



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Regulación de la ingesta y el metabolismo energético asociada a  
hiperprolactinemia crónica por delección del receptor  
dopaminérgico D2 en lactotropos**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Lic. María Felicitas López Vicchi**

Director de tesis: Dra. Damasia Becú de Villalobos

Consejero de estudios: Dr. Norberto Iusem

Laboratorio de Regulación Hipofisaria

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Buenos Aires, 2020.

## **Regulación de la ingesta y el metabolismo energético asociada a hiperprolactinemia crónica por deleción del receptor dopaminérgico D2 en lactotropos**

La ingesta es un proceso altamente regulado. Su control es multifactorial y fundamental para el mantenimiento del equilibrio energético. El hipotálamo es el responsable de recibir señales aferentes, periféricas y centrales, orexigénicas y anorexigénicas, que reflejan el estado nutricional del animal y de integrarlas para regular el apetito y el gasto energético. Entre estas múltiples señales, la prolactina cumple un papel fundamental, aunque no totalmente dilucidado, dada la dificultad de estudiar su rol fisiológico utilizando un enfoque diferente al farmacológico.

Para evaluar el efecto de la hiperprolactinemia en el control hipotalámico de la ingesta de alimentos y el metabolismo energético, utilizamos un modelo de ratón con deleción específica del receptor de dopamina D2 en los lactotropos (lacDrd2KO). En ausencia del tono inhibitorio que la dopamina ejerce sobre la síntesis y secreción de prolactina, las hembras lacDrd2KO desarrollan hiperprolactinemia crónica y evidencian niveles de ingesta aumentados desde los 3 meses de edad y, adiposidad y peso corporal aumentados desde los 5. En este trabajo se evaluó la progresión del fenotipo, y el posible papel de la prolactina, estudiando parámetros metabólicos a dos edades, 5 y 10 meses.

A los 5 meses de edad, las hembras lacDrd2KO son hiperprolactinémicas. Los niveles de ingesta se encuentran significativamente aumentados, aunque, la obesidad no es evidente ya que el peso corporal aumenta solo marginalmente. A los 10 meses de edad, la hiperprolactinemia se mantiene. La señalización intracelular constantemente activada por prolactina endógena se evidencia en ratones lacDrd2KO por un aumento de la fosforilación basal de STAT5b en áreas hipotalámicas relacionadas con la ingesta de alimentos, como son el núcleo arcuato (ARC), dorsomedial (DMN) y ventromedial (VMN). Además, las hembras lacDrd2KO desarrollan hiperleptinemia y un fenotipo de obesidad mórbida, lo que sugiere una desregulación en aquellos mecanismos de control que la leptina ejerce sobre el metabolismo energético. La resistencia a leptina en hembras lacDrd2KO de 10 meses de edad se evidenció en la incapacidad de reducir la ingesta de alimentos, consistente con la respuesta alterada en la fosforilación de STAT3 en el hipotálamo medio basal (MBH, incluye el ARC y el VMN). Por ello, se estudiaron los niveles de expresión de genes orexigénicos, anorexigénicos e implicados en el control del metabolismo energético. Se observó un aumento en los niveles de expresión del *receptor de prolactina (Prlr)* en el ARC de hembras lacDrd2KO de 5 meses de edad y un incremento de dos genes orexigénicos, el *neuropéptido Y (Npy)* y el *péptido relacionado con la proteína Agoutí (Agrp)* y en ese mismo núcleo hipotalámico, los 10 meses. A esta edad, *Npy* se encontró también aumentado

en el DMN lo que podría contribuir al aumento en el nivel de ingesta y a la disminución en los niveles de expresión de *Ucp1*, proteína desacoplante de mitocondrias, en el tejido adiposo pardo, ambos eventos favorecen el incremento de peso observado.

En este contexto, desafiamos a hembras lacDrd2KO y control de 3 meses de edad, a dos meses de dieta rica en grasa con el objetivo de evidenciar cambios fenotípicos posiblemente enmascarados por mecanismos fisiológicos de control homeostático del balance energético. Hembras lacDrd2KO de 5 meses de edad que recibieron una dieta rica en grasa a edades tempranas, mostraron un mayor nivel de ingesta y mayor consumo de calorías que hembras control bajo el mismo tratamiento. Encontramos que mientras que las hembras control y lacDrd2KO que recibieron alimento regular, mantuvieron su peso constante a lo largo del protocolo. Sorprendentemente, las hembras lacDrd2KO que recibieron una dieta rica en grasa, tuvieron depósitos de tejido adiposo blanco y pardo de mayor tamaño que las hembras control bajo el mismo tipo de dieta, lo que fue acompañado por un aumento de peso significativamente mayor. Asimismo, observamos que en estas hembras la expresión de *Ucp1*, se encontraba significativamente disminuida en el tejido adiposo pardo interescapular, lo que indica capacidad termogénica reducida. La falla en este mecanismo compensatorio que mantiene la homeostasis energética, podría explicar, en parte, el aumento en el peso corporal. Por otra parte, el nivel de expresión del *Prlr* en este tejido se encontraba aumentado, lo que sugiere una posible acción directa de la prolactina sobre los adipocitos pardos.

Este trabajo revela un papel importante de la prolactina en la ingesta de alimentos y la acumulación de adiposidad, que puede ser fundamental en las adaptaciones metabólicas a la preñez y la lactancia, pero que en condiciones de hiperprolactinemia patológica pueden predisponer a alteraciones metabólicas. Nuestros resultados sugieren que, niveles de prolactina patológicos impactan sobre núcleos hipotalámicos específicos donde median la alteración en los niveles de expresión de genes orexigénicos, anorexigénicos, resistencia a leptina y desregulación de circuitos hipotalámicos que controlan el balance energético del tejido adiposo.

**Palabras clave:**

Balance energético

Prolactina

Leptina

Hipotálamo

Tejido adiposo

## **Endocrine control of food intake and metabolism associated to increased prolactin in mice with selective ablation of D2Rs in lactotropes**

Food Intake is a highly regulated process. Its control is multifactorial and fundamental for the maintenance of energy balance. The hypothalamus is responsible for receiving afferent, peripheral and central, orexigenic and anorexigenic inputs, which reflect the animal's nutritional status and integrates them to regulate food intake and energy expenditure. Among these multiple inputs, the participation of prolactin is fundamental, although not fully understood, given the difficulty of studying its physiological role using a pharmacological approach or exogenous prolactin administration.

To evaluate the effect of chronic hyperprolactinemia on brain control of food intake and metabolism we used female mice which lack dopamine D2 receptors in lactotropes (lacDrd2KO). In the absence of the tonic inhibitory control that dopamine exerts on dopamine synthesis and release, female mice have lifelong hyperprolactinemia, increased food intake and adiposity, and gradual development of obesity. In the present work we evaluated the progression of this phenotype, and prolactin's possible causative role, by studying metabolic parameters at two different time points, 5 and 10 months of age.

At 5 months of age, lacