las vesículas secretoras, a diferencia de lo que ocurre con los canales de tipo L. La apertura de canales de potasio dependientes de voltaje (tipo A) sería responsable de la repolarización del potencial de acción (Figura 3).

Por otra parte, basándonos en este modelo, altas concentraciones de glucosa aumentarían de forma significativa los niveles de ATP en el citosol, provocando el cierre total de los canales de K_{ATP} . En este caso, el nivel de despolarización de la membrana alcanzado provocaría el efecto contrario al anterior, inactivando tanto los canales de sodio como los canales de calcio tipo T. Esto haría que la amplitud del potencial de acción fuese insuficiente para activar los canales de calcio tipo P/Q, y como resultado se produciría una disminución en la secreción de glucagón, al reducirse la exocitosis (Ashcroft and Rorsman, 2013). Aunque se trata del modelo más extendido, existen trabajos que ponen en duda la importancia del canal K_{ATP} en la secreción de glucagón (Gylfe, 2016). Existen estudios en los que empleando modelos de ratón que carecen de canales K_{ATP} han sido capaces de reproducir respuestas similares a las descritas en este mismo apartado.

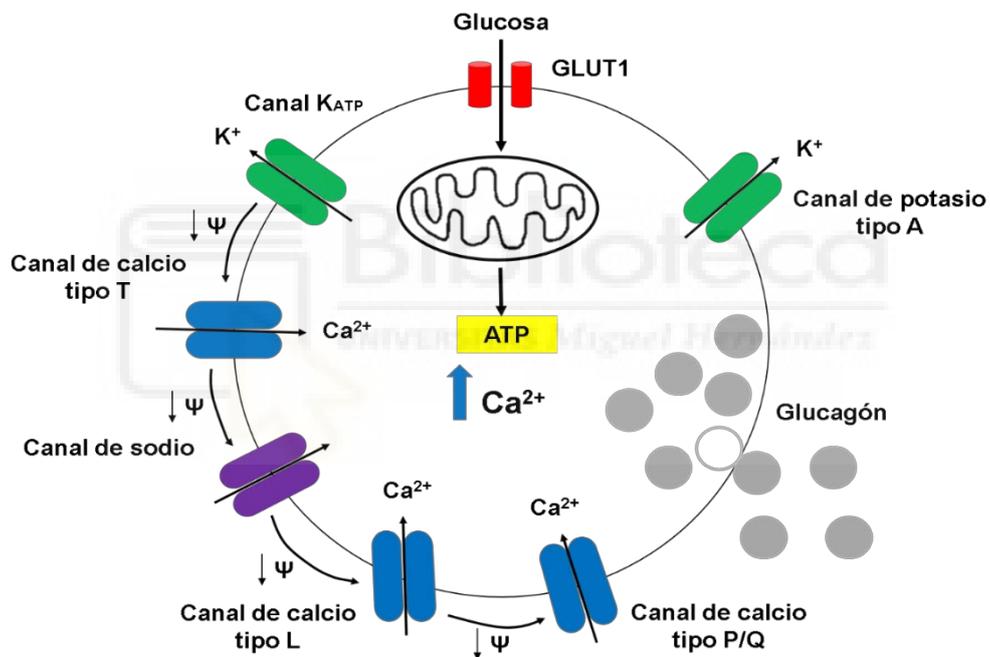


Figura 3: Modelo acoplamiento estímulo-secreción en la célula α regulado por glucosa: papel del canal K_{ATP} . Cuando se produce una condición de hipoglucemia, el nivel de ATP citosólico generando en las células α sería suficiente para producir el cierre de parte de los canales K_{ATP} , generando una despolarización ($\Psi \downarrow$) suficiente para alcanzar un potencial de membrana en el cual se produce la apertura de canales de calcio tipo T y canales de sodio. La activación de estos canales, sigue despolarizando la membrana hasta un nivel donde se activan canales de calcio tipo L y P/Q. Estos canales son los encargados de generar potenciales de acción y señales de calcio intracelular que terminan en la exocitosis de los gránulos de glucagón. (cont.)

Figure 3 (cont.) En condiciones de hiperglucemia, los niveles elevados de ATP citosólico producido por el metabolismo de la glucosa en las mitocondrias, llevaría al cierre total de los canales K_{ATP} , alcanzando una despolarización de tal magnitud que llevaría el potencial de membrana a un nivel, al cual no se podría producir la activación de los canales anteriormente mencionados o se genera su inactivación dependiente de voltaje. Esto provocaría a su vez una disminución de la actividad eléctrica de la célula, disminución de la señalización de calcio y por tanto disminución de la secreción de glucagón.

3.2 Modelo alternativo acoplamiento estímulo-secreción en la célula α : efecto hiperpolarizante de la glucosa y el retículo endoplásmico.

Existen diversos estudios que sugieren que la glucosa no despolarizaría la membrana, tal y como hemos descrito en el anterior modelo, sino que por el contrario tendría un efecto hiperpolarizante sobre la célula α . En este nuevo modelo, el retículo endoplásmico presentaría un papel protagonista (Liu, Y. J. *et al.*, 2004, Tian *et al.*, 2012, Vieira *et al.*, 2007). Según este modelo, a bajas concentraciones de glucosa, los niveles menores de ATP del citosol serían insuficientes para promover la entrada de calcio al retículo endoplásmico a través de las bombas SERCA (del inglés, *sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase*). Esto llevaría a la activación de la entrada de calcio al citosol a través de canales SOC (del inglés, *store-operated channels*) de la membrana plasmática de las células α , debido a la caída de los niveles de calcio dentro del retículo. La entrada de calcio extracelular provocaría la despolarización de la membrana hasta un umbral suficiente para la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, disparando potenciales de acción en la célula α , que en última instancia llevarían a la formación de señales intracelulares de calcio y a la exocitosis de gránulos de glucagón (Figura 4A).

Por el contrario, en situaciones donde la concentración de la glucosa es más elevada (normoglucemia o hiperglucemia), se generarían unos niveles de ATP citosólico capaces de activar las bombas SERCA, promoviendo el acúmulo de calcio en el retículo endoplásmico, y desactivando la entrada de calcio a través de los canales SOC, lo cual inhibiría la despolarización de la membrana de las células α (llevando a un nivel de Ψ hiperpolarizado) y por consiguiente bloquearía la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje, disminuyendo la secreción de glucagón (Figura 4B).

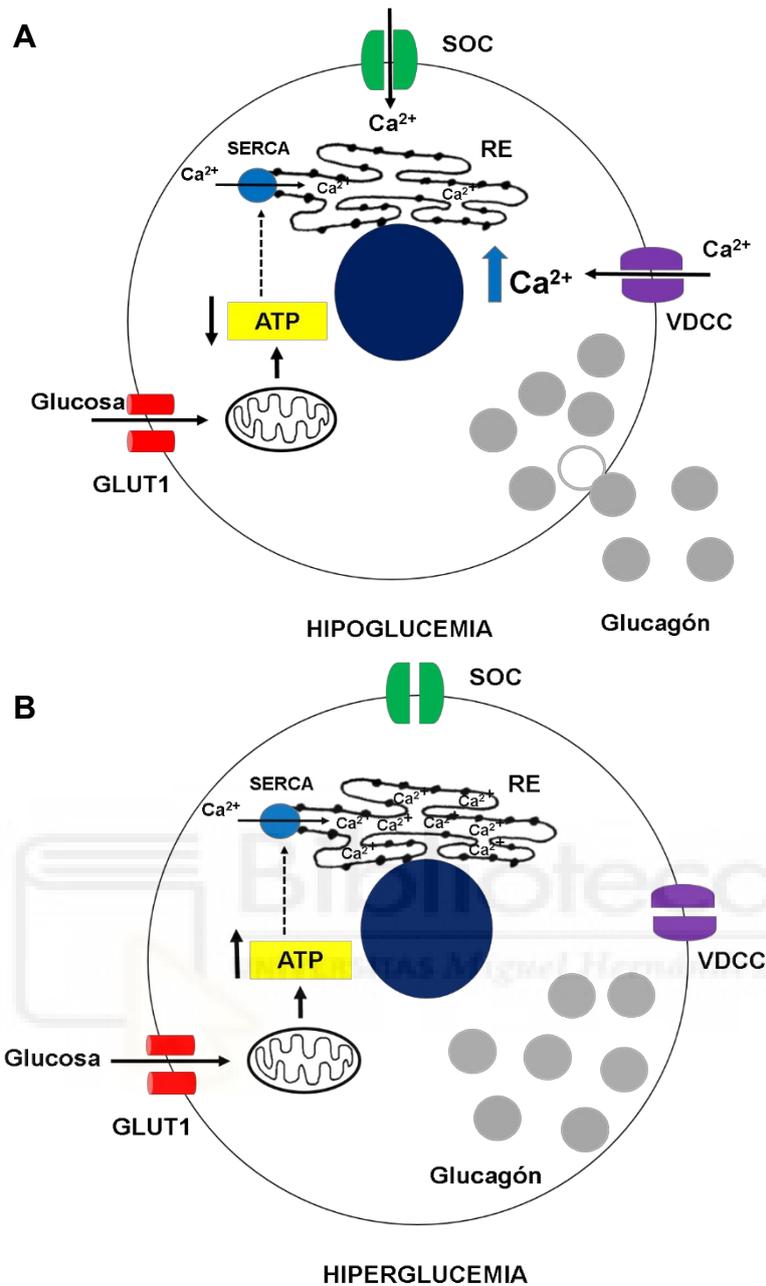


Figura 4: Modelo alternativo acoplamiento estímulo-secreción en la célula α : papel del retículo endoplásmico. (A) Cuando se produce una situación de hipoglucemia, el metabolismo de la glucosa genera bajas concentraciones de ATP, por lo que la activación de las bombas SERCA propiciada por la entrada de Ca^{2+} al retículo endoplásmico (RE) se encuentra mermada, presentando esta organela bajas concentraciones de Ca^{2+} . Este hecho desencadena la activación de los canales SOC (Store-Operated Channels). De este modo, la entrada de cationes a través de SOC despolariza ($\Psi \downarrow$) la célula α , activándose canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC). El aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , debido a la entrada del mismo a través de los canales VDCC, promueve la fusión de los gránulos cargados de glucagón a la membrana plasmática y la secreción de esta hormona. (B) Durante la hiperglucemia la respuesta es opuesta a la descrita durante la hipoglucemia. Las altas concentraciones de glucosa y por consiguiente de ATP, activan las bombas SERCA, acumulándose Ca^{2+} en el RE, que inactiva los canales SOC. La falta de una señal despolarizante inhibe la entrada de Ca^{2+} a través de los canales VDCC y la secreción de glucagón.

4. ADAPTACIONES FISIOLÓGICAS DURANTE LA GESTACIÓN: CAMBIOS EN LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.

Durante la gestación la madre experimenta importantes cambios fisiológicos, tanto a nivel sistémico como local, para satisfacer los requerimientos energéticos del feto en crecimiento. Estos cambios en la madre dependen del estadio de la gestación, estando estos íntimamente ligados a la relación o compromiso que se establece entre los requerimientos metabólicos de la madre y los del feto, que van cambiando a medida que este se va desarrollando. La glucosa cubre una fracción importante de las necesidades energéticas del feto. Su transporte a través de la placenta es facilitado a través de transportadores de glucosa (GLUT 1-5 y GLUT 7) (Baumann *et al.*, 2002), siendo la principal isoforma GLUT-1. Para que se produzca este transporte de manera eficaz debe establecerse un gradiente entre la concentración de glucosa circulante materna y la fetal. En los primeros estadios de la gestación, el gradiente se mantiene gracias a un aumento de la secreción basal de insulina por parte de las células β fetales y a una relativa insensibilidad a la glucosa en estas células, que resultan en una baja concentración de glucosa circulante en el feto. Por el contrario, a medida que el feto crece, especialmente hacia el final de la gestación, se produce un aumento de la fracción de glucosa materna que es desviada a través de la placenta al feto (Nolan and Proietto, 1994). Este hecho pone en riesgo el mantenimiento del gradiente al disminuir la concentración de glucosa en sangre de la madre. Por ello, para contrarrestar este efecto, la placenta secreta hormonas como lactógeno placentario, prolactina, progesterona y hormona de crecimiento que aumentan la resistencia a la insulina en tejidos periféricos maternos y la gluconeogénesis hepática (Baeyens *et al.*, 2016, Burton and Jauniaux, 2015) (Figura 5). Como resultado se produce un aumento de los niveles de glucosa circulantes en la madre, manteniendo el gradiente materno-fetal.

Tal como acabamos de mencionar, al comienzo de la gestación, la demanda energética del feto es relativamente baja. Es por ello, que la sensibilidad a insulina en el organismo materno no cambia o incluso se ve aumentada, favoreciendo un aumento de las reservas energéticas de la madre. A nivel del tejido adiposo, se produce un aumento de la sensibilidad a insulina en el tejido adiposo blanco de la madre relacionado con la hipertrofia de los adipocitos, aumento de la lipogénesis y almacenamiento de lípidos. Además, a nivel hepático se produce una acumulación de glucógeno que contribuye a aumentar la reserva energética en la madre (Hadden and McLaughlin, 2009, McIlvride *et al.*, 2017). Sin embargo, con el fin de mantener el gradiente de concentración de glucosa entre la madre y el feto durante el embarazo, la sensibilidad a la insulina disminuye progresivamente durante las últimas 20 semanas de gestación

en los humanos (Catalano *et al.*, 1991), mientras que en roedores, el desarrollo de resistencia a insulina ocurre con el progreso de la gestación, especialmente en la segunda mitad (Asplund *et al.*, 1969, Parsons *et al.*, 1992). Esta resistencia a la insulina se genera principalmente en aquellos tejidos periféricos, como el hígado, el músculo y el tejido adiposo, que tienen un papel importante en la homeostasis de la glucosa. Con el fin de mantener la normoglucemia en la madre, al mismo tiempo que se asegura un adecuado aporte energético al feto, se produce un aumento de la lipólisis y de la gluconeogénesis materna (Freemark *et al.*, 2002, Musial *et al.*, 2016). Estas alteraciones a nivel metabólico y endocrino durante la gestación desencadenan toda una serie de adaptaciones a nivel del páncreas endocrino y de los tejidos periféricos implicados en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa.

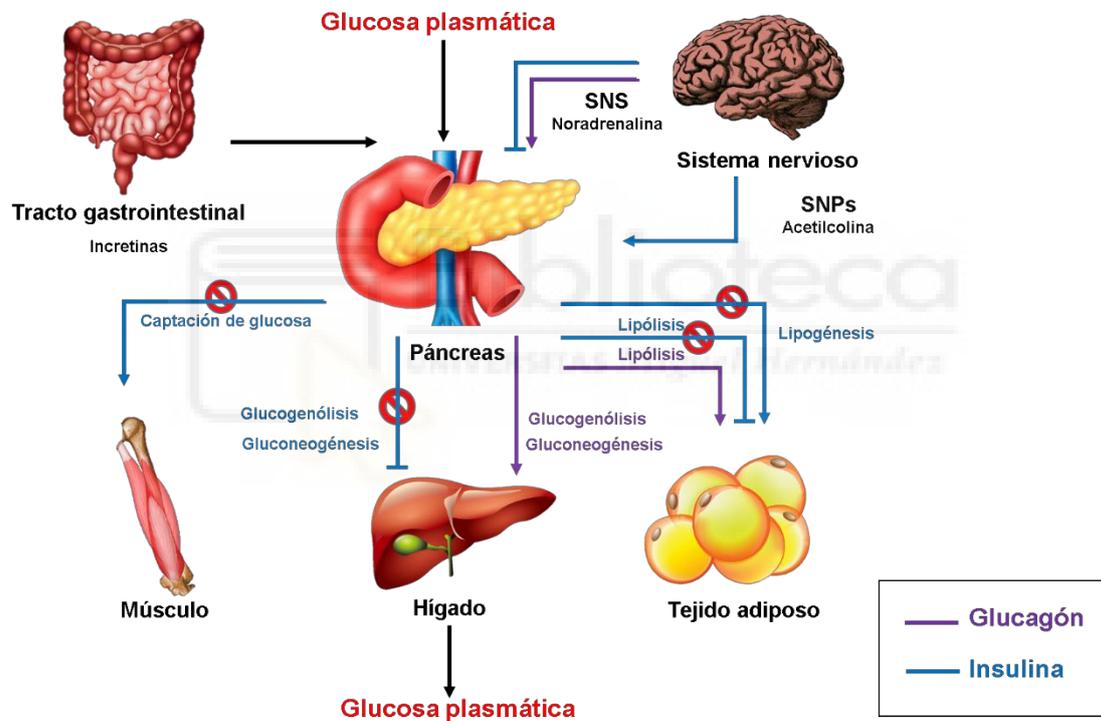


Figura 5: Homeostasis de la glucosa durante la segunda mitad de la gestación. Esquema que representa la regulación de los niveles de glucosa en sangre por parte de las hormonas glucagón e insulina durante la segunda mitad de la gestación, donde se desarrolla una resistencia fisiológica a la insulina en tejidos periféricos como músculo, hígado y tejido adiposo. Aunque se ha incluido el posible efecto del glucagón durante la preñez, no existen aún suficientes estudios para determinar con exactitud estos efectos.

Estas adaptaciones en el organismo materno con un ambiente de resistencia a la insulina son necesarias para propiciar un equilibrio materno-fetal y para hacer frente a los retos metabólicos que se producen tras la ingesta de alimentos, previniendo un flujo excesivo de nutrientes al feto (Rieck and Kaestner, 2010, Baeyens *et al.*, 2016). Cerca del final de la gestación, se ha observado en roedores que la resistencia a la insulina del organismo de la madre disminuye, posiblemente como un mecanismo para conservar nutrientes para el uso materno a medida que se aproxima el parto y la lactancia (Musial *et al.*, 2016).

Acompañando a las adaptaciones a nivel metabólico y endocrino, también se producen alteraciones a nivel del sistema cardiovascular de la madre, necesarias para asegurar que se produzca un flujo de sangre óptimo hacia la placenta que permita la adecuada nutrición y oxigenación del feto. Estas alteraciones tienen lugar muy temprano durante la gestación y finalmente conducen a una vasodilatación sistémica que permite una mayor perfusión a los órganos maternos, entre los que se incluye el útero. En el ratón, la presión sanguínea disminuye un 15%, a la vez que el rendimiento cardíaco aumenta un 48%. Por su parte en los humanos, además de producirse un aumento del rendimiento cardíaco de un 40%, se reduce la resistencia vascular sistémica en torno a un 25-30% (Kulandavelu *et al.*, 2006, Soma-Pillay *et al.*, 2016).

5. LAS HORMONAS GESTACIONALES.

Durante la gestación, la mayoría de los tejidos y órganos de la madre responden a este particular estado fisiológico, produciéndose numerosos cambios en los mismos. Estas adaptaciones incluyen alteraciones en tamaño, morfología, función y cambios en la respuesta a señales hormonales y metabólicas. Dada la naturaleza dinámica del embarazo, se requiere de una gran coordinación en todas estas adaptaciones para asegurar un suministro de nutrientes y oxígeno adecuados para el crecimiento del feto, manteniendo a su vez la salud materna. En este proceso, las hormonas gestacionales cumplen un papel clave, siendo esenciales para el mantenimiento del embarazo, preservando un equilibrio energético óptimo entre la madre y el feto. En este sentido la placenta presenta un papel preponderante, ya que se trata de un órgano endocrino altamente activo durante la gestación, capaz de secretar una gran variedad de hormonas con efectos fisiológicos en la madre (Baumann *et al.*, 2002). Entre las hormonas secretadas encontramos miembros de la familia de la prolactina (como lactógeno placentario y prolactina), hormonas esteroideas (como estradiol y progesterona) y neurohormonas (como la serotonina) (Napso *et al.*, 2018). En el

presente estudio centramos nuestra atención en los dos primeros grupos, ya que en ellos se encuentran las principales hormonas encargadas de las adaptaciones del páncreas endocrino a la preñez.

5.1 Hormonas de la familia de la prolactina: lactógeno placentario y prolactina.

Entre las especies de mamíferos, existen diferencias en el número y tipo de estas hormonas expresadas por la placenta. En el ratón, la placenta es capaz de expresar genes que codifican para el lactógeno placentario (PL) y otros miembros de la familia de la hormona de crecimiento (GH), mientras que la prolactina (PRL) se expresa en las células lactotrópicas de la glándula pituitaria anterior y en la decidua o endometrio, que dará lugar a la porción materna de la placenta. Mientras tanto en el humano, la placenta sólo es capaz de expresar genes que codifican para el PL, y otros miembros de la familia de la hormona de crecimiento (GH) (Soares *et al.*, 2007). La expresión de los distintos miembros de la familia de la prolactina varía espacial y temporalmente en la placenta de ratón (Simmons *et al.*, 2008). Así, mientras que al comienzo de la gestación la glándula pituitaria anterior es la encargada de producir PRL y GH, esta disminuye hacia la mitad de la gestación, cuando la producción de hormonas placentarias es predominante (Bridges, 2015). Los miembros de esta familia presentan similitudes estructurales, lo cual les permite unirse, con distinta afinidad, al receptor de la prolactina (PRLr), miembro de la superfamilia de receptores de citoquinas. Este receptor está ampliamente conservado a lo largo de la evolución, se expresa en casi todos los tejidos y órganos, y presenta una función clave para el establecimiento de la gestación y el mantenimiento de la misma. Se trata de un receptor clasificado como un receptor de citoquinas tipo 1, el cual carece de actividad intrínseca de tirosina quinasa pero puede ser fosforilado por proteínas asociadas. Aunque el gen de la PRLr es único en cada una de las especies, el ajuste alternativo genera distintas isoformas, que son idénticas en sus dominios extracelulares, pero difieren en la longitud y secuencia de sus dominios intracelulares (Bole-Feysot *et al.*, 1998, Trott *et al.*, 2004). Tradicionalmente se había pensado que era necesaria la unión de una molécula de prolactina o lactógeno placentario a dos monómeros del receptor en la superficie celular para que se produjese su dimerización y se activase la cascada de señalización. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la dimerización es independiente de ligando en estos receptores de citoquinas. Lo que ocurre es que el ligando se une a un dímero del preformado e inicia cambios conformacionales que llevan a la activación del receptor (Qazi *et al.*, 2006). A nivel proteico encontramos una isoforma larga del PRLr (long-R), y diversas isoformas cortas

de PRLr (short-R). En humanos se han encontrado siete isoformas, mientras que en el ratón se han detectado cuatro. La unión de las hormonas lactogénicas a la isoforma larga del PRLr produce la activación de diversas vías mediadas por quinasas, entre las que encontramos Jak2/Stat (*Janus Kinase 2/ Signal transducer and activator of transcription*), quinasas Src, PI3K/AKT (fosfatidilinositol-3-quinasa/Protein quinasa B) y protein quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Figura 6). La señalización a través de estas vías activa la expresión de numerosos genes relacionados con proliferación y diferenciación celular. Por el contrario, disponemos de poca información sobre la isoforma corta del PRLr y su regulación. Actualmente sabemos que no es fosforilado por tirosinas, lo que hace que no interactúe directamente por ejemplo con los factores Stat, mediando sus acciones a través de otras vías como Jak2, quinasas Src o PI3K/AKT (Binart *et al.*, 2010) (Figura 6).

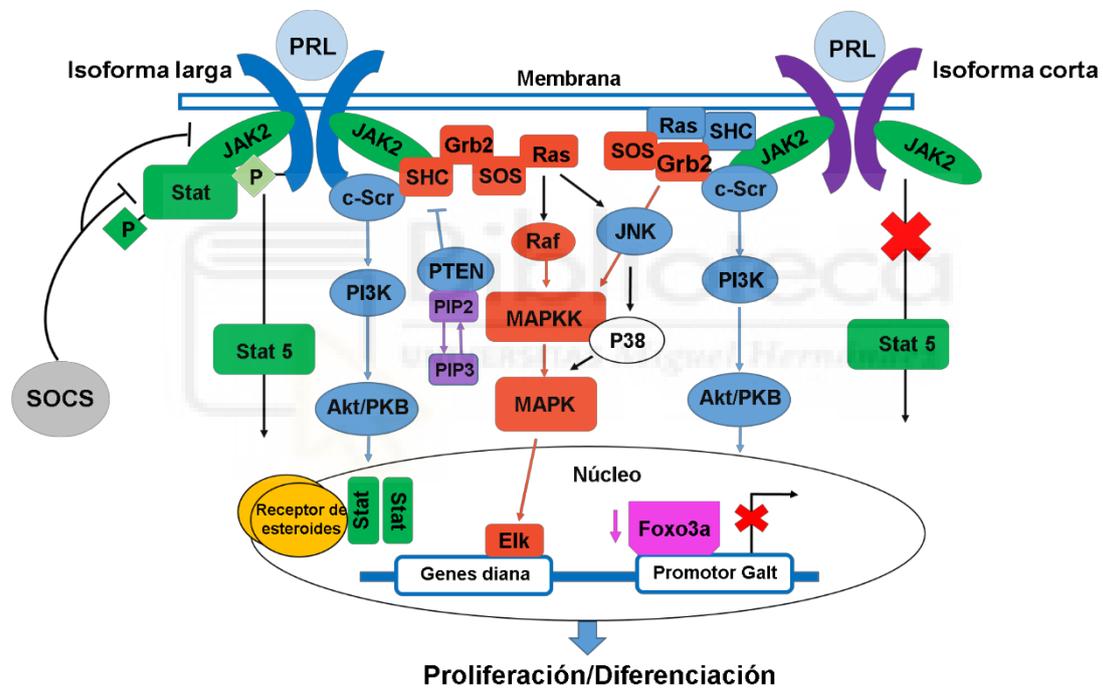


Figura 6: Principales cascadas de señalización activadas por la isoforma larga y la isoforma corta del receptor de prolactina. La activación del receptor de la prolactina (PRLR) inducida por ligando, desencadena varias cascadas de señalización. En la ruta principal, característica de la isoforma larga del receptor, interviene la tirosina quinasa Jak2, que a su vez activa a dos miembros de la familia Stat (Signal transducer and activator of transcription), Stat5a y Stat5b. La vía MAPK es otra cascada importante del PRLR. En ella participan los intermediarios Shc / Grb2 / Sos / Ras / Raf, actuando aguas arriba de las MAPK quinasas. El reclutamiento de PI3K conduce a la producción de fosfatidilinositol (3,4,5) – trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol (3,4,5) –difosfato (PIP2). Como regulador negativo de PI3K, la fosfatasa PTEN convierte PIP3 en PIP2 y Akt es captado por PIP3. La activación de otras vías de señalización ha sido descrita recientemente; entre ellas, se sabe que las quinasas Src, activadas por Jak2, desempeñan un papel importante en la proliferación. Modificada de Gorvin, 2015.

5.2 Hormonas esteroideas: estradiol y progesterona.

La placenta es una fuente primaria de hormonas esteroideas durante la gestación. En esta ocasión también encontramos diferencias entre especies. En especies como los roedores, el cuerpo lúteo continúa contribuyendo a la reserva de estas hormonas circulantes, mientras que en otras especies como los humanos, la placenta sirve como fuente principal, limitándose la producción por parte del cuerpo lúteo a las primeras semanas de embarazo (Costa, 2016). Estas hormonas tienen un papel fundamental en las adaptaciones del páncreas endocrino durante la gestación, siendo importantes en los cambios en la sensibilidad a insulina y metabolismo de la glucosa. Además se ha observado que están relacionadas con el desarrollo de enfermedades asociadas al embarazo como la diabetes gestacional. Se ha observado que las mujeres que padecen diabetes gestacional presentan concentraciones elevadas de progesterona y estradiol (Branisteanu and Mathieu, 2003, Qi *et al.*, 2017).

La progesterona (P) es una hormona crucial para el mantenimiento de la gestación, siendo también popularmente conocida como “hormona del embarazo”. Esta hormona se sintetiza principalmente a partir del colesterol materno, a través de una reacción en dos pasos, que tiene lugar en las mitocondrias del sincitiotrofoblasto. La progesterona ejerce acciones tanto genómicas como no genómicas, a través de la activación de diversos receptores. Los receptores nucleares de progesterona clásicos (NPR), PR α y PR β , tras la unión de la progesterona, median sus acciones genómicas por medio de su unión a elementos de DNA específicos en el promotor de genes diana. Por otra parte, las acciones no genómicas están mediadas por receptores de progesterona asociados a membrana (MPR), que tras la unión de la hormona, producen la activación de MAPK, descenso de la producción de AMPc y movilización intracelular de calcio (Goldman and Shalev, 2007).

Los estrógenos cumplen numerosas funciones durante la gestación (Nadal *et al.*, 2009). Entre estos estrógenos encontramos el 17- β -estradiol (E₂). Todo ellos median sus efectos clásicamente a través de la activación de los receptores nucleares, ER α y ER β (Bryzgalova *et al.*, 2006, Takeda *et al.*, 2003). Similar a lo que ocurre con los receptores de progesterona, la unión del estradiol a sus receptores promueve su dimerización, modulando la expresión de numerosos genes. Además son capaces de activar receptores de estrógenos asociados a membrana, ejerciendo acciones no-genómicas que incluyen movilización de calcio intracelular, activación de adenil ciclasa y por tanto aumento de los niveles de AMPc y de la actividad MAPK. Como ya hemos comentado, los niveles de E₂ aumentan hacia la segunda mitad de la gestación en

roedores, habiendo sido relacionado este hecho con el desarrollo de la resistencia a la insulina en tejido periféricos característica de este estado (Barros *et al.*, 2009).

6. ADAPTACIONES DEL PÁNCREAS ENDOCRINO DURANTE LA GESTACIÓN: LA CÉLULA β .

La gestación es un proceso dinámico y altamente coordinado que implica tanto cambios a nivel local como sistémicos en la madre para, como hemos visto en el apartado anterior, cubrir la demanda de nutrientes y oxígeno por parte del feto en crecimiento. Uno de estos cambios o adaptaciones principales es la resistencia a la insulina que de manera fisiológica se desarrolla en la madre principalmente en la segunda mitad de la gestación para mantener un gradiente adecuado que permita el flujo de glucosa de la madre al feto a través de un transporte facilitado por los transportadores GLUT a favor de gradiente. Esta alteración en la fisiología materna, que se produce tanto en humanos como en ratones, requiere de toda una serie de adaptaciones, que son especialmente relevantes a nivel del páncreas endocrino y están muy bien documentadas en la célula β pancreática. A rasgos generales, podemos clasificarlas en dos grandes grupos: adaptaciones morfológicas y funcionales. En cuanto a las adaptaciones morfológicas o estructurales se ha observado que en la segunda mitad de la gestación en roedores, conjuntamente con el desarrollo de la resistencia a la insulina materna, hay un aumento de la masa de célula β en la madre, dos a tres veces superior a la situación fisiológica normal (Rieck and Kaestner, 2010, Sorenson and Brelje, 1997) (Figura 7). Esta expansión de la célula β no es una simple respuesta al aumento de la demanda de insulina causada por la resistencia, sino que también se produce en paralelo con el aumento de las hormonas lactogénicas, tanto pituitarias como placentarias (Parsons *et al.*, 1992). Los principales procesos celulares implicados en el aumento de la masa de célula β son la proliferación o división celular a partir de células β preexistentes (hiperplasia) y el aumento del tamaño (hipertrofia) celular (Figura 7). La proliferación de células β es máxima entre los días 13-15 de gestación (dos a cinco veces mayor), disminuyendo paulatinamente a partir de los días 18-19 de gestación (Johansson *et al.*, 2006). A pesar de que la proliferación parece ser el principal mecanismo implicado en la expansión de la célula β , recientemente se han propuesto otros mecanismos que podrían contribuir a la misma, como son cambios en los niveles de apoptosis, así como la neogénesis a partir de células del ducto o la transdiferenciación a partir de otros tipos celulares (Banerjee, 2018, Rieck and Kaestner, 2010). Por lo que respecta a la neogénesis, se ha sugerido que ésta pueda tener una

posible contribución al aumento de la masa de célula β durante la gestación, tanto en ratones (Abouna *et al.*, 2010, Beamish *et al.*, 2017, Toselli *et al.*, 2014) como en humanos (Butler *et al.*, 2010). Durante la primera semana post-parto la masa de célula β vuelve a recuperar los niveles control mediante la disminución de la proliferación y del tamaño celular, al mismo tiempo que aumenta la muerte celular de las mismas. Es decir, se produce un cambio en el ratio proliferación/apoptosis (Rieck and Kaestner, 2010, Scaglia *et al.*, 1995).

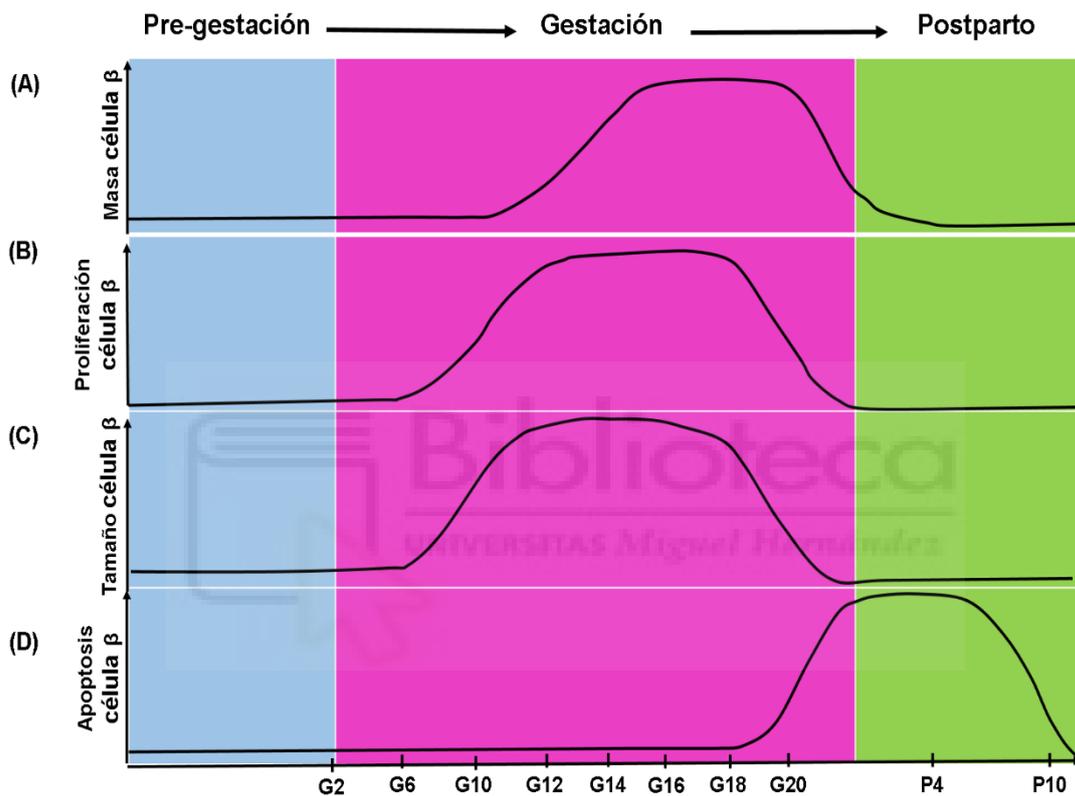


Figura 7: Dinámica de las adaptaciones de la célula β durante la preñez en el ratón. Principales adaptaciones maternas de la célula β pancreática a lo largo de la gestación en el ratón, donde G representa el día de gestación y P el día postparto. En la presente figura se muestra un esquema actualizado con la dinámica de la masa de células β , el tamaño, y los procesos de proliferación y apoptosis. La aproximación a la evolución temporal y magnitud de estas variables se basa en estudios recientes que indican que muchos de estos factores permanecen muy activos aún en G18 y G20 (Beamish *et al.*, 2017, Huang *et al.*, 2009, Xu *et al.*, 2015). Modificada de Rieck and Kaestner, 2010.

Por lo que respecta a las adaptaciones funcionales, durante la gestación, éstas se producen en el ratón principalmente entre los días 11 y 19 de la gestación, volviendo al

estado basal tras el parto. En primer lugar, cabría destacar que en las células β pancreáticas se produce un aumento de la síntesis de insulina, así como un aumento de la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) de manera que se genera un descenso en el umbral de estimulación por glucosa (Bone and Taylor, 1976, Ohara-Imaizumi *et al.*, 2013, Sorenson and Brelje, 1997). Además, se produce en las células β un aumento del metabolismo de la glucosa, promovido por un aumento de los niveles de transportadores de glucosa (especialmente Glut-2) y glucoquinasas (Weinhaus *et al.*, 1996, Weinhaus *et al.*, 2007). Estas últimas son enzimas que actúan como sensores de glucosa en estas células integrando los niveles de glucosa extracelular con la secreción de insulina, optimizando en este caso el acoplamiento estímulo-secreción. Otra de las adaptaciones que se producen en este tipo celular es el aumento de las proteínas de fusión de membranas SNARE (del inglés, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*), implicadas en la exocitosis de los gránulos de insulina (Cunha *et al.*, 2006).

Las hormonas gestacionales, esenciales para el mantenimiento del embarazo, tienen un papel muy importante en la preservación del equilibrio energético entre la madre y el feto. Estas hormonas, entre las que encontramos, el lactógeno placentario, la prolactina, la progesterona y el estradiol, son las encargadas de promover las adaptaciones en las células β pancreáticas, tanto morfológicas como funcionales, para hacer frente a la resistencia a la insulina desarrollada hacia el final de la gestación. Estudios recientes también involucran nuevos elementos en la regulación de las adaptaciones del páncreas endocrino durante la gestación, como serían la serotonina y factores de crecimiento como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Baeyens *et al.*, 2016).

Estudios en modelos animales, en concreto roedores, han mostrado como el crecimiento de la masa de célula β durante la gestación, así como la función incrementada, no son simples respuestas tan solo al aumento de la demanda de insulina por el desarrollo de resistencia a la misma, sino que se correlacionan con el aumento en suero de los niveles de lactógenos, placentarios y pituitarios (Parsons *et al.*, 1992, Sorenson and Brelje, 1997). En este proceso de adaptación de la células β son muy importantes los receptores de prolactina (PRLr) ya que estos actúan como receptores de las dos hormonas lactogénicas, PL y PRL (Freemark *et al.*, 2002, Amaral *et al.*, 2004, Huang *et al.*, 2009, Rawn *et al.*, 2015, Goyvaerts *et al.*, 2015, Moldrup *et al.*, 1993, Amaral *et al.*, 2004). A nivel funcional, múltiples estudios *in vivo* e *in vitro* realizados en islotes de Langerhans han demostrado que PL y PRL aumentan la secreción de insulina, especialmente la GSIS, al disminuir el umbral de estimulación por glucosa, y aumentan

la expresión de glucoquinas y transportadores de glucosa, al mismo tiempo que se activa la vía de biosíntesis de serotonina en los islotes (Arumugam *et al.*, 2014, Brelje *et al.*, 1993, Sorenson and Brelje, 1997). A nivel estructural, aumenta la proliferación de las células β y aumenta su supervivencia (al disminuir la apoptosis), obteniendo como resultado un aumento de la masa de las células productoras de insulina (Brelje *et al.*, 1993, Huang *et al.*, 2009), como habíamos mencionado anteriormente. Además, durante la gestación se ha observado que la expresión de PRLr está aumentada en los islotes de Langerhans maternos lo que favorecería la acción de las hormonas PL y PRL, impulsando todas estas adaptaciones. El receptor de la prolactina, que pertenece a la superfamilia de receptores citoquinas clase-1 (Brooks, 2012), cuando se le une su ligando, es fosforilado por la quinasa Janus 2 (JAK2), permitiendo así el reclutamiento y fosforilación del Transductor de la Señal y Activador de la Transcripción (STAT5), el cual se moviliza hacia el núcleo donde regula la expresión de genes diana (Bole-Feysot *et al.*, 1998, Brelje *et al.*, 2002). De entre los reguladores de las adaptaciones de la célula β durante la gestación, se ha propuesto recientemente que la serotonina desempeña un papel en la misma, estando su función íntimamente ligada a las hormonas lactogénicas. Se ha observado *in vivo* que la expresión de los genes que codifican la enzima triptófano hidroxilasa 1 (Tph 1), una enzima que participa en la síntesis de serotonina, así como la propia serotonina se encuentran aumentadas en los islotes de ratonas gestantes. A su vez, también se ha comprobado *in vitro*, que el tratamiento con lactógenos, que como hemos visto, tienen una gran relevancia en la adaptación de la célula β durante la gestación, produce el mismo aumento en la expresión de Tph 1 y serotonina. Se ha visto además que la prolactina aumenta la expresión de Tph 1 y la producción de serotonina en islotes de ratón *in vitro*, lo que sugiere que la serotonina actúa aguas abajo en la cascada de señalización tras el acoplamiento de los lactógenos con su receptor, aumentando la proliferación de célula β materna (Kim, H. *et al.*, 2010). Estos resultados han sido corroborados por estudios *in vivo*, donde se ha observado la importancia de la serotonina en la expansión de la masa de célula β durante la gestación en el ratón (Goyvaerts *et al.*, 2016).

En cuanto a las hormonas esteroideas, progesterona y estradiol, la placenta es la fuente principal de las mismas durante el embarazo, produciéndose una elevación continua de sus niveles, que es especialmente marcada con el progreso de la gestación tanto en humanos como en roedores, aunque en caso de estos últimos parece que los niveles de progesterona caen hacia el final de la gestación (Nadal *et al.*, 2009), no obstante existen pocos datos al respecto. Numerosos estudios *in vivo* realizados en humanos y ratones sugieren que las hormonas esteroideas tendrían un papel importante

en los cambios en la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa que se producen durante la gestación en la madre. Se ha observado a través de estudios en los que se lleva a cabo un *clamp* hiperinsulinémico-euglicémico, que la progesterona cumple una función importante al disminuir la sensibilidad materna a insulina durante el embarazo (Kim, J. K., 2009, Leturque *et al.*, 1984, Ryan *et al.*, 1985). Además se ha demostrado que la administración de progesterona disminuye la capacidad de la insulina de inhibir la producción de glucosa en el hígado, y disminuye la captación de glucosa estimulada por insulina por parte del músculo esquelético y tejido adiposo de animales no preñados (Fang *et al.*, 1997, Stelmanska and Sucajty-Szulc, 2014). Por el contrario, la administración exógena de estrógenos aumenta la sensibilidad a la insulina en todo el organismo en un estado de no preñez (Ahmed-Sorour and Bailey, 1980). A nivel del páncreas endocrino, y más concretamente de la célula β , diversos estudios sugieren que la P actuaría de algún modo inhibiendo la proliferación cuando es inducida a través del PRLr en este tipo celular, al mismo tiempo que inhibiría la secreción de las células β *in vitro* (Sorenson *et al.*, 1993). Estos estudios han llevado a la hipótesis de que la regulación al alza de los niveles de progesterona al final de la gestación e inicio del periodo postparto, pueden ser responsables del aumento de la apoptosis, el descenso de la proliferación y la normalización de la masa células β , así como de la disminución de la secreción de insulina hasta alcanzar valores basales en este periodo. Por su parte, se ha observado que el E_2 ejerce un papel importante en el aumento de GSIS y biosíntesis de insulina, similares a los que se producen durante la gestación, no teniendo ningún efecto sobre la proliferación de la célula β o la masa de la misma en situaciones no patológicas como esta (Alonso-Magdalena *et al.*, 2008). Cuando el estradiol es administrado empleando concentraciones fisiológicas, tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha observado que aumenta de forma importante la GSIS (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006), presentando además de este efecto agudo, un efecto de regulación a largo plazo de la biosíntesis de insulina (Sutter-Dub, 2002). Diversos estudios han observado que la incubación de islotes de Langerhans con concentraciones fisiológicas de esta hormona, no solo aumentan la biosíntesis de insulina a través del receptor $ER\alpha$, sino que también aumentan la GSIS (Adachi *et al.*, 2005, Alonso-Magdalena *et al.*, 2006, Alonso-Magdalena *et al.*, 2008).

Por último, existen otros elementos relacionados con las adaptaciones de la célula β durante la gestación como son los factores de crecimiento. Entre ellos cabe destacar el papel del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF), cuyos niveles circulantes se encuentran significativamente elevados durante la gestación (Horibe *et al.*, 1995). Estudios *in vitro* e *in vivo* en los que se han usado cultivos primarios de células a partir

de islotes de roedores, ratones modificados genéticamente y líneas celulares productoras de insulina, han demostrado que HGF es un factor insulínico, mitógeno de la célula β y regulador de la supervivencia de la misma (García-Ocana *et al.*, 2001, García-Ocana *et al.*, 2003, Otonkoski *et al.*, 1994, Vasavada *et al.*, 2006).

7. ADAPTACIONES DEL PÁNCREAS ENDOCRINO DURANTE LA GESTACIÓN: LA CÉLULA α .

De entre los elementos clave para el mantenimiento y regulación de la homeostasis de la glucosa, además de la insulina, se encuentra el glucagón. Esta hormona, producida y secretada por las células α pancreáticas, es liberada en condiciones de hipoglucemia promoviendo un aumento de los niveles de glucosa en plasma al estimular la producción de glucosa hepática, restaurando la normoglucemia (Quesada *et al.*, 2008). En los últimos años, numerosos estudios han aportado evidencias que apoyan el hecho de que alteraciones en la secreción de glucagón, así como en la masa de célula α y su función, están involucradas en la etiopatología de la diabetes y en el desarrollo de hiperglucemia. Se ha observado que incluso en situaciones de ausencia de insulina, la inhibición de la acción o secreción de glucagón pueden llevar a la normalización de los niveles de glucosa en plasma (Gromada *et al.*, 2018, Hughes *et al.*, 2018, Yu *et al.*, 2008). Sin embargo, y a pesar de la importancia de esta población celular, las potenciales adaptaciones de la célula α pancreática y su contribución al mantenimiento de la homeostasis de la glucosa durante la gestación son prácticamente desconocidas. Al igual que la insulina, los niveles plasmáticos de glucagón presentan un patrón dinámico a lo largo de la gestación tanto en humanos como en animales (Luyckx *et al.*, 1975, Moffett *et al.*, 2014). Algunos estudios sugieren que el glucagón juega un papel importante en el metabolismo de las células de glucógeno (GCs) en la placenta. Estas células constituyen una de las poblaciones celulares del trofoblasto, cuya función principal es la acumulación de glucógeno, siendo esenciales para la supervivencia del feto (Coan *et al.*, 2006, 2006, Perlman *et al.*, 1988). Además, se ha observado que la falta de señalización por parte del glucagón produce alteraciones en el ambiente metabólico materno en el ratón, al mismo tiempo que causa alteraciones fetoplacentarias (Ouhilal *et al.*, 2012). Durante la gestación se ha visto que la respuesta contrarreguladora del glucagón ante una situación de hipoglucemia se encuentra disminuida (Canniff *et al.*, 2006).

Todos estos datos sugieren la importancia de las células α pancreáticas y la secreción de glucagón como elementos clave, junto con las células β pancreáticas y la

secreción de insulina, en el metabolismo y homeostasis de la glucosa durante la gestación. Sin embargo, la información que tenemos sobre las potenciales adaptaciones de este tipo celular son prácticamente inexistentes y más, si se comparan con toda la información de la que disponemos sobre las adaptaciones de la célula β durante la gestación, expuestas anteriormente. Los datos publicados hasta el momento pertenecen a estudios donde el objetivo principal, no era el estudio de la célula α , ofreciendo muy pocos datos sobre la misma. Uno de estos estudios propone que existe un aumento de un 6% en el área de célula α (calculado como ratio célula α /célula β) en las ratonas en el día de gestación 14 al compararlas con las ratonas control no preñadas (Kharouta *et al.*, 2009). También en otro trabajo realizado en ratón C57BL/6, en el que se estudia un poco más en detalle las adaptaciones morfológicas y estructurales, proponen que existe un aumento de la masa y tamaño de la célula α pancreática en los días de gestación G14.5 y G18.5 (Xu *et al.*, 2015). En ambos casos, los datos hacen referencia a cambios en el área o masa de la célula α , no aportando información ni sobre otros aspectos morfológicos, ni sobre adaptaciones funcionales que afecten a la secreción de glucagón. Como sabemos, con el progreso de la gestación, cuando la demanda energética del feto en crecimiento es cada vez mayor, se desarrolla una resistencia a la insulina en tejidos periféricos para hacer frente a este reto metabólico. En otros modelos de resistencia a la insulina como la obesidad, se ha observado que la célula α pancreática experimenta una serie de adaptaciones morfológicas y funcionales que contribuyen a mantener la normoglucemia en los primeros estadios, donde los islotes de Langerhans intentan compensar la resistencia a la insulina desarrollada por la obesidad (Merino *et al.*, 2015). Además, se sabe que la diabetes mellitus gestacional (GDM) está asociada con un aumento de los niveles de glucagón en plasma hacia el final de la gestación (Grigorakis *et al.*, 2000) y con la falta de supresión de la secreción de glucagón en respuesta a glucosa (Beis *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta por tanto la relevancia que la célula α pancreática tiene en patologías como la T2DM, así como su implicación en la GDM y en alteraciones fetoplacentarias, sumado a la poca información disponible hasta el momento de las adaptaciones de la misma durante la gestación, resulta necesario un estudio detallado como el que se expone en el presente trabajo. Es necesario conocer las potenciales adaptaciones, tanto morfológicas como funcionales que ocurren en este tipo celular del islote de Langerhans, así como la posible contribución de las hormonas gestacionales en la regulación de las mismas. Esto nos permitiría tener una visión más global de los cambios que se producen a nivel del páncreas endocrino durante la gestación, con el

fin de mantener una homeostasis de la glucosa óptima, tanto para la madre como para el feto, previniendo el desarrollo de GDM.

8. DIABETES MELLITUS GESTACIONAL: CONSECUENCIAS ADVERSAS PARA LA SALUD DE LA MADRE Y LA DESCENDENCIA.

Durante la gestación, el páncreas endocrino, como hemos detallado en los apartados anteriores, experimenta importantes adaptaciones, tanto a nivel morfológico como funcional, con el fin de mantener un equilibrio entre la creciente demanda energética del feto y el mantenimiento de los niveles circulantes de glucosa maternos dentro de unos niveles óptimos. Estas adaptaciones son promovidas como respuesta a la resistencia a insulina en tejidos periféricos que se desarrolla en la madre con el progreso de la gestación, e implica la participación de las hormonas gestacionales, como hemos comentado anteriormente. Cuando el organismo de la madre no es capaz de adaptarse a esta disminución en la sensibilidad periférica a la insulina, la homeostasis de la glucosa se ve alterada, desarrollándose entonces una intolerancia a la glucosa con la consiguiente hiperglucemia, que puede desembocar en Diabetes mellitus gestacional (GDM, por sus siglas en inglés, *gestational diabetes mellitus*).

La GDM es un tipo particular de diabetes mellitus de tipo 2 (T2DM, por sus siglas en inglés, *Type 2 Diabetes mellitus*), que aparece de manera transitoria durante el embarazo, remitiendo post-parto cuando la resistencia a la insulina materna desaparece. Este tipo particular de diabetes se caracteriza porque se identifica por primera vez durante la gestación, siendo su aparición derivada de esta condición fisiológica en particular. Entre los factores y marcadores de riesgo para el desarrollo de GDM, encontramos la edad materna (siendo mayor el riesgo cuanto mayor sea la edad materna), el sobrepeso u obesidad, aumento excesivo de peso durante el embarazo, antecedentes familiares de diabetes, haber padecido diabetes gestacional en embarazos previos o exceso de glucosa en la orina durante el embarazo (Hollander *et al.*, 2007). La prevalencia puede variar dependiendo de factores como el criterio diagnóstico, el origen étnico (por ejemplo, aumenta en mujeres procedentes del sur y sudeste asiático y Latino América) y factores socio-demográficos. Actualmente la prevalencia de la GDM, una de las complicaciones más comunes durante el embarazo, ha aumentado en un periodo de una o dos décadas más de un 30% en un gran número de países, entre los que se incluyen países desarrollados, constituyendo así una epidemia global emergente. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la mayor

prevalencia media a nivel mundial la encontramos en el norte de África con un 12.9% (8.4 – 24.5) de las mujeres embarazadas afectadas por esta patología. Por el contrario, la prevalencia media entre la población europea es de 5.8% (1.8 – 22.3), la prevalencia más baja de GDM a nivel global (Zhu, Y. and Zhang, 2016) (Figura 8).

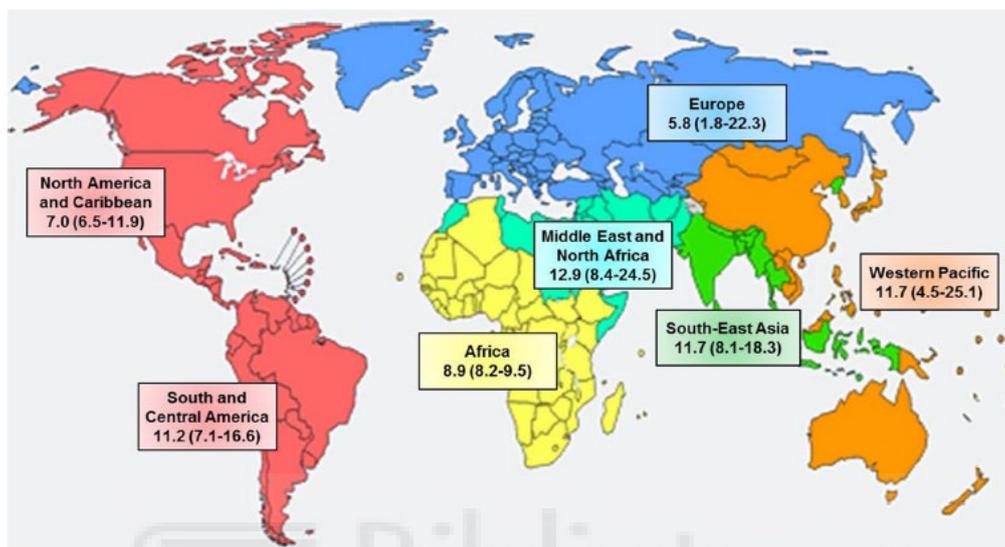


Figura 8: Mapa en el que se representa la prevalencia media de diabetes gestacional. Prevalencia media (rango intercuartil), por región expresada en % de DMG según datos de la OMS entre los años 2005–2015. (Mapa generado desde: <http://www.who.int/about/regions/en/>).

La GDM se ha relacionado con importantes efectos negativos, tanto a corto como a largo plazo, para la salud de la madre e incluso para la salud de la descendencia. Cuando el organismo de la mujer y en especial el páncreas endocrino, no es capaz de adaptarse a la resistencia a la insulina que se desarrolla de manera fisiológica durante la gestación, se puede generar un ambiente hiperglucémico que afecta tanto a la madre como al desarrollo del feto. En la madre se ha descrito que incluso en aquellos casos en que se presentan diversos grados de intolerancia a la glucosa durante la gestación más leves que los que se dan en la GDM, existe un mayor riesgo de presentar alteraciones en la sensibilidad a la insulina, función de la célula β y tolerancia a la glucosa a los 3 meses post-parto (Retnakaran *et al.*, 2008). La GDM se diagnostica mediante un test de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) o una concentración plasmática de glucosa en ayuno ≥ 92 mg/dl en la mujer. El diagnóstico positivo de GDM por medio del OGTT se produce cuando los valores de glucosa en sangre transcurrida 1 hora de la carga oral de glucosa superan los 180 mg/dl o tras 2 horas exceden los 153 mg/dl (resultados OGTT según criterios consensuados internacionales) (Hollander *et al.*,

2007). La presencia de GDM durante la gestación supone un factor de riesgo para el desarrollo a largo plazo de T2DM, así como otras muchas patologías como síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular entre otros. Los resultados publicados en una revisión sistemática que aúna los datos de 20 estudios de investigación muestran que las mujeres que han padecido GDM tienen aproximadamente 7 veces más riesgo de padecer T2DM en un futuro que las mujeres con normoglicemia durante el embarazo (Bellamy *et al.*, 2009). El impacto negativo del desarrollo de GDM no se limita a la salud materna, sino que tiene importantes consecuencias adversas para la salud del feto durante la gestación, así como para la de la descendencia en la vida adulta (Farahvar *et al.*, 2019). A nivel fetal, el ambiente hiperglucémico en el que se desarrollan los fetos de madres que padecen GDM aumenta el riesgo de macrosomías fetales, así como, hipoglucemia, hiperbilirubinemia y complicaciones respiratorias neonatales (Kc *et al.*, 2015, Michael Weindling, 2009). Además de las complicaciones en la etapa fetal o perinatal, también se ha observado que la descendencia de gestaciones en las que se ha desarrollado GDM, presenta un riesgo aumentado de padecer alteraciones en el desarrollo del páncreas endocrino, así como de la función de la célula β que pueden llevar al desarrollo de obesidad, intolerancia a la glucosa y a una potencial predisposición de padecer T2DM en la vida adulta. Estos efectos fueron observados tanto en humanos como en modelos animales como el ratón (Kahraman *et al.*, 2014, Kawasaki *et al.*, 2018, Kelstrup *et al.*, 2013). Un estudio poblacional multiétnico de jóvenes de entre 10-22 años con T2DM demostró que un 30.4 % de estos jóvenes habían sido expuestos a un ambiente materno diabético durante su gestación, comparado con el grupo control de jóvenes no diabéticos (6.3 %) (Dabelea *et al.*, 2008). Estudios recientes en ratón sugieren que cambios en los patrones de metilación del DNA en el páncreas en desarrollo de la descendencia de madres con GDM, aumentan la susceptibilidad de padecer obesidad y T2DM en la vida adulta de los mismos (Zhu, Z. *et al.*, 2019). La obesidad es otra de las consecuencias adversas de la GDM. Numerosos estudios poblacionales han demostrado que existe una fuerte relación entre obesidad infantil, atendiendo al Índice de Masa Corporal (IMC), y la GDM (Philipps *et al.*, 2011), llegando incluso algunos de ellos a establecer una asociación entre niveles de glucosa en sangre materna ≥ 130 mg/dl y un mayor riesgo de la descendencia de padecer sobrepeso u obesidad a los 3 años, independientemente del IMC de las madres previo al embarazo (Deierlein *et al.*, 2011).

En definitiva, todos estos datos ponen de manifiesto la importancia de las adaptaciones, tanto morfológicas como funcionales, que se producen en el páncreas endocrino durante la gestación para compensar la resistencia a la insulina que se

desarrolla de manera fisiológica en la madre con el fin de asegurar un aporte energético óptimo al feto, manteniendo asimismo la normogluemia en la madre. Cuando estas adaptaciones no se producen o no lo hacen de forma adecuada, la madre desarrolla una intolerancia a la glucosa que puede desembocar en una GDM, teniendo consecuencias negativas no sólo para la salud materna, sino para la de la descendencia. Por tanto, podemos afirmar que un mayor conocimiento de las adaptaciones que se producen en el páncreas endocrino durante la gestación, y muy especialmente en la célula α pancreática, dado su gran desconocimiento, podría ayudar a mejorar el manejo de esta enfermedad, la cual constituye un grave problema de salud pública, dado las complicaciones y riesgos que supone tanto para la madre, como para la descendencia.





OBJETIVOS

El embarazo representa un importante reto metabólico para la madre, ya que debe asegurar un aporte energético óptimo para el feto, el cual crece a medida que la gestación avanza, al mismo tiempo que se deben mantener unos niveles de glucosa dentro de la normalidad, preservando una correcta homeostasis de la glucosa. Con el fin de alcanzar este equilibrio, se producen una serie de cambios a nivel fisiológico que incluyen el desarrollo de resistencia a la insulina en tejidos periféricos y la consiguiente adaptación de la célula β pancreática tanto a nivel morfológico como funcional. En aquellas gestaciones en que el páncreas endocrino no es capaz de adaptarse a la resistencia a la insulina, se produce un desajuste en la homeostasis de la glucosa, que puede conducir a una hiperglucemia en la madre y al desarrollo de diabetes gestacional. El desarrollo de diabetes gestacional supone importantes efectos negativos tanto para la salud de la madre como del feto, aumentando además el riesgo de padecer T2DM tras el parto en el caso de la madre, y en la vida adulta en el caso de la descendencia, además de otras enfermedades asociadas en estos últimos como obesidad y síndrome metabólico.

La célula α presenta un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. A través de la secreción de glucagón, hormona contrareguladora de las acciones de la insulina secretada por las células β , el organismo es capaz de responder a las disminuciones en los niveles de glucosa a lo largo del día, generadas principalmente en los periodos interprandiales y de ayuno. De esta manera, conjuntamente con la liberación de insulina desde las células β , se regula la homeostasis de la glucosa. Dada la importancia de la célula α del islote de Langerhans en el mantenimiento de la glucemia, no es de extrañar su implicación en la etiología de la diabetes tipo 2 (Quesada et al. 2008). Igualmente, existen indicios de que alteraciones en su función también podrían contribuir al desarrollo de diabetes gestacional.

Sin embargo, a pesar de la importancia de la célula α en el mantenimiento de la glucemia y su posible implicación en el desarrollo de la diabetes gestacional, apenas se sabe actualmente acerca de las adaptaciones de este tipo celular durante la gestación. Es por ello que el objetivo global del presente trabajo consiste en la descripción de las alteraciones y/o adaptaciones a nivel morfológico y funcional de la célula α pancreática durante la gestación, empleando como modelo animal el ratón C57BL/6. Se analizaron aquellos periodos o días de gestación donde se desarrollan las principales adaptaciones de la célula β pancreática durante la preñez. Como control, se utilizaron ratonas no preñadas. Además, mediante el empleo de la línea celular secretora de glucagón, α -TC1.9, estudiamos la posible implicación de las hormonas gestacionales (PL, PRL, P y E_2) en la regulación de las adaptaciones de la célula α durante la gestación.

Por tanto, los objetivos específicos del presente trabajo son los siguientes:

1. Estudiar las adaptaciones morfológicas y estructurales de la célula α pancreática durante la gestación mediante el análisis del área y la masa de la célula α así como del tamaño celular.
2. Investigar los posibles mecanismos responsables de los cambios morfológicos proliferación, apoptosis, neogénesis y transdiferenciación.
3. Analizar posibles cambios en el perfil hormonal (insulina y glucagón) y glucemia de las ratonas preñadas, comparándolas con las ratonas control.
4. Determinar posibles alteraciones en la función de la célula α durante la gestación mediante el estudio *ex vivo* de la secreción estática de glucagón, contenido de glucagón y señalización intracelular de calcio, a partir de islotes de Langerhans frescos.
5. Analizar el efecto *in vitro* de las hormonas gestacionales, tras una exposición crónica de 8 días, sobre la proliferación de las células de la línea α -TC1.9, secretoras de glucagón.
6. Estudiar el efecto *in vitro* de las hormonas gestacionales a nivel funcional en las células α -TC1.9 tras una exposición crónica de 8 días, mediante el análisis de la secreción de glucagón, contenido de glucagón y expresión del gen de proglucagón Gcg.

MATERIAL Y MÉTODOS

UNIVERSITAS Miguel Hernández

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Los animales de experimentación empleados para la realización del presente estudio fueron ratones hembra de la cepa C57BL/6, de unas 8 a 10 semanas de edad, suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Los animales se mantuvieron estabulados bajo condiciones controladas y estandarizadas, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, una temperatura aproximada de 22°C y acceso a comida y agua *ad libitum*. Para los experimentos *in vivo* y *ex vivo*, se establecieron como grupo control ratones hembra no preñadas, mientras que como grupo de estudio se emplearon ratonas preñadas en días de gestación G12.5, G15.5 y G.18.5. Tras el cruce de la hembra con el macho, se establece la observación del tapón vaginal como día de gestación G0.5. Los procedimientos empleados en este trabajo fueron previamente evaluados y aprobados por el Comité de Ética de la UMH conforme a la legislación estatal y europea vigente.

2. AISLAMIENTO DE ISLOTES DE LANGERHANS.

Para la obtención de los islotes de Langerhans, la eutanasia de los animales se llevó a cabo mediante dislocación cervical. Tras la esterilización del área a intervenir con etanol al 70%, se practicó una laparotomía media completa, dejando al descubierto la cavidad abdominal del ratón. A continuación, se retiraron las vísceras, así como los lóbulos hepáticos, dejando accesible el conducto biliar común o colédoco, que resulta de la convergencia del conducto hepático común con el conducto cístico, y que termina en el duodeno. Antes de desembocar en el duodeno, confluye con el conducto pancreático principal, constituyéndose así el conducto hepatopancreático. Para llevar a cabo la canulación del colédoco, se realizó una ligadura en la parte más distal del mismo, quedando obstruida la comunicación con el duodeno. A continuación, se realizó una pequeña incisión con la ayuda de unas microtijeras en la parte más proximal, permitiendo la entrada de una aguja (calibre 30G – largo 12mm) acoplada a una jeringa de 5 ml. La jeringa se cargó previamente con 5 ml de solución de aislamiento con 0.5 mg/ml de enzima colagenasa (tipo V; Sigma, Madrid, España) y se perfundió el páncreas hasta que éste aumentó su volumen, hasta alcanzar su capacidad máxima. La composición de la solución de aislamiento (en mM) fue la siguiente: 115 NaCl, 5 KCl, 10 NaHCO₃, 1.1 MgCl₂, 1.2 NaH₂CO₄, 2.5 CaCl₂, 25 HEPES, 5 glucosa, y 0.25% BSA, ajustado a pH=7.4.

Tras perfundir toda la solución con colagenasa se procedió a aislar el páncreas y extraerlo del cuerpo del animal. Para ello y con ayuda de unas tijeras, se procedió a liberarlo de todas las adherencias a otros órganos próximos y se introdujo en un falcon de 15 ml, cubriéndolo con una pequeña cantidad de solución con colagenasa. Seguidamente se introdujo en un baño a 37°C para activar la digestión enzimática y así producirse la liberación o separación de los islotes de Langerhans del tejido exocrino. El tiempo de digestión se valoró en cada experimento visualmente, ya que este puede variar en función del lote de la enzima. Una vez transcurrido este tiempo, la reacción enzimática se paró adicionando solución de aislamiento fría, y se conservó el tubo en posición vertical en hielo hasta que se produjo la precipitación de la porción celular del disgregado. La primera fracción, el sobrenadante, se descartó, ya que no contiene islotes pancreáticos, mientras que el pellet obtenido se resuspendió con solución de aislamiento y se procedió a la recuperación de los islotes de Langerhans en placas de Petri estériles, con la ayuda de una lupa binocular y una micropipeta. Una vez recolectados los islotes, se realizaron lavados sucesivos en solución de aislamiento fresca, con el fin de eliminar los posibles restos de tejido exocrino que pudiesen quedar adheridos a los mismos. Los islotes de Langerhans se dejaron recuperar como mínimo una hora en un incubador a 37°C de temperatura y una atmósfera de CO₂ del 5%, antes de realizar con ellos cualquier procedimiento experimental.

3. IMAGEN DE CALCIO: MICROSCOPIA CONFOCAL.

El estudio de las señales intracelulares de calcio en las células α se realizó empleando un sistema de microscopía confocal. Las principales características que distinguen este sistema de un sistema de microscopía de fluorescencia convencional, es que este presenta como fuente de iluminación un láser de argón con una única longitud de onda de excitación de 488 nm, a diferencia de la lámpara de mercurio normalmente empleada en un sistema óptico convencional. El sistema confocal permite realizar sucesivos escaneos o barridos de la muestra con el láser facilitando estudiar zonas concretas de la misma. Además, presenta un sistema de diafragma o *pinhole*, que consiste en una apertura de diámetro regulable situada delante del fotomultiplicador que permite la detección de señales de fluorescencia situadas en el plano focal, bloqueando la luz procedente de áreas que se encuentran por encima o por debajo de la región enfocada. De este modo, podemos ser capaces de regular el grosor de la sección óptica a estudiar, obteniendo una mayor resolución y contraste que con la microscopía de fluorescencia convencional.

Para llevar a cabo el registro de las señales intracelulares de calcio de células α individuales en islotes de Langerhans aislados, estos se obtuvieron como se describe en el apartado anterior. Una vez aislados, se dejaron recuperar en el incubador a 37°C en 2 ml de medio de aislamiento durante una hora. A continuación, se pasaron a una placa con el mismo volumen de medio de aislamiento al que se le habían añadido 4 μ l de sonda fluorescente FLUO-4/AM (acetoximetil éster) (Molecular Probes, Holanda) reconstituida en DMSO (Sigma, Madrid, España), hasta obtener una concentración stock de 2 mM, siendo la concentración final de la sonda en la placa de 4 μ M. Esta sonda presenta un grupo éster que permite que la forma esterificada lipofílica penetre a través de las membranas celulares. Una vez en el interior celular, queda retenida en el citosol gracias a la hidrólisis de los grupos AM que realizan las esterasas. Este procesamiento le dota de una carga negativa, impidiendo que vuelva a difundir hacia el exterior celular. Además, otra particularidad que ofrece una gran ventaja es que su forma unida a calcio exhibe un gran incremento en la emisión de fluorescencia (> 100 veces), permitiendo una gran sensibilidad de detección. La carga de los islotes con la sonda se realizó durante al menos una hora a temperatura ambiente, en una atmósfera húmeda y expuestos de forma constante a carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Una vez cargados se transfirieron a una cámara de registro que presenta un cubreobjetos tratado con poli-L-lisina, montada sobre una placa termostatazada para mantener la solución de perfusión dentro de la cámara a una temperatura constante de 37°C. La poli-L-lisina carga positivamente la superficie del cubreobjetos, generando un dipolo con la membrana plasmática de la célula (con carga negativa) que permite la inmovilización del islote. Durante el experimento, los islotes fueron perfundidos a una velocidad constante, con una solución compuesta por (en mM): 120 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO₃, 1.1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂. En todo momento la solución de perfusión se mantuvo gaseada con carbógeno para mantener un pH igual a 7.4.

Los elementos que componen el *setup* empleado para el registro de las señales de calcio intracelular fueron un microscopio invertido Axiovert 200M (Zeiss) acoplado con un módulo confocal (Zeiss LSM 510) y un láser de argón con una longitud de onda de excitación de 488nm. La monitorización de la señal se realizó con un objetivo 40x Plan NeoFluar (Zeiss; 1.3 de apertura numérico e inmersión en aceite). La señal de fluorescencia emitida se hizo pasar por un filtro con paso de banda de 506-560 nm. Las células α monitorizadas de forma individual se tomaron de una sección horizontal del islote de 9 μ m de espesor. Asimismo, fueron tomadas imágenes con una frecuencia de 2 imágenes/segundo y una resolución digital de 256x256 píxeles. Los registros se

expresaron en unidades arbitrarias (u.a.) de fluorescencia emitida empleando el software ZEN 2009 (Zeiss) para su procesamiento.

Se emplearon concentraciones de glucosa estimuladoras (0.5mM) y no estimuladoras (11mM) para las células α (Nadal *et al.*, 1999, Quesada *et al.*, 1999), con el fin de monitorizar la señal de calcio de las mismas en respuesta a distintas concentraciones de glucosa. Las células α fueron identificadas en la periferia del islote mediante su señal oscilatoria característica a baja glucosa, empleando como elemento adicional, para la identificación de este tipo celular, la adrenalina (10 μ M) (Hamilton *et al.*, 2018). Dado que existen células α que responden a adrenalina y otras que no lo hacen, el criterio principal seguido fue la identificación del patrón oscilatorio característico de la célula α a 0.5 mM glucosa, seguido por su inhibición a alta glucosa, 11 mM.

4. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN Y CONTENIDO DE GLUCAGÓN.

4.1 Secreción estática de glucagón.

Una vez se llevó a cabo el aislamiento de los islotes de Langerhans de hembras control y hembras preñadas G18.5, por el método descrito anteriormente, se realizaron grupos homogéneos de 15 islotes por cada animal, para cada uno de los estímulos, en placas de 24 pocillos. Se realizó una preincubación de una hora a 37°C, en 500 μ l de medio de secreción con baja concentración de glucosa (0.5 mM) y 0.1% BSA, siendo la composición del medio la siguiente (en mM): 140 NaCl, 4.5 KCl, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂ y 20 HEPES; pH=7.4. Transcurrido el tiempo de preincubación, se transfirieron los islotes en 5 μ l de medio a otra placa con 300 μ l de medio de secreción por pocillo con los estímulos correspondientes: baja glucosa (0.5 mM), alta glucosa (11mM) y baja glucosa (0.5 mM) más 10 nM insulina. El periodo de secreción se prolongó una hora a 37°C y una atmósfera de CO₂ del 5%, parando la reacción transcurrido este tiempo tras disminuir la temperatura de la placa al depositarla sobre hielo durante 15 minutos, y se extrajo el sobrenadante para la medida de glucagón liberado. El medio de secreción se recogió en viales de vidrio con 15 μ l de aprotinina y se almacenaron a -80°C hasta su posterior cuantificación de los niveles de glucagón. Para la determinación del contenido de glucagón, se recogieron los islotes en un volumen total de medio de 5 μ l y se transfirieron a un tubo eppendorf con 20 μ L de buffer de lisis (75% EtOH, 24,6% H₂O destilada y 0,4% HCl al 30%) y 1 μ l de aprotinina (20 mg/l) (Sigma, Madrid, España). Se dejaron en agitación toda la noche a 4°C, para favorecer el lisado completo de los mismos.

Transcurridas unas 12-18 horas se procedió a centrifugar las muestras a 14000 rpm durante 4 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante y conservándolo a -20°C hasta su posterior análisis.

4.2 Determinación de la secreción y contenido de glucagón.

La cuantificación del contenido de glucagón de los islotes, así como la cantidad de hormona secretada por los mismos, se realizó mediante el kit Mercodia Glucagon ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Suecia). Siguiendo minuciosamente el protocolo indicado por el fabricante, se empleó un volumen de muestra de 25 µl, teniendo que diluir las muestras para que los valores se ajustaran al rango de detección del kit (1 pmol/l), siendo la dilución para las muestras de secreción de 1:100 y la de las muestras de contenido 1:2500. La absorbancia fue medida a 450 nm en un espectrofotómetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.3 Cuantificación de la proteína total.

Para llevar a cabo la cuantificación de la proteína total contenida en los islotes se empleó el método Bradford, cuyo principio se basa en la formación de un compuesto de adsorción de coloración azul entre los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante azul Coomassie. La absorbancia se mide a 595 nm y la intensidad de la absorción depende del contenido de aminoácidos básicos y aromáticos. En primer lugar, se realizó una recta patrón con concentraciones crecientes de BSA a partir de un stock de 1 mg/ml: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/ml. La cuantificación se realizó empleando 10 µl del lisado celular (dilución 1:10), al que se le añadieron 200 µl de reactivo de Bradford. Se realizó una incubación a temperatura ambiente de 5 minutos para que la reacción se produjera, y a continuación, se procedió a la lectura de las absorbancias a 595 nm en un espectrofotómetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

5. DETERMINACIÓN DE VALORES SANGUÍNEOS.

En primer lugar y previo a la obtención de un volumen de sangre mayor para las distintas determinaciones hormonales, se obtuvo una pequeña muestra de sangre procedente de la cola para la medición de la glucemia, empleando un glucómetro Accu

Check® (Roche, Roche, Mannheim, Alemania). Una vez medida la glucemia, la obtención de las muestras sanguíneas se realizó por medio del siguiente procedimiento. Para la obtención de volúmenes pequeños (aproximadamente 200 µl), no se requirió la eutanasia del animal, obteniendo la muestra sanguínea tras la punción de la vena safena de la pata. Para la obtención de muestras de plasma sanguíneo, se emplearon tubos con heparina (Microvette®; Sarstedt, Alemania), que por un sistema de capilaridad permiten recoger pequeños volúmenes de sangre. Tras la recolección de la muestra sanguínea, los tubos fueron centrifugados a 4°C, durante 9 min a 7000 rpm, recolectando a continuación el sobrenadante que se corresponde con el plasma sanguíneo. En el caso de las muestras destinadas a la medición de los niveles sanguíneos de glucagón, se suplementaron con aprotinina (20 mg/l) (Sigma, Madrid, España), necesaria para evitar la proteólisis de dichas hormonas. Una vez recolectadas las muestras, estas se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Para la medición de los niveles de las hormonas implicadas en la regulación de la glucemia se empleó la técnica de ELISA, acrónimo del inglés Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay. El principio de esta técnica consiste en la utilización de antígenos o anticuerpos específicos conjugados con una enzima, y adheridos a la superficie de un soporte (placa 96 pocillos). La reacción antígeno-anticuerpo se revelará al añadir un sustrato específico produciendo una reacción colorimétrica, cuantificable mediante espectrofotometría. De este modo, el análisis de los niveles de insulina y glucagón, se llevó a cabo por medio del kit ELISA (Crystal Chem Inc., Elk Grove Village, IL, USA) específico para cada hormona, siguiendo con precisión las instrucciones indicadas por el fabricante en cada caso. Los volúmenes de muestra variaron en función del kit empleado, utilizando para ambas muestras de plasma. La longitud de onda a la cual se lleva a cabo la lectura de las absorbancias fue de 450/655 nm.

6. ESTUDIO HISTOLÓGICO.

El primer paso para llevar a cabo el estudio histológico del páncreas, fue la extracción de los mismos por medio de cirugía tras la eutanasia del animal. Los páncreas fueron fijados con una solución fría de paraformaldehído al 4% (Sigma, Madrid, España) durante 20 horas a 4°C, siendo a continuación transferidos a PBS también frío, realizando como mínimo dos pases a PBS antes de embeber los páncreas en parafina. Los páncreas fueron pesados en una balanza de precisión antes de comenzar la deshidratación de los mismos.

La deshidratación de los páncreas se realizó mediante la inmersión de estos en etanol de graduación creciente: 1 hora en etanol 70%, 2 horas en etanol al 90% y 3 horas en etanol absoluto. Se cambió cada hora la solución. A continuación, se realizaron dos inmersiones de 30 minutos cada una en xileno y se transfirieron a una placa con parafina a 65°C en la estufa durante 2 horas. Una vez transcurridas las dos horas se pasaron a una placa con parafina nueva y se dejaron toda la noche dentro de la estufa. Finalmente, se formaron los bloques de parafina empleando unos cassetes de plástico que nos permiten fijar o acoplar los bloques en el micrótopo (modelo RM2245, Leica, Alemania) para su posterior corte. El grosor de los cortes de tejido fue de 5 µm, realizando cortes en 3 secciones distintas del páncreas, separadas cada una de ellas por una distancia de 200 µm. Los cortes se recogieron empleando portaobjetos tratados con 3-triethoxysilylpropylamine (TESPA), para asegurar una mejor adhesión del tejido al mismo, en un baño calefactado a unos 40-50°C. Los cortes de tejido se dejaron secar a 37°C durante la noche en la estufa.

6.1 Inmunohistoquímica de glucagón en tejidos parafinados.

Con el fin de poder realizar el estudio histológico del páncreas endocrino se procedió a realizar una tinción inmunohistoquímica para identificar las células positivas para glucagón en cortes de tejido parafinado. Para ello se realizó el siguiente protocolo. En primer lugar, para desparafinar las muestras, éstas se introdujeron en la estufa a 65°C durante 30 minutos y transcurrido ese tiempo se sumergieron en xileno durante 30 minutos, cambiando de cubeta cada 10 minutos. Una vez eliminada la parafina se procedió a rehidratar los cortes sumergiéndolos en cubetas con etanol en orden decreciente de graduación: absoluto durante 5 minutos (x2), 95% durante 5 minutos (x2), 70% durante 10 minutos. Seguidamente se pasaron a una cubeta con agua destilada durante dos minutos y a continuación a una con PBS durante 5 minutos. Para el desenmascaramiento de antígeno se sumergieron las muestras en buffer citrato hirviendo (8.2% de trisodio citrato dihidratado (100 mM) y 1.8% de citrato ácido (100 mM) en agua destilada), con una concentración final de 10 mM a pH=6, durante 20 minutos. Se dejaron enfriar las muestras durante 1 hora, se delimitó el tejido con pap-pen y se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS. A continuación se llevaron a cabo dos bloqueos. En primer lugar se bloqueó la peroxidasa endógena al sumergir los cortes en una solución de H₂O₂ al 3% en metanol al 50% durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados de 5 minutos con PBS. En segundo lugar se bloquearon las uniones inespecíficas empleando una solución de BSA al 3% durante

1 hora. Como anticuerpo primario se utilizó Anti glucagón rabbit (Monosan, Uden, Países Bajos), dilución 1:100 en solución BSA al 3%. Este se incubó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizó un lavado de 30 minutos en PBS. Por otro lado, como anticuerpo secundario se empleó Biotin anti-rabbit IgG (H+L) (Zymed, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), dilución 1:200 en solución BSA al 3%, incubando las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS de 40 minutos. Finalmente, y con el fin de identificar las células α (a través del marcaje de su hormona, el glucagón), se usó en primer lugar el kit Vectastain ABC (Avidin-Biotin Complex) (Vector laboratorios, Burlington, ON, Canadá) para marcar las muestras, biotiniladas gracias al anticuerpo secundario, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se empleó para el revelado posterior una solución 3'-diaminobencidina (DAB) (Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) con la que se cubrieron los cortes de tejido, ajustando el tiempo de revelado y comprobando la intensidad de la tinción en un microscopio. Seguidamente, las muestras se lavaron con agua destilada. Para la tinción de los núcleos se empleó Hematoxilina, lavando posteriormente las muestras con agua. Finalmente, previo al montaje de las muestras, se procedió a la deshidratación de las mismas. Para ello, los portaobjetos se sumergieron en una batería de alcoholes en orden creciente de graduación (70% durante 2 minutos, 95% durante 2 minutos y 100% durante 2 minutos (x2)). A continuación, se sumergieron en xileno durante 10 minutos dos veces. El montaje se realizó empleando el medio de montaje Vitro-clud (Deltalab, Barcelona, España).

6.2 Cuantificación del tamaño celular, masa y área de célula α .

Tras la tinción por inmunohistoquímica, se tomaron imágenes las secciones pancreáticas usando una cámara Kappa ACC1, integrada en un microscopio Nikon Eclipse TE200. Empleando un objetivo 4X, se adquirieron imágenes de todo el tejido pancreático para determinar posteriormente el área total del páncreas. Así mismo, empleamos un objetivo 20X para fotografiar los islotes de Langerhans con el fin de analizar el área de célula α presente en el páncreas. Para la cuantificación de los distintos parámetros morfológicos empleamos el programa MetaMorph® Analysis Software (Nashville, TN, USA), analizando las imágenes tomadas de dos secciones distintas por animal, y un total de cinco animales de cada grupo.

6.3 Proliferación de la célula α .

El estudio de proliferación de la célula α se realizó empleando el antígeno nuclear ki67. Ki67 es una proteína nuclear presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, G2, S y mitosis), no encontrándose en aquellas células en estado quiescente (G0). Además el contenido de esta proteína aumenta de forma muy significativa durante la progresión de la fase S del ciclo celular. Se empleó la tinción inmunohistoquímica para el estudio de proliferación se realizó con el Kit EnVision Gl2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red) (Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA), que nos permitió realizar una tinción doble empleando anticuerpos frente a glucagón y Ki67.

Para llevar a cabo dicha técnica, seguimos las instrucciones indicadas por el fabricante del kit. Previamente desparafinamos los cortes de tejido y realizamos una rehidratación de los mismos, seguida de un proceso de desenmascaramiento de antígenos o *retrieval* empleando tampón citrato 10 mM y pH=6, llevándolo a ebullición en un microondas. Los anticuerpos empleados fueron: Monoclonal Anti-glucagon: Clone K79bBLO (Sigma, Madrid, España) con una dilución 1:1000 y Anti-Ki67 (D3B5) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Danvers, MS, USA) con una dilución 1:400. Finalmente, se obtuvieron imágenes de los islotes empleando el microscopio Nikon anteriormente mencionado y las imágenes se analizaron utilizando el programa MetaMorph®, encontrando las células positivas para glucagón marcadas en rosa y los núcleos de células en proceso de proliferación, positivas para ki67, marcadas en marrón.

6.4 Apoptosis de la célula α .

La apoptosis de la célula α en muestras de tejido parafinado fue analizada por medio del ensayo TUNEL (Roche Diagnostics, USA). Los ensayos TUNEL (de sus siglas en inglés, *terminal desoxynucleotidil transferasa dUTP nick end labeling*) son un método valioso para detectar la fragmentación del DNA, que es un sello distintivo de la apoptosis o muerte celular programada. En un ensayo TUNEL, una enzima conocida como desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) identifica mellas, o puntos de fragmentación, en el DNA de la muestra. TdT cataliza la adición de nucleótidos dUTP que se han marcado previamente, para la detección posterior.

El procedimiento de desparafinización, rehidratación y desenmascaramiento del antígeno de las muestras se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.1 de Material y Métodos. A continuación se procedió a la permeabilización de los tejidos con Tris HCl 0.1 M durante 20 minutos. En paralelo se seleccionó una muestra como control positivo, tratando la misma con 500 μ l de Tris HCl 50 mM y 30 μ l de DNasa I recombinante. Posteriormente se realizaron 3 lavados consecutivos con PBS. Para el marcaje de las células apoptóticas se usó la mezcla del kit TUNEL, siguiendo las instrucciones del fabricante, incubando durante 1 hora a 37°C en oscuridad y atmósfera húmeda, seguido de 3 lavados con PBS. A continuación, se llevó a cabo el bloqueo de uniones inespecíficas con BSA al 3% durante una hora seguida de la incubación con el anticuerpo primario anti glucagón de conejo empleado en el apartado 6.1 de Material y Métodos (1:100). Tras lavar con PBS se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario durante dos horas a temperatura ambiente y oscuridad. En este caso al tratarse de un marcaje por inmunofluorescencia, se usó el anticuerpo Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Life technologies, Carlsbad, CA, USA), dilución 1:500 y en presencia de 0.3% de suero de cabra. Seguidamente se lavaron las muestras con PBS 3 veces y se marcaron los núcleos con Hoechst 33342 (Molecular Probes, Barcelona, España), dilución 1:1000 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo se realizaron 3 lavados más con PBS y finalmente las muestras se montaron con ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Barcelona, España). La cuantificación del porcentaje de células apoptóticas se llevó a cabo empleando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 y un objetivo de inmersión 40X.

6.5 Neogénesis de la célula α .

El estudio de neogénesis en la célula α se realizó en cortes de tejido parafinado empleando como marcador del origen ductal de las células el anticuerpo pan-Cytokeratin (C11): sc-8018 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), que está recomendado para la detección de las citoqueratinas 4, 5, 6, 8, 10, 13 y 18. Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas tal y como se indica en el apartado 6.1 de Material y Métodos. A continuación, se procedió al desenmascaramiento de los antígenos de superficie. En este caso se sumergieron las muestras en tampón citrato 10 mM y pH=6, sin llegar nunca a ebullición en el microondas, durante 14 minutos. Seguidamente, los cortes fueron cubiertos por tripsina (0.5 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C. Previamente, a la incubación con los anticuerpos primarios, se realizó un bloqueo con BSA al 3% y un 5% de suero de cabra. Los anticuerpos primarios empleados se incubaron por separado

durante la noche a 4°C. En el día uno del protocolo, se incubó con el anticuerpo primario pan-Cytokeratin (C11): sc-8018 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), con una dilución 1:300, empleando como anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Life technologies, Carlsbad, CA, USA), con una dilución 1:500 y en presencia de 1% de suero de cabra durante 2 horas. En el segundo día se incubó con el anticuerpo primario anti-glucagon rabbit (Monosan, Uden, Países Bajos), a una dilución 1:100, empleando como anticuerpo secundario Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Life technologies, Carlsbad, CA, USA), a una dilución 1:500 y en presencia de 1% de suero de cabra durante 2 horas. Para marcar los núcleos y montar las muestras se siguieron los mismos pasos que en el apartado anterior. Tras la incubación con los anticuerpos o tratamiento con cada uno de los compuestos empleados en dicho protocolo se realizaron 3 lavados consecutivos con PBS de 10 minutos cada uno. Las imágenes de los islotes de Langerhans, así como de las células positivas para glucagón aisladas se tomaron en un microscopio Zeiss Axio Observer Z1 implementado con la tecnología para realizar secciones ópticas ApoTome de Zeiss y un objetivo de inmersión 40X. Posteriormente se llevó a cabo su análisis por medio del programa MetaMorph®.

6.6 Estudio de transdiferenciación.

El estudio de transdiferenciación se llevó a cabo en tejido pancreático parafinado procedente de hembras control no preñadas, así como hembras en día de gestación G18.5. Para ello, se realizó un marcaje bihormonal de insulina y glucagón por inmunofluorescencia para detectar y estudiar la colocación de ambas hormonas en las células de los islotes de Langerhans. Se analizaron un total de 6 secciones procedentes de 3 ratones diferentes por cada uno de los grupos: control y G18.5. En primer lugar, se procedió a desparafinar las secciones pancreáticas, seguido de la rehidratación de las mismas, siguiendo los pasos 1 y 2 descritos en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. A continuación se llevó a cabo el desenmascaramiento de antígenos empleando tampón citrato (12 mM y pH=6) calentado en el microondas hasta que empiece a hervir durante 10 minutos. Seguidamente se dejaron enfriar las muestras de 30 minutos a 1 hora y se marcó el límite del tejido con el marcador hidrofóbico pappin. Previo a la adición de los anticuerpos primarios se llevó a cabo un bloqueo de uniones inespecíficas con BSA al 3% durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios empleados fueron Anti-insulina rabbit a una dilución 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), y Anti-glucagon mouse a una dilución 1:100

(Sigma, Madrid, España), incubándolos durante toda la noche a 4°C. En cuanto a los anticuerpos secundarios, se utilizaron Alexa Fluor® 488 Goat anti-rabbit IgG (H+L) (Life technologies, Carlsbad, CA, USA), a una dilución 1:500 en presencia de 0.5 % de suero de cabra para la insulina y Alexa Fluor® 546 goat anti-mouse IgG (H+L) (Life technologies, Carlsbad, CA, USA), a una dilución 1:500 en presencia de 0.5 % de suero de cabra para el glucagón. Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras cada incubación con los anticuerpos ya sean primarios o secundarios se realizan 3 lavados consecutivos de 10 minutos con PBS en agitación. Tras la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios los núcleos celulares se marcaron con Hoechst (10 mg/ml) empleando una concentración 1:1000 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno en agitación y las muestras se montaron con Prolong Gold Antifade Reagent. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Leica SPE II y un objetivo de inmersión 40X.

7. CULTIVO CELULAR DE α -TC1.9: EXPOSICIÓN A HORMONAS GESTACIONALES.

α -TC1 clon 9 (ATCC, Manassas, VA, USA) es una línea celular de células α pancreáticas productoras de glucagón, clonadas a partir de la línea celular α -TC1. Esta última fue derivada de un adenoma creado en un ratón transgénico que expresa el SV40 large T antigen, un oncogén bajo el control del promotor de preproglucagon de rata. A pesar de que la línea celular parental α -TC1 produce glucagón y cantidades considerables de insulina y preproinsulina RNAm, el clon 9 está mucho más diferenciado y produce exclusivamente glucagón.

La línea celular α -TC1.9 fue empleada como modelo para el estudio de las adaptaciones de la célula α tras la exposición crónica a las principales hormonas responsables del mantenimiento de la gestación, siendo estas hormonas clave en las adaptaciones de la célula β pancreática durante el embarazo. El cultivo celular se realizó empleando el medio DMEM sin rojo fenol (Invitrogen, Barcelona, España), suplementado con 2 mM L-glutamina, 1.5 g/l NaHCO₃, 10% FBS inactivado, 15 mmol/l HEPES, 0.1 mmol/l de aminoácidos no esenciales y glucosa hasta alcanzar una concentración de 3 g/l. La concentración celular inicial empleada para realizar los experimentos fue de 100.000 células por pocillo/cubreobjetos. Las células fueron tratadas durante 8 días (cambiando el medio cada 48 horas) con las distintas hormonas gestacionales por separado, empleando en cada caso las siguientes concentraciones:

500 ng/ml de lactógeno placentario, 500 ng/ml de prolactina, 100 ng/ml de progesterona y 100 pM de estradiol. Como vehículo se usó 0.0005% de DMSO. La concentración de hormonas empleadas se basan en los rangos fisiológicos que podemos encontrar durante la gestación en el ratón, habiendo sido empleadas en estudios previos (Barkley *et al.*, 1979, Goyvaerts *et al.*, 2015, Soares and Talamantes, 1982, Sorenson *et al.*, 1993, Virgo and Bellward, 1974).

7.1 Estudio de proliferación: marcaje con BrdU.

En los experimentos para el estudio de la proliferación, tras 7 días de tratamiento con las hormonas gestacionales, las células (sembradas en cubreobjetos) fueron expuestas durante 24 horas a una concentración 10 μ M de bromodeoxiuridina (BrdU), nucleótido sintético análogo a la timidina que es incorporado al DNA durante la fase S de la mitosis celular, permitiendo detectar las células que están sufriendo un proceso de replicación mediante un marcaje fluorescente. Transcurridas las últimas 24 horas de tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y, posteriormente, fijadas con paraformaldehído al 4% durante 5 minutos. Tras la fijación las células fueron tratadas para permitir la permeabilización de las membranas y la unión del anticuerpo primario al BrdU. Para ello, se trataron las células durante 30 minutos con etanol al 70% y 4°C de temperatura. Posteriormente, se realizaron 3 lavados consecutivos con PBS de 10 minutos cada uno. A continuación, las muestras fueron tratadas con HCl 2N durante 20 minutos a temperatura ambiente seguido del tratamiento con borato 0.1 M durante 15 minutos. Se procedió al lavado de las muestras con PBS, seguido del bloqueo de lugares de unión inespecíficos del anticuerpo empleando BSA al 3% durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario Monoclonal Mouse Anti-Bromodeoxyuridine (Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) a una concentración 1:100 en presencia de 3% BSA, durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación con el anticuerpo primario se procedió al lavado de las muestras con PBS, tres lavados consecutivos de 10 minutos cada uno. Seguidamente se incubaron las células durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (Life technologies, Carlsbad, CA, USA), a una dilución 1:500 y en presencia de 1% de suero de cabra en BSA. Tras los lavados con PBS, las células fueron tratadas con yoduro de propidio para marcar los núcleos celulares, a una dilución 1:1000 en PBS durante 1 minuto. Finalmente, se procedió al lavado de las muestras y al montaje de las mismas con Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Barcelona, España). Las muestras fueron analizadas tomando imágenes con un

microscopio confocal descrito anteriormente en la sección 3 de Materiales y Métodos, siendo tomadas 20 imágenes de manera aleatoria haciendo un barrido de cada cubreobjetos. A continuación, éstas fueron analizadas con el software ImageJ, siendo contabilizados el número total de células (un mínimo de 2000 células por cubreobjetos), así como el número de células positivas para BrdU, obteniendo así un valor del porcentaje de proliferación tras el tratamiento con las hormonas gestacionales. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes, siendo analizados un total de 8 cubres por tratamiento.

7.2 Secreción de glucagón en α -TC1.9.

Después de 8 días de tratamiento con las hormonas gestacionales en placas de 24 pocillos, las células fueron lavadas con PBS para eliminar las células muertas, así como los restos de medios del tratamiento. A continuación, se realizó una preincubación de dos horas a 37°C con el medio de secreción, cuya composición está descrita en el apartado “Secreción estática de glucagón”, pero en este caso con una concentración de glucosa de 5.6 mM. Transcurrida la preincubación, se procedió a la secreción de glucagón añadiendo 500 μ l de medio de secreción con los diferentes estímulos. Un total de 3 pocillos/estímulo se dispusieron para cada uno de los tratamientos hormonales, siendo los estímulos: 0.5 mM glucosa, 11 mM glucosa y 0.5 mM glucosa + 10 nM insulina. La secreción se llevó a cabo durante una hora en el incubador a 37°C. Una vez pasado este tiempo, la reacción se detuvo dejando las placas en hielo durante 15 minutos, tomándose a continuación 400 μ l del medio de secreción intentando evitar el fondo del pocillo para no arrastrar células junto con el medio. Para evitar al máximo la presencia de células en el medio, se centrifugó el medio de secreción a 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante y adicionando 20 μ l de aprotinina (20 mg/l), para evitar la degradación del glucagón. Seguidamente se retiró el resto de medio de secreción que quedó en los pocillos y las células se lavaron con PBS. Finalmente, se añadieron 200 μ l de etanol ácido y 10 μ l de aprotinina a las células, dejándolas en agitación toda la noche a 4°C. A continuación, las células se despegaron del pocillo empleando una punta de pipeta estéril, y se centrifugó el contenido del pocillo a 14000 rpm durante 4 minutos a 4°C y recuperando el sobrenadante para medir el contenido total de glucagón, así como la proteína total. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes.

7.3 Obtención de ARN, RT-PCR y PCR cuantitativa.

Transcurridos los 8 días de cultivo con las distintas hormonas gestacionales, las células fueron lavadas con PBS para retirar las células muertas y los restos de medio con los tratamientos. Se realizaron 3 experimentos independientes, en cada uno de los cuales teníamos dos muestras por cada uno de los tratamientos. Para la purificación del ARN se empleó el kit comercial RNeasy Micro (Qiagen, Hilden, Alemania). La lisis celular se llevó a cabo empleando el tampón de lisis comercial RLT suplementado con un 0.01% de β -mercaptoetanol, adicionando a cada pocillo 300 μ l de buffer de lisis, utilizando a continuación la punta de un pipeta estéril para despegar las células del pocillo. A continuación, se procedió a la purificación del ARN siguiendo los pasos especificados por la casa comercial. La concentración final de ARN obtenida se midió empleando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Empleando el valor de la razón entre las absorbancias obtenidas a 260 y 280 nm determinamos la pureza de las muestras. Aquellas muestras cuyo ratio 260/280 fue igual o muy próximo a 2.0, fueron consideradas aptas para su análisis y posterior uso para la retrotranscripción.

La retrotranscripción para obtener DNA complementario (cDNA) en nuestras muestras de mRNA purificado se llevó a cabo utilizando 0.5 μ g de ARN, añadiendo a la reacción un inhibidor de ribonucleasas (RNase Inhibitor, Ambion®, Thermo Fisher Scientific). El kit comercial utilizado fue el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), empleando para llevar a cabo la reacción un termociclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), y el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C y un paso final sin límite de tiempo para el mantenimiento de las muestras a 4°C.

Finalmente, con el objetivo de medir los niveles de expresión del mensajero de nuestro gen de interés, el precursor de glucagón (Gcg), se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR, del inglés quantitative PCR). Empleando el mismo termociclador que en la retrotranscripción, la mezcla de reacción estuvo compuesta por 1 μ l de cDNA, 200 nM de los cebadores directo y reverso (Tabla 1) y 1x IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), siendo el volumen final de la mezcla de 10 μ l. A continuación, las muestras fueron sometidas a las siguientes condiciones: 3 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 5 segundos a 95°C, 5 segundos a 60°C y 10 segundos a 72°C, y una curva de melting de 65 a 95°C con una pendiente de 0.1°C/s. El fundamento de esta técnica de cuantificación se basa en las propiedades fluorescentes del fluoróforo SYBER Green 1, cuya fluorescencia aumenta significativamente a medida que se

intercala en el DNA de doble hebra. Tras cada ciclo de amplificación, el termociclador es capaz de medir este valor de emisión de fluorescencia, siendo este valor proporcional al número de copias sintetizadas, dependiendo éste de la cantidad de cDNA de partida. Así, los niveles de expresión de nuestro gen de interés se expresaron respecto de los niveles de expresión de un gen de expresión constitutiva o Housekeeping. En nuestro caso se utilizó el gen HPRT, empleando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, siendo Ct el valor del número de ciclos necesarios para obtener un incremento significativo de fluorescencia respecto de la señal basal, y donde $\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen endógeno}$ (Livak and Schmittgen, 2001). La secuencia de los cebadores empleados para la amplificación de los genes de interés se muestra en la siguiente tabla:

Gen	Directo (5' → 3')	Reverso (5' → 3')
Hprt	GGTTAAGCAGTACAGCCCCA	TCCAACACTTCGAGAGGTCC
Glucagon (Gcg)	CACTCACAGGGCACATTAC	TTTGAATGTTGTTCCGGT

Tabla 1: Secuencias de los cebadores empleados en la reacción de amplificación de la PCR cuantitativa a tiempo real.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos mostrados en el presente trabajo se representan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). En función del diseño experimental y los grupos comparados en cada experimento, se aplicó Student's t-test (comparaciones de dos grupos) o ANOVA (comparaciones de más de dos grupos), con post test para comparaciones múltiples Dunnet (en one-way ANOVA) o Bonferroni (en two-way ANOVA). En el caso de que los datos no cumplieren con la asunción de normalidad (no presentasen una distribución normal), se aplicó estadística no-paramétrica, Mann-Whitney o Kruskal Wallis, seguido del post test para comparaciones múltiples de Dunn, según el tipo de análisis. En algunos ensayos los datos se analizaron mediante one-way ANOVA seguido del post-test para comparaciones múltiples Fisher's LSD test (que es menos restrictivo que los test descritos anteriormente). En todos los casos, se considera diferencia significativa entre los grupos cuando esta sea $p < 0.05$.



RESULTADOS

1. Las ratonas preñadas en el día de gestación G18.5 presentan una masa de célula α pancreática aumentada debido a un proceso de hipertrofia e hiperplasia.

Con el objetivo de estudiar las adaptaciones morfológicas de la célula α pancreática durante la gestación empleamos hembras C57BL/6 no preñadas como control, así como hembras C57BL/6 preñadas en distintos estadios o días de gestación: G12.5, G15.5 y G18.5. Estos días de estudio fueron seleccionados en base a los tiempos en los que se producen las adaptaciones en la célula β pancreática durante la gestación (Beamish *et al.*, 2017, Rieck and Kaestner, 2010, Sorenson and Brelje, 1997). Se estudiaron un total de 5 animales por grupo, siendo analizadas dos secciones pancreáticas de cada animal mediante la técnica de inmunohistoquímica. Se seleccionó un anticuerpo para la hormona glucagón, para identificar y analizar las características morfológicas de la masa de la célula α pancreática. Tras el análisis de las imágenes empleando el programa Metamorph Analysis Software (Nashville, TN, USA) y aplicando el factor de conversión de píxeles a mm^2 descrito en el apartado de Materiales y Métodos, se observó un aumento del área de célula α , expresado en porcentaje del área total del páncreas, de algo más del doble en las ratonas preñadas en el día de gestación G18.5 (0.106 ± 0.017 %) comparadas con las ratonas control (0.049 ± 0.010 %) (Figura 9A). Asimismo, a partir del valor del área y teniendo en cuenta el peso del páncreas de cada ratona, se pudo calcular la masa de célula α en miligramos, observando a su vez también un aumento de la misma magnitud en las ratonas G18.5 (0.315 ± 0.052 mg) comparado con los controles (0.132 ± 0.030 mg) (Figura 9B).

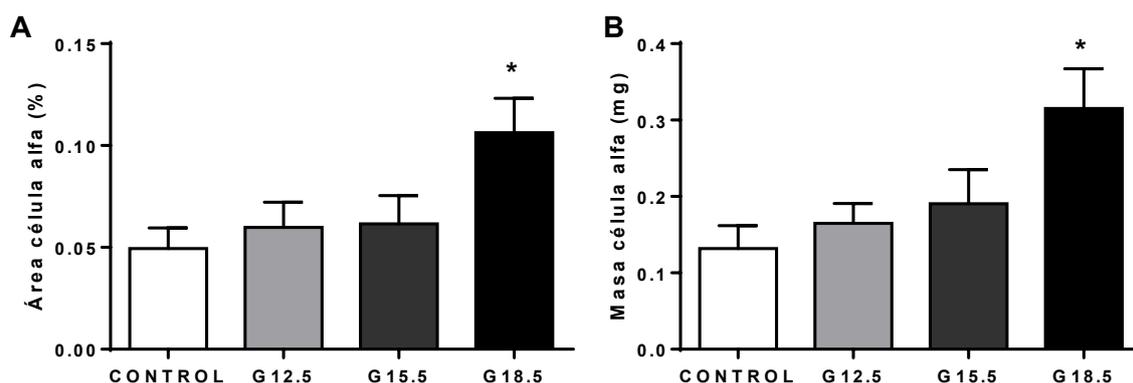


Figura 9: Aumento del área y masa de célula α en las ratonas preñadas en el día de gestación G18.5. (A) Área de célula α medida en porcentaje en ratonas control no preñadas y ratonas preñadas en día de gestación: G12.5, G15.5 y G18.5. (n= 5 animales por grupo y condición). **(B)** Masa de célula α medida en miligramos en hembras control y hembras preñadas en los días de gestación mencionados anteriormente (n= 5 animales por grupo y condición). Los valores representan las medias \pm SEM. *p<0.05 One way-ANOVA seguido por el post-test para comparaciones múltiples Dunnet.

Una vez observada la expansión de la masa de célula α en las ratonas G18.5, nos dispusimos a estudiar si esta adaptación morfológica era debida a un aumento en el número de células α o hiperplasia, o bien, a un aumento en el tamaño celular o hipertrofia, seleccionando al azar 10 islotes por sección pancreática, hasta un total de 100 islotes por grupo.

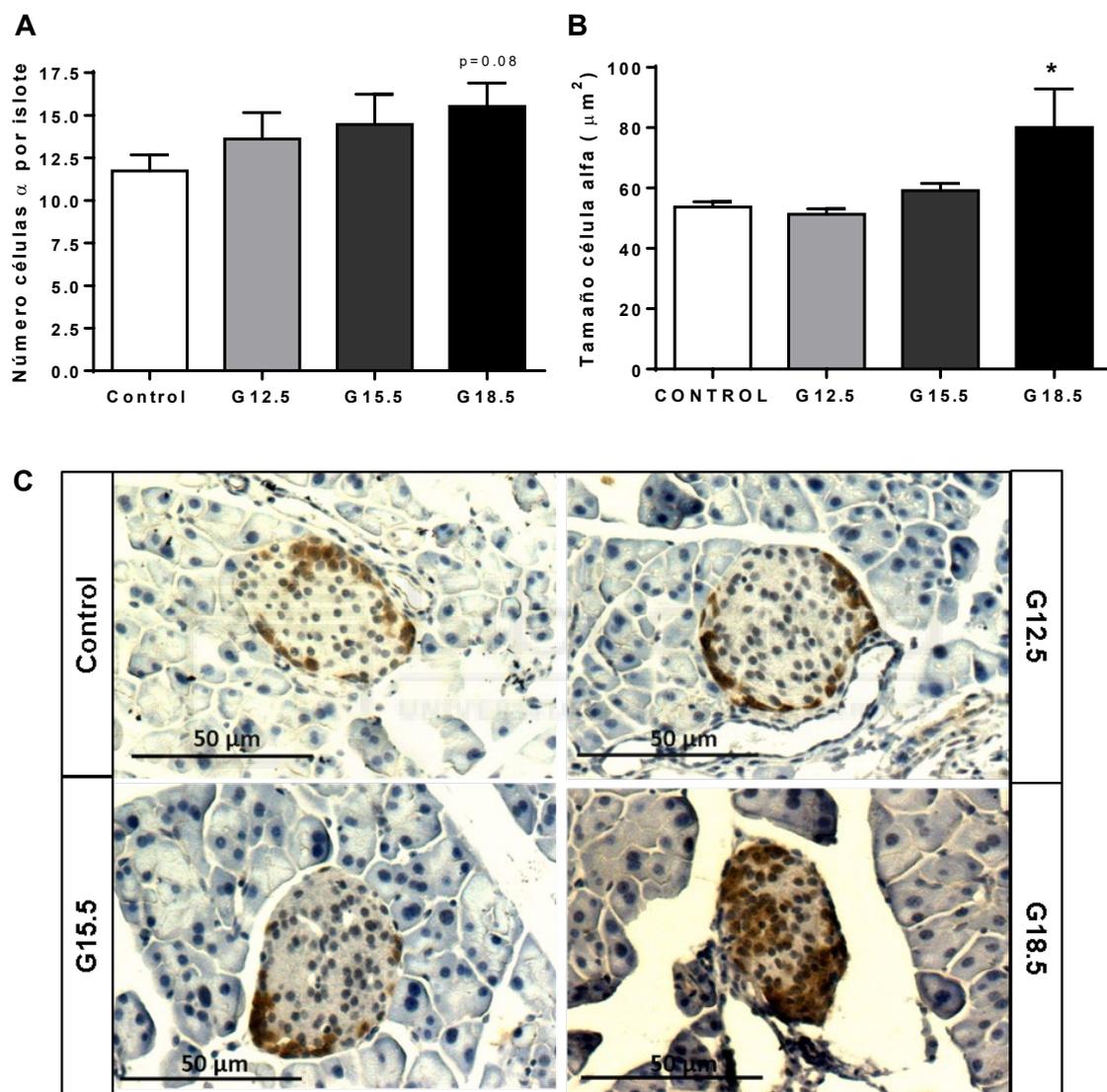


Figura 10: Hipertrofia de la célula alfa en las ratonas preñadas en el día de gestación G18.5. (A) Número medio de células α por islote procedentes de hembras control y hembras preñadas en los días de gestación mencionados anteriormente (n=100 islotes por grupo y condición fueron seleccionados aleatoriamente procedentes de un total de 5 animales). **(B)** Tamaño medio de la célula alfa en los islotes de Langerhans de ratonas control no preñadas y ratonas preñadas en día de gestación: G12.5, G15.5 y G18.5. (n=100 islotes por grupo y condición fueron seleccionados aleatoriamente procedentes de un total de 5 animales). **(C)** Imágenes representativas de islotes de Langerhans en los que por medio de tinción inmunohistoquímica para glucagón (marrón) podemos identificar las células α tanto en hembras control como preñadas. Los valores representan las medias \pm SEM. *p<0.05, one way-ANOVA seguido del post-test sin corrección para comparaciones múltiples Fisher's LSD test (A) y Kruskal-Wallis seguido por el post test para comparaciones múltiples de Dunn (B).

En cuanto al número de células α (células positivas para glucagón) en las ratonas preñadas en día de gestación G18.5 observamos que éste estaba incrementado, pasando de un valor medio de 11.73 ± 0.95 células α por islote en las ratonas control a 15.53 ± 1.36 células α por islote en las ratonas G18.5 (Figura 10A). Asimismo, se analizó el tamaño celular, que resulta de dividir el área de célula α entre el número de células positivas para glucagón, encontrando un aumento del mismo. Por tanto, la célula α pancreática presentaba una hipertrofia en las ratonas en día de gestación G18.5 ($80.07 \pm 12.78 \mu\text{m}^2$) comparado con el tamaño de las células α en las ratonas control ($53.67 \pm 1.79 \mu\text{m}^2$) (Figura 10B).

2. La proliferación de la célula α pancreática está aumentada en los islotes de Langerhans de las ratonas preñadas G18.5.

Dado que los cambios morfológicos de la célula α pancreática tenían lugar en el día G18.5, decidimos centrar el resto de experimentos en analizar esta etapa tardía del embarazo. Como podemos encontrar bien descrito en la literatura, uno de los principales procesos responsables de la expansión de la masa de célula β pancreática durante el embarazo es el aumento de la proliferación (Rieck and Kaestner, 2010, Xu *et al.*, 2015). Es por ello que, ante las evidencias expuestas en el presente trabajo donde observamos un aumento del área y masa de célula α pancreática en las ratonas preñadas en día de gestación G18.5, decidimos estudiar la proliferación de la célula α empleando el marcador nuclear Ki67, proteína presente en todas fases activas del ciclo celular (G1, G2, S y mitosis). Empleando técnicas de inmunohistoquímica, marcamos secciones de páncreas pertenecientes al grupo control y al de ratonas preñadas G18.5, para la hormona glucagón, identificando así las células α , y para la proteína nuclear Ki67, identificando aquellas células que están sufriendo un proceso de división celular. De este modo, se observó que la proliferación expresada en porcentaje, estaba incrementada en las hembras preñadas G18.5 ($1.23 \pm 0.23 \%$) en más de dos veces el valor medio de proliferación en el grupo control ($0.58 \pm 0.11 \%$) (Figura 11).

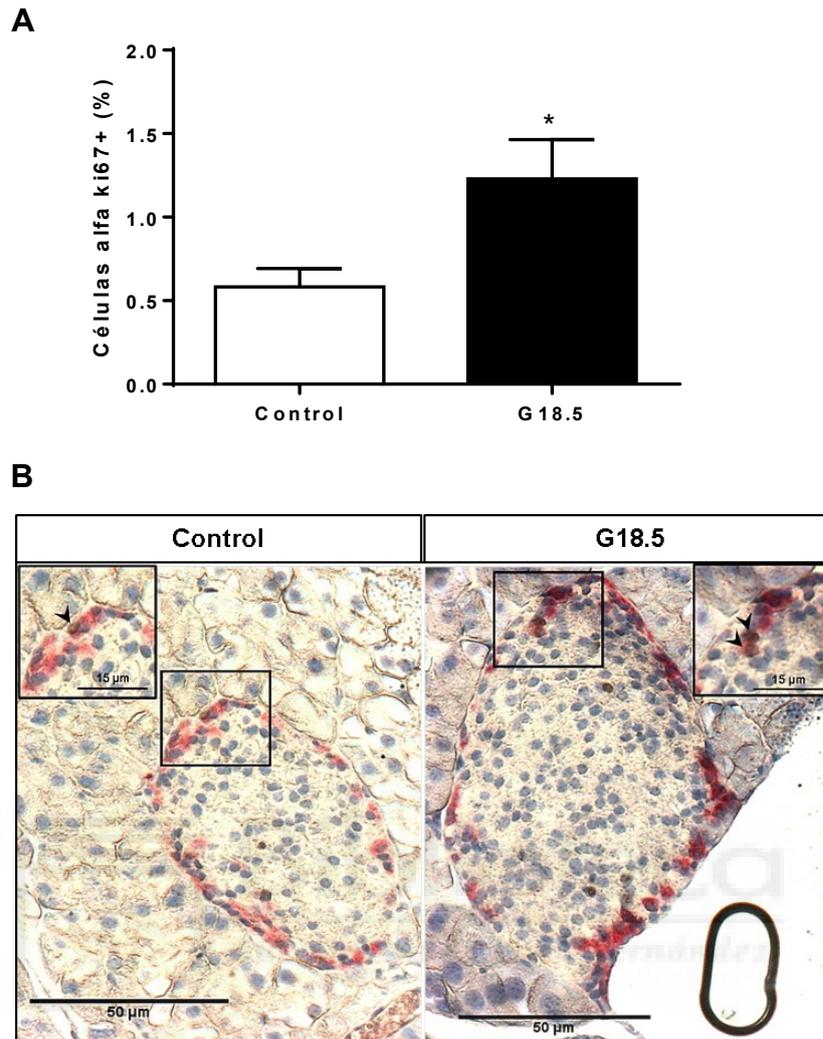


Figura 11: Aumento de proliferación de la célula alfa en las ratonas preñadas en el día de gestación G18.5. (A) El valor de proliferación representa el porcentaje de células α positivas para el marcador nuclear ki67 en el grupo control de hembras no preñadas y en el grupo de preñadas G18.5 (n=4 controles y n=5 preñadas G18.5). (B) Imágenes representativas donde podemos ver células α (rosa) y células no alfa, positivas para Ki67 (marrón) en islotes de Langerhans de ratonas control y preñadas G18.5. Las flechas en color negro indican células alfa positivas para el marcaje nuclear Ki67. Los valores representan las medias \pm SEM. * $p < 0.05$ Mann-Whitney test.

3. La apoptosis en el proceso de expansión de la célula α pancreática durante la gestación.

Durante la gestación, el aumento de la masa de célula β pancreática, como respuesta adaptativa al desarrollo de resistencia a la insulina en tejidos periféricos está fundamentalmente asociada a un aumento en la tasa de proliferación, como hemos indicado anteriormente. Sin embargo, en dicha adaptación también pueden haber otros procesos implicados, como la disminución de la tasa de apoptosis en este tipo celular

(Huang *et al.*, 2009). De este modo, basándonos en los mecanismos que intervienen en la adaptación de la célula β , decidimos estudiar la potencial contribución de la apoptosis a la expansión de la masa de célula α en el día de gestación G18.5. Para ello, se utilizó un kit comercial para realizar el ensayo de TUNEL en secciones pancreáticas del grupo control y de ratonas preñadas G18.5. Este ensayo nos permite identificar las células que presentan fragmentación de DNA, siendo este un signo distintivo de apoptosis, empleando a su vez la hormona glucagón como elemento para identificar las células α pancreáticas. En el caso de la célula α , no observamos diferencias significativas en los niveles de apoptosis entre las hembras no preñadas y las hembras en día de gestación G18.5, siendo los niveles control (0.22 ± 0.02 %), prácticamente idénticos a los niveles en las ratonas G18.5 (0.22 ± 0.03 %) (Figura 12).

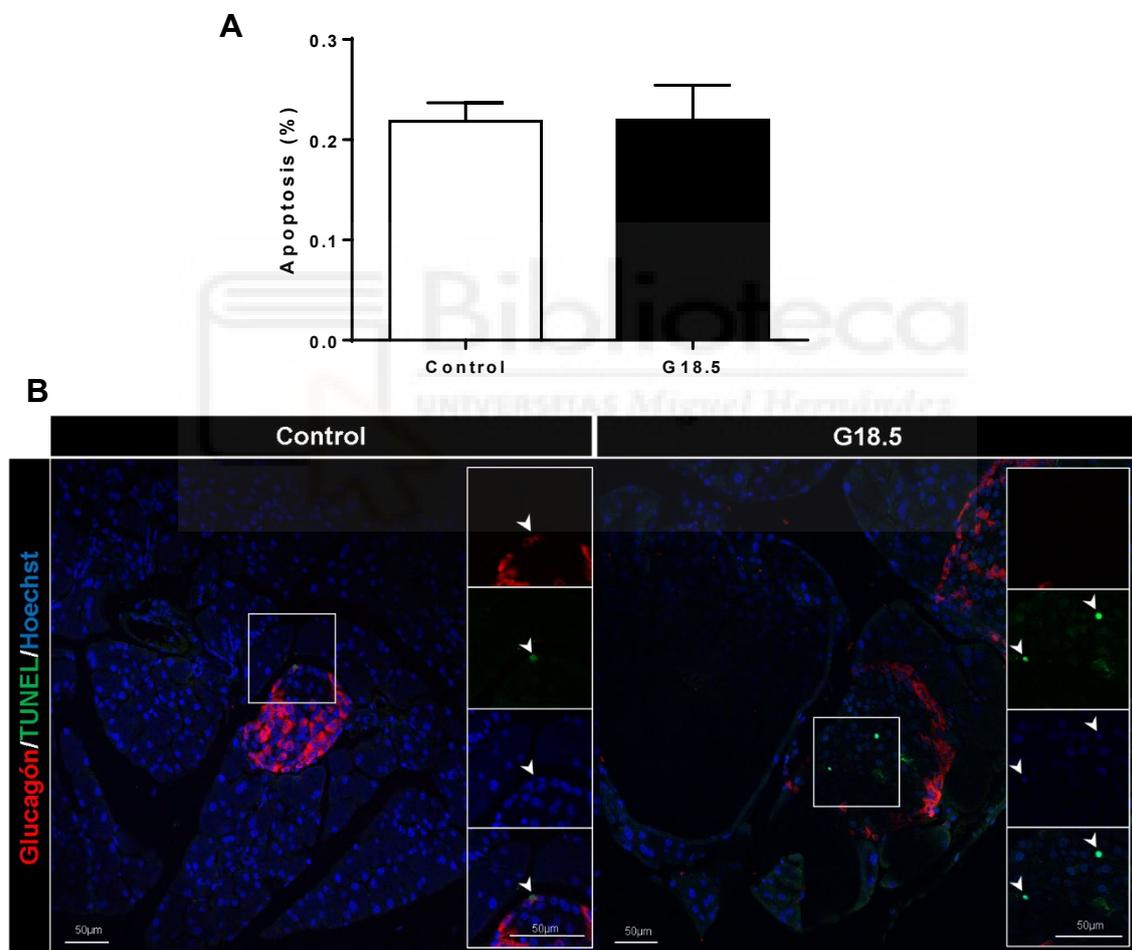


Figura 12: Los niveles de apoptosis se mantienen sin cambios en las ratonas preñadas G18.5 comparado con las hembras no preñadas. (A) Porcentaje de células α apoptóticas positivas para TUNEL en las ratonas control no preñadas y en las ratonas preñadas en el día de gestación G18.5 (n=5 animales por grupo). **(B)** Imágenes representativas de islotes de Langerhans, pertenecientes al grupo control y al grupo de preñadas G18.5, marcados para glucagón (rojo), TUNEL (verde) y Hoechst (azul). Las flechas blancas muestran algunas células positivas para TUNEL. Los valores representan las medias \pm SEM. Student's t test.

4. La neogénesis en el proceso de expansión de la célula α pancreática durante la gestación.

Por lo que respecta al papel del proceso de neogénesis en la expansión de la célula β durante el embarazo en humanos y ratones, parecen existir aún a día de hoy ciertas discrepancias entre los distintos trabajos publicados (Butler *et al.*, 2010, Parsons *et al.*, 1995, Zhao, 2014). Sin embargo, algunos trabajos recientes sugieren que la neogénesis podría contribuir al aumento de masa de célula β durante la gestación en ambas especies. En el presente trabajo se estudió la posible contribución de la neogénesis en la expansión de la masa de célula α en las ratonas preñadas G18.5, empleando un marcador ductal como elemento para identificar la neoformación de células α pancreáticas a partir de células del ducto.

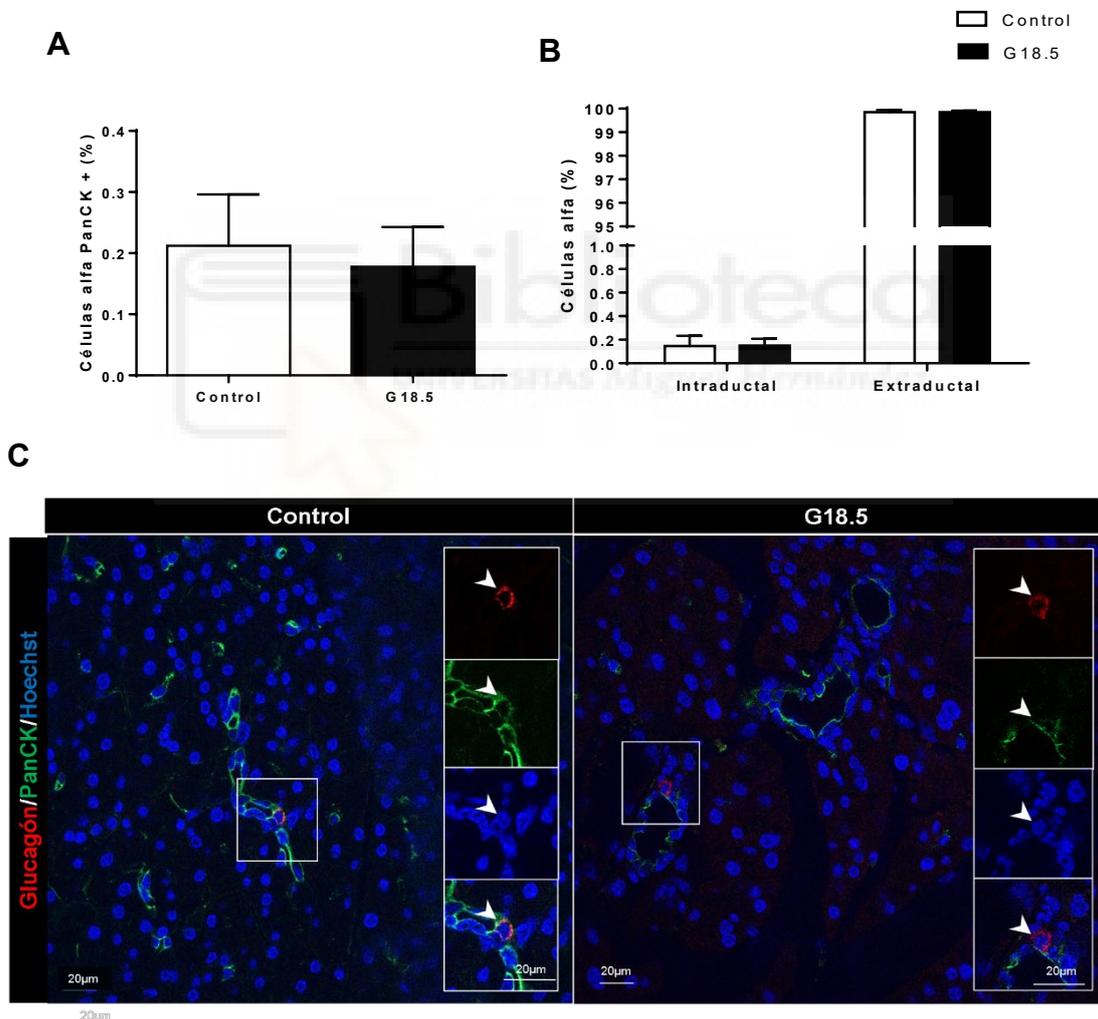


Figura 13: La neogénesis, a partir de células del ducto, no contribuye a la expansión de la masa de célula alfa en el día de gestación G18.5. (A) Porcentaje de células doble positivas para glucagón y PanCK en ratonas control y preñadas G18.5 (n=5 animales por grupo). **(B)** Clasificación de las células α basado en su posición con respecto a los ductos pancreáticos (%) en ratonas control no preñadas y ratonas preñadas G18.5 (n=5 animales por grupo). (cont.)

Figura 13 (cont.) (C) Imágenes representativas de secciones pancreáticas de ratonas control y preñadas G18.5 en las que podemos observar la tinción celular para glucagón (rojo), PanCK (verde) y para el marcador nuclear Hoechst (azul). Las áreas encuadradas se encuentran aumentadas en la derecha de la imagen. Las flechas blancas indican las células doble positivas. Los valores representan las medias \pm SEM. Student's t test (A) y Two-way ANOVA seguido por el post-test para comparaciones múltiples Bonferroni.

Al igual que ocurría con la apoptosis, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células α positivas para el marcador ductal Pancitoqueratina (C11), siendo los valores medios en el grupo control de 0.21 ± 0.80 % y en el grupo G18.5 de 0.18 ± 0.06 % (Figura 13A). Asimismo, también se estudió si existían diferencias entre ambos grupos de estudio en cuanto a la distribución o posición de las células α con respecto a los ductos, diferenciando entre dos categorías: intraductales (células que forman parte de los ductos) y células α extraductales (células que se encuentran alejadas de los ductos). Basándonos en esta clasificación, se observó que no existen diferencias significativas en el porcentaje de células α pertenecientes a cada uno de los grupos, entre las hembras control (intraductales: 0.15 ± 0.09 %, extraductales: 99.85 ± 0.09 %) y las preñadas G18.5 (intraductales: 0.15 ± 0.06 %, extraductales: 99.85 ± 0.06 %) (Figura 13B).

5. La transdiferenciación en el proceso de expansión de la célula α pancreática durante la gestación.

Algunos trabajos proponen que procesos como la neogénesis o la transdiferenciación podrían tener un papel en la expansión de las células del islote durante la gestación (Abouna *et al.*, 2010). Por todo esto, tras el estudio de la neogénesis, nos dispusimos a analizar si la transdiferenciación estaba implicada en la expansión de la masa de célula α observada en el día de gestación G18.5. Para ello, cuantificamos en secciones pancreáticas de hembras control no preñadas y hembras G18.5, el porcentaje de células bihormonales, doble positivas para las hormonas glucagón e insulina. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en el porcentaje de células bihormonales, siendo este muy bajo en ambos casos (0.22 ± 0.11 % en el control y 0.34 ± 0.17 % en G18.5) (Figura 14). Todos estos resultados parecen indicar que el principal responsable del aumento de la masa de célula α durante la gestación, al igual que ocurre con la célula β , es la proliferación, siendo la contribución del resto de procesos mínima, sin diferencias con el grupo control.

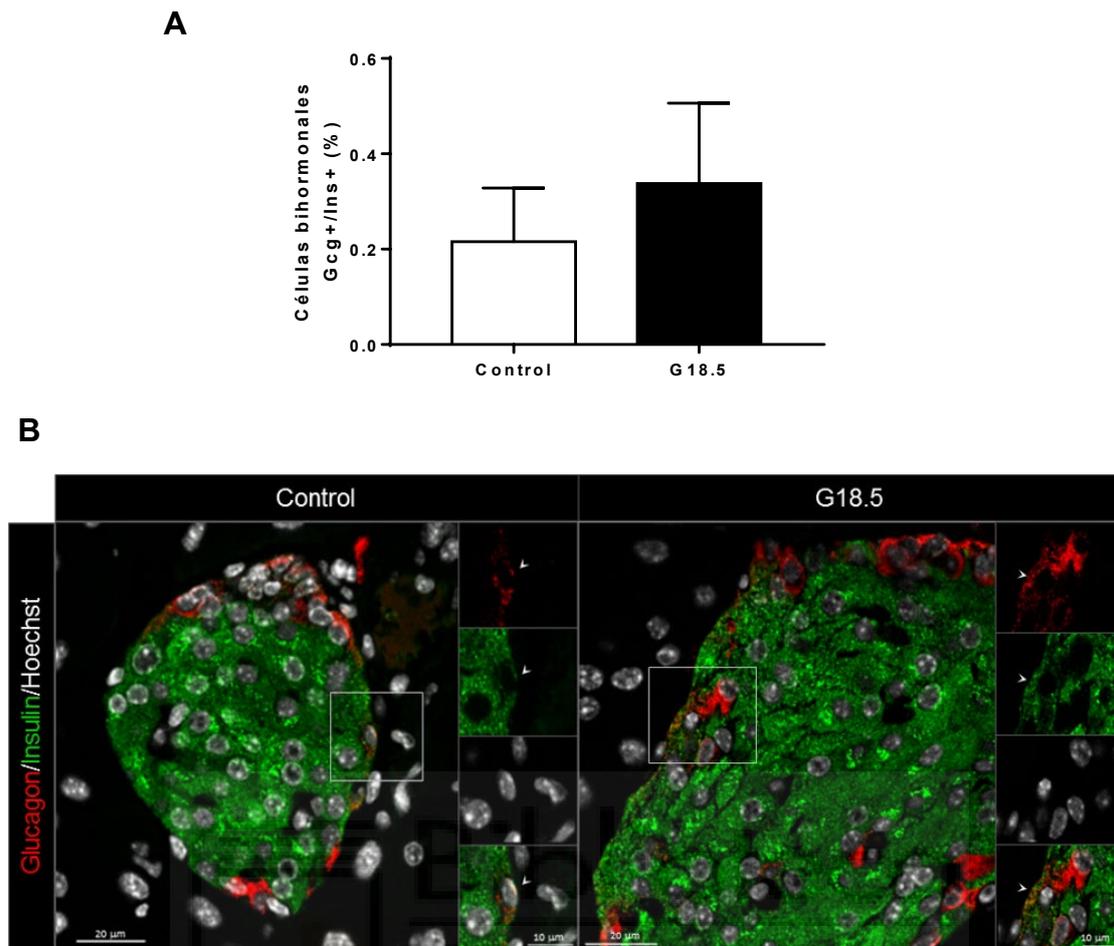


Figura 14: La transdiferenciación no está implicada en la expansión de la célula α durante la preñez. (A) Porcentaje de células bihormonales, doble positivas para glucagón e insulina en ratonas control no preñadas y ratonas preñadas G18.5 (n=3 animales por grupo, 2000 células α por grupo aproximadamente). **(B)** Imágenes representativas de islotes de Langerhans de ratonas control y ratonas preñadas G18.5 marcados para glucagón (rojo), insulina (verde) y el marcador nuclear Hoechst (gris). Las áreas encuadradas se encuentran aumentadas en la derecha de la imagen. Las flechas blancas indican las células doble positivas. Los valores representan las medias \pm SEM. Mann-Whitney test.

6. Valores hormonales en el día de gestación G18.5 en el ratón.

Tras el estudio de las adaptaciones morfológicas de la célula α en el día G18.5, nos dispusimos a caracterizar diversos parámetros plasmáticos relacionados con la homeostasis de la glucosa, como los niveles de glucemia y el perfil hormonal (insulina y glucagón) de las ratonas preñadas comparado con las hembras control no preñadas, atendiendo a este día de gestación en particular. Todos los parámetros fueron medidos en estado alimentado de los animales. Así, los niveles de glucemia medidos a partir de una pequeña muestra de sangre de la cola empleando el glucómetro Accu Check®

(Roche, Roche, Mannheim, Alemania) revelaron que hacía el final de la gestación, en el día G18.5 las ratonas presentan una disminución significativa de los niveles de glucemia (122.88 ± 5.43 mg/dl) comparado con las ratonas control (151.88 ± 2.59 mg/dl), no siendo estos niveles en ningún caso patológicos (Figura 15A). Por lo que respecta al análisis de las distintas hormonas implicadas en la homeostasis de la glucosa, este se llevó a cabo a partir de muestras plasmáticas procedentes de sangre obtenida de la vena safena de la pata empleando la técnica de ELISA. En cuanto a los niveles plasmáticos de glucagón, en las ratonas preñadas en día de gestación G18.5 se encontró una marcada hipoglucagonemia, con unos niveles plasmáticos de glucagón de 33.15 ± 3.20 pg/ml mientras que en las ratonas control no preñadas encontramos unos niveles de 60.36 ± 3.65 pg/ml (Figura 15B). Por otra parte, respecto a los niveles plasmáticos de insulina, se observó una tendencia al aumento en las ratonas G18.5 (1.58 ± 0.24 ng/ml) comparadas con las hembras control (1.17 ± 0.18 ng/ml), no siendo estadísticamente significativo (Figura 15C).

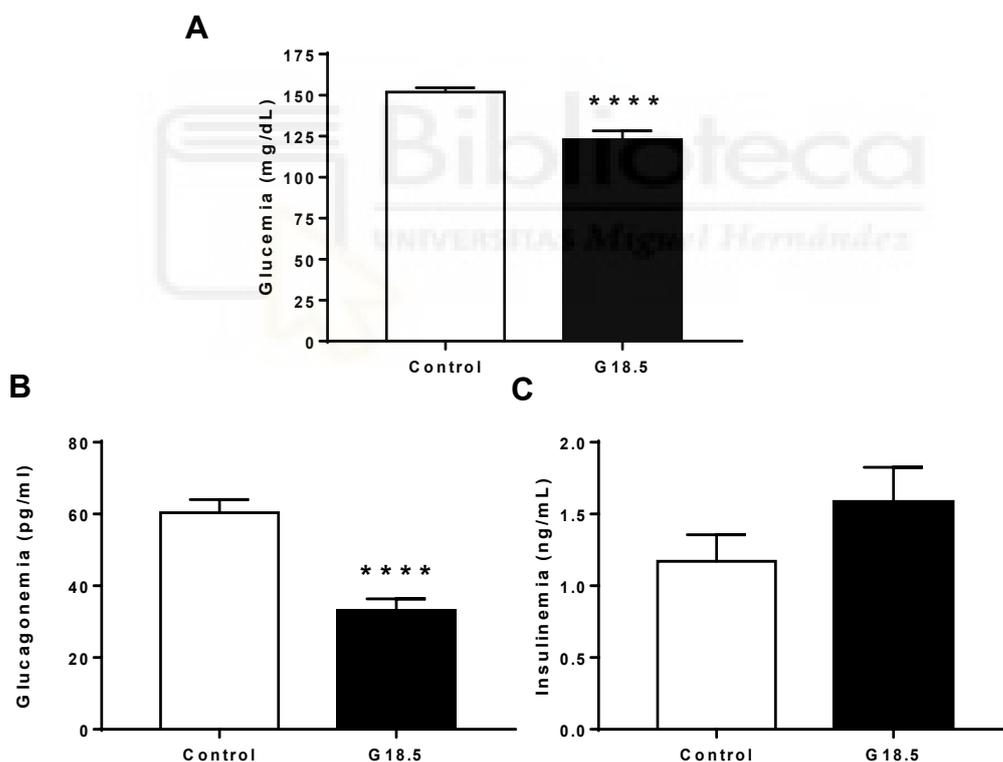


Figura 15: Cambios en los niveles hormonales en el día de gestación G18.5. (A) Glucemia en ratonas control no preñadas y ratonas preñadas G18.5 (n=16 y n=8 animales, respectivamente). (B) Niveles plasmáticos de glucagón en ratonas control y preñadas G18.5 (n=12 y n=8 animales, respectivamente). (C) Niveles plasmáticos de insulina en ratonas control y preñadas G18.5 (n=12 y n=8 animales, respectivamente). Todos los parámetros plasmáticos fueron medidos en estado alimentado. Los valores representan las medias \pm SEM. ****p<0,0001 Student's t test

7. La secreción de glucagón se encuentra alterada hacia el final de la gestación en las ratonas preñadas.

Con el fin de evaluar el estatus funcional de la célula α pancreática, se realizó una secreción estática de glucagón a partir de islotes de Langerhans frescos, empleando diferentes estímulos. Por una parte, se utilizó una concentración de glucosa baja, 0.5 mM glucosa, como estímulo positivo que promueve la secreción de glucagón. Por otra parte, se usó una concentración alta de glucosa, 11 mM, así como una concentración baja de glucosa más insulina (0.5 mM G + 10 nM Insulina), como estímulos negativos, inhibidores de la secreción de glucagón.

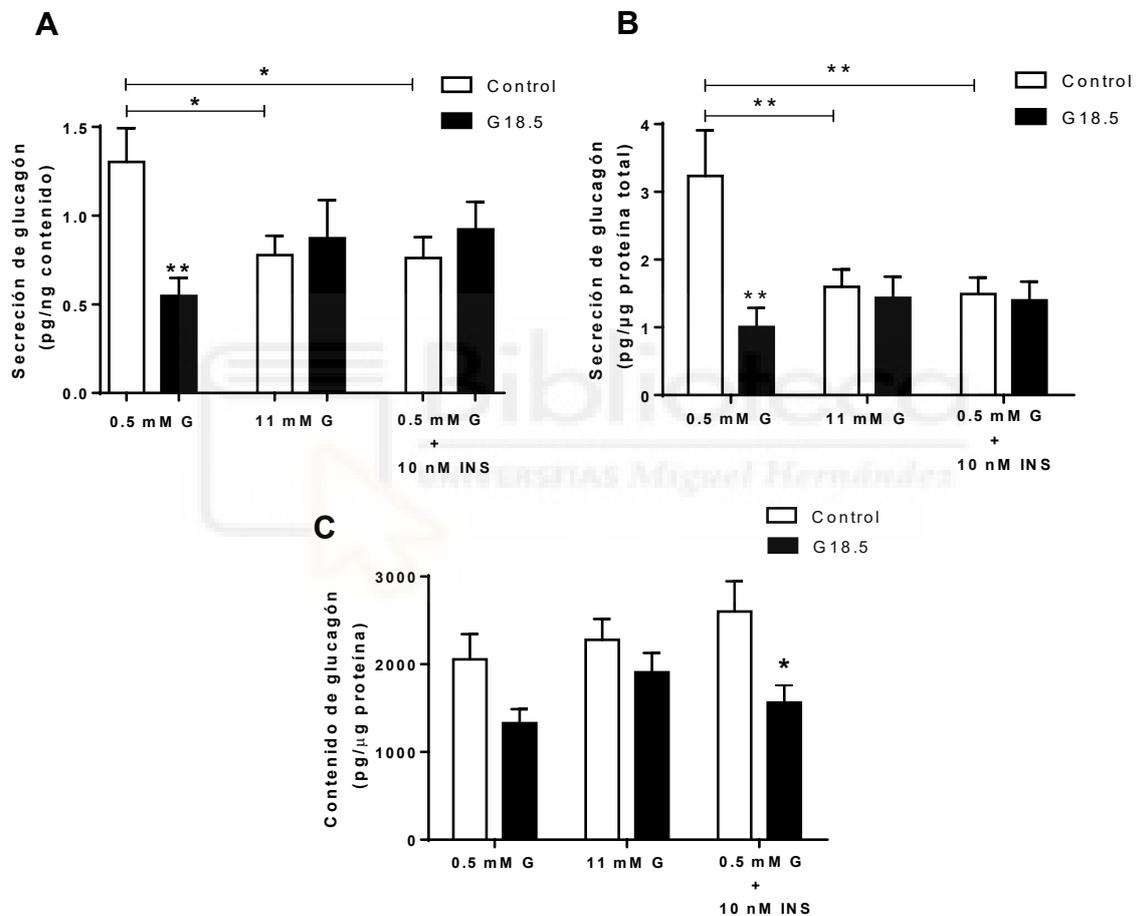


Figura 16: Disminución de la secreción de glucagón a 0.5mM G (glucosa) en las ratonas preñadas G18.5. (A) Secreción de glucagón normalizada por el contenido, a partir de islotes aislados frescos procedentes de ratonas control no preñadas y ratonas preñadas G18.5, a 0.5 mM G, 11 mM G y 10 nM insulina (INS) (n=18-19 ratonas control; n=11 ratonas preñadas G18.5). (B) Secreción de glucagón normalizada por la proteína total procedente de islotes aislados frescos procedentes de ratonas control no preñadas y ratonas preñadas G18.5 a 0.5 mM G, 11 mM G y 10 nM insulina (INS) (n=18-19 ratonas control; n=11 ratonas preñadas G18.5). (C) Contenido de glucagón normalizado por proteína en ratonas no preñadas y ratonas gestantes G18.5 (n=20 y n=13, respectivamente). Los valores representan las medias \pm SEM. *p<0.05; **p<0.01 Two-way ANOVA seguido por el post-test para comparaciones múltiples Bonferroni.

Tras la incubación de forma independiente, de grupos de islotes procedentes de ratonas control y ratonas G18.5 con los medios de secreción con los distintos estímulos, se analizaron los medios empleando un kit de ELISA para la hormona glucagón. Se observó que, mientras que los islotes de las hembras control no preñadas respondían de forma adecuada a los diferentes estímulos, la secreción de glucagón estaba disminuida aproximadamente en un 60% a 0.5 mM glucosa en los islotes de las ratonas G18.5 (Figura 16A). Los mismos resultados se obtuvieron al normalizar la secreción de glucagón por el contenido total de proteína de los islotes (Figura 16B). En cuanto al contenido global de glucagón, este se encuentra disminuido en los islotes de las hembras preñadas G18.5 comparado con los islotes de las hembras no preñadas, aunque sólo encontramos significancia estadística en los islotes expuestos al estímulo 0.5 mM G + 10 nM insulina (Figura 16C).

8. La movilización de calcio al interior celular en respuesta a glucosa no se ve alterada durante la gestación.

Con el fin de seguir estudiando la función de las células α pancreáticas durante la gestación y basándonos en los resultados anteriores donde observamos una alteración en la secreción de glucagón en las ratonas preñadas, nos dispusimos a analizar cambios en el patrón oscilatorio de este ion mediante experimentos de imagen de calcio. Como ya sabemos, el calcio juega un papel muy importante en el acoplamiento estímulo-secreción. Bajas concentraciones de glucosa en plasma promueven un incremento de la concentración de calcio intracelular, por la entrada del mismo en la célula α , desencadenando la movilización y exocitosis de los gránulos de glucagón. Por consiguiente, alteraciones en los niveles de calcio intracelular podrían estar afectando a la capacidad secretora de las células α . Mediante el empleo de la tecnología confocal se llevaron a cabo experimentos de microfluorimetría en islotes de Langerhans intactos de ratonas control no preñadas y ratonas G18.5, mediante el empleo de la sonda fluo-4. Así, analizamos la frecuencia de las señales oscilatorias de calcio (oscilaciones/min) a una concentración de glucosa estimuladora (0.5 mM G) y a una concentración de glucosa inhibitoria (11 mM G) para las células α . Para la identificación de las células α , empleamos su característica respuesta oscilatoria a baja glucosa y su inhibición a 11 mM glucosa (Nadal *et al.*, 1999, Quesada *et al.*, 1999), así como a adrenalina, siendo la respuesta a esta última específica de este tipo celular (Hamilton *et al.*, 2018). Sin embargo, como parte de las células α no respondieron a adrenalina (registros mostrados

en figura 17B), decidimos considerar como criterio de identificación tan sólo las respuestas a glucosa (Nadal *et al.*, 1999, 1999, Quesada *et al.*, 1999).

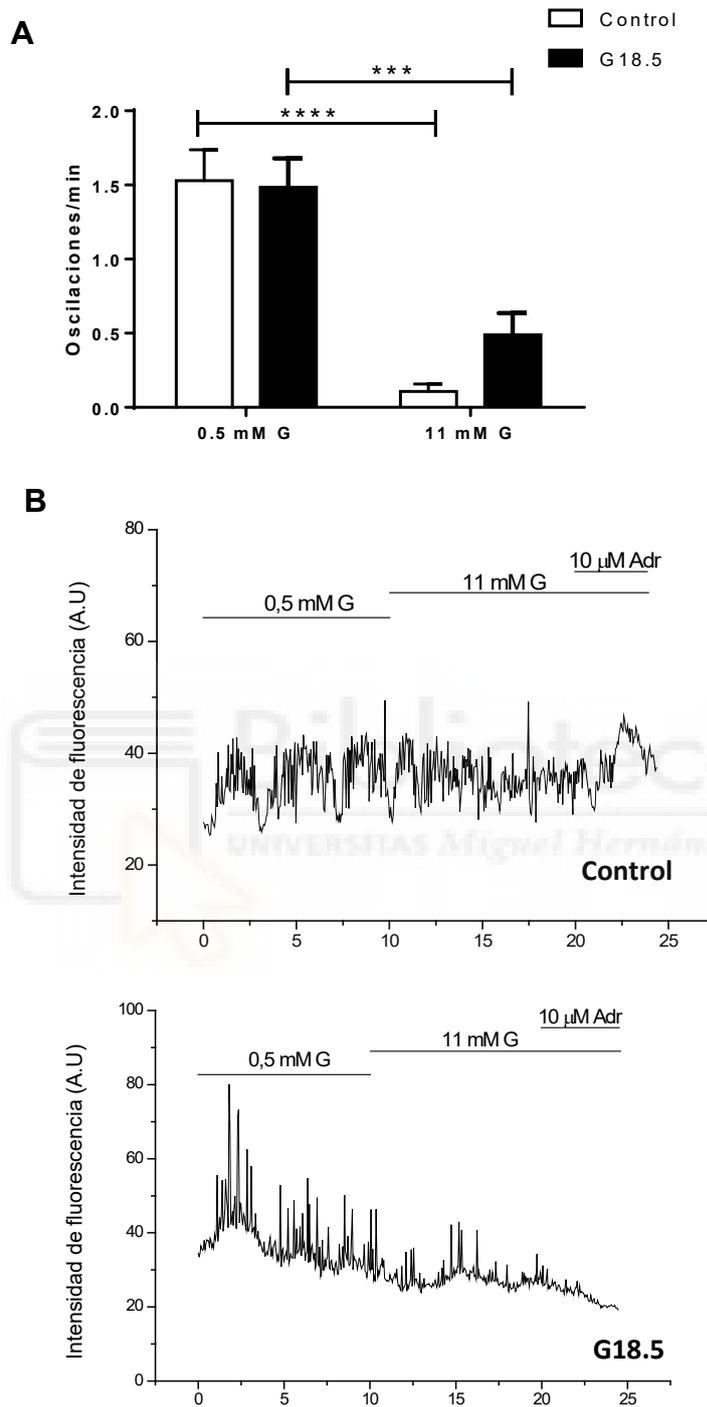


Figura 17: Señalización intracelular de calcio en la célula α de ratonas preñadas G18.5 y ratonas control. (A) Frecuencia de oscilación expresada como oscilaciones /minuto en hembras control y hembras preñadas G18.5 (n= 15-19 células α analizadas, de un total de n=21 islotes control y n=27 islotes G18.5 registrados). **(B)(C)** Registros representativos de la señal de Ca^{2+} en respuesta a los diferentes estímulos. Cada gráfica corresponde al registro de una única célula α dentro de un islote de Langerhans intacto en el grupo control y G18.5. (cont.)

Figura 17 (cont.) La respuesta a adrenalina se tomó como criterio identificativo de células α , adicional a la respuesta característica a 0.5 mM G, prevaleciendo siempre este último, ya que como podemos ver algunas células α (como en la gráfica de las hembras no preñadas) no responden a adrenalina. Los valores representan las medias \pm SEM. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ Two-way ANOVA seguido por el post-test para comparaciones múltiples Bonferroni.

Observamos como el patrón oscilatorio tanto a baja glucosa (0.5 mM G), como a alta glucosa (11 mM G), no se ve alterado al comparar las hembras preñadas G18.5 con los controles. En ambos casos, encontramos que las células α presentan su máxima actividad oscilatoria a una concentración de glucosa estimuladora (Control: 1.53 ± 0.21 oscilaciones/min; G18.5: 1.48 ± 0.19 oscilaciones/min), inhibiéndose al pasar a una concentración de glucosa alta (11 mM) (Control: 0.11 ± 0.05 oscilaciones/min; G18.5: 0.49 ± 0.15 oscilaciones/min) (Figura 17A).

9. Las hormonas lactogénicas (PL y PRL) y el estradiol afectan a la proliferación en la línea celular secretora de glucagón α -TC1.9.

Durante la preñez, las hormonas gestacionales (PL, PRL, P y E_2) son las principales mediadoras de las adaptaciones que tienen lugar en la célula β pancreática como respuesta a la desensibilización a la insulina que tiene lugar en tejidos periféricos. Estas hormonas, y en concreto las hormonas lactogénicas (PL y PRL) son las encargadas de promover y regular la expansión de la masa de célula β que se produce hacia la mitad de la gestación en el ratón. Es por ello que decidimos estudiar el papel de estas hormonas en las adaptaciones de la célula α descritas en el presente trabajo. Para ello se realizó un tratamiento crónico de 8 días de duración usando la línea celular secretora de glucagón α -TC1.9 con las distintas hormonas gestacionales. Se emplearon concentraciones en los rangos que se han descrito durante la gestación en el ratón. Se observó un aumento de proliferación (medido como un valor porcentual de células positivas para BrdU respecto de las células tratadas con el vehículo) en las células tratadas con lactógeno placentario (1.23 ± 0.06) y prolactina (1.24 ± 0.08), comparado con las células tratadas con el vehículo DMSO (1.00 ± 0.06). Por su parte, el tratamiento de las células α -TC1.9 con la hormona estradiol resultó en una disminución de la proliferación (0.73 ± 0.08) (Figura 18).

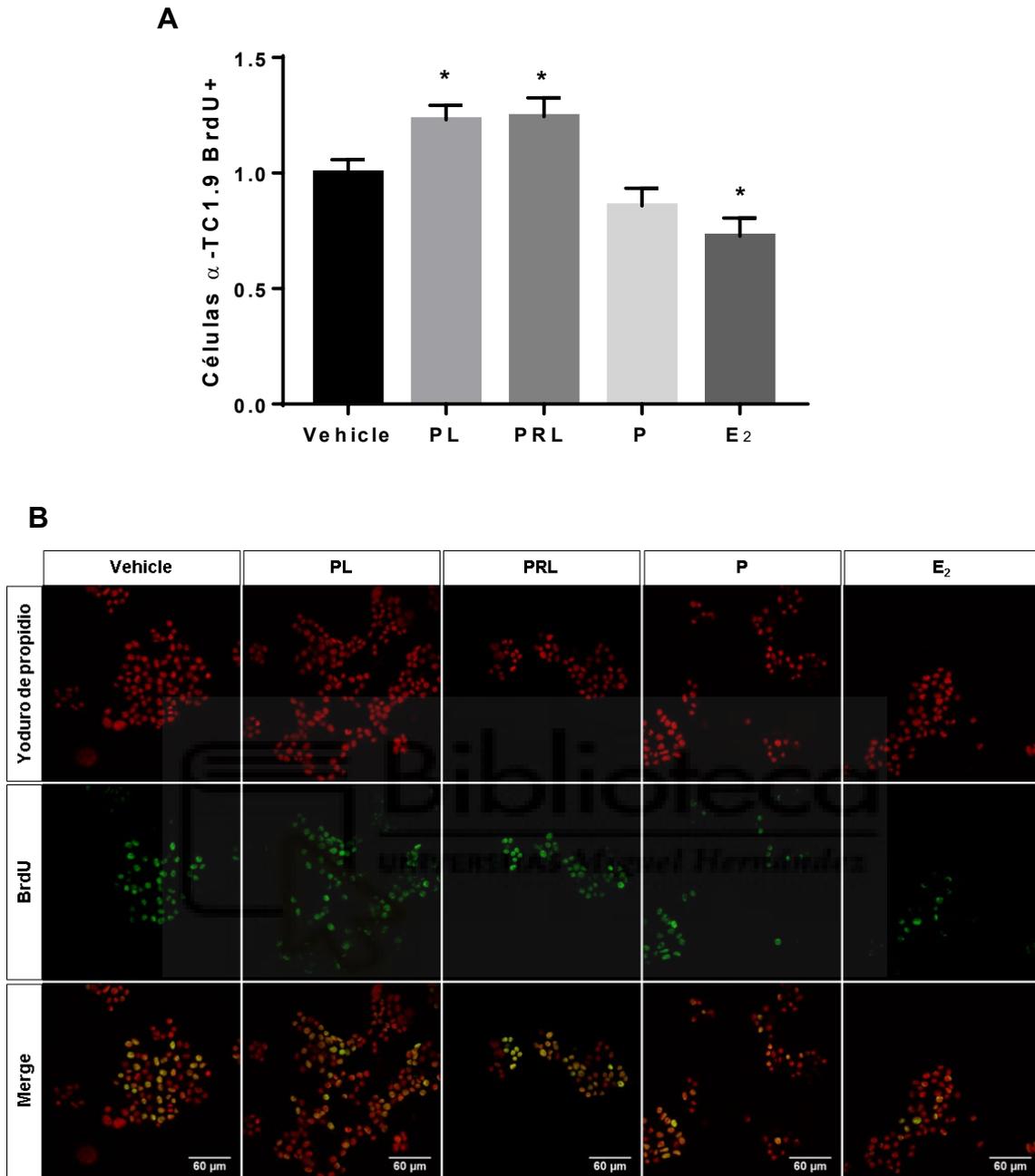


Figura 18: Efecto de las hormonas gestacionales PL, PRL, P y E₂ sobre la proliferación de las células secretoras de glucagón α -TC1.9. (A) Cuantificación de las células positivas para BrdU relativa a la cuantificación de la condición control (Vehículo) en las células α -TC1.9 tratadas durante 8 días con PL (500 ng/mL), PRL (500 ng/mL), P (100 ng/mL) y E₂ (100 pmol/L). Se llevaron a cabo tres experimentos independientes (n=8 cubres por condición; habiendo contado al menos 2000 células por cubre). (B) Imágenes representativas de las células α -TC1.9, tratadas con las diferentes hormonas gestacionales, marcadas frente a yoduro de propidio (rojo) como marcador nuclear, y BrdU (verde). Los valores representan las medias \pm SEM. *p<0.05 One way-ANOVA seguido del post-test sin corrección para comparaciones múltiples Fisher's LSD test.

10. La secreción de glucagón en la línea celular α -TC1.9 se encuentra alterada tras el tratamiento crónico con las hormonas gestacionales.

La secreción de glucagón es otro de los procesos en los que se observó una adaptación en las hembras preñadas en día de gestación G18.5, como se ha expuesto anteriormente. Es por ello que se decidió explorar si las hormonas gestacionales podían estar implicadas en la regulación de dicha adaptación como se ha descrito con la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas durante la gestación. Mediante el empleo de la línea celular secretora de glucagón α -TC1.9, utilizando concentraciones descritas en el rango de la gestación para cada una de las hormonas y un tratamiento crónico de 8 días, pudimos observar los siguientes resultados. Los valores de secreción de glucagón normalizados por el contenido total de dicha hormona indicaron que las células tratadas con el vehículo DMSO presentaban la respuesta característica a los distintos estímulos: respondieron de forma adecuada tanto a los potenciadores de la secreción de glucagón, 0.5 mM glucosa (6.33 ± 1.08 pg/ng), como a los estímulos inhibidores de la misma, 11 mM glucosa (2.63 ± 0.35 pg/ng) y 0.5 mM glucosa + 10 nM insulina (3.93 ± 0.48 pg/ng). Por otro lado, las células tratadas de forma independiente con las hormonas PL, PRL y E_2 presentaban una alteración en la secreción de glucagón a baja glucosa (0.5 mM glucosa), encontrándose la misma disminuida con respecto de las células tratadas con el vehículo (Figura 19A). Los valores obtenidos en pg/ng fueron los siguientes: Veh = 6.33 ± 1.08 ; PL = 3.98 ± 0.42 ; PRL = 3.00 ± 0.38 ; E_2 = 3.21 ± 0.51 (Figura 19A). Asimismo, el tratamiento con la hormona PRL provocó un ligero aumento de la secreción de glucagón a 11 mM glucosa en las células α -TC1.9 (4.84 ± 0.74 pg/ng), comparadas con el control (2.63 ± 0.35 pg/ng) (Figura 19A). La secreción de glucagón normalizada por el contenido de proteína total mostró efectos similares (Fig. 19B). En cuanto al contenido de glucagón, no se observaron diferencias entre las células sometidas a los distintos tratamientos (Tabla 2). Los valores del contenido de glucagón normalizado por la proteína total para cada tratamiento y estímulo se encuentran detallados en la tabla 2. Estos resultados, pertenecientes a tres réplicas experimentales independientes, nos sugieren que las hormonas gestacionales PL, PRL y E_2 son capaces de alterar la secreción de glucagón en la línea celular y por tanto presentar un papel potencial como reguladoras de esta adaptación en la célula α durante la gestación.

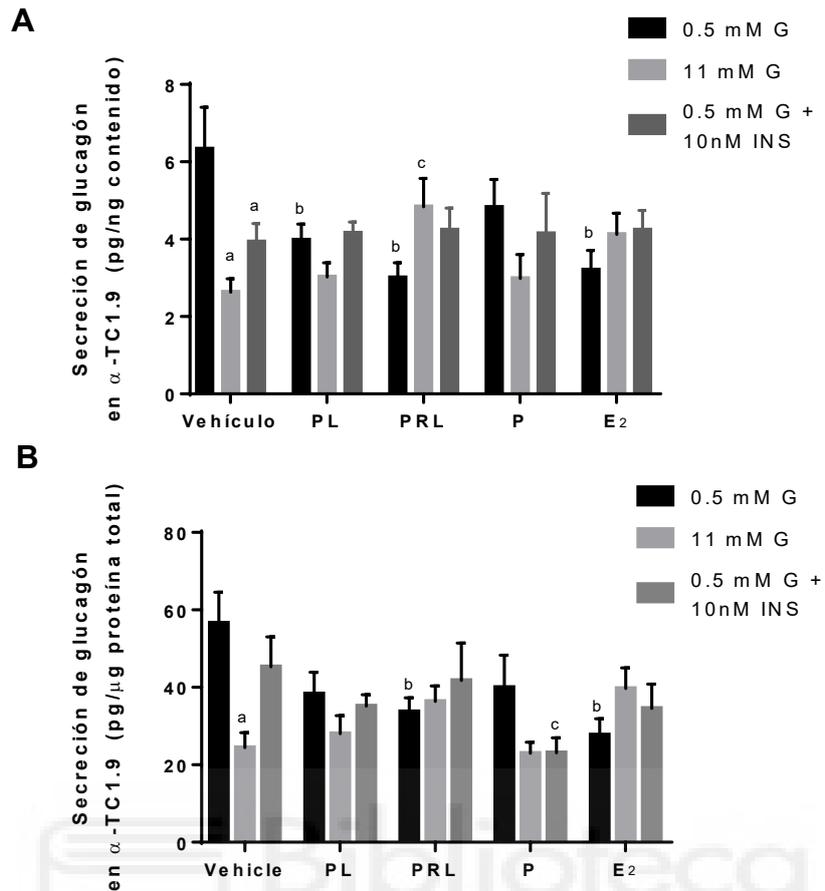
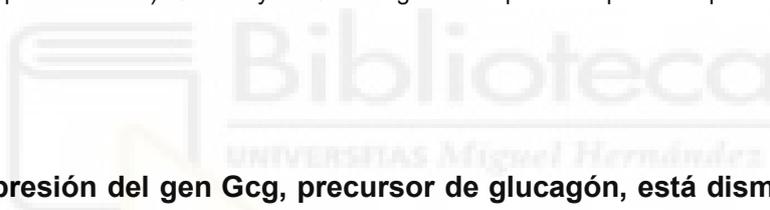


Figura 19: Efecto de las hormonas gestacionales sobre las secreción y contenido de glucagón en las células α -TC1.9. Las células fueron tratadas durante 8 días con PL (500 ng/mL), PRL (500 ng/mL), P (100 ng/mL) y E2 (100 pmol/L), por separado. **(A)** Secreción de glucagón, normalizada por el contenido, tras una hora de incubación con los siguientes estímulos: 0.5 mM G, 11 mM G y 0.5 mM G + 10 nM INS. **(B)** Secreción de glucagón normalizada por la proteína total en las células α -TC1.9, tras una hora de incubación con los siguientes estímulos: 0.5 mM G, 11 mM G y 0.5 mM G + 10 nM INS. Los valores representan las medias \pm SEM. Two-way ANOVA seguido por el post-test para comparaciones múltiples Bonferroni (A), donde las letras indican $p < 0.05$: a, 11 mM G y 0.5 mM G + 10 nM INS versus 0.5 mM G en el vehículo; b, 0.5 mM G en las células tratadas con hormonas gestacionales versus 0.5 mM G en las células tratadas con el vehículo; c, 11 mM G en las tratadas con PRL versus 11 mM G vehículo. Two-way ANOVA seguido por el post-test para comparaciones múltiples Bonferroni (B), donde las letras indican $p < 0.05$: a, 11 mM G versus 0.5 mM G en el vehículo; b, 0.5 mM G en las células tratadas con hormonas gestacionales versus 0.5 mM G en las células tratadas con el vehículo; c, 0.5 mM G + 10 nM INS en las tratadas con P versus 0.5 mM G + 10 nM INS vehículo.

	Vehículo	PL	PRL	P	E₂
0.5 mM G	8050.2 ± 667.5	9370.4 ± 1212	10521.2 ± 1107	8538.2 ± 1337	8553 ± 1052
11 mM G	9658.6 ± 1008	10001.9 ± 1187	10450.3 ± 1195	10450.9 ± 2164	9095.1 ± 1019
0.5 mM G + 10 nM INS	9467.4 ± 770.4	10099.4 ± 1092	9830.8 ± 1640	9297.3 ± 1487	9667.1 ± 1333

Tabla 2: Valores del contenido medio de glucagón en las células α -TC1.9 normalizado por proteína total (ng/ μ g) a 0.5 mM G, 11 mM G y 0.5 mM G + 10 nM INS, para cada uno de los tratamientos con las hormonas gestacionales y el vehículo DMSO. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes (n=8-9 pocillos por condición). One-way ANOVA seguido del post-test para comparaciones múltiples de Dunnet.



11. La expresión del gen Gcg, precursor de glucagón, está disminuida en las células α -TC1.9 expuestas a estradiol.

Basándonos en los resultados obtenidos en la línea celular α -TC1.9 tratada con las hormonas gestacionales, nos propusimos investigar el efecto de dichas hormonas sobre la expresión del gen Gcg, que codifica para el precursor de glucagón (proglucagón). Para ello se trataron las células durante 8 días con las distintas hormonas gestacionales de manera independiente empleando las mismas concentraciones que en los experimentos anteriores. Tras el análisis de los experimentos, encontramos que las células tratadas con 100 pM estradiol presentaban una disminución significativa cercana al 30% de la expresión del RNAm del gen de proglucagón (Gcg), al compararlo con la expresión de las células tratadas con el vehículo DMSO (Figura 20).

El tratamiento con el resto de hormonas gestacionales no tuvo ningún efecto a nivel de expresión en la línea celular α -TC1.9.

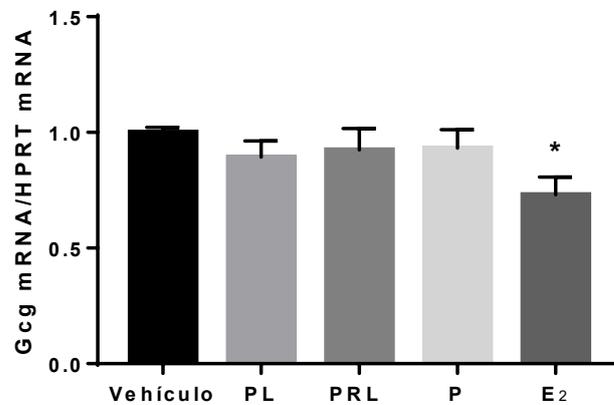


Figura 20: Las células secretoras de glucagón, α -TC1.9, tratadas con estradiol presentan una reducción en la expresión del ARNm del gen Gcg. Expresión del ARNm del gen del proglucagón (Gcg) en las células tratadas con las hormonas gestacionales, relativa a la expresión en las células tratadas con el vehículo. Los niveles de expresión del gen Gcg se expresaron respecto de los niveles de expresión de un gen de expresión constitutiva o Housekeeping, el gen HPRT. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes (n=6 pocillos por condición). Los valores representan las medias \pm SEM. * $p < 0.05$ One-way ANOVA seguido del post test para comparaciones múltiples de Dunnet.



Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

DISCUSIÓN

1. El páncreas endocrino durante la gestación.

Durante la gestación, la madre experimenta importantes cambios metabólicos y hormonales con el fin de satisfacer los requerimientos energéticos del feto en crecimiento. Entre estos cambios, se produce un aumento de la resistencia a la insulina en tejidos periféricos para asegurar el mantenimiento del gradiente de glucosa que se establece entre madre y feto. Este gradiente de concentración de glucosa es clave, ya que el transporte de glucosa de la madre al feto a través de la placenta tiene lugar mediante transportadores de glucosa (GLUTs) (Baumann *et al.*, 2002, Nolan and Proietto, 1994). Por ello, para mantener una adecuada homeostasis de la glucosa en este particular ambiente fisiológico de resistencia a la insulina, se requiere que tengan lugar importantes adaptaciones en la célula β pancreática, tanto a nivel morfológico como funcional, para aumentar la secreción hormonal de insulina compensando así la pérdida de sensibilidad periférica a la misma. Las hormonas gestacionales, esenciales para el mantenimiento de la gestación, juegan un papel clave tanto en el desarrollo de la resistencia a la insulina, como en las adaptaciones de la célula β durante la gestación (Sorenson *et al.*, 1997, Baeyens *et al.*, 2016, Napso *et al.*, 2018). Sin embargo, cuando estas adaptaciones se producen de manera inadecuada, pueden conducir a una alteración en la homeostasis de la glucosa y al desarrollo de GDM. El desarrollo de estas patologías supone importantes efectos negativos, tanto a corto como a largo plazo, para la salud de la madre y del feto. Entre estos efectos perjudiciales encontramos, aumento del riesgo de padecer T2DM post-parto en el caso de la madre y un aumento del riesgo en la descendencia de padecer obesidad, síndrome metabólico o T2DM en la vida adulta.

En los últimos años se ha descrito que las alteraciones en la masa y en la secreción de la célula α pancreática estarían involucradas en la etiopatología de la T2DM y en el desarrollo de hiperglucemia (Gromada *et al.*, 2018, Quesada *et al.*, 2008). Además existen algunos trabajos que también indican que alteraciones en la secreción de glucagón durante el embarazo podrían estar relacionadas con el desarrollo de diabetes gestacional (Grigorakis *et al.*, 2000). Sin embargo, a pesar de que sabemos que en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa son cruciales tanto las células β como las α , y de las evidencias que muestran la importancia de estas últimas en el desarrollo de la diabetes, la información acerca de las adaptaciones de la célula α pancreática durante la gestación son prácticamente inexistentes. Por todo ello, y basándonos en estudios previos en otros modelos de resistencia a la insulina como la obesidad, donde se describen diversas adaptaciones morfológicas y a nivel de la secreción de glucagón (Merino *et al.*, 2015), hemos querido analizar en el presente

estudio qué cambios tienen lugar en la célula α pancreática durante el embarazo. Nuestro modelo experimental se compone de ratonas preñadas C57BL/6, en diferentes días de gestación, empleadas para estudiar las características morfofuncionales de la célula α pancreática durante este particular estado fisiológico en las madres.

2. Adaptaciones morfológicas de la célula α pancreática durante la gestación.

Comenzamos la caracterización de la célula α pancreática durante la gestación atendiendo a las potenciales adaptaciones estructurales o morfológicas de este tipo celular que desarrollan las ratonas a lo largo de la gestación. Para ello, se estudiaron *in vivo* ratonas preñadas en diferentes días de gestación (G12.5, G15.5 y G18.5) en los que se han caracterizado previamente las principales adaptaciones de las células β pancreáticas (Beamish *et al.*, 2017, Rieck and Kaestner, 2010, Sorenson and Brelje, 1997). Empleando anticuerpos contra la hormona glucagón como elemento identificador de las células α productoras de esta hormona, nuestros datos muestran que tanto el área de célula α como la masa de la misma se encuentran aumentadas en el día de gestación G18.5, al compararlas con las ratonas control no preñadas. Además, nuestros resultados muestran una hipertrofia celular en este mismo día de gestación. Estos resultados concuerdan con un estudio previo en el que se observó un aumento de la masa de la célula α , así como un aumento del tamaño celular durante la gestación, en un periodo de tiempo similar (Xu *et al.*, 2015). Al analizar el número de células α para cada uno de los grupos, encontramos que existe una tendencia al aumento en las ratonas G18.5, pero sin resultar estadísticamente significativo. Este resultado podría ser debido a limitaciones de la técnica para cuantificar este parámetro, ya que se utilizó microscopía óptica convencional. El uso de microscopía confocal podría ofrecer una mayor resolución en este sentido al poder contabilizar células en distintos planos focales, evitando el problema de posibles solapamientos entre las mismas o dificultades para encontrar los límites definidos de las células. Por ello se llevó a cabo un análisis de proliferación, *in vivo*, empleando la proteína nuclear Ki67, como marcador de células α que se encuentran en las fases activas del ciclo celular (G1, G2, S y mitosis). Este marcador ofrece resultados mucho más precisos que otros empleados clásicamente, como el PCNA, ya que este último es menos específico como marcador de proliferación, ya que no sólo se detecta en células en proceso activo de división, sino en aquellas células en las que se está produciendo reparación del DNA, generando así falsos positivos (Jurikova *et al.*, 2016). Además, se ha visto que existe una correlación pobre entre los resultados de tinción inmunohistoquímica de estas dos proteínas (PCNA y

Ki67). A este respecto, nuestros datos muestran un aumento significativo de la proliferación de la célula α en el día de gestación G18.5, indicando que este mecanismo junto con la hipertrofia celular serían los principales responsables de la expansión de la masa de célula α observada en las ratonas preñadas. Una situación similar ha sido observada en la adaptación morfológica de la célula β a la gestación, donde la proliferación y el aumento del tamaño celular se postulan como los mayores contribuyentes a la expansión de este tipo celular (Rieck and Kaestner, 2010, Xu *et al.*, 2015). Múltiples estudios describen un aumento de proliferación en célula beta pancreática en etapas similares (Beamish *et al.*, 2017, Huang *et al.*, 2009, Karnik *et al.*, 2007, Kim, H. *et al.*, 2010, Moffett *et al.*, 2014).

Con el propósito de analizar otros factores que pudieran estar implicados en la regulación de la masa de célula α en el día de gestación G18.5, analizamos los niveles de apoptosis. En el caso de la célula β pancreática, varios trabajos han descrito que uno de los mecanismos que contribuye a la expansión de la masa de célula β durante la gestación es el descenso de la tasa de apoptosis (Butler *et al.*, 2010, Fujinaka *et al.*, 2007, Huang *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros datos sugieren que, en el caso del incremento de la masa de célula α en el día de gestación G18.5, no estarían implicados cambios en la tasa de apoptosis celular, ya que los niveles de apoptosis son similares y permanecen muy bajos tanto en las ratonas preñadas como en las ratonas control. Este resultado era esperable ya que la tasa de apoptosis de la célula α es muy baja en ratones control no gestantes (Nielsen *et al.*, 2016). Además, estudios con células α y β purificadas han demostrado que las células α presentan una mayor resistencia a estímulos proapoptóticos como el palmitato que las células β . Esta mayor resistencia es debida a la mayor expresión de proteínas antiapoptóticas (Marroqui *et al.*, 2015).

Igualmente, analizamos la contribución que a esta expansión podrían tener otras fuentes diferentes a la división de la célula α . Este planteamiento se apoyaba en varios estudios en célula β , en los que empleando análisis de “tracing” del linaje celular en ratonas preñadas, se obtuvieron resultados que apuntan en esa dirección (Abouna *et al.*, 2010, Toselli *et al.*, 2014). En ellos se postula que, en la expansión de la masa de célula β , hasta un 10-25 % de estas células podrían provenir de otras fuentes celulares, y no de otras células β preexistentes (Banerjee, 2018). Sin embargo, el papel de la neogénesis a partir de progenitores diferentes de la célula β durante el embarazo es todavía incierto según estudios en ratón. En cambio, estudios realizados con muestras humanas han propuesto que la neogénesis de células β a partir de células del ducto podría ser incluso más importante que la proliferación en el crecimiento de la masa de célula β durante la gestación humana (Butler *et al.*, 2010). Sin embargo, esta idea sigue

siendo controvertida a día de hoy. Los críticos con el estudio de Butler *et al.*, argumentan que estos resultados deben ser tenidos en cuenta con precaución ya que las muestras obtenidas pertenecen a tiempos de gestación o estadios diferentes, pero fueron analizadas todas en conjunto. De este modo, si la proliferación y muerte celular ocurren en una estrecha ventana temporal durante la gestación, como ocurre en el ratón, es posible que aumentos en la proliferación y cambios en la apoptosis de la célula β podrían diluirse en el amplio rango de edades gestacionales analizadas. Además, las conclusiones de este estudio se basaron en análisis indirectos tras la observación de que, en las muestras de mujeres embarazadas, existía un mayor número de islotes pequeños y células β aisladas. Este parámetro se utilizó como un indicador de neogénesis al no disponer de un análisis de rastreo del linaje de la célula β en humanos. Igualmente, habría que añadir que otros estudios no han sido capaces de detectar neogénesis en la célula β durante la gestación (Parsons *et al.*, 1995, Zhao, 2014). En nuestro caso, los resultados muestran que no existen diferencias en el porcentaje de células α positivas para el marcador ductal PanCK, entre el grupo de ratonas G18.5 y los controles. Estos resultados sugieren que la neogénesis a partir de células de los ductos pancreáticos no representa una fuente de células α que contribuya al crecimiento de la masa de este tipo celular durante la gestación. Por tanto, estas observaciones estarían en consonancia con los resultados de estudios mencionados anteriormente en los que no se observa neogénesis de célula β durante la gestación. Los procesos de transdiferenciación tampoco parecen contribuir a la expansión de la masa de célula α observada en las ratonas preñadas, ya que el porcentaje de células bihormonales, doble positivas para las hormonas glucagón e insulina, es muy bajo y similar en ambos grupos. Existen estudios llevados a cabo en modelos animales modificados genéticamente y/o determinadas condiciones fisiopatológicas, donde se ha observado transdiferenciación entre las distintas poblaciones celulares del islote de Langerhans (Cigliola *et al.*, 2018, Piran *et al.*, 2014). Por tanto, si bien estos procesos de transdiferenciación serían más activos en condiciones patológicas, tendrían una menor relevancia en situaciones de adaptaciones fisiológicas como el embarazo.

3. Las hormonas gestacionales PL, PRL y E_2 son potenciales reguladoras de la masa de célula α durante la preñez.

Las hormonas gestacionales, esenciales para el mantenimiento del embarazo, cumplen importantes funciones en la adaptación del organismo materno a la gestación, permitiendo que se mantenga un equilibrio energético óptimo entre la madre y el feto en

crecimiento. Estas hormonas son importantes reguladores de los cambios estructurales que el páncreas endocrino de la madre experimenta durante la gestación. Como ya hemos mencionado anteriormente, la pérdida de sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos, promueve importantes cambios morfológicos en los islotes de Langerhans. En la expansión de la célula β pancreática, la proliferación es promovida y regulada por las hormonas lactogénicas PRL y PL (Baeyens *et al.*, 2016, Karnik *et al.*, 2007, Parsons *et al.*, 1992, Vasavada *et al.*, 2000). Ambas hormonas ejercen su función sobre las células β a través del mismo receptor, la isoforma larga del PRLr (Huang *et al.*, 2009), activando la vía de señalización JAK2/STAT5 (Brelje *et al.*, 2002). La activación de esta vía supone que las proteínas STAT (de sus siglas en inglés, *signal transducers and activators of transcription*) presentes en el citoplasma celular, en concreto STAT5, es activada por JAK2. Este proceso implica su fosforilización, generando un dímero que se transloca al núcleo celular, donde se une a elementos específicos del DNA, modulando la expresión de genes diana al actuar como factor de transcripción. Sin embargo, otras hormonas como E₂ y P también podrían jugar un papel en este proceso de replicación (Jacovetti *et al.*, 2012, Sorenson *et al.*, 1993). De este modo, y basándonos en estas evidencias, analizamos el efecto de las hormonas gestacionales en la línea celular secretora de glucagón α -TC1.9. El empleo de esta línea celular nos ofrecía una gran herramienta para tratar con las distintas hormonas gestacionales, de forma independiente, células capaces de producir y secretar la hormona glucagón. El empleo de esta línea celular permitió realizar numerosos análisis *in vitro*, ante la imposibilidad de disponer de un cultivo enriquecido de células α procedentes de los islotes de las ratonas, al no disponer de la tecnología de citometría de flujo para realizar la separación de los distintos tipos celulares de los mismos. De esta manera, tras un cultivo de 8 días, empleando concentraciones fisiológicas de estas hormonas durante la gestación, y empleando en las últimas 24 horas de cultivo BrdU como marcador de células en división, observamos que tanto el PL como la PRL tenían un efecto positivo sobre la proliferación de las células α -TC1.9, coincidiendo con efectos similares descritos en las células β (Sorenson *et al.*, 1997). En cuanto a la vía de activación y señalización por parte de estas hormonas, ha sido publicado que, al igual que en las células β , el PRLr estaría presente en las células α pancreáticas (Freemark *et al.*, 1997, Sorenson and Stout, 1995). Sin embargo, parece que la unión de PL y PRL a su receptor en las células α , activaría una vía de señalización distinta a JAK2/STAT5, debido a la ausencia de translocación nuclear de STAT5B en este tipo celular (Brelje *et al.*, 2002). Por tanto, otras rutas deben mediar la activación del receptor de PRL en la célula α , tal como se ha descrito en otros tipos celulares incluyendo la célula β pancreática (Binart *et al.* 2010). Además, se ha observado que ratones con una delección para Stat5a/b en las células β

pancreáticas, no presentan defectos discernibles en el desarrollo de estas células, aunque sí se ha visto que las ratonas preñadas con esta delección presentan una moderada intolerancia a la glucosa (Lee, J. Y. *et al.*, 2007). Este fenotipo es mucho más leve que el observado en ratones PRLr-null, que presentan una copia no funcional para el gen del receptor de prolactina. Estos ratones presentan una masa de célula β reducida, menor densidad celular en el islote, una disminución en la secreción de insulina y una tolerancia a glucosa alterada (Huang *et al.*, 2009). Estas evidencias sugieren que la proteína STAT5 por sí sola no es la responsable de todos los efectos mediados por prolactina en la célula β (Gorvin, 2015), y que una parte de estos efectos podrían estar regulados por otras vías alternativas, como podría ocurrir con las células α pancreáticas. Nuestros resultados empleando la línea celular α -TC1.9 parecen sugerir que, en las células α , las hormonas PL y PRL estarían actuando a través de la isoforma corta de PRLr, que no es fosforilada por una tirosina, lo cual previene que interactúe directamente con proteínas como STAT. Sin embargo, es capaz de activar vías de señalización que incluyen otras quinasas como MAPK y PI3K capaces de actuar sobre genes diana implicados en eventos de proliferación y diferenciación, como ha sido observado en otros tipos celulares (Binart *et al.*, 2010). Esto explicaría el hecho de que tengamos un aumento de proliferación al tratar las células con PL y PRL, a pesar de que en las células α parece que no se activa la vía JAK2/STAT5, al menos en rata (Brelje *et al.*, 2002), ya que en este caso la acción de estas hormonas a través de PRLr estaría sucediendo por una vía alternativa.

Sin embargo, a diferencia de las hormonas lactogénicas (PL y PRL), el tratamiento de las células con E_2 produjo una disminución significativa de la proliferación. El efecto del E_2 sobre la proliferación de la célula α no ha sido explorado con anterioridad, por lo que su regulación permanece incierta. Con respecto al papel que esta hormona ejerce sobre la división de la célula β , encontramos estudios con resultados dispares. Algunos trabajos apuntan a que el E_2 revierte parcialmente la incorporación de BrdU inducida por PRL en islotes de rata (Sorenson *et al.*, 1993), mientras que otros estudios más recientes han observado que esta hormona aumenta la proliferación en insulinomas de células INS1 y en células β aisladas de rata tras 48 horas de cultivo (Jacovetti *et al.*, 2012), si bien es cierto que en este último trabajo se utilizaron concentraciones suprafisiológicas (100 nM), lo cual difiere de nuestro estudio. Por tanto, aunque parece que los efectos del E_2 pueden diferir en función de las condiciones experimentales, nuestros resultados apuntan a una disminución de la proliferación de la célula α a una concentración de E_2 fisiológica durante la gestación en el ratón. Por otro lado, la progesterona produjo una tendencia similar no significativa al E_2 , semejante a las

acciones que esta hormona presenta en célula β , donde se ha visto que contrarresta la inducción de la proliferación por parte de PRL y parece clave para la regresión de la masa de célula β al estado basal postparto (Sorenson *et al.*, 1993). En el presente estudio se llevaron a cabo experimentos en los cuales las células fueron tratadas con las hormonas gestacionales de forma independiente, ya que el objetivo principal era describir el papel que podría desempeñar cada una de ellas en la expansión de la masa de célula α . Sin embargo, teniendo en cuenta que en una situación fisiológica se encuentran todas presentes y atendiendo a la dinámica de los niveles de estas hormonas durante la gestación en roedores (Nadal *et al.*, 2009), donde PRL y PL presentan sus valores máximos hacia el final de la gestación, podríamos inferir que estas dos hormonas actuarían de forma sinérgica, siendo las principales responsables del aumento de la masa de célula α , mientras que el E_2 , cuyos niveles comienzan a aumentar en torno al día 17-18 de gestación, podría contribuir a la disminución de la masa de célula α hasta valores control tras el parto. Más estudios en este sentido serían necesarios ya que se trata de una regulación muy compleja en el que intervienen multitud de factores. Por lo tanto, podemos concluir que nuestros resultados arrojan luz sobre el papel de las hormonas gestacionales en las adaptaciones de la célula α , indicando que fundamentalmente PRL, PL y E_2 podrían cumplir una función importante en la regulación de la masa de célula α durante la gestación, tal y como sucede con la masa de célula β (Banerjee, 2018, Rieck and Kaestner, 2010, Sorenson *et al.*, 1993).

4. Adaptaciones funcionales de la célula α pancreática durante la gestación.

El primer objetivo para evaluar las potenciales adaptaciones funcionales de la célula α pancreática durante la gestación fue realizar una caracterización del perfil hormonal (glucagón e insulina) así como los niveles de glucemia, tanto de las hembras control como de las hembras preñadas en día de gestación G18.5, ya que este día de gestación en particular era en el que habíamos observado que se producían todas las adaptaciones morfológicas en las células α pancreáticas. Como se ha descrito en numerosos trabajos, el embarazo promueve que los niveles de insulina en plasma así como la secreción de insulina estimulada por glucosa se vean aumentados, regulándose al alza en las células β (Baeyens *et al.*, 2016, Banerjee, 2018, Napso *et al.*, 2018, Sorenson *et al.*, 1993). Esta regulación es dinámica de manera que estos dos parámetros alcanzan su máximo durante la segunda mitad del embarazo y vuelven a valores basales en momentos cercanos al parto (Parsons *et al.*, 1992, Sorenson and Brelje, 1997). Sin embargo, no existe prácticamente ninguna evidencia de cómo

responden las células α ante este desafío metabólico en cuanto a la secreción de glucagón.

Los niveles de glucemia obtenidos se encontraban disminuidos en las ratonas preñadas G18.5 comparados con las ratonas control, no siendo en ningún caso niveles de glucosa en sangre que pudiéramos considerar patológicos, encontrándose dentro de los rangos normales. Esta reducción de los niveles de glucosa en sangre por debajo de los niveles de las ratonas no preñadas podría responder a la gran demanda de nutrientes que se produce por parte de los fetos en los últimos estadios de la gestación, habiendo sido observado este fenómeno con anterioridad (Canniff *et al.*, 2006, Kahraman *et al.*, 2014). Se ha observado además que si bien la resistencia a la insulina aumenta a medida que progresa la gestación, la sensibilidad a esta hormona vuelve a aumentar hacia valores basales momentos antes del parto, facilitando la adaptación metabólica materna a la situación postparto (Musial *et al.*, 2016). Por tanto, la disminución de la resistencia a la insulina al final de la gestación conjuntamente con valores de insulina superiores a los basales, podría llevar a una situación de ligera hipoglucemia como la que observamos. Las determinaciones hormonales se realizaron empleando el plasma obtenido a partir de sangre recolectada de la vena safena con el animal sin anestésiar, ya que existen estudios que muestran que ciertos compuestos empleados en muchos procedimientos para la anestesia de animales de experimentación pueden alterar los niveles de insulina y glucosa en plasma (Zardooz *et al.*, 2010). Tras aplicar la técnica ELISA para la medición de los niveles de estas hormonas en plasma, observamos que las hembras gestantes G18.5 presentaban una marcada hipoglucagonemia, con unos niveles de glucagón en estado alimentado significativamente disminuidos comparados con los de las ratonas no preñadas, llegando estos niveles a reducirse prácticamente a la mitad. Estos resultados se encuentran en consonancia con otro estudio previo, en el que empleando el mismo modelo animal (ratones C57BL/6) y analizando los niveles de glucagón en plasma en estado alimentado en el mismo día de gestación, obtuvieron los mismos resultados (Moffett *et al.*, 2014). Además, siguiendo esta línea, sabemos que en las mujeres, las concentraciones de glucagón en plasma aumentan durante el primer y segundo trimestre. Sin embargo, hacia el final del embarazo los niveles de glucagón en plasma disminuyen significativamente (Luyckx *et al.*, 1975). De igual modo, la hipoglucagonemia observada en nuestro modelo, reproduce una situación similar a lo que ocurre en otros modelos de resistencia a la insulina como en la obesidad inducida por la dieta HFD (de sus siglas en inglés, *High Fat Diet*) (Merino *et al.*, 2015), en las que encontramos un estado prediabético, caracterizado por resistencia a la insulina, normoglucemia y

alteración de los niveles plasmáticos de glucagón, encontrándose los mismos disminuidos. El descenso en los niveles de glucagón plasmáticos observados en las ratonas preñadas en el día de gestación G18.5 podría ser el resultado de factores directamente relacionados con la gestación como serían las hormonas gestacionales. Algo similar ocurre con el incremento de los niveles de insulina, donde estas hormonas cumplen un papel importante en el aumento de la función de las células β (Napso *et al.*, 2018, Sorenson *et al.*, 1993). Por otro lado, podría deberse al efecto inhibitorio sobre las células α pancreáticas de las secreciones de otras poblaciones celulares del islote de Langerhans, como la insulina y la serotonina (Almaca *et al.*, 2016, Kawamori *et al.*, 2009, Moffett *et al.*, 2014), cuya secreción por parte de las células β se encuentra aumentada durante la gestación (Baeyens *et al.*, 2016, Kim, H. *et al.*, 2010). Por otra parte, observamos que los niveles de insulina en plasma presentan una tendencia al aumento en las ratonas preñadas G18.5, lo cual se correspondería con los resultados obtenidos en estudios previos en ratón, en los que se obtuvieron niveles más altos de insulinemia hacia la mitad de la gestación al compararlos con los niveles de insulina en plasma al final de la gestación o en ratonas control no preñadas (Beamish *et al.*, 2017, Kahraman *et al.*, 2014). Esta mayor insulinemia en el ratón hacia la mitad de la gestación coincidiría con el momento en que las adaptaciones morfológicas de la célula β , es decir, la expansión de la masa de célula β se encuentra en su punto más alto.

Por lo que respecta a la secreción *in vitro* de glucagón a partir de islotes de Langerhans frescos procedentes de ratonas preñadas G18.5 y ratonas control, observamos que existe una disminución de la secreción de dicha hormona a 0.5 mM glucosa en las ratonas gestantes. Este descenso en la secreción de glucagón no puede ser atribuido por completo a cambios en el contenido de esta hormona, ya que aunque disminuido en las ratonas preñadas G18.5, esta reducción no llega a ser estadísticamente significativa en nuestros experimentos, salvo en la condición de baja glucosa (0.5 mM) más 10 nM insulina. Además, encontramos resultados similares tanto al normalizar la secreción de glucagón por el contenido de glucagón o por la proteína total. Este fenómeno ya había sido observado previamente en ratas preñadas, donde la secreción basal de glucagón a partir de islotes aislados se encontraba disminuida en presencia de bajas concentraciones de glucosa (2.5 mM G) (Moes *et al.*, 1993). Esta alteración observada a bajas concentraciones de glucosa en nuestros experimentos, donde se espera que la secreción de glucagón por parte de las células α sea máxima en condiciones normales, no puede ser el resultado de la regulación paracrina por parte de otras hormonas del islote, especialmente insulina o somatostatina, ya que a esta concentración de glucosa estas hormonas no deberían secretarse (Gromada *et al.*,

2018, Quesada *et al.*, 2008, Vieira *et al.*, 2007). Por tanto, la inhibición de la secreción de glucagón en las ratonas preñadas podría reflejar un efecto directo sobre la célula α , siendo probablemente el resultado de la regulación a la baja a nivel de procesos como la sensibilidad a glucosa, transducción de la señal y/o exocitosis. Empleando imagen de calcio para evaluar la función de las células α en los islotes de Langerhans a nivel de la sensibilidad a glucosa, se emplearon concentraciones de glucosa activadoras de la secreción de glucagón (0.5 mM G), así como concentraciones inhibitorias de la misma (11mM G). El resultado obtenido muestra que las células α en ambos grupos, ratonas preñadas G18.5 y ratonas control, efectivamente son capaces de responder a cambios en las concentraciones de glucosa, inhibiéndose la actividad de estas células a altas concentraciones de la misma. Esta actividad es medida como cambios en la frecuencia oscilatoria de las células, expresada como oscilaciones/minuto, correspondiendo estas oscilaciones a movilización o entrada de calcio al interior celular, al citosol. Puesto que no observamos cambios a nivel de la señal de calcio, parece que la disminución de la secreción de glucagón, observada en las ratonas preñadas G18.5, podría deberse muy posiblemente a una alteración a nivel de la maquinaria excitotóxica y del proceso de exocitosis. Una disminución similar en la secreción de glucagón ha sido reportada en ratonas hembra obesas resistentes a la insulina (Merino *et al.*, 2015).

5. Papel de las hormonas gestacionales en las adaptaciones funcionales de la célula α durante la etapa final de la gestación.

A pesar de la importancia de la secreción de glucagón en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y su contribución a la etiología de la diabetes, los mecanismos que controlan la secreción de esta hormona siguen siendo controvertidos, existiendo diversos modelos que explicarían su regulación (Hughes *et al.*, 2018). Basándonos en la posible contribución de las hormonas gestacionales en la expansión de la masa de célula α en las ratonas gestantes mostrada en el presente trabajo, y la relevancia de estas hormonas en las adaptaciones funcionales que tienen lugar en la célula β durante la gestación (Brelje *et al.*, 1993, Brelje *et al.*, 2002, Sorenson and Stout, 1995); se llevaron a cabo experimentos empleando la línea celular α -TC1.9, con el fin de estudiar el efecto de estas hormonas sobre la función de una línea celular productora de glucagón. Al analizar el efecto de las hormonas gestacionales sobre la secreción de glucagón, observamos que el tratamiento con las hormonas lactogénicas (PL y PRL) disminuyen la secreción a 0.5 mM glucosa, tras 8 días de tratamiento. Hasta la actualidad, no hemos encontrado ningún trabajo que estudie directamente el papel de

PRLr en la secreción de glucagón, por lo que el presente estudio nos ofrece los primeros datos sobre una posible implicación de dicho receptor en los cambios en la secreción de glucagón que se producen hacia el final de la gestación en el ratón. Además, encontramos que la secreción de glucagón también estaba disminuida en las células tratadas con E₂ a 0.5 mM glucosa. El estradiol mejora la homeostasis de la glucosa por medio de efectos directos sobre las células β pancreáticas, células α y células L intestinales. En consonancia con nuestros resultados, se ha observado que el tratamiento de un cultivo primario purificado de células α pancreáticas procedentes de ratonas ovariectomizadas con una dosis de 10 nM E₂ durante 48 horas produce una disminución en la secreción de glucagón, acompañada de un aumento de la razón GLP-1/glucagón (Handgraaf *et al.*, 2018). El E₂ además es capaz de modular los niveles de mRNA del gen de proglucagón (Gcg), disminuyendo la expresión de este gen en las células α -TC1.9 tras 8 días de tratamiento comparado con las células tratadas con el vehículo DMSO. En el estudio mencionado anteriormente observaron que el E₂ era capaz de modular genes que codifican para enzimas responsables de la maduración del proglucagón a glucagón funcional, disminuyendo los niveles de mRNA de la prohormona convertasa 1/3 y la prohormona convertasa 2. Sin embargo, la expresión del gen Gcg no se veía afectada tras un tratamiento agudo de 48 horas con altas dosis de estradiol (10 nM). Es posible que la exposición crónica a dosis fisiológicas durante el embarazo (100 pM) pueda modular la síntesis de mRNA del gen de proglucagón (GcG), tal y como hemos observado en el presente trabajo, mientras que exposiciones a dosis suprafisiológicas no tengan efecto (Handgraaf *et al.*, 2018). La implicación de las hormonas gestacionales en la secreción de glucagón por parte de las células α , no había sido referida hasta la fecha, no existiendo estudios que abordaran esta cuestión. Es por ello que a nivel global, nuestros estudios *in vitro* empleando la línea celular nos indican que las hormonas PL, PRL y E₂, probablemente estén implicadas en el efecto inhibitorio observado en la secreción de glucagón a partir de islotes de ratonas preñadas G18.5. En cualquier caso, no podemos descartar la implicación de otras hormonas, dada la complejidad de las señales que regulan las adaptaciones del páncreas endocrino durante la gestación (Napso *et al.*, 2018).

En el presente estudio hemos observado un comportamiento dual por parte de las células α pancreáticas en el embarazo: por un lado aumenta la masa de este tipo celular, mientras que, al mismo tiempo, se constata una disminución de la secreción de glucagón por parte de los islotes pancreáticos así como de los niveles plasmáticos de esta hormona. En este sentido, existen estudios que demuestran que ambos procesos, masa y función, podrían interactuar entre sí. Por ejemplo, la ablación genética tanto de la

prohormona convertasa 2 como del glucagón conducen a la hiperplasia e hipertrofia de la célula α (Furuta *et al.*, 1997, Furuta *et al.*, 2001, Hayashi *et al.*, 2009). Estas adaptaciones a nivel morfológico y estructural en la célula α han sido interpretadas como una respuesta compensatoria a la falta de secreción funcional de la hormona glucagón por parte de estas células, lo que se traduce en un descenso de los niveles de glucagón en plasma, así como una disminución de la señalización por parte del glucagón (Furuta *et al.*, 1997, Hayashi *et al.*, 2009, Hayashi and Seino, 2018). Basándonos en esta hipótesis, es posible que la expansión de la masa de célula α por hiperplasia e hipertrofia celular observada en el presente trabajo en las ratonas preñadas sea una consecuencia o respuesta a la hipoglucagonemia observada en estos animales. No obstante, serían necesarios más experimentos para demostrar la relación causa-efecto de este fenómeno durante la gestación. En cualquier caso, el estudio de este efecto dual masa-función de la población α pancreática durante el embarazo sería complicado de abordar pues la regulación de este tipo celular se realiza en múltiples niveles que implican interacciones complejas entre factores metabólicos, nutrientes, hormonas y sistema nervioso, así como comunicación endocrina y paracrina, entre los diferentes tipos celulares del islote (Quesada *et al.*, 2008; Marroquí *et al.*, 2014). Además, el embarazo implica múltiples cambios a largo plazo en el ambiente materno tanto a nivel fisiológico como metabólico y endocrino; como por ejemplo, el aumento de los niveles de cortisol que se producen en el tercer trimestre de la gestación en los humanos (Jung *et al.*, 2011). Esta hormona además de presentar un papel fundamental en la maduración fetal, sabemos que ejerce importantes efectos sobre la función de las células del islote, como la modulación de la función de la célula β y la secreción de insulina (Fine *et al.*, 2018), que podría contribuir a la adaptación del páncreas endocrino durante la gestación.

Igualmente, este efecto dual *in vivo* durante la gestación podría también deberse a la doble acción de PRL y PL sobre la proliferación y la liberación de glucagón que hemos descrito en las células α -TC1.9. La activación del receptor de la PRL (PRLR) implica la estimulación de al menos tres principales vías de señalización, JAK2/STAT5, MAPK y PI3K, tanto en la célula β pancreática como en otros tipos celulares (Baeyens *et al.*, 2016, Binart *et al.*, 2010). La activación de las cascadas de señalización MAPK o JAK2/STAT5 a través de PRLR, se asocia principalmente a un aumento de la proliferación (Baeyens *et al.*, 2016, Binart *et al.*, 2010). Sin embargo, en la célula α pancreática y en la línea celular α -TC1 la activación de la vía PI3K se ha asociado tanto a una inhibición de la secreción de glucagón (Kawamori *et al.*, 2009, Piro *et al.*, 2010, Quesada *et al.*, 2008), como a un aumento de la proliferación (Liu, Z. *et al.*, 2011, Liu, Z., Stanojevic *et al.*, 2011). Por tanto, es posible, que la activación de PRLR en la célula

α produzca acciones opuestas en la proliferación y secreción, como ocurre en nuestros resultados, vía PI3K. Una situación similar ha sido descrita en el caso de la insulina vía PI3K y GLP-1 a través de la ruta de señalización PKA. Mientras que ambas hormonas disminuyen la secreción de glucagón por parte de las células α pancreáticas y las células α -TC1 (De Marinis *et al.*, 2010, Kawamori *et al.*, 2009, Piro *et al.*, 2010, Quesada *et al.*, 2008), a su vez inducen la proliferación en este tipo celular del islote de Langerhans (Keddes *et al.*, 2009, Lee, Y. S. *et al.*, 2018, Liu, Z. *et al.*, 2011).

En cualquier caso, debemos tomar con precaución los efectos de PRL y PL observados en nuestro modelo *in vitro*, en comparación con las condiciones *in vivo*. Usando enfoques similares a los descritos anteriormente *in vitro* para imitar la exposición a largo plazo a la señalización de estas hormonas durante el embarazo y su efecto sobre la proliferación de células β (Sorenson *et al.*, 1993), expusimos las células α -TC1.9 durante 8 días a las diferentes hormonas gestacionales que pudieran tener un papel clave en el embarazo (Baeyens *et al.*, 2016). Sin embargo, en estas condiciones a largo plazo testadas para la proliferación, la secreción de glucagón de las células α -TC1.9, también podría estar bajo la influencia de una red reguladora multifactorial. Se ha demostrado que el control de la secreción de células α pancreáticas es un proceso complejo, comparado con el de las células β (Gromada *et al.*, 2018, Sandoval and D'Alessio, 2015, Walker *et al.*, 2011). Se ha demostrado que, además del glucagón, las células α pancreáticas también pueden producir y secretar otras moléculas de señalización como GLP-1, acetilcolina, GIP (polipéptido insulínico dependiente de glucosa) y glutamato, las cuales pueden afectar a las células α y beta por regulación autocrina y paracrina respectivamente (Cabrera *et al.*, 2008, Ellingsgaard *et al.*, 2011, Fujita *et al.*, 2010, Rodriguez-Diaz *et al.*, 2011, Sandoval and D'Alessio, 2015, Traub *et al.*, 2017). Estos procesos pueden ser inducidos bajo ciertas condiciones, y generalmente involucran estimulación a largo plazo (como condiciones crónicas *in vitro*), en lugar de modulación aguda a corto plazo. Además, se ha demostrado que varios estímulos como la glucosa o la adrenalina producen un efecto bifásico dependiente de la dosis sobre la liberación de glucagón (De Marinis *et al.*, 2010, Walker *et al.*, 2011), el cual se ha atribuido a la actividad eléctrica particular y patrón de actividad del canal K_{ATP} que regula específicamente la secreción de células α pancreáticas (De Marinis *et al.*, 2010, MacDonald *et al.*, 2007, Walker *et al.*, 2011). Por lo tanto, no podemos descartar totalmente que, en otras condiciones, PRL y PL pueden inducir efectos secretorios alternativos sobre las células α pancreáticas durante el embarazo, lo que representa un escenario complejo con múltiples señales.

En resumen, los hallazgos realizados en el presente trabajo muestran como durante la gestación, las células α pancreáticas experimentan importantes adaptaciones, tanto morfológicas como funcionales, en respuesta a esta condición fisiológica extraordinaria. Además, los datos evidencian la potencial implicación de las hormonas gestacionales, especialmente PL, PRL y E_2 , en la regulación de estos cambios adaptativos, al igual que ocurre con la célula β pancreática durante la gestación. Estas adaptaciones de la célula α , ante una condición de pérdida de sensibilidad a la insulina a nivel periférico, podrían ser cruciales para el mantenimiento de una homeostasis de la glucosa adecuada, favoreciendo un ambiente metabólico óptimo tanto para la madre como para el feto en crecimiento. De hecho, el papel crítico del glucagón durante la gestación ha sido demostrado previamente por estudios que han evidenciado que la interrupción de la señalización de glucagón tiene como resultado defectos fetoplacentarios, así como alteraciones en el ambiente metabólico fetal (Ouhilal *et al.*, 2012). Además, diversos estudios previos han demostrado que el glucagón regula el metabolismo de las células de glucógeno placentarias (Coan *et al.*, 2006, Perlman *et al.*, 1988). Basándonos en la información previa de las que disponemos y ante los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos afirmar que es posible que la función atenuada de las células α , observada en las ratonas preñadas G18.5, tenga como objetivo prevenir una evolución potencial hacia un estado hiperglucémico, rompiendo así el equilibrio madre-feto, lo que podría desencadenar el desarrollo de GDM. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que, en efecto, el desarrollo de GDM ha sido asociado con numerosas alteraciones en la función de este tipo celular del islote de Langerhans y con la hipersecreción de glucagón (Beis *et al.*, 2005, Canniff *et al.*, 2006, Grigorakis *et al.*, 2000). De este modo, una inadecuada adaptación de la célula α pancreática durante el embarazo, podría promover una condición de hiperglucemia, muy perjudicial para la salud materno-fetal, tanto durante el periodo gestacional como en la vida adulta, aumentando el riesgo de desarrollo de patologías como la T2DM y obesidad. Nuestras observaciones, por tanto, podrían resultar de gran interés para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas en GDM. Por todo ello, los hallazgos realizados en el presente trabajo ofrecen una información novedosa sobre las complejas adaptaciones que tienen lugar en el páncreas endocrino durante la gestación, aportando una visión más global, así como iniciando el camino para el estudio del papel que cumplen las hormonas gestacionales en este proceso.



Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

CONCLUSIONES

1. Durante la gestación la madre experimenta importantes cambios morfológicos y estructurales a nivel del islote de Langerhans. Tal como hemos podido demostrar en el presente trabajo, en el día gestacional G18.5 se produce la expansión de la masa de célula α pancreática en el ratón.
2. El crecimiento de la masa de célula α en este periodo del embarazo se debe principalmente a un aumento en la proliferación de este tipo celular, así como a la hipertrofia de la misma. Otros mecanismos como la neogénesis, la transdiferenciación o cambios en los niveles de apoptosis no parecen desempeñar un papel relevante.
3. En G18.5, observamos *in vivo* que las ratonas preñadas presentan una ligera hipoglucemia, una tendencia no significativa a la hiperinsulinemia y una marcada hipoglucagonemia.
4. Igualmente, en experimentos *ex vivo* se observa una alteración tanto a nivel de la secreción de glucagón como del contenido intracelular, viéndose ambos disminuidos.
5. La exposición crónica a lactógeno placentario y prolactina aumenta la proliferación en la línea celular secretora de glucagón α -TC1.9, mientras que el E_2 disminuye la misma. Estos resultados indican que las hormonas gestacionales podrían estar implicadas en los cambios que la masa de célula α experimenta hacia el final de la gestación en el ratón.
6. La exposición crónica a PL, PRL y E_2 tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de glucagón inducida a baja glucosa en α -TC1.9. El estradiol además tiene también un efecto inhibitorio sobre la expresión del gen de proglucagón Gcg. Estos resultados indican que las hormonas gestacionales podrían participar en la regulación de las adaptaciones funcionales de la célula α durante la gestación.
7. En resumen, hacia el final de la gestación en el ratón, se producen importantes adaptaciones tanto a nivel morfológico como funcional en la población de células α pancreáticas, donde las hormonas gestacionales podrían desempeñar un papel importante en la regulación de las mismas.

1. During pregnancy, the endocrine pancreas in the mother undergoes important morphological and structural changes. As we have been able to demonstrate in the present work, there is an expansion of the alpha-cell mass at late gestation in the mice.
2. The increase of the alpha-cell mass observed at G18.5 in the mouse is mainly due to an increase in proliferation of this cell type, as well as alpha-cell hypertrophy. Other mechanisms such as neogenesis, transdifferentiation or changes in apoptosis, do not seem to play a relevant role.
3. At gestational day 18.5, *in vivo* experiments showed that pregnant mice have a mild hypoglycaemia, a non-significant hyperinsulinaemia and an important hypoglucagonaemia.
4. At the same time, our *ex vivo* experiments showed that G18.5 pregnant mice present impaired glucagon secretion and intracellular content, both of them being diminished.
5. Chronic exposure to placental lactogen and prolactin increases proliferation in the glucagon release α -TC1.9 cell line, while E2 reduces it. These results indicate that gestational hormones may be involved in the changes that α cell mass undergoes at late pregnancy in the mouse.
6. Chronic exposure to PL, PRL and E2 has an inhibitory effect on glucagon secretion induced at low glucose in α -TC1.9. Estradiol also has an inhibitory effect on the expression of the *Gcg* proglucagon gene. These results indicate that gestational hormones could participate in the regulation of functional adaptations of the α cell during pregnancy.
7. In summary, the present findings show that the pancreatic alpha-cell undergoes important morphofunctional adaptations during pregnancy, especially at late pregnancy in the mouse. These adaptations are likely regulated by the main pregnancy hormones, which play an important role in the adaptive response of the pancreatic beta-cell during gestation as well.



Biblioteca
UNIVERSITATIS

BIBLIOGRAFÍA

Abouna S, Old RW, Pelengaris S, Epstein D, Ifandi V, Sweeney I, Khan M. Non-beta-cell progenitors of beta-cells in pregnant mice. *Organogenesis* 2010;6:125-133.

Adachi T, Yasuda K, Mori C, Yoshinaga M, Aoki N, Tsujimoto G, Tsuda K. Promoting insulin secretion in pancreatic islets by means of bisphenol A and nonylphenol via intracellular estrogen receptors. *Food Chem Toxicol* 2005;43:713-719.

Ahmed-Sorour H, Bailey CJ. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Interaction with insulin, glucagon and epinephrine. *Horm Res* 1980;13:396-403.

Almaca J, Molina J, Menegaz D, Pronin AN, Tamayo A, Slepak V, Berggren PO, Caicedo A. Human Beta Cells Produce and Release Serotonin to Inhibit Glucagon Secretion from Alpha Cells. *Cell Rep* 2016;17:3281-3291.

Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* 2006;114:106-112.

Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquie M, Gauthier BR, Nef S, Stefani E, Nadal A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One* 2008;3:e2069.

Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Garcia-Arevalo M, Soriano S, Quesada I, Muhammed SJ, Salehi A, Gustafsson JA, Nadal A. Antidiabetic actions of an estrogen receptor beta selective agonist. *Diabetes* 2013;62:2015-2025.

Amaral ME, Cunha DA, Anhe GF, Ueno M, Carneiro EM, Velloso LA, Bordin S, Boschero AC. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J Endocrinol* 2004;183:469-476.

Arrojo e Drigo R, Ali Y, Diez J, Srinivasan DK, Berggren PO, Boehm BO. New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. *Diabetologia* 2015;58:2218-2228.

Arumugam R, Fleenor D, Freemark M. Knockdown of prolactin receptors in a pancreatic beta cell line: effects on DNA synthesis, apoptosis, and gene expression. *Endocrine* 2014;46:568-576.

Ashcroft FM, Rorsman P. K(ATP) channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. *Nat Rev Endocrinol* 2013;9:660-669.

Asplund K, Westman S, Hellerstrom C. Glucose stimulation of insulin secretion from the isolated pancreas of foetal and newborn rats. *Diabetologia* 1969;5:260-262.

Baeyens L, Hindi S, Sorenson RL, German MS. β -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes Obes. Metab.* 2016;18:63-70.

Banerjee RR. Piecing together the puzzle of pancreatic islet adaptation in pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 2018;1411:120-139.

Barkley MS, Geschwind II, Bradford GE. The gestational pattern of estradiol, testosterone and progesterone secretion in selected strains of mice. *Biology of reproduction* 1979;20:733-8.

Barros RP, Gabbi C, Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297:E124-33.

Baumann MU, Deborde S, Illsley NP. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* 2002;19:13-22.

Beamish CA, Zhang L, Szlapinski SK, Strutt BJ, Hill DJ. An increase in immature beta-cells lacking Glut2 precedes the expansion of beta-cell mass in the pregnant mouse. *PLoS One* 2017;12:e0182256.

Beis C, Grigorakis SI, Philippou G, Alevizaki M, Anastasiou E. Lack of suppression of plasma glucagon levels in late pregnancy persists postpartum only in women with previous gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2005;42:31-35.

Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2009;373:1773-1779.

Binart N, Bachelot A, Bouilly J. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:362-368.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998;19:225-268.

Bone AJ, Taylor KW. Metabolic adaptation to pregnancy shown by increased biosynthesis of insulin in islets of Langerhans isolated from pregnant rat. *Nature* 1976;262:501-502.

Bonner-Weir S, Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* 1982;31:883-889.

Branisteanu DD, Mathieu C. Progesterone in gestational diabetes mellitus: guilty or not guilty? *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:54-56.

Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG, Sorenson RL. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology* 1993;132:879-887.

Brelje TC, Svensson AM, Stout LE, Bhagroo NV, Sorenson RL. An immunohistochemical approach to monitor the prolactin-induced activation of the JAK2/STAT5 pathway in pancreatic islets of Langerhans. *J Histochem Cytochem* 2002;50:365-383.

Briant L, Salehi A, Vergari E, Zhang Q, Rorsman P. Glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Ups J Med Sci* 2016;121:113-119.

Bridges RS. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Front Neuroendocrinol* 2015;36:178-196.

Brooks CL. Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr Rev* 2012;33:504-525.

Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, Zierath JR, Galuska D, Steiler TL, Dahlman-Wright K, Nilsson S, Gustafsson JA, Efendic S *et al*. Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* 2006;49:588-597.

Burton GJ, Jauniaux E. What is the placenta? *Am J Obstet Gynecol* 2015;213:S6.e1, S6-8.

Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, Butler PC. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia* 2010;53:2167-2176.

Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2334-2339.

Cabrera O, Jacques-Silva MC, Speier S, Yang SN, Kohler M, Fachado A, Vieira E, Zierath JR, Kibbey R, Berman DM *et al.* Glutamate is a positive autocrine signal for glucagon release. *Cell Metab* 2008;7:545-554.

Canniff KM, Smith MS, Lacy DB, Williams PE, Moore MC. Glucagon secretion and autonomic signaling during hypoglycemia in late pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:R788-95.

Catalano PM, Tyzbit ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1667-1672.

Cigliola V, Ghila L, Thorel F, van Gorp L, Baronnier D, Oropeza D, Gupta S, Miyatsuka T, Kaneto H, Magnuson MA *et al.* Pancreatic islet-autonomous insulin and smoothed-mediated signalling modulate identity changes of glucagon(+) alpha-cells. *Nat Cell Biol* 2018;20:1267-1277.

Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev Dyn* 2006;235:3280-3294.

Costa MA. The endocrine function of human placenta: an overview. *Reprod Biomed Online* 2016;32:14-43.

Cunha DA, Amaral ME, Carvalho CP, Collares-Buzato CB, Carneiro EM, Boschero AC. Increased expression of SNARE proteins and synaptotagmin IV in islets from pregnant rats and in vitro prolactin-treated neonatal islets. *Biol Res* 2006;39:555-566.

Dabelea D, Mayer-Davis EJ, Lamichhane AP, D'Agostino RB, Jr, Liese AD, Vehik KS, Narayan KM, Zeitler P, Hamman RF. Association of intrauterine exposure to maternal diabetes and obesity with type 2 diabetes in youth: the SEARCH Case-Control Study. *Diabetes Care* 2008;31:1422-1426.

De Marinis YZ, Salehi A, Ward CE, Zhang Q, Abdulkader F, Bengtsson M, Braha O, Braun M, Ramracheya R, Amisten S *et al.* GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca²⁺ channel-dependent exocytosis. *Cell Metab* 2010;11:543-553.

Deacon CF. Incretin-based treatment of type 2 diabetes: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Diabetes Obes Metab* 2007;9 Suppl 1:23-31.

Deierlein AL, Siega-Riz AM, Chantala K, Herring AH. The association between maternal glucose concentration and child BMI at age 3 years. *Diabetes Care* 2011;34:480-484.

Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5:219-226.

Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, Eppler E, Bouzakri K, Wueest S, Muller YD *et al.* Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med* 2011;17:1481-1489.

Fang X, Wong S, Mitchell BF. Effects of RU486 on estrogen, progesterone, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation. *Endocrinology* 1997;138:2763-2768.

Farahvar S, Walfisch A, Sheiner E. Gestational diabetes risk factors and long-term consequences for both mother and offspring: a literature review. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2019;14:63-74.

Fine NHF, Doig CL, Elhassan YS, Vierra NC, Marchetti P, Bugliani M, Nano R, Piemonti L, Rutter GA, Jacobson DA *et al.* Glucocorticoids Reprogram beta-Cell Signaling to Preserve Insulin Secretion. *Diabetes* 2018;67:278-290.

Freemark M, Avril I, Fleenor D, Driscoll P, Petro A, Opara E, Kendall W, Oden J, Bridges S, Binart N *et al.* Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology* 2002;143:1378-1385.

Freemark M, Driscoll P, Maaskant R, Petryk A, Kelly PA. Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue differentiation and development. *J Clin Invest* 1997;99:1107-1117.

Fujinaka Y, Takane K, Yamashita H, Vasavada RC. Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *J Biol Chem* 2007;282:30707-30717.

Fujita Y, Wideman RD, Asadi A, Yang GK, Baker R, Webber T, Zhang T, Wang R, Ao Z, Warnock GL *et al.* Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in pancreatic islet alpha-cells and promotes insulin secretion. *Gastroenterology* 2010;138:1966-1975.

Furuta M, Yano H, Zhou A, Rouille Y, Holst JJ, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, Furuta H, Steiner DF. Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:6646-6651.

Furuta M, Zhou A, Webb G, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, Steiner DF. Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice. *J Biol Chem* 2001;276:27197-27202.

Garcia-Ocana A, Takane KK, Reddy VT, Lopez-Talavera JC, Vasavada RC, Stewart AF. Adenovirus-mediated hepatocyte growth factor expression in mouse islets improves pancreatic islet transplant performance and reduces beta cell death. *J Biol Chem* 2003;278:343-351.

Garcia-Ocana A, Vasavada RC, Cebrian A, Reddy V, Takane KK, Lopez-Talavera JC, Stewart AF. Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the beta-cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice. *Diabetes* 2001;50:2752-2762.

Goldman S, Shalev E. Progesterone receptor profile in the decidua and fetal membrane. *Front Biosci* 2007;12:634-648.

Gorvin CM. The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *J Clin Transl Endocrinol* 2015;2:85-91.

Goyvaerts L, Lemaire K, Arijs I, Auffret J, Granvik M, Van Lommel L, Binart N, in't Veld P, Schuit F, Schraenen A. Prolactin receptors and placental lactogen drive male mouse pancreatic islets to pregnancy-related mRNA changes. *PLoS One* 2015;10:e0121868.

Goyvaerts L, Schraenen A, Schuit F. Serotonin competence of mouse beta cells during pregnancy. *Diabetologia* 2016;59:1356-1363.

Grigorakis SI, Alevizaki M, Beis C, Anastasiou E, Alevizaki CC, Souvatzoglou A. Hormonal parameters in gestational diabetes mellitus during the third trimester: high glucagon levels. *Gynecol Obstet Invest* 2000;49:106-109.

Gromada J, Chabosseau P, Rutter GA. The alpha-cell in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2018;14:694-704.

Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocr Rev* 2007;28:84-116.

Gylfe E. Glucose control of glucagon secretion-'There's a brand-new gimmick every year'. *Ups J Med Sci* 2016;121:120-132.

Hadden DR, McLaughlin C. Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;14:66-71.

Hamilton A, Zhang Q, Salehi A, Willems M, Knudsen JG, Ringgaard AK, Chapman CE, Gonzalez-Alvarez A, Surdo NC, Zaccolo M *et al.* Adrenaline Stimulates Glucagon Secretion by Tpc2-Dependent Ca(2+) Mobilization From Acidic Stores in Pancreatic alpha-Cells. *Diabetes* 2018;67:1128-1139.

Handgraaf S, Dusaulcy R, Visentin F, Philippe J, Gosmain Y. 17-beta Estradiol regulates proglucagon-derived peptide secretion in mouse and human alpha- and L cells. *JCI Insight* 2018;3:10.1172/jci.insight.98569.

Hayashi Y, Seino Y. Regulation of amino acid metabolism and alpha-cell proliferation by glucagon. *J Diabetes Investig* 2018; Jan 3. doi: 10.1111/jdi.12797.

Hayashi Y, Yamamoto M, Mizoguchi H, Watanabe C, Ito R, Yamamoto S, Sun XY, Murata Y. Mice deficient for glucagon gene-derived peptides display normoglycemia and hyperplasia of islet {alpha}-cells but not of intestinal L-cells. *Mol Endocrinol* 2009;23:1990-1999.

Hoiriis Nielsen J, Nielsen V, Molsted Pedersen L, Deckert T. Effects of pregnancy hormones on pancreatic islets in organ culture. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986;111:336-341.

Hollander MH, Paarlberg KM, Huisjes AJ. Gestational diabetes: a review of the current literature and guidelines. *Obstet Gynecol Surv* 2007;62:125-136.

Horibe N, Okamoto T, Itakura A, Nakanishi T, Suzuki T, Kazeto S, Tomoda Y. Levels of hepatocyte growth factor in maternal serum and amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:937-942.

Huang C, Snider F, Cross JC. Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology* 2009;150:1618-1626.

Hughes JW, Ustione A, Lavagnino Z, Piston DW. Regulation of islet glucagon secretion: Beyond calcium. *Diabetes Obes Metab* 2018;20 Suppl 2:127-136.

Jacovetti C, Abderrahmani A, Parnaud G, Jonas JC, Peyot ML, Cornu M, Laybutt R, Meugnier E, Rome S, Thorens B *et al.* MicroRNAs contribute to compensatory beta cell expansion during pregnancy and obesity. *J Clin Invest* 2012;122:3541-3551.

Johansson M, Mattsson G, Andersson A, Jansson L, Carlsson PO. Islet endothelial cells and pancreatic beta-cell proliferation: studies in vitro and during pregnancy in adult rats. *Endocrinology* 2006;147:2315-2324.

Jung C, Ho JT, Torpy DJ, Rogers A, Doogue M, Lewis JG, Czajko RJ, Inder WJ. A longitudinal study of plasma and urinary cortisol in pregnancy and postpartum. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1533-1540.

Jurikova M, Danihel L, Polak S, Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem* 2016;118:544-552.

Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006;444:840-846.

Kahraman S, Dirice E, De Jesus DF, Hu J, Kulkarni RN. Maternal insulin resistance and transient hyperglycemia impact the metabolic and endocrine phenotypes of offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307:906-918.

Karnik SK, Chen H, McLean GW, Heit JJ, Gu X, Zhang AY, Fontaine M, Yen MH, Kim SK. Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. *Science* 2007;318:806-809.

Kawamori D, Kurpad AJ, Hu J, Liew CW, Shih JL, Ford EL, Herrera PL, Polonsky KS, McGuinness OP, Kulkarni RN. Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo. *Cell Metab* 2009;9:350-361.

Kawasaki M, Arata N, Miyazaki C, Mori R, Kikuchi T, Ogawa Y, Ota E. Obesity and abnormal glucose tolerance in offspring of diabetic mothers: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2018;13:e0190676.

Kc K, Shakya S, Zhang H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. *Ann Nutr Metab* 2015;66 Suppl 2:14-20.

Kedees MH, Grigoryan M, Guz Y, Teitelman G. Differential expression of glucagon and glucagon-like peptide 1 receptors in mouse pancreatic alpha and beta cells in two models of alpha cell hyperplasia. *Mol Cell Endocrinol* 2009;311:69-76.

Kelstrup L, Damm P, Mathiesen ER, Hansen T, Vaag AA, Pedersen O, Clausen TD. Insulin resistance and impaired pancreatic beta-cell function in adult offspring of women with diabetes in pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:3793-3801.

Kharouta M, Miller K, Kim A, Wojcik P, Kilimnik G, Dey A, Steiner DF, Hara M. No mantle formation in rodent islets -- the prototype of islet revisited. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;85:252-257.

Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, Fujitani Y, Kawamori R, Miyatsuka T, Kosaka Y *et al.* Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med* 2010;16:804-808.

Kim JK. Hyperinsulinemic-euglycemic clamp to assess insulin sensitivity in vivo. *Methods Mol Biol* 2009;560:221-238.

Kulandavelu S, Qu D, Adamson SL. Cardiovascular function in mice during normal pregnancy and in the absence of endothelial NO synthase. *Hypertension* 2006;47:1175-1182.

Lee JY, Gavrilova O, Davani B, Na R, Robinson GW, Hennighausen L. The transcription factors Stat5a/b are not required for islet development but modulate pancreatic beta-cell physiology upon aging. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007;1773:1455-1461.

Lee YS, Lee C, Choung JS, Jung HS, Jun HS. Glucagon-Like Peptide 1 Increases beta-Cell Regeneration by Promoting alpha- to beta-Cell Transdifferentiation. *Diabetes* 2018;67:2601-2614.

Leturque A, Burnol AF, Ferre P, Girard J. Pregnancy-induced insulin resistance in the rat: assessment by glucose clamp technique. *Am J Physiol* 1984;246:E25-31.

Leung YM, Ahmed I, Sheu L, Tsushima RG, Diamant NE, Hara M, Gaisano HY. Electrophysiological characterization of pancreatic islet cells in the mouse insulin promoter-green fluorescent protein mouse. *Endocrinology* 2005;146:4766-4775.

Liu YJ, Vieira E, Gylfe E. A store-operated mechanism determines the activity of the electrically excitable glucagon-secreting pancreatic alpha-cell. *Cell Calcium* 2004;35:357-365.

Liu Z, Kim W, Chen Z, Shin YK, Carlson OD, Fiori JL, Xin L, Napora JK, Short R, Odetunde JO *et al.* Insulin and glucagon regulate pancreatic alpha-cell proliferation. *PLoS One* 2011;6:e16096.

Liu Z, Stanojevic V, Avadhani S, Yano T, Habener JF. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4) axis activation induces intra-islet glucagon-like peptide-1 (GLP-1) production and enhances beta cell survival. *Diabetologia* 2011;54:2067-2076.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001;25:402-408.

Longuet C, Sinclair EM, Maida A, Baggio LL, Maziarz M, Charron MJ, Drucker DJ. The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting. *Cell Metab* 2008;8:359-371.

Luyckx AS, Gerard J, Gaspard U, Lefebvre PJ. Plasma glucagon levels in normal women during pregnancy. *Diabetologia* 1975;11:549-554.

MacDonald PE, De Marinis YZ, Ramracheya R, Salehi A, Ma X, Johnson PR, Cox R, Eliasson L, Rorsman P. A K ATP channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans. *PLoS Biol* 2007;5:e143.

Marroqui L, Masini M, Merino B, Grieco FA, Millard I, Dubois C, Quesada I, Marchetti P, Cnop M, Eizirik DL. Pancreatic alpha Cells are Resistant to Metabolic Stress-induced Apoptosis in Type 2 Diabetes. *EBioMedicine* 2015;2:378-385.

McIlvride S, Mushtaq A, Papacleovoulou G, Hurling C, Steel J, Jansen E, Abu-Hayyeh S, Williamson C. A progesterone-brown fat axis is involved in regulating fetal growth. *Sci Rep* 2017;7:10671-017-10979-7.

Merino B, Alonso-Magdalena P, Lluesma M, Neco P, Gonzalez A, Marroqui L, Garcia-Arevalo M, Nadal A, Quesada I. Pancreatic alpha-cells from female mice undergo morphofunctional changes during compensatory adaptations of the endocrine pancreas to diet-induced obesity. *Sci Rep* 2015;5:11622.

Michael Weindling A. Offspring of diabetic pregnancy: short-term outcomes. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009;14:111-118.

Moes H, Schuiling GA, Koiter TR. Arginine stimulated glucagon and insulin secretion by islets of Langerhans of pregnant and lactating rats. *Horm Metab Res* 1993;25:246-249.

Moffett RC, Vasu S, Thorens B, Drucker DJ, Flatt PR. Incretin receptor null mice reveal key role of GLP-1 but not GIP in pancreatic beta cell adaptation to pregnancy. *PLoS One* 2014;9:e96863.

Moldrup A, Petersen ED, Nielsen JH. Effects of sex and pregnancy hormones on growth hormone and prolactin receptor gene expression in insulin-producing cells. *Endocrinology* 1993;133:1165-1172.

Montanya E, Tellez N. Pancreatic remodeling: beta-cell apoptosis, proliferation and neogenesis, and the measurement of beta-cell mass and of individual beta-cell size. *Methods Mol Biol* 2009;560:137-158.

Musial B, Fernandez-Twinn DS, Vaughan OR, Ozanne SE, Voshol P, Sferruzzi-Perri AN, Fowden AL. Proximity to Delivery Alters Insulin Sensitivity and Glucose Metabolism in Pregnant Mice. *Diabetes* 2016;65:851-860.

Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Ropero AB, Quesada I. The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *J Physiol* 2009;587:5031-5037.

Nadal A, Quesada I, Soria B. Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol* 1999;517 (Pt 1):85-93.

Napso T, Yong HEJ, Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri AN. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation. *Front Physiol* 2018;9:1091.

Nielsen SS, Christensen GL, Holst JJ, Billestrup N. Regulation of Pancreatic alpha-Cell Function and Proliferation by Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) In Vitro. *Endocrinology* 2016;157:3809-3820.

Nolan CJ, Proietto J. The feto-placental glucose steal phenomenon is a major cause of maternal metabolic adaptation during late pregnancy in the rat. *Diabetologia* 1994;37:976-984.

Ohara-Imaizumi M, Kim H, Yoshida M, Fujiwara T, Aoyagi K, Toyofuku Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Okamura T, Uchida T *et al.* Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta cells during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:19420-19425.

Otonkoski T, Beattie GM, Rubin JS, Lopez AD, Baird A, Hayek A. Hepatocyte growth factor/scatter factor has insulinotropic activity in human fetal pancreatic cells. *Diabetes* 1994;43:947-953.

Ouhilal S, Vuguin P, Cui L, Du XQ, Gelling RW, Reznik SE, Russell R, Parlow AF, Karpovsky C, Santoro N *et al.* Hypoglycemia, hyperglucagonemia, and fetoplacental defects in glucagon receptor knockout mice: a role for glucagon action in pregnancy maintenance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302:E522-31.

Parsons JA, Bartke A, Sorenson RL. Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology* 1995;136:2013-2021.

Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 1992;130:1459-1466.

Perlman R, Halabi C, Bick T, Hochberg Z. The human placenta as a target tissue for glucagon. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;151:1019-1024.

Philipps LH, Santhakumaran S, Gale C, Prior E, Logan KM, Hyde MJ, Modi N. The diabetic pregnancy and offspring BMI in childhood: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 2011;54:1957-1966.

Piran R, Lee SH, Li CR, Charbono A, Bradley LM, Levine F. Pharmacological induction of pancreatic islet cell transdifferentiation: relevance to type I diabetes. *Cell Death Dis* 2014;5:e1357.

Piro S, Maniscalchi ET, Monello A, Pandini G, Mascali LG, Rabuazzo AM, Purrello F. Palmitate affects insulin receptor phosphorylation and intracellular insulin signal in a pancreatic alpha-cell line. *Endocrinology* 2010;151:4197-4206.

Qazi AM, Tsai-Morris CH, Dufau ML. Ligand-independent homo- and heterodimerization of human prolactin receptor variants: inhibitory action of the short forms by heterodimerization. *Mol Endocrinol* 2006;20:1912-1923.

Qi X, Gong B, Yu J, Shen L, Jin W, Wu Z, Wang J, Wang J, Li Z. Decreased cord blood estradiol levels in related to mothers with gestational diabetes. *Medicine (Baltimore)* 2017;96:e6962.

Quesada I, Nadal A, Soria B. Different effects of tolbutamide and diazoxide in alpha, beta-, and delta-cells within intact islets of Langerhans. *Diabetes* 1999;48:2390-2397.

Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 2008;199:5-19.

Rawn SM, Huang C, Hughes M, Shaykhutdinov R, Vogel HJ, Cross JC. Pregnancy Hyperglycemia in Prolactin Receptor Mutant, but Not Prolactin Mutant, Mice and Feeding-Responsive Regulation of Placental Lactogen Genes Implies Placental Control of Maternal Glucose Homeostasis. *Biol Reprod* 2015;93:75.

Retnakaran R, Qi Y, Sermer M, Connelly PW, Hanley AJ, Zinman B. Glucose intolerance in pregnancy and future risk of pre-diabetes or diabetes. *Diabetes care* 2008;31:2026-31.

Rieck S, Kaestner KH. Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:151-158.

Rodriguez-Diaz R, Caicedo A. Novel approaches to studying the role of innervation in the biology of pancreatic islets. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2013;42:39-56.

Rodriguez-Diaz R, Dando R, Jacques-Silva MC, Fachado A, Molina J, Abdulreda MH, Ricordi C, Roper SD, Berggren PO, Caicedo A. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nat Med* 2011;17:888-892.

Rorsman P, Braun M, Zhang Q. Regulation of calcium in pancreatic alpha- and beta-cells in health and disease. *Cell Calcium* 2012;51:300-308.

Rorsman P, Eliasson L, Kanno T, Zhang Q, Gopel S. Electrophysiology of pancreatic beta-cells in intact mouse islets of Langerhans. *Prog Biophys Mol Biol* 2011;107:224-235.

Ryan EA, O'Sullivan MJ, Skyler JS. Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes* 1985;34:380-389.

Sandoval DA, D'Alessio DA. Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiol Rev* 2015;95:513-548.

Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S. Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* 1995;136:5461-5468.

Schuit F, De Vos A, Farfari S, Moens K, Pipeleers D, Brun T, Prentki M. Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J Biol Chem* 1997;272:18572-18579.

Schwartz MW, Seeley RJ, Tschop MH, Woods SC, Morton GJ, Myers MG, D'Alessio D. Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes. *Nature* 2013;503:59-66.

Sekine N, Cirulli V, Regazzi R, Brown LJ, Gine E, Tamarit-Rodriguez J, Girotti M, Marie S, MacDonald MJ, Wollheim CB. Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem* 1994;269:4895-4902.

Simmons DG, Rawn S, Davies A, Hughes M, Cross JC. Spatial and temporal expression of the 23 murine Prolactin/Placental Lactogen-related genes is not associated with their position in the locus. *BMC Genomics* 2008;9:352-2164-9-352.

Soares MJ, Konno T, Alam SM. The prolactin family: effectors of pregnancy-dependent adaptations. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18:114-121.

Soares MJ, Talamantes F. Gestational effects on placental and serum androgen, progesterone and prolactin-like activity in the mouse. *J Endocrinol* 1982;95:29-36.

Soma-Pillay P, Nelson-Piercy C, Tolppanen H, Mebazaa A. Physiological changes in pregnancy. *Cardiovasc J Afr* 2016;27:89-94.

Sorenson RL, Brelje TC, Roth C. Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology* 1993;133:2227-8.

Sorenson RL, Brelje TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 1997;29:301-307.

Sorenson RL, Stout LE. Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an immunohistochemical analysis. *Endocrinology* 1995;136:4092-4098.

Stelmanska E, Sucajtys-Szulc E. Enhanced food intake by progesterone-treated female rats is related to changes in neuropeptide genes expression in hypothalamus. *Endokrynol Pol* 2014;65:46-56.

Sutter-Dub MT. Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids* 2002;67:77-93.

Takeda K, Toda K, Saibara T, Nakagawa M, Saika K, Onishi T, Sugiura T, Shizuta Y. Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. *J Endocrinol* 2003;176:237-246.

Tellez N, Montanya E. Gastrin induces ductal cell dedifferentiation and beta-cell neogenesis after 90% pancreatectomy. *J Endocrinol* 2014;223:67-78.

Tian G, Tepikin AV, Tengholm A, Gylfe E. cAMP induces stromal interaction molecule 1 (STIM1) puncta but neither Orai1 protein clustering nor store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) in islet cells. *J Biol Chem* 2012;287:9862-9872.

Toselli C, Hyslop CM, Hughes M, Natale DR, Santamaria P, Huang CT. Contribution of a non-beta-cell source to beta-cell mass during pregnancy. *PLoS One* 2014;9:e100398.

Traub S, Meier DT, Schulze F, Dror E, Nordmann TM, Goetz N, Koch N, Dalmas E, Stawiski M, Makshana V *et al.* Pancreatic alpha Cell-Derived Glucagon-Related Peptides Are Required for beta Cell Adaptation and Glucose Homeostasis. *Cell Rep* 2017;18:3192-3203.

Trott JF, Hovey RC, Koduri S, Vonderhaar BK. Multiple new isoforms of the human prolactin receptor gene. *Adv Exp Med Biol* 2004;554:495-499.

Vasavada RC, Garcia-Ocana A, Zawalich WS, Sorenson RL, Dann P, Syed M, Ogren L, Talamantes F, Stewart AF. Targeted expression of placental lactogen in the beta cells of transgenic mice results in beta cell proliferation, islet mass augmentation, and hypoglycemia. *J Biol Chem* 2000;275:15399-15406.

Vasavada RC, Gonzalez-Pertusa JA, Fujinaka Y, Fiaschi-Taesch N, Cozar-Castellano I, Garcia-Ocana A. Growth factors and beta cell replication. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:931-950.

Vieira E, Salehi A, Gylfe E. Glucose inhibit glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia* 2007;50:370-379.

Virgo BB, Bellward GD. Serum progesterone levels in the pregnant and postpartum laboratory mouse. *Endocrinology* 1974;95:1486-1490.

Walker JN, Ramracheya R, Zhang Q, Johnson PR, Braun M, Rorsman P. Regulation of glucagon secretion by glucose: paracrine, intrinsic or both? *Diabetes Obes Metab* 2011;13 Suppl 1:95-105.

Weinhaus AJ, Stout LE, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *J Endocrinol* 2007;193:367-381.

Weinhaus AJ, Stout LE, Sorenson RL. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets. *Endocrinology* 1996;137:1640-1649.

Wierup N, Yang S, McEvelly RJ, Mulder H, Sundler F. Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem* 2004;52:301-310.

Xu Y, Wang X, Gao L, Zhu J, Zhang H, Shi H, Woo M, Wu X. Prolactin-stimulated survivin induction is required for beta cell mass expansion during pregnancy in mice. *Diabetologia* 2015;58:2064-2073.

Yu X, Park BH, Wang MY, Wang ZV, Unger RH. Making insulin-deficient type 1 diabetic rodents thrive without insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:14070-14075.

Zardooz H, Rostamkhani F, Zaringhalam J, Faraji Shahrivar F. Plasma corticosterone, insulin and glucose changes induced by brief exposure to isoflurane, diethyl ether and CO₂ in male rats. *Physiol Res* 2010;59:973-978.

Zhao X. Increase of beta cell mass by beta cell replication, but not neogenesis, in the maternal pancreas in mice. *Endocr J* 2014;61:623-628.

Zhu Y, Zhang C. Prevalence of Gestational Diabetes and Risk of Progression to Type 2 Diabetes: a Global Perspective. *Curr Diab Rep* 2016;16:7-015-0699-x.

Zhu Z, Chen X, Xiao Y, Wen J, Chen J, Wang K, Chen G. Gestational diabetes mellitus alters DNA methylation profiles in pancreas of the offspring mice. *J Diabetes Complications* 2019;33:15-22.



Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

ANEXO

17 **Abstract**

18 Background: Pregnancy represents a major metabolic challenge for the mother, and
19 involves a compensatory response of the pancreatic beta-cell to maintain
20 normoglycaemia. However, although pancreatic alpha-cells play a key role in glucose
21 homeostasis and seem to be involved in gestational diabetes, there is no information about
22 their potential adaptations or changes during pregnancy.

23 Material and methods: Non-pregnant (controls) and pregnant C57BL/6 mice at
24 gestational day 18.5 (G18.5) and their isolated pancreatic islets were used for *in vivo* and
25 *ex vivo* studies, respectively. The effect of pregnancy hormones was tested in glucagon-
26 secreting α -TC1.9 cells. Immunohistochemical analysis was performed in pancreatic
27 slices. Glucagon gene expression was monitored by RT-qPCR. Glucagon secretion and
28 plasma hormones were measured by ELISA.

29 Results: Pregnant mice on G18.5 exhibited alpha-cell hypertrophy as well as augmented
30 alpha-cell area and mass. This alpha-cell mass expansion was mainly due to increased
31 proliferation. No changes in alpha-cell apoptosis, ductal neogenesis, or alpha-to-beta
32 transdifferentiation were found compared with controls. Pregnant mice on G18.5
33 exhibited hypoglucagonaemia. Additionally, *in vitro* glucagon secretion at low glucose
34 levels was decreased in isolated islets from pregnant animals. Glucagon content was also
35 reduced. Experiments in α -TC1.9 cells indicated that, unlike estradiol and progesterone,
36 placental lactogens and prolactin stimulated alpha-cell proliferation. Placental lactogens,
37 prolactin and estradiol also inhibited glucagon release from α -TC1.9 cells at low glucose
38 levels.

39 Conclusions: The pancreatic alpha-cell in mice undergoes several morphofunctional
40 changes during late pregnancy, which may contribute to proper glucose homeostasis.
41 Gestational hormones are likely involved in these processes.

42

43 **Keywords:** pregnancy, pancreatic alpha-cell, glucagon, pregnancy hormones.

44

45 **Abbreviations:** GDM, gestational diabetes mellitus; G, glucose; INS, insulin; PL,
46 placental lactogen; PRL, prolactin; P, progesterone; E₂, estradiol.

47



48 **1. Introduction.**

49 To fulfill the energy requirements of the growing fetus, major physiological
50 adaptations occur in the gravid mother. During late pregnancy, maternal insulin resistance
51 in peripheral tissues allows for an adequate glucose gradient and supply to the fetus [1,2].
52 Among other factors, increased levels of gestational hormones are known to play a role
53 in the decline of insulin sensitivity during late pregnancy [1]. Under this particular
54 scenario, pancreatic islets undergo multiple adaptations driven predominantly by
55 gestational hormones: placental lactogen (PL), prolactin (PRL), progesterone (P) and
56 estradiol (E₂) [3]. These adaptations constitute a physiological response to insulin
57 resistance in order to increase plasma insulin levels and maintain a normoglycemic state
58 in the mother. Adaptive changes in pancreatic beta-cells involve hyperplasia, hypertrophy
59 and increased secretory activity in both humans and rodents [1,2,4]. When these maternal
60 beta-cell adaptations are not able to compensate for insulin resistance, hyperglycaemia
61 and gestational diabetes mellitus (GDM) arises and leads to negative outcomes in the
62 mother and offspring. GDM increases the maternal risk of developing Type 2 diabetes
63 mellitus (T2DM) after delivery [1]. Moreover, GDM could also have adverse metabolic
64 consequences for the offspring, such as impaired development of the endocrine pancreas,
65 predisposition to obesity, glucose intolerance and T2DM later in life [5].

66 In addition to insulin, glucagon release from pancreatic alpha-cells also regulates
67 glucose homeostasis [6]. Hypoglycemia stimulates secretion from these endocrine cells,
68 leading to a rise in plasma glucagon levels and glucagon-induced hepatic glucose
69 production to normalize glycaemia [6,7]. In recent years, accumulated evidence indicates
70 that alterations in both glucagon secretion and pancreatic alpha-cell mass and function
71 are involved in the development of hyperglycaemia and the etiopathogenesis of diabetes
72 [6,7]. Despite the importance of this islet cell population, the potential adaptations of the

73 pancreatic alpha-cell during pregnancy are essentially unknown. Glucagon seems to play
74 a significant role in the metabolism of placental glycogen cells [8,9] and the lack of
75 glucagon signaling leads to fetoplacental defects and alterations in the maternal metabolic
76 milieu in pregnant mice [10]. Like insulin, plasma glucagon levels exhibit dynamic
77 changes throughout gestation in humans and mice [11,12]. It has been reported that the
78 counter-regulatory glucagon response to hypoglycemia is diminished in pregnancy [13].
79 Remarkably, GDM is associated with higher plasma glucagon levels in late pregnancy
80 [14] and with the lack of glucagon suppression in response to glucose [15], which can
81 contribute to hyperglycemia. Despite these observations, virtually nothing is known about
82 either the alterations or adaptations of the alpha-cell during gestation or the potential
83 contribution of pregnancy hormones in pancreatic alpha-cell regulation. In the present
84 study, we show that the pancreatic alpha-cell also undergoes several morphological and
85 functional changes during pregnancy and that prolactin and placental lactogens may be
86 involved in these alterations.

87

88 **2. Materials and Methods.**

89 **2.1 Animals.**

90 The procedures used in this work were previously evaluated and approved by the
91 Animal Ethics Committee of the Miguel Hernandez University (UMH) in accordance
92 with current national and European legislation. Animals were 8-10 weeks-old C57BL/6
93 female mice, which were supplied by the UMH Animal Experimentation Service. The
94 animals were kept under controlled and standardized conditions with a light/dark cycle
95 of 12 hours, 22°C and *ad libitum* access to food and water. Non-pregnant female mice
96 were established as controls, while the study group included pregnant mice on gestational
97 days G12.5, G15.5 and G18.5. Mating was confirmed by the presence of a vaginal plug
98 and this day was established as G0.5.

99

100 **2.2 Cell culture.**

101 For the *in vitro* experiments, we used the glucagon-releasing cell line α -TC1.9
102 (ATCC, Manassas, VA, USA). According to the supplier, these cells were derived from
103 an adenoma, which was obtained in transgenic mice expressing the SV40 T antigen
104 oncogene under the control of the rat preproglucagon promoter. Because of the similar
105 secretory profile of α -TC1.9 cells to that of primary mouse alpha-cells, this cell line has
106 been frequently used as a model to study calcium signaling and glucagon release from
107 pancreatic alpha-cells [16]. α -TC1.9 cells were grown in DMEM (Invitrogen, Barcelona,
108 Spain) without phenol red and supplemented with 2 mM l-glutamine, 1.5 g/l NaHCO₃,
109 10% inactivated FBS, 15 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 0.1
110 mM non-essential amino acids, and a final glucose concentration of 3 g/l. Cells were
111 treated for 8 days with the different pregnancy hormones: PL (500 ng/ml), PRL (500

112 ng/ml), P (100 ng/ml) and E₂ (100 pM). DMSO was used as vehicle. The media was
113 refreshed every 48 hours.

114

115 **2.3 Immunocytochemistry and immunohistochemistry.**

116 For the immunohistochemistry, the pancreases were removed and fixed overnight
117 in 4% paraformaldehyde. Subsequently, the tissue was embedded in paraffin and the
118 sections were prepared for immunohistochemistry to identify glucagon-containing cells.
119 After dehydration, the sections were heated to 100°C in the presence of citrate buffer
120 (10mM, pH 6.0) for 20 min. Endogenous peroxidase was blocked by incubation with a
121 solution of 3% hydrogen peroxidase in 50% methanol for 30 min. The sections were then
122 incubated in 3% BSA in PBS for 1 h at room temperature to block nonspecific binding
123 [17-19]. Two to three pancreas sections separated by 200 µm were measured per animal.
124 The total pancreatic area, alpha-cell area and cell size were measured using Metamorph
125 Analysis Software (Nashville, TN, USA). In these experiments, glucagon-containing
126 cells were identified using a polyclonal anti-glucagon rabbit antibody (1:100; Monosan,
127 Uden, The Netherlands) as previously described [17-19] with a hematoxylin counterstain
128 to identify nuclei. Proliferation was analyzed using a monoclonal anti-Ki67 rabbit
129 antibody (1:400; Cell Signaling Technology, Danvers, MS, USA) and a monoclonal anti-
130 glucagon mouse antibody (1:1000; Sigma, Madrid, Spain) to identify the alpha-cells in
131 hematoxylin-counterstained samples. A kit for a double immunostaining was used in this
132 experiment (EnVision Gl2 Doublestain System, Rabbit/Mouse; DAB+/Permanent Red)
133 (Agilent DAKO, Santa Clara, CA, USA). In both experiments, images were acquired
134 using a Nikon Eclipse TE200 microscope (20X objective). Apoptotic cell counting was
135 analyzed in pancreas sections with the TUNEL technique [18,19]. Images were acquired

136 using a Zeiss Axiovert 200 fluorescence microscope (40X objective). Ductal neogenesis
137 was analyzed using the monoclonal anti-pan-Cytokeratin mouse antibody (1:300; Santa
138 Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), as previously described [18]. In this case, images
139 were acquired using a Zeiss Axio Observer Z1 microscope with ApoTome (40X
140 objective). To identify glucagon and insulin double-positive cells, a mouse monoclonal
141 anti-glucagon antibody (1:100; Sigma, Madrid, Spain) and a rabbit anti-insulin antibody
142 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) were used. Double-positive cells
143 were manually counted using the LAS X software (Leica Microsystems Inc. Buffalo
144 Grove, IL, USA). Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 488 goat anti-
145 mouse IgG were used as secondary antibodies in the apoptosis and neogenesis
146 experiments, while Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 546 goat anti-
147 mouse IgG (1:500; Life technologies, Carlsbad, CA, USA) were used in the
148 immunostaining of glucagon-insulin positive cells. Nuclei were stained with Hoechst
149 33342 (1:1000; Invitrogen, Barcelona, Spain). Sections were mounted using ProLong
150 Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Barcelona, Spain).

151 To study the proliferation rate in α -TC1.9 cells, the cells were seeded on coverslips
152 treated with poly-L-lysine (at least 100.000 cells/coverslip) and exposed for 8 days with
153 the different hormones. The incubation medium was refreshed every 48 hours. On day 7,
154 cells were incubated with 10 μ M BrdU for 24 hours. Cells were then fixed with 4%
155 paraformaldehyde and immunofluorescence was performed. First, cells were immersed
156 in 70% ethanol at 4°C for 30 min; then, cells were immersed in 2 N HCl for 20 min,
157 followed by incubation in a 0.1 M borax solution for 15 min at room temperature and by
158 a wash step after incubation with PBS. To prevent non-specific binding, the cells were
159 incubated for 1 h in 3% BSA in PBS at room temperature. Staining was performed using
160 monoclonal anti-BrdU mouse antibody (1:100; Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) and

161 propidium iodide to label the nuclei. The samples were mounted using ProLong Gold
162 Antifade Reagent (Invitrogen, Barcelona, Spain). Images were acquired using a Zeiss
163 LSM 510 confocal microscope (40X objective).

164

165 **2.4 Plasma measurements.**

166 Blood glucose was measured from the tail vein with an automatic glucometer
167 (Accu-Chek Compact plus; Roche, Mannheim, Germany). Blood samples were collected
168 from the saphenous vein using Microvette tubes (Sarstedt, Germany). For glucagon
169 measurements, blood samples were supplemented with aprotinin (20 mg/l) to protect
170 them from proteolysis. Plasma glucagon and insulin concentrations were determined by
171 ELISA (Crystal Chem Inc., Elk Grove Village, IL, USA).

172

173 **2.5 Glucagon secretion and content measurements.**

174 Mice were euthanized by cervical dislocation, and islets were isolated by
175 collagenase digestion as previously described [18]. Freshly isolated islets from non-
176 pregnant controls and G18.5 pregnant mice were left to recover for 2 hours at 37°C and
177 5% CO₂ in the isolation medium, which contained (in mM): 115 NaCl, 5 KCl, 10
178 NaHCO₃, 1.1 MgCl₂, 1.2 NaH₂CO₄, 2.5 CaCl₂, 25 HEPES, 5 glucose and 0.25% BSA
179 (pH 7.4). Groups of 15 islets were preincubated for 1 hour in 500 µl of medium with 0.5
180 mM glucose (G), 0.1% BSA and the following composition (in mM): 140 NaCl, 4.5 KCl,
181 1 MgCl₂ and 20 HEPES (pH 7.4). Islets were then exposed for 1 hour to 300 µl of medium
182 with the same composition and different stimuli: 0.5 mM G, 11 mM G, or 0.5 mM G plus
183 10 nM insulin. Finally, media were collected and glucagon concentrations were measured
184 by ELISA (Merckodia AB, Uppsala, Sweden). To determine glucagon content, islets were
185 collected and incubated overnight at 4°C in 20 µl of a lysis buffer (75% ETOH, 24,6%

186 dH₂O and 0,4% of 30% HCl) and then centrifuged at 14.000 rpm for 4 minutes. Glucagon
187 content was measured in the supernatant by ELISA. Total protein concentration was
188 analyzed using the Bradford dye method [18].

189 Measurement of glucagon secretion from α -TC1.9 cells was performed with the
190 media described for experiments with isolated islets. On day 8 after hormonal treatment,
191 cells were preincubated for 2 hours with 500 μ l of secretion media with 5.6 mM G and
192 then, incubated for 1 hour with the appropriate stimuli: 0.5 mM G, 11 mM G or 0.5 mM
193 G plus 10 nM insulin. Next, 400 μ l were collected and used to measure glucagon secretion
194 by ELISA. To determine glucagon content, cells were recovered from the wells and
195 treated with 200 μ l of lysis buffer overnight at 4°C. To measure glucagon release or
196 content, aprotinin (20 mg/l) was included in all media [18].

197

198 **2.6 RNA isolation and real time PCR.**

199 After 8 days of hormonal treatment, total RNA from α -TC1.9 cells was extracted
200 using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Madrid, Spain) and quantified by optical density at
201 260 and 280 nm using the NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific,
202 Waltham, MA, USA). cDNA synthesis was carried out from 0.5 μ g of total RNA using
203 the High Capacity cDNA Reverse Transcription RNA kit (Applied Biosystems, Foster
204 City, CA, USA) under the following conditions: 10' at 25°C, 120' at 37°C and 5' at 85°C,
205 cooling down the samples at 4°C after these steps. Quantitative PCR assays were
206 performed using a CFX96 Real Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with 1 μ l of
207 cDNA in a total final volume of 10 μ l, containing 200 nM of each primer and 1X IQ™
208 SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Samples were subjected to the
209 following conditions: 3 min at 95°C, 45 cycles of 5 s at 95°C, 5 s at 60°C and 10 s at
210 72°C, and a melting curve of 65 to 95°C with a slope of 0.1°C/s. The housekeeping gene

211 HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) was used as the endogenous
212 control for quantification. The resulting values were expressed as relative expression
213 compared with control levels ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) [20]. Further information about the primers
214 sequences can be found in the Supplementary Table 1.

215

216 **2.6 Statistical analysis.**

217 Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad
218 Software Inc., San Diego, CA, USA). Data was shown as the mean \pm SEM. Student's t
219 test, one-way ANOVA or two-way ANOVA were applied according to the set of groups
220 that were compared. Non-parametric tests were performed when data did not meet the
221 assumption of normality. Except when indicated, a Dunnett's post hoc test or a Bonferroni
222 post hoc test was performed after one-way ANOVA or two-way ANOVA analysis,
223 respectively. Results were considered significant at $p < 0.05$.

224

225

226 **3. Results.**

227 **3.1 Pregnant mice exhibit increased pancreatic alpha-cell mass due to hypertrophy**
228 **and hyperplasia on gestational day G18.5.**

229 To study the morphological characteristics of the pancreatic alpha-cell during
230 pregnancy, we first analyzed the alpha-cell population at different time points during
231 mouse gestation: G12.5, G15.5 and G18.5. Major beta-cell morphological changes have
232 been reported at these time periods [4,21]. The alpha-cell area and mass were significantly
233 increased on G18.5 (Fig. 1A, B). Additionally, the alpha-cell size was augmented on
234 G18.5 and there was a high tendency for increased alpha-cell number per islet compared
235 with controls (Fig. 1C, D). These morphological changes suggested that hypertrophy and,
236 probably, hyperplasia were part of the regulatory events involved in the alpha-cell mass
237 expansion observed on G18.5. This alpha-cell mass increase occurred with a similar
238 temporal pattern as that described for the expansion of the pancreatic beta-cell during
239 mouse pregnancy, which peaks around G16-G18.5 [22,23]. Given that different
240 morphological parameters were significantly altered on G18.5, we focused on this time
241 point in the following experiments.

242

243 **3.2 Alpha-cell mass expansion during late pregnancy is mainly due to increased**
244 **alpha-cell proliferation.**

245 Although it has been claimed that pancreatic beta-cell mass expansion during
246 gestation is essentially driven by enhanced proliferation, other processes like apoptosis,
247 neogenesis and transdifferentiation have also been proposed [1,2,4]. To determine the
248 processes responsible for the pancreatic alpha-cell mass expansion, we first analyzed
249 proliferation by measuring Ki-67 antigen expression in glucagon-positive cells [19]. A
250 two-fold increase in alpha-cell proliferation was observed on G18.5 (Fig. 1E).

251 Additionally, the apoptotic rate was found to be very low in pancreatic alpha-cells and no
252 significant differences were observed on G18.5 compared with controls (Fig. 1F).

253 Given that few studies have suggested that beta-cell neogenesis from ductal cells
254 may also play a role during pregnancy in humans [24] and mice [21,25,26], we explored
255 whether this process was also contributing to alpha-cell growth during gestation. The
256 analysis of the presence of glucagon-containing cells co-stained with the ductal marker
257 pan-cytokeratin (PanCK) [19] revealed that their occurrence was low and not different
258 between both groups (Fig. 2A, B). In order to determine whether islet-cell
259 transdifferentiation may also occur during gestation as part of the pancreas adaptive
260 response, we performed an immunofluorescence analysis to quantify the presence of
261 glucagon and insulin double-positive cells [27,28]. We observed 4 double-positive cells
262 out of 1602 total alpha-cells in controls (n=3) and 6 double-positive cells out of 1815
263 alpha-cells in pregnant mice (n=3) (Fig. 2C), suggesting a negligible involvement of
264 alpha-beta reprogramming. Overall, these results indicate that alpha-cell proliferation is
265 probably the main contributor to the increased alpha-cell mass during late pregnancy.

266

267 **3.3 Pregnant mice on G18.5 exhibit hypoglucagonaemia and impaired glucagon** 268 **secretion.**

269 When plasma parameters associated with glucose homeostasis were analyzed, we
270 found a decrease in glycaemia in pregnant mice on G18.5 compared with controls (Fig.
271 3A). Pregnant animals also exhibited hypoglucagonaemia (Fig. 3B), while plasma insulin
272 levels showed a non-significant increase (Fig. 3C). To evaluate alpha-cell functional
273 activity, we performed a static glucagon secretion experiment using freshly isolated islets.
274 Islets were challenged with stimulatory (0.5 mM) or inhibitory (11 mM) glucose (G)
275 concentrations for the pancreatic alpha-cell [29] and also with insulin, which reduces

276 glucagon release [30]. As expected, islets from non-pregnant mice exhibited vigorous
277 glucagon secretion at 0.5 mM G, while hormonal release was significantly inhibited in
278 the presence of 11 mM G or 10 nM insulin (Fig. 3D), consistent with prior studies [29,30].
279 Remarkably, glucagon secretion at 0.5 mM G was significantly reduced in islets from
280 pregnant mice compared to controls (Fig. 3D and Supplementary Fig. 1 for secretion
281 normalized to glucagon islet content and total islet protein, respectively). Glucagon
282 content was decreased in pancreatic islets from pregnant animals compared with controls,
283 although this only reached statistical significance in the insulin condition (Fig. 3E).

284

285 **3.4 Lactogenic hormones and estradiol affect proliferation, glucagon release and** 286 **proglucagon mRNA expression in α -TC1.9 cells.**

287 PL, PRL, P and E₂ hormones promote different aspects of the adaptive response
288 of the pancreatic beta-cell during pregnancy [3]. To assess whether these hormones also
289 function to regulate the alpha-cell changes described above, we analyzed proliferation
290 and glucagon release from α -TC1.9 cells. These cells were treated for 8 days with
291 hormone concentrations within the range described in pregnant mice [3,31-34] and in
292 similar *in vitro* studies [32,35]. While PL and PRL stimulated proliferation, E₂ induced
293 the opposite effect (Fig. 4).

294 Based on the results obtained from the *ex vivo* glucagon secretion studies (Fig. 3),
295 we also examined the potential role of pregnancy hormones in glucagon release from α -
296 TC1.9 cells. After 8 days of hormone exposure [32], glucagon secretion was analyzed
297 after incubation of cells with 0.5 mM G, 11 mM G or 0.5 mM G plus 10 nM insulin for 1
298 hour. Similar to isolated islets (Fig. 3), α -TC1.9 cells treated with vehicle exhibited
299 maximal glucagon secretion at 0.5 mM G and significant decreases at both 11 mM G and
300 0.5 mM G plus insulin. Interestingly, glucagon release at 0.5 mM G was significantly

301 inhibited in the cells treated with PL, PRL and E₂ (Fig 5A). Similar results were obtained
302 when glucagon release was normalized to islet protein content (Supplementary Fig. 2A).
303 No differences were found between groups in the glucagon content or in glucagon gene
304 expression, with the exception of a decrease in glucagon mRNA after E₂ exposure (Fig.
305 5B, C and Supplementary Fig. 2B, C). Overall, our findings in both pancreatic alpha-cells
306 and α -TC1.9 cells indicate that the gestational hormones PRL, PL and E₂ are likely
307 involved in the alpha-cell alterations during pregnancy.

308

309



310 **4. Discussion.**

311 During pregnancy, the mother undergoes major hormonal and metabolic changes
312 to meet the energy requirements of the growing fetus. These changes involve a maternal
313 decrease in peripheral insulin sensitivity to ensure the glucose gradient for the fetus. To
314 maintain glucose homeostasis in this situation, important morphofunctional adaptations
315 take place in the pancreatic beta-cell to increase hormonal secretion and compensate for
316 the insulin resistance [1,2,4,36]. A deficient pancreatic beta-cell adaptation can lead to
317 impaired glucose homeostasis and GDM [1,2,5]. It has been described that pregnancy
318 hormones play a key role in the development of both insulin resistance and beta-cell
319 adaptations during gestation [3], yet there is little information about the alterations of the
320 pancreatic alpha-cell during pregnancy and the potential function of gestational
321 hormones.

322 In the present study, we analyzed the morphofunctional features of pancreatic
323 alpha-cells during pregnancy. We found a significant increase in alpha-cell mass at G18.5,
324 which was mainly associated with hypertrophy and hyperplasia, a situation similar to that
325 reported in beta-cells [4,22]. These findings are in accordance with a previous study
326 showing alpha-cell expansion during pregnancy in a similar period [22]. The increase in
327 alpha-cell mass on G18.5 was not associated with changes in apoptosis, which remained
328 at low levels, similar to what has been reported for beta-cells during pregnancy [24,37].
329 This result was not unexpected, since alpha-cell apoptosis is very low in non-pregnant
330 mice [38] and this islet cell type exhibits a high resistance to pro-apoptotic stimuli
331 compared with beta-cells [39].

332 Although proliferation seems to be the major contributor to beta-cell mass growth
333 in rodent pregnancy, few studies have observed that up to 10-25% of beta-cells may come
334 from other non-beta-cell sources[2,25,26]. In this regard, neogenesis from ductal cells has

335 been postulated as an important contributor to beta-cell mass during human pregnancy
336 [24]. However, since other studies failed to detect beta-cell neogenesis [40,41], this issue
337 remains controversial. Of note, we found a low proportion of glucagon-containing cells
338 expressing the ductal marker PanCK that did not change between control and pregnant
339 animals. Thus, these findings indicate that pancreatic ductal cells do not act as an alpha-
340 cell source during pregnancy. Transdifferentiation among different islet cell types has
341 been reported under some pathophysiological conditions and with genetically modified
342 animal models [27,28]. In our study, we observed a similar very low number of islet cells
343 expressing both insulin and glucagon in control and pregnant mice, which suggests that
344 transdifferentiation programs may not have a significant impact on alpha-cell mass during
345 pregnancy.

346 Although E₂ and P may also have an effect on beta-cell proliferation [32,42], PL
347 and PRL have been described as key regulators of gestational beta-cell replication
348 [1,22,23,37]. Treatment of α -TC1.9 cells with PL and PRL increased proliferation,
349 suggesting an important role for these hormones, which is similar to findings in beta-cells
350 [32]. The PRL receptor has been reported in neonatal rat pancreatic alpha-cells [43].
351 However, while PRL activated the JAK/STAT5 pathway in rat beta-cells, this effect was
352 not observed in alpha-cells [35]. This suggests that PRL may activate STAT-independent
353 signaling routes in glucagon-secreting cells, as has been reported in other cell types [44].
354 Unlike PL and PRL, E₂ diminished α -TC1.9 cell proliferation. Progesterone also
355 produced a similar trend, as expected since this hormone counteracts PRL-induced rat
356 beta-cell proliferation [32]. The role of E₂ in beta-cell proliferation is still unclear: while
357 this hormone partially reverses PRL-induced BrdU incorporation in rat islets (Sorenson
358 *et al.*, 1993), it has been shown that E₂ increases proliferation in insulinoma INS1 cells
359 and dispersed rat beta-cells after 48 hours of culture [42]. Given that these studies were

360 performed with pharmacological doses, it is difficult to draw conclusions to the
361 physiological context. Thus, although E₂ proliferative effects on the beta-cell may differ
362 depending on experimental conditions, our findings indicate that E₂ may decrease alpha-
363 cell replication. Overall, all these results indicate that PRL and PL may have a prominent
364 function in the regulation of the alpha-cell mass expansion during pregnancy, as has been
365 reported for the pancreatic beta-cell [2,4,32].

366 It is well known that plasma insulin levels and glucose-stimulated insulin
367 secretion (GSIS) from pancreatic beta-cells follow a dynamic pattern during pregnancy
368 [1,2,32,36,45,46]. One of the most important adaptive changes in pregnancy is a lowering
369 of the threshold for GSIS [45,46]. This threshold changes throughout pregnancy peaking
370 at G15, when islets release 8-fold more insulin at 5.6 mM glucose. At G19, this effect is
371 diminished to 4-fold increase in insulin secretion, and reaches control levels at G20
372 [45,46]. Additionally, it has been reported in mice that whole body insulin sensitivity both
373 is higher at G19 compared with G16 and is similar to non-pregnant animals [47]. This
374 insulin sensitivity level at G19 near control conditions [47], together with a decreased
375 threshold for GSIS at this gestational day [45], may explain the lower glucose levels and
376 the trend to high insulin concentrations found in the present work. A similar scenario has
377 been previously described in late pregnancy in mice [5]. Likewise, higher insulinemia at
378 mid gestation compared with late pregnancy and non-pregnant controls has also been
379 described in mice [21]. This situation should be considered as an aspect of late pregnancy
380 reconditioning to prepare the mother for labor and lactation [46].

381 Contrary to the situation of beta-cells, there is nearly no evidence about glucagon
382 secretion from pancreatic alpha-cells during pregnancy. In agreement with a previous
383 study [12], we observed that pregnant mice exhibited hypoglucagonemia on G18.5. In
384 women, plasma glucagon concentrations rise during the first and second trimesters but

385 they decrease at late pregnancy [11]. The hypoglucagonemia observed in pregnant
386 animals was further supported by *in vitro* glucagon release experiments showing that
387 alpha-cell secretion from freshly isolated islets was down-regulated in pregnant mice.
388 Additionally, glucagon content also seemed to be reduced in the islets from pregnant
389 female. Because paracrine influences should not affect alpha-cells at 0.5 mM glucose
390 [6,7,29], the reduced glucagon secretion may reflect a direct action on these cells,
391 probably a down-regulation at the level of glucose-sensing, signal transduction and/or
392 exocytosis. In pregnant rats, basal glucagon release from isolated islets was also found to
393 be reduced at 2.5 mM glucose [48]. The lower plasma glucagon levels found during late
394 gestation could be the result of a direct regulation by pregnancy-induced factors and/or
395 by paracrine inhibitory signals acting on alpha-cells, like insulin or serotonin [12,30,49],
396 whose intra-islet secretion from beta-cells is increased during gestation [1,50]. In the
397 present work, the *in vitro* experiments with α -TC1.9 cells also point to a direct role for
398 gestational hormones in late pregnancy hypoglucagonemia. PL, PRL and E₂ all
399 diminished glucagon secretion at 0.5 mM G. A previous study using purified primary
400 alpha-cells also showed that exposure to 10 nM E₂ for 48 hours down-regulated glucagon
401 content and release [51]. In line with this, E₂ produced an inhibitory effect on α -TC1.9
402 cells at the level of secretion and glucagon mRNA expression in our experiments. To the
403 best of our knowledge, there are no previous data describing PL and PRL actions on
404 alpha-cell secretion. Overall, these results indicate that PL, PRL and E₂ are likely
405 involved in the inhibitory effect observed in glucagon secretion from isolated islets in
406 pregnant mice. In any case, given the complexity of the signals that regulate the
407 adaptations of the endocrine pancreas during gestation [36], we cannot rule out the
408 involvement of other hormones.

409 It has been reported that genetic ablation of either prohormone convertase 2 or
410 glucagon leads to alpha-cell hyperplasia and hypertrophy [52-54]. These results have
411 been interpreted as a compensatory response to the limited hepatic glucagon signaling
412 associated with the lower plasma glucagon levels in these animals [54]. Thus, it is
413 plausible that the alpha-cell hyperplasia and hypertrophy described here in pregnant mice
414 could be derived from their hypoglucagonemia. Recent findings have also shown that
415 interrupted glucagon receptor signaling can induce hepatic amino-acid release and
416 hyperaminoacidemia, which seems to be linked to mTOR-mediated alpha-cell
417 proliferation [55]. Further studies will be required to better understand the whole scenario.

418 In addition to the potential *in vivo* interactions described above that may take place
419 during pregnancy, the results obtained with the alpha-cell line also point to a direct role
420 of PL and PRL in the dual actions on alpha-cells during gestation. Activation of the PRL
421 receptor involves the stimulation of at least three main signaling pathways in the
422 pancreatic beta-cell and other cell types: JAK2/STAT5, MAPK and PI3K [1,44]. In the
423 case of mouse alpha-cells and alpha-TC1 cells, activation of the PI3K pathway has been
424 associated with both the inhibition of glucagon secretion [6,30] and the increase of
425 proliferation [56]. Thus, it is plausible that PRL receptor activation may produce opposite
426 actions on alpha-cell proliferation and secretion through PI3K signaling. A similar
427 situation has also been described for insulin via PI3K [6,7,30,56] and for glucagon-like
428 peptide 1 (GLP-1) via the PKA signaling pathway [6,7,57,58].

429 In any case, we should take with some caution the PRL and PL effects observed
430 in our *in vitro* model, when compared with *in vivo* conditions. The control of pancreatic
431 alpha-cell secretion is a complex process compared with that of the beta-cell [7,59,60]. It
432 has been shown that, in addition to glucagon, pancreatic alpha-cells can also secrete other
433 signaling molecules like GLP-1, acetylcholine, GIP (gastric inhibitory polypeptide) and

434 glutamate, which can subsequently affect alpha-cell function by autocrine regulation
435 [6,7,59,60]. These processes can be induced under certain conditions, and usually involve
436 long-term stimulation (like chronic *in vitro* conditions) rather than short-term acute
437 modulation. Additionally, several stimuli like glucose or adrenaline have been shown to
438 produce a dose-dependent biphasic action on glucagon release [57,60], which has been
439 attributed to the particular electrical activity and ATP-dependent K⁺ channel activity
440 pattern that specifically regulates pancreatic alpha-cell secretion [57,60]. Thus, we cannot
441 totally discard that, in other conditions, PRL and PL may induce alternative secretory
442 effects on pancreatic alpha-cells during pregnancy, which represents a complex scenario
443 with multiple signals.

444 In summary, the present findings show that the pancreatic alpha-cell undergoes
445 important morphofunctional changes during pregnancy. These changes are likely
446 regulated by the main pregnancy hormones that have been implicated in the adaptive
447 response of the pancreatic beta-cell during this physiological condition. These alpha-cell
448 adaptations during an insulin-resistant condition might be crucial for the maintenance of
449 an adequate glucose and metabolic milieu for the mother and the fetus. Indeed, the key
450 role of glucagon during pregnancy has been previously pointed out by studies showing
451 that interruption of glucagon signaling results in fetoplacental defects and alterations in
452 the fetal metabolic environment [10], and that this hormone regulates the metabolism of
453 placental glycogen cells [8,9]. Therefore, the attenuated alpha-cell function on G18.5
454 described here could be an adaptation to prevent a potential evolution to a hyperglycemic
455 state. Indeed, since GDM has been associated with several alterations in the function of
456 these islet cells and glucagon hypersecretion [13-15], an inadequate pancreatic alpha-cell
457 adaptation to pregnancy may promote a hyperglycemic condition. Our current findings
458 provide novel information about the complex adaptations of the endocrine pancreas

459 during pregnancy to have a more complete view of the general scenario. These data would
460 be also interesting for the design of new therapeutic strategies in GDM.

461

462 **Acknowledgements.**

463 We thank M.S. Ramon, M.L. Navarro and G. Expósito for their expert technical
464 assistance, and J.L. Yanowitz from the University of Pittsburgh, School of Medicine for
465 her assistance with English. This research was supported by grants from the Ministerio
466 de Ciencia, Innovación y Universidades, Agencia Estatal de Investigación (AEI), Fondo
467 Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and Generalitat Valenciana: BFU2017-86579-
468 R and PROMETEO II/2015/016 to AN and BFU2016-77125-R to IQ. LM holds a Juan
469 de la Cierva fellowship from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades
470 (IJCI-2015-24482). CIBERDEM is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

471

472 **Declarations of interests.**

473 The authors have no interests to declare.

474

475 **Author contributions.**

476 I.Q. and A.N. designed the experiments; C.Q.C. and E.T. performed and analyzed
477 the experiments; C.Q.C, E.T., P.A.M., L.M., I.Q. and A.N. interpreted the results; C.Q.C.,
478 I.Q. and A.N. wrote the manuscript. All authors contributed to the discussion, reviewed
479 the manuscript and approved the final version of the article.

480

481 **References.**

- 482 1. Baeyens L, Hindi S, Sorenson RL, et al. β -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes*
483 *Obes.Metab.* 2016;18((Suppl 1)):63-70.
- 484 2. Banerjee RR. Piecing together the puzzle of pancreatic islet adaptation in pregnancy.
485 *Ann N Y Acad Sci* 2018;1411(1):120-39.
- 486 3. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, et al. The role of oestrogens in the adaptation
487 of islets to insulin resistance. *J Physiol* 2009;587(Pt 21):5031-7.
- 488 4. Rieck S, Kaestner KH. Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. *Trends*
489 *Endocrinol Metab* 2010;21(3):151-8.
- 490 5. Kahraman S, Dirice E, De Jesus DF, et al. Maternal insulin resistance and transient
491 hyperglycemia impact the metabolic and endocrine phenotypes of offspring. *Am J Physiol*
492 *Endocrinol Metab.* 2014;307(10):906-18.
- 493 6. Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, et al. Physiology of the pancreatic alpha-cell and
494 glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol*
495 2008;199(1):5-19.
- 496 7. Gromada J, Chabosseu P, Rutter GA. The alpha-cell in diabetes mellitus. *Nat Rev*
497 *Endocrinol* 2018;14(12):694-704.
- 498 8. Coan PM, Conroy N, Burton GJ, et al. Origin and characteristics of glycogen cells in
499 the developing murine placenta. *Dev Dyn* 2006;235(12):3280-94.
- 500 9. Perlman R, Halabi C, Bick T, et al. The human placenta as a target tissue for glucagon.
501 *Biochem Biophys Res Commun* 1988;151(3):1019-24.
- 502 10. Ouhilal S, Vuguin P, Cui L, et al. Hypoglycemia, hyperglucagonemia, and
503 fetoplacental defects in glucagon receptor knockout mice: a role for glucagon action in
504 pregnancy maintenance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302(5):E522-31.
- 505 11. Luyckx AS, Gerard J, Gaspard U, et al. Plasma glucagon levels in normal women
506 during pregnancy. *Diabetologia* 1975;11(6):549-54.

- 507 12. Moffett RC, Vasu S, Thorens B, et al. Incretin receptor null mice reveal key role of
508 GLP-1 but not GIP in pancreatic beta cell adaptation to pregnancy. *PLoS One*
509 2014;9(6):e96863.
- 510 13. Canniff KM, Smith MS, Lacy DB, et al. Glucagon secretion and autonomic signaling
511 during hypoglycemia in late pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*
512 2006;291(3):R788-95.
- 513 14. Grigorakis SI, Alevizaki M, Beis C, et al. Hormonal parameters in gestational diabetes
514 mellitus during the third trimester: high glucagon levels. *Gynecol Obstet Invest*
515 2000;49(2):106-9.
- 516 15. Beis C, Grigorakis SI, Philippou G, et al. Lack of suppression of plasma glucagon
517 levels in late pregnancy persists postpartum only in women with previous gestational
518 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2005;42(1):31-5.
- 519 16. Ravier MA, Rutter GA. Glucose or insulin, but not zinc ions, inhibit glucagon
520 secretion from mouse pancreatic alpha-cells. *Diabetes* 2005;54(6):1789-97.
- 521 17. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Garcia-Arevalo M, et al. Antidiabetic actions of
522 an estrogen receptor beta selective agonist. *Diabetes* 2013;62(6):2015-25.
- 523 18. Merino B, Alonso-Magdalena P, Lluesma M, et al. Pancreatic alpha-cells from female
524 mice undergo morphofunctional changes during compensatory adaptations of the
525 endocrine pancreas to diet-induced obesity. *Sci Rep* 2015;5:11622.
- 526 19. Montanya E, Tellez N. Pancreatic remodeling: beta-cell apoptosis, proliferation and
527 neogenesis, and the measurement of beta-cell mass and of individual beta-cell size.
528 *Methods Mol Biol* 2009;560:137-58.
- 529 20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time
530 quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- 531 21. Beamish CA, Zhang L, Szlapinski SK, et al. An increase in immature beta-cells
532 lacking Glut2 precedes the expansion of beta-cell mass in the pregnant mouse. *PLoS One*
533 2017;12(7):e0182256.

- 534 22. Xu Y, Wang X, Gao L, et al. Prolactin-stimulated survivin induction is required for
535 beta cell mass expansion during pregnancy in mice. *Diabetologia* 2015;58(9):2064-73.
- 536 23. Karnik SK, Chen H, McLean GW, et al. Menin controls growth of pancreatic beta-
537 cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. *Science*
538 2007;318(5851):806-9.
- 539 24. Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, et al. Adaptive changes in pancreatic beta cell
540 fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia*
541 2010;53(10):2167-76.
- 542 25. Abouna S, Old RW, Pelengaris S, et al. Non-beta-cell progenitors of beta-cells in
543 pregnant mice. *Organogenesis* 2010;6(2):125-33.
- 544 26. Toselli C, Hyslop CM, Hughes M, et al. Contribution of a non-beta-cell source to
545 beta-cell mass during pregnancy. *PLoS One* 2014;9(6):e100398.
- 546 27. Cigliola V, Ghila L, Thorel F, et al. Pancreatic islet-autonomous insulin and
547 smoothed-mediated signalling modulate identity changes of glucagon(+) alpha-cells.
548 *Nat Cell Biol* 2018;20(11):1267-77.
- 549 28. Piran R, Lee SH, Li CR, et al. Pharmacological induction of pancreatic islet cell
550 transdifferentiation: relevance to type I diabetes. *Cell Death Dis* 2014;5:e1357.
- 551 29. Vieira E, Salehi A, Gylfe E. Glucose inhibit glucagon secretion by a direct effect on
552 mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia* 2007;50:370-9.
- 553 30. Kawamori D, Kurpad AJ, Hu J, et al. Insulin signaling in alpha cells modulates
554 glucagon secretion in vivo. *Cell Metab* 2009;9(4):350-61.
- 555 31. Goyvaerts L, Lemaire K, Arijs I, et al. Prolactin receptors and placental lactogen drive
556 male mouse pancreatic islets to pregnancy-related mRNA changes. *PLoS One*
557 2015;10(3):e0121868.
- 558 32. Sorenson RL, Brejle TC, Roth C. Effects of steroid and lactogenic hormones on islets
559 of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of
560 islets to pregnancy. *Endocrinology* 1993;133(5):2227-8.

- 561 33. Hoiriis Nielsen J, Nielsen V, Molsted Pedersen L, et al. Effects of pregnancy
562 hormones on pancreatic islets in organ culture. *Acta Endocrinol (Copenh)*
563 1986;111(3):336-41.
- 564 34. Barkley MS, Geschwind II, Bradford GE. The gestational pattern of estradiol,
565 testosterone and progesterone secretion in selected strains of mice. *Biology of*
566 *reproduction* 1979;20(4):733-8.
- 567 35. Brelje TC, Svensson AM, Stout LE, et al. An immunohistochemical approach to
568 monitor the prolactin-induced activation of the JAK2/STAT5 pathway in pancreatic islets
569 of Langerhans. *J Histochem Cytochem* 2002;50(3):365-83.
- 570 36. Napso T, Yong HEJ, Lopez-Tello J, et al. The Role of Placental Hormones in
571 Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation. *Front Physiol*
572 2018;9:1091.
- 573 37. Huang C, Snider F, Cross JC. Prolactin receptor is required for normal glucose
574 homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology*
575 2009;150(4):1618-26.
- 576 38. Nielsen SS, Christensen GL, Holst JJ, et al. Regulation of Pancreatic alpha-Cell
577 Function and Proliferation by Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) In Vitro.
578 *Endocrinology* 2016;157(10):3809-20.
- 579 39. Marroqui L, Masini M, Merino B, et al. Pancreatic alpha Cells are Resistant to
580 Metabolic Stress-induced Apoptosis in Type 2 Diabetes. *EBioMedicine* 2015;2(5):378-
581 85.
- 582 40. Zhao X. Increase of beta cell mass by beta cell replication, but not neogenesis, in the
583 maternal pancreas in mice. *Endocr J* 2014;61(6):623-8.
- 584 41. Parsons JA, Bartke A, Sorenson RL. Number and size of islets of Langerhans in
585 pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect
586 of lactogenic hormones. *Endocrinology* 1995;136(5):2013-21.

- 587 42. Jacovetti C, Abderrahmani A, Parnaud G, et al. MicroRNAs contribute to
588 compensatory beta cell expansion during pregnancy and obesity. *J Clin Invest*
589 2012;122(10):3541-51.
- 590 43. Sorenson RL, Stout LE. Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an
591 immunohistochemical analysis. *Endocrinology* 1995;136(9):4092-8.
- 592 44. Binart N, Bachelot A, Bouilly J. Impact of prolactin receptor isoforms on
593 reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21(6):362-8.
- 594 45. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy:
595 increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental
596 lactogen secretion. *Endocrinology* 1992;130(3):1459-66.
- 597 46. Sorenson RL, Brelje TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell
598 growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res*
599 1997;29(6):301-7.
- 600 47. Musial B, Fernandez-Twinn DS, Vaughan OR, et al. Proximity to Delivery Alters
601 Insulin Sensitivity and Glucose Metabolism in Pregnant Mice. *Diabetes* 2016;65(4):851-
602 60.
- 603 48. Moes H, Schuiling GA, Koiter TR. Arginine stimulated glucagon and insulin
604 secretion by islets of Langerhans of pregnant and lactating rats. *Horm Metab Res*
605 1993;25(5):246-9.
- 606 49. Almaca J, Molina J, Menegaz D, et al. Human Beta Cells Produce and Release
607 Serotonin to Inhibit Glucagon Secretion from Alpha Cells. *Cell Rep* 2016;17(12):3281-
608 91.
- 609 50. Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, et al. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass
610 during pregnancy. *Nat Med* 2010;16(7):804-8.
- 611 51. Handgraaf S, Dusaulcy R, Visentin F, et al. 17-beta Estradiol regulates proglucagon-
612 derived peptide secretion in mouse and human alpha- and L cells. *JCI Insight* 2018;3(7).

- 613 52. Furuta M, Yano H, Zhou A, et al. Defective prohormone processing and altered
614 pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci U S A*
615 1997;94(13):6646-51.
- 616 53. Hayashi Y, Yamamoto M, Mizoguchi H, et al. Mice deficient for glucagon gene-
617 derived peptides display normoglycemia and hyperplasia of islet {alpha}-cells but not of
618 intestinal L-cells. *Mol Endocrinol* 2009;23(12):1990-9.
- 619 54. Hayashi Y, Seino Y. Regulation of amino acid metabolism and alpha-cell
620 proliferation by glucagon. *J Diabetes Investig* 2018;9(3):464-472.
- 621 55. Solloway MJ, Madjidi A, Gu C, et al. Glucagon Couples Hepatic Amino Acid
622 Catabolism to mTOR-Dependent Regulation of α -Cell Mass. *Cell Rep* 2015;12(3):495-
623 510.
- 624 56. Liu Z, Kim W, Chen Z, et al. Insulin and glucagon regulate pancreatic α -cell
625 proliferation. *PLoS One* 2011;6(1):e16096.
- 626 57. De Marinis YZ, Salehi A, Ward CE, et al. GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates
627 glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca²⁺ channel-dependent
628 exocytosis. *Cell Metab* 2010;11(6):543-553.
- 629 58. Lee YS, Lee C, Choung JS, et al. Glucagon-Like Peptide 1 Increases β -Cell
630 Regeneration by Promoting α - to β -Cell Transdifferentiation. *Diabetes*
631 2018;67(12):2601-2614.
- 632 59. Sandoval DA, D'Alessio DA. Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon
633 and GLP-1 in health and disease. *Physiol Rev* 2015;95(2):513-48.
- 634 60. Walker JN, Ramracheya R, Zhang Q, et al. Regulation of glucagon secretion by
635 glucose: paracrine, intrinsic or both? *Diabetes Obes Metab* 2011;13 Suppl 1:95-105.
- 636
- 637

638 **Figure legends**

639 **Figure 1.** Increase in alpha-cell mass, area and cell size in pregnant mice on G18.5. (A-
640 **D)** Different morphological parameters were measured on gestational days G12.5, G15.5
641 and G18.5 in pregnant mice and non-pregnant controls. (A) Alpha-cell area (n=5 mice
642 per group). (B) Alpha-cell mass (n=5 mice per group). (C) Alpha-cell number per islet
643 (100 islets were randomly selected from 5 mice per group). (D) Alpha-cell size (100 islets
644 were randomly selected from 5 mice per group). (E) Alpha-cell proliferation (%) in non-
645 pregnant (control) and pregnant mice on G18.5 (n=4 controls; n=5 pregnant mice). (C)
646 Alpha-cell apoptosis (%) analyzed by TUNEL in control and pregnant mice (n=5 mice
647 each group). Values represent mean \pm SEM. *p<0.05. One way-ANOVA followed by
648 Dunnet's post hoc test (A, B); One way-ANOVA followed by Fisher's Least Significant
649 Difference (LSD) test (C); Kruskal-Wallis followed by Dunn's post hoc test (D). Mann-
650 Whitney test (E); Students t test (F).

651
652 **Figure 2.** Ductal glucagon-containing and insulin-glucagon double-positive cells are not
653 increased in pregnant mice on G18.5. (A) Percentage of double-positive cells for
654 glucagon and PanCK in control and pregnant mice on G18.5 (n=5 mice each group). (B)
655 Representative images showing the cellular staining for glucagon (red), PanCk (green)
656 and the nuclear labeling with Hoechst (blue) in pancreatic sections from controls and
657 pregnant mice. Boxed areas are enlarged on the right. White arrows indicate double-
658 positive cells. (C) Representative images showing the cellular staining for glucagon (red),
659 insulin (green) and the nuclear labeling with Hoechst (grey) in pancreatic sections from
660 controls and pregnant mice. Boxed areas are enlarged on the right. White arrows indicate
661 double-positive cells. Values represent mean \pm SEM. *p<0.05. Students t test (A).

662

663 **Figure 3.** Plasma parameters and *ex vivo* glucagon secretion on G18.5. **(A)** Glycaemia in
664 control and pregnant mice (n=16 and n=8 animals, respectively). **(B)** Glucagon plasma
665 levels in control and pregnant mice (n=11 and n=9 animals, respectively). **(C)** Insulin
666 plasma levels in control and pregnant mice (n=12 and n=8 animals, respectively). All
667 plasma parameters were measured in non-fasted state conditions **(D)** Glucagon secretion
668 normalized by content from freshly isolated islets of controls and pregnant mice at 0.5
669 mM glucose (G), 11 mM G and 0.5 mM glucose plus 10 nM insulin (INS) (n=18-19
670 control mice; n=11 pregnant mice; 15 islets per animal and condition were used). **(E)**
671 Glucagon content in each condition in non-pregnant mice and pregnant G18.5 mice
672 (n=19-20 control mice; n=12 pregnant mice; 15 islets per animal and condition were
673 used). Values represent mean \pm SEM. *p<0.05; **p<0.01; ****p<0.001. Students t test
674 (A-C); Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test (D-E).

675
676 **Figure 4.** Effects of the pregnancy hormones P, PL, PRL and E₂ on the proliferation of α -
677 TC1.9 cells. **(A)** Quantification of BrdU-positive cells relative to control conditions
678 (vehicle) in α -TC1.9 cells treated for 8 days with PL (500 ng/ml), PRL (500 ng/ml), P
679 (100 ng/ml) and E₂ (100 pmol/l). Three different experiments were performed (n= 8
680 coverslips per condition; at least 2.000 cells were counted per coverslip). **(B)**
681 Representative images showing nuclei stained for propidium iodide (red) and BrdU
682 (green). Values represent mean \pm SEM. *p<0.05. One way-ANOVA followed by Fisher's
683 Least Significant Difference (LSD) test (A).

684
685 **Figure 5.** Effect of pregnancy hormones on glucagon secretion, content and proglucagon
686 mRNA expression in α -TC1.9 cells. Cells were treated for 8 days with PL (500 ng/ml),

687 PRL (500 ng/ml), P (100 ng/ml) and E₂ (100 pmol/l). **(A)** Glucagon release from α -TC1.9
688 cells normalized by glucagon content was measured after 1 hour incubation in 0.5 mM
689 G, 11 mM G or 0.5 mM G plus 10 nM insulin. **(B)** Glucagon content normalized by total
690 protein from α -TC1.9 cells exposed at 0.5 mM glucose in A. **(C)** Proglucagon mRNA
691 expression relative to the control (vehicle). Three different experiments were performed:
692 n=7-9 wells per condition in (A), n=8-9 wells per condition in (B), and n=6 wells per
693 condition in (C). Values represent mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by
694 Bonferroni's post hoc test was performed in (A), where letters indicate p<0.05: a, 11 mM
695 G and 0.5 mM G + 10 nM INS versus 0.5 mM G in vehicle experiments; b, 0.5 mM G in
696 hormone-treated conditions versus 0.5 mM G in vehicle; c, 11 mM G in PRL conditions
697 versus 11 mM G vehicle. One-way ANOVA followed by Dunnet's post hoc test was
698 performed in (B) and (C), *p<0.05.

699



Figure 1

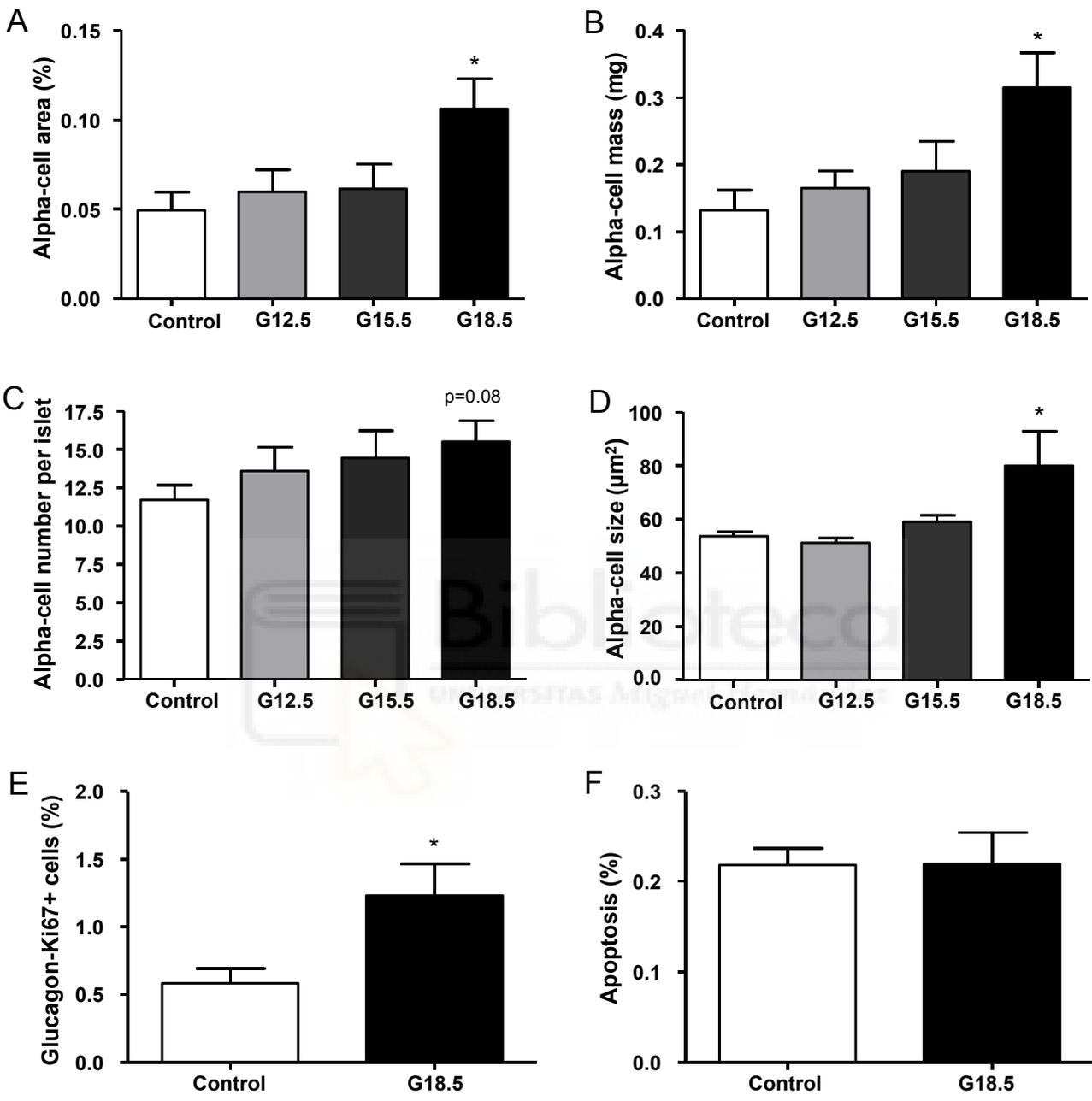


Figure 2

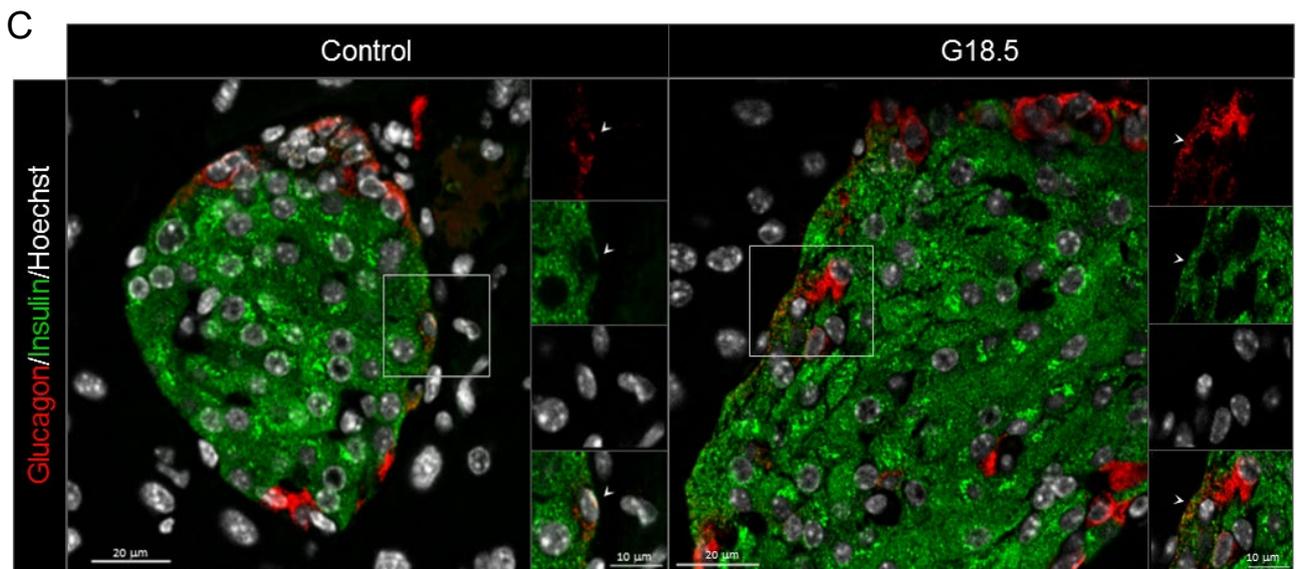
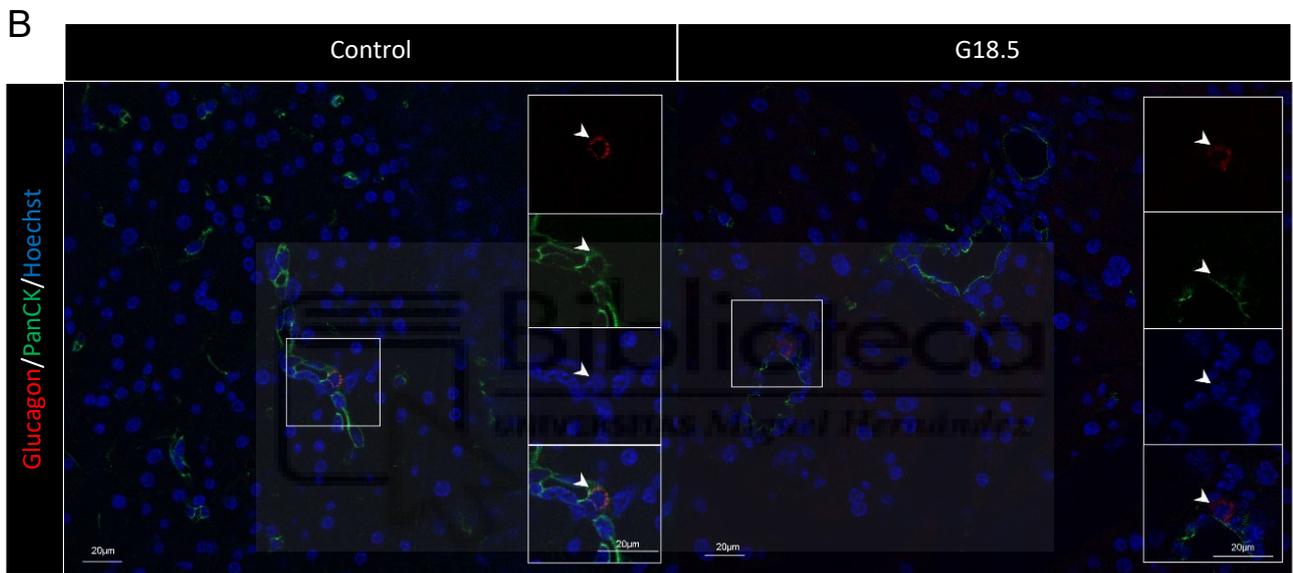
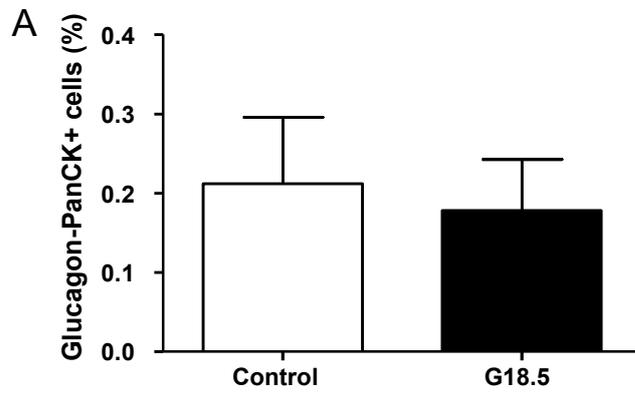


Figure 3

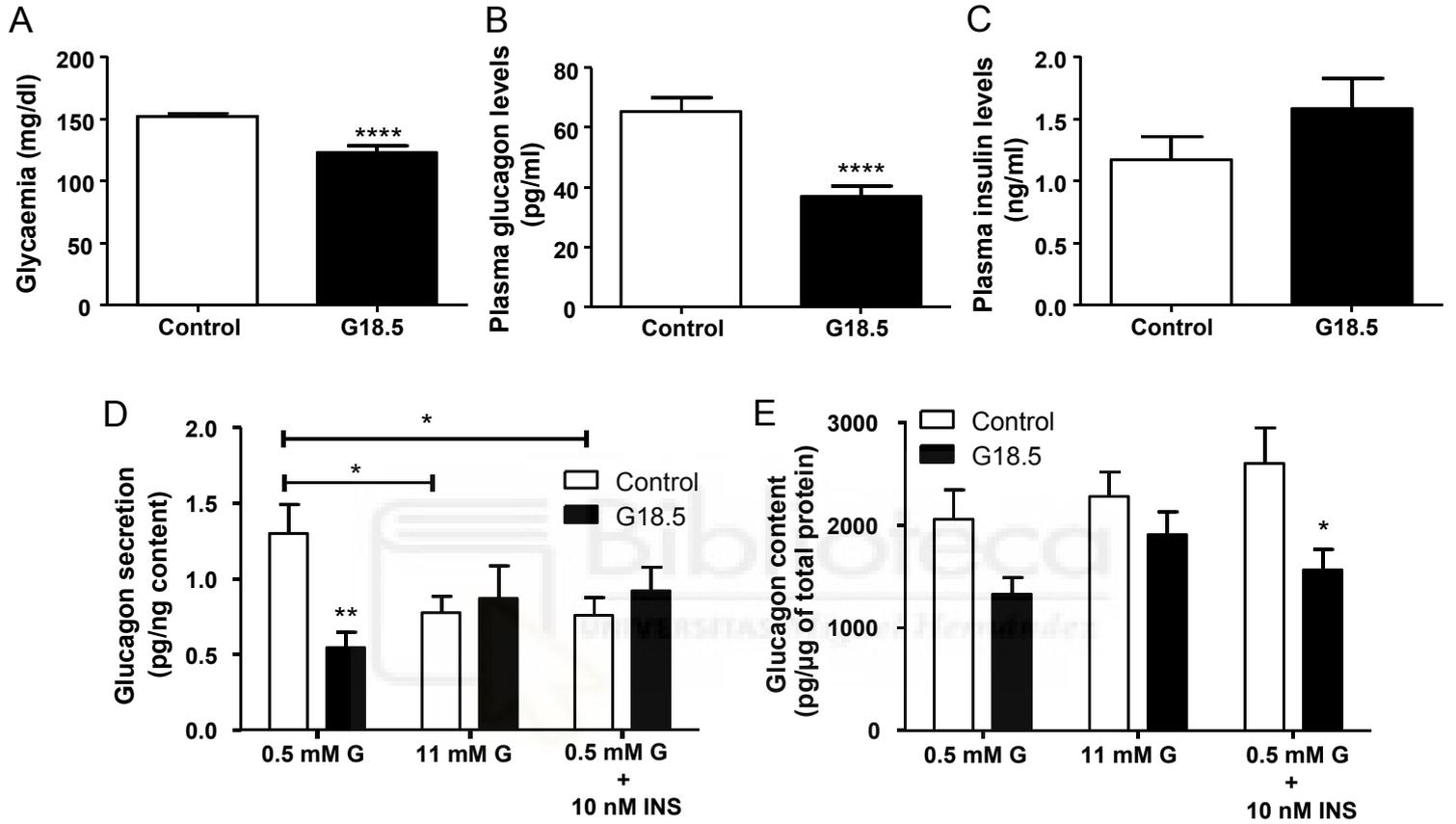


Figure 4

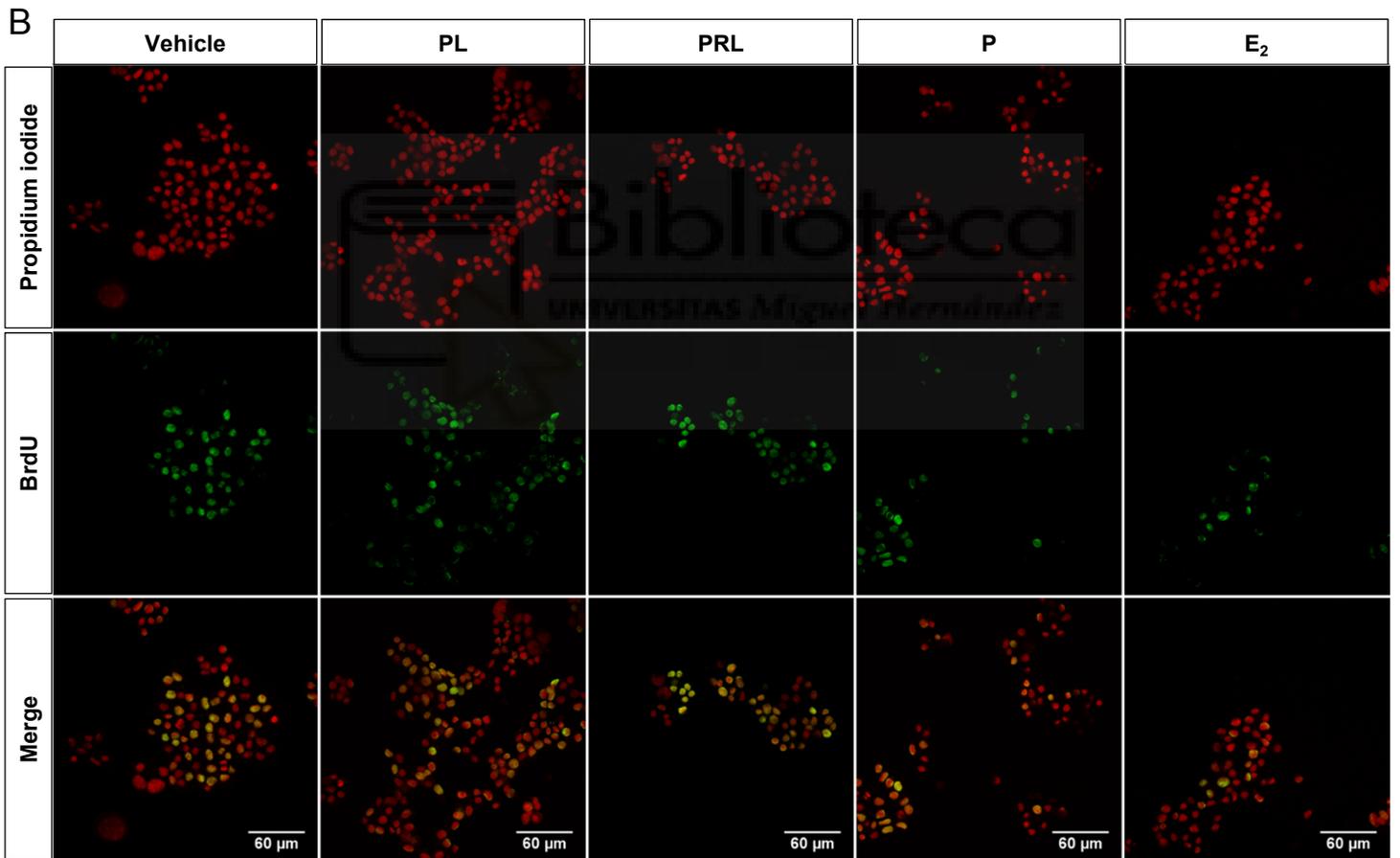
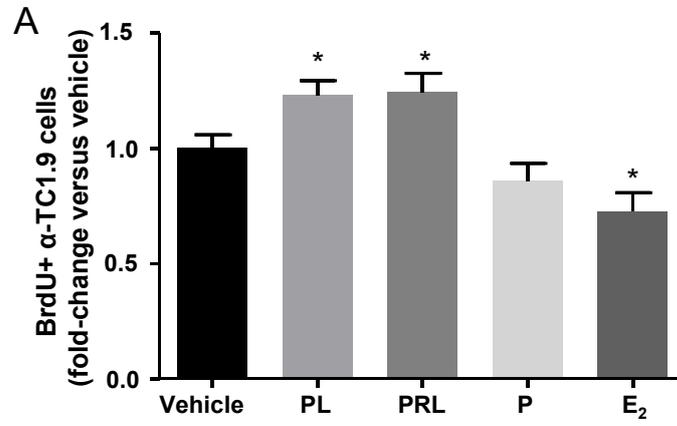
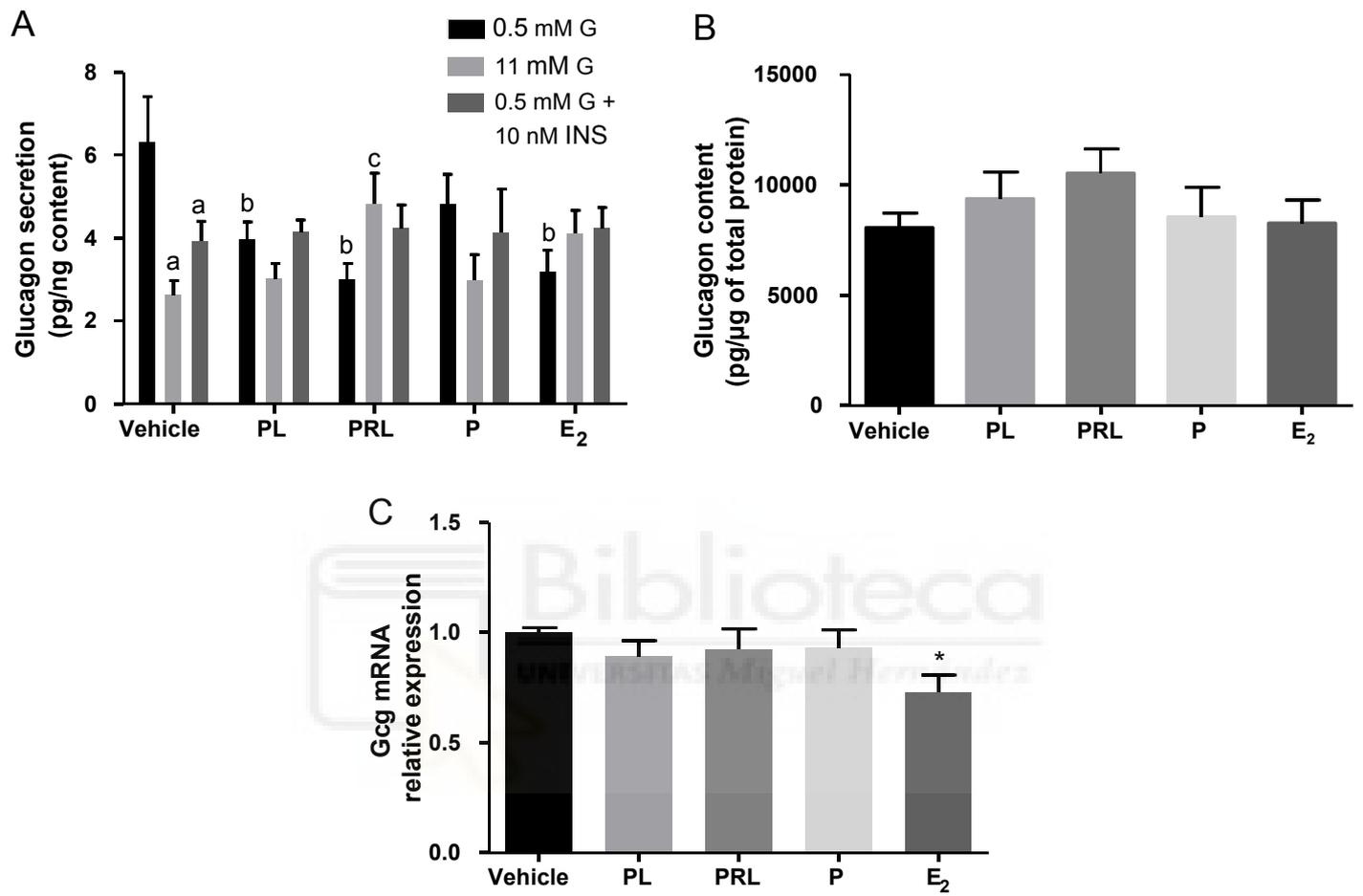
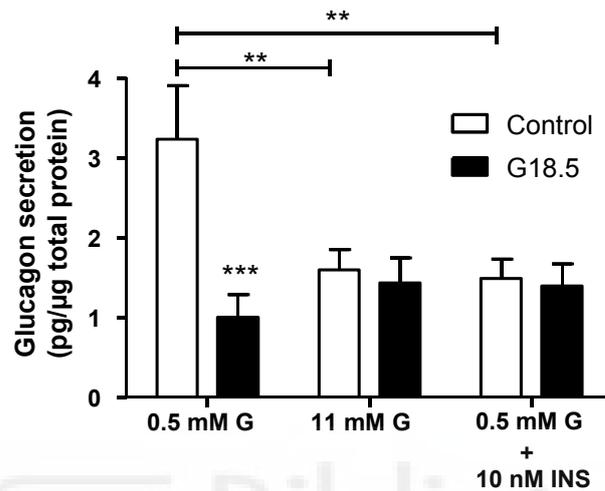


Figure 5

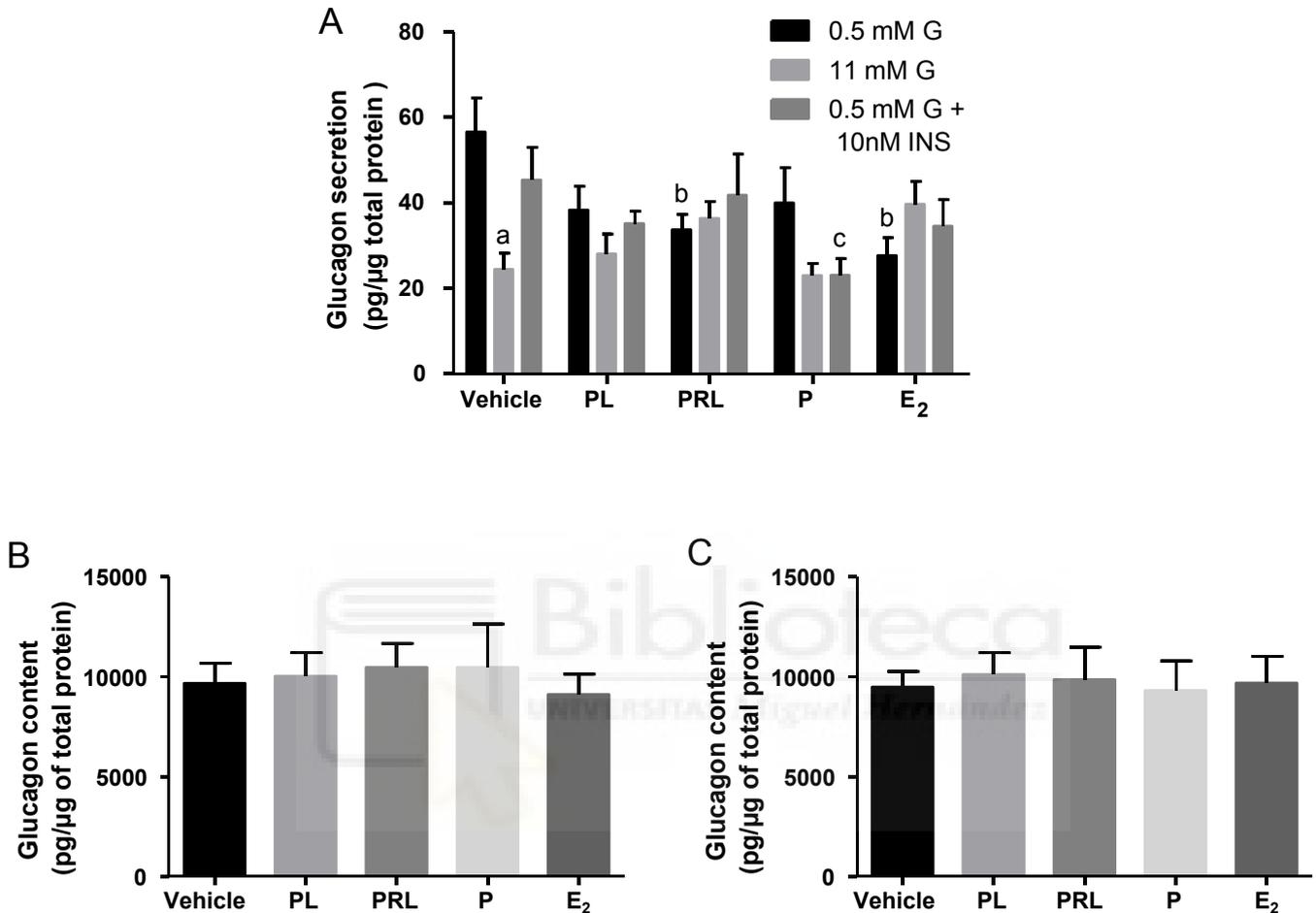


Supplementary figure 1



Supplementary Figure 1: Glucagon secretion normalized by total protein from freshly isolated islets of controls and pregnant mice at 0.5 mM glucose (G), 11 mM G or 0.5 mM G plus 10 nM insulin (INS) (n=18-19 for controls; n=11 for pregnant mice). Values represent mean \pm SEM. **p<0.01; ***p<0.001; Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

Supplementary figure 2



Supplementary Figure 2: Effect of pregnancy hormones on glucagon secretion and content in α -TC1.9 cells. Cells were treated for 8 days with PL (500 ng/mL), PRL (500 ng/mL), P (100 ng/mL) and E₂ (100 pmol/L). **(A)** Glucagon release cells normalized by total protein from α -TC1.9 after 1 hour incubation at 0.5 mM glucose (G), 11 mM G or 0.5 mM G plus 10 nM insulin. **(B)** Glucagon content normalized by total protein from α -TC1.9 cells that were incubated at 11 mM G in figure 4D. **(C)** Glucagon content normalized by total protein from α -TC1.9 cells that were incubated at 0.5 mM G plus 10 nM Insulin in figure 4D. Values represent mean \pm SEM. Three different experiments were performed: n=7-9 wells per condition in (A) and n=8-9 wells per condition in (B) and (C). Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test was performed in (A), where letters indicate p<0.05: a, 11 mM G versus 0.5 mM G in vehicle experiments; b, 0.5 mM G in hormone-treated conditions versus 0.5 mM G in vehicle; c, 0.5 mM G + 10 nM INS in P condition versus 0.5 mM G + 10 nM INS in vehicle. One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test was performed in (B) and (C).

Supplementary Table 1: Quantitative real-time PCR primers.

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Hprt	GGTTAAGCAGTACAGCCCCA	TCCAACACTTCGAGAGGTCC
Glucagon (Gcg)	CACTCACAGGGCACATTCAC	TTTGGAAATGTTGTTCCGGTT





AGRADECIMIENTOS

Dicen que lo mejor de una tesis es que se acaba, pero no puedo dejar de sentir una sensación agrídulce al escribir estos agradecimientos, ya que suponen decir adiós a una experiencia que sin duda ha marcado mi vida y el curso de la misma.

En primer lugar me gustaría empezar agradeciendo a mis directores de tesis, el Dr. Ivan Quesada Moll y el Dr. Ángel Nadal Navajas. Gracias por la oportunidad que me brindasteis hace cuatro años de embarcarme en este trabajo que sin duda suponía para mí un reto profesional inmenso, y en el que vuestra supervisión y consejo han sido claves para poder concluirlo con éxito. Quería agradecer también a la Dra. Paloma Alonso-Magdalena. Gracias Paloma por tratar de resolver mis mil y una dudas cada vez que entraba en tu despacho con una sonrisa y una paciencia y amabilidad infinitas. Gracias también a la Dra. Esther Fuentes y a la Dra. Cristina Ripoll por ser una parte fundamental de esta familia científica. Gracias al Dr. Sergi Soriano por llenar de alegría el laboratorio en cada visita. Aunque creo que los pobres ratones de peluche de Eva no estarían tan de acuerdo con esto. Agradecer también al Dr. Reinaldo dos Santos y la Dra. Hilda Ferrero. Hemos coincidido poco tiempo pero ha sido suficiente para conocer la gran calidad profesional y humana que tenéis. Finalmente quería agradecer muy especialmente a mis gurús de la célula α , la Dra. Eva Tudurí y la Dra. Laura Marroquí. Gracias Eva por estar siempre dispuesta a escucharme, por tus consejos, siempre serenos, de mujer sabia. Gracias Laura, gracias por tu inmensa ayuda desde el primer instante en que llegaste al laboratorio. Gracias por convertirte en mi refugio científico al que acudía con mil y una dudas y miedos, y del que salía no solo sabiendo un poco más de ciencia y de la célula α , sino con la sensación de haber hablado con una amiga.

Sé que suena a tópico, pero es la pura verdad. Ahora toca agradecer a dos de las piezas fundamentales de nuestro laboratorio, Luisi y Salomé. Gracias Luisi por ser tú, que no es poco. Gracias por tu energía arrolladora, por estar siempre para todo y para todos con una alegría desbordante, por nuestros tardeos, la música a todo volumen mientras cazamos islotes, por nuestras múltiples charlas y confidencias. Gracias por hacerme sentir como en casa el primer día en que pisé el laboratorio y me dijiste si yo era la chica nueva a la que le gustaba el indie. Luisi eres la leche y te voy a echar de menos en cada laboratorio al que vaya. Si existe una persona a la que agradecer que yo hoy esté escribiendo estas palabras después de todo este tiempo eres sin duda tú Salomé. A veces pequeños gestos que parecen insignificantes son suficientes para cambiar la vida de alguien y transformarla para siempre, y ese pequeño gesto empezó contigo. Graciès Salo, por cruzarte aquel día hace más de cuatro años con mi tío y acordarte de mí. Este trabajo ha transformado mi vida tanto a nivel profesional como personal, regalándome lo más maravilloso que hay en ella y sin duda tú has formado

parte de escribir esa historia y por ello te estaré eternamente agradecida. Salo, eres una mujer increíble, luchadora, trabajadora incansable, constante (y si no que se lo digan a tus profes de inglés), pero sobre todo una persona con un amor infinito para repartir y a la que es imposible no querer. Y por eso yo lo haré para siempre, porque en todo este tiempo no solo has sido una compañera de trabajo, ni tan solo una amiga, te has convertido en parte de mi familia.

Las compañeras de tesis son sin duda una parte clave de este largo viaje que supone escribir una tesis doctoral, y sin duda yo no hubiese podido tener unas mejores. Querría empezar dando las gracias a dos de mis compañeras del team de la célula alfa. Gracias a la Doctora Beatriz Merino por guiarme en mis primeros momentos en el laboratorio y sobre todo darme muchos consejos sobre el estudio de la célula alfa y enseñarme a cogerle cariño, aunque mira que a veces te lo pone complicado, sobre todo cuando estás haciendo registros de calcio. Y a Lucía, coincidimos muy poco tiempo, pero el suficiente para saber que eres una apasionada de la ciencia y desearte todo lo mejor. Sin duda otra de las componentes destacadas del team alfa es Eva Brú, a la que tengo que agradecer en primer lugar ser una compañera de “despacho” estupenda. Gracias Eva por ser la más sensata y madura de todas a pesar de ser la más joven, ha sido un placer compartir escritorio, charlas (algunas con una temática más científica que otras) y sobretodo muchas risas y buenos momentos. Gracias Jean, mi hermano brasileiro del alma, por entrar en una habitación e iluminarla con tu sonrisa y tu buen rollo. No hay nada como empezar la mañana de trabajo con un “Buenos días guapa” y una sonrisa de oreja a oreja. Gracias Talía, por haberme escuchado siempre con una paciencia y un cariño infinitos cuando más lo necesitaba. Empezamos a trabajar con un mes de diferencia pero creo que no nos conocimos realmente hasta casi el final y de verdad que ha sido un placer conocerte. Para mí fuiste todo un descubrimiento y desde luego mi experiencia en el laboratorio hubiese sido muy distinta sin ti en ella. Gracias por ser como eres, por hacer sentir bien a todo aquel que está a tu alrededor. Y hablando de que mi experiencia en el laboratorio hubiese sido muy distinta si no hubiese tenido las compañeras que he tenido no podría olvidarme de ti, Sabrina. Desde el preciso instante en que te conocí sentí que te conocía de toda la vida, como si siempre hubiésemos sido amigas, familia, y tengo que decir que esa sensación nunca ha desaparecido. Nadie me ha ayudado tanto a conseguir esto como tú, no creo que hubiese llegado al final del camino sin tu ayuda constante, tus mil y un consejos y tus críticas feroces. Gracias Sabrina por ser la punta de mi pipeta, el cebador de mi hebra, el ion al que era selectivo mi canal, esta tesis es tan tuya como mía.

Siempre tiendo a rodearme de mujeres fuertes y maravillosas que hacen mi vida mucho más interesante, y esas son mis amigas. Gracias a Laura, Cristi, Loreto y Esther, por estar siempre ahí, por preocuparse por cómo iba la tesis, mis experimentos y mis ratones, aunque no tuviesen muy claro nunca lo que estaba haciendo. Gracias Espe, por aparecer de repente en mi vida y llenarla de locuras y experiencias increíbles. Por regar nuestras alegrías y penas con un buen albariño y un tardeo improvisado. A tu lado creo que volví a mi época adolescente por un tiempo y fue impresionante. Entre las mujeres también se cuele algún hombre maravilloso que conoce muy bien lo duro que es esto de hacer ciencia. Gracias Abraham, por ser ese cerebro privilegiado al que recurrir desde el primer año de carrera. Por estar siempre ahí, aunque nos separen los años y los kilómetros.

Por supuesto una parte muy importante de mis agradecimientos no podría ir para otras personas que no fuesen mi familia. Gracias a mis padres, porque sin ellos este trabajo no hubiese sido posible. Gracias por darme las herramientas para construir la persona que soy hoy en día, por respetar y apoyar todas mis decisiones, y sobre todo por hacerme sentir siempre tan querida. Gracias a mis hermanos, tan diferentes entre sí, pero tan iguales en el fondo. Porque no hay nada que nos una más que el amor infinito que nos tenemos, gracias por ser dos de mis mejores amigos en este mundo. Creo que juntos, los cinco, formamos un gran equipo. Gracias a mis abuelas y a mi abuelo, por mostraros siempre tan orgullosos de mí. A mis abuelas, por ser las mujeres más fuertes y luchadoras que conozco. Y a mi abuelo, por arrancarme siempre una sonrisa al preguntarme cada vez que nos veíamos que cuándo iba a curarle la diabetes y quedarse pensativo cuando le explicaba que estaba estudiando la diabetes durante el embarazo. Gracias a mis tíos, tías, primos y primas, por sus ánimos constantes y por formar una gran familia de la que estoy muy orgullosa de pertenecer. En especial quiero dar las gracias a mi tía Maricarmen, por ser un ejemplo para mí a lo largo de toda mi vida. Por ese vínculo tan especial que tenemos desde que tengo memoria. Gracias por todo lo que has hecho y haces por mí y por darme una de las cosas más maravillosas y que más alegría trae a mi vida, mi ahijado Fernando.

No sé si esto ha ocurrido muchas veces en los agradecimientos de una tesis, pero existe una persona que se merece darle las gracias por partida doble, de hecho creo más bien se merece que me pase la vida entera dándole las gracias. Gracias Sabrina, gracias por encontrarnos en este mundo inmenso, gracias por hacerme sentir que a tu lado soy capaz de todo. Gracias por ser mi persona en el mundo, la persona que ha hecho que la palabra Todo cobre mil y un significados. Porque juntas todo es posible. Todo para siempre.

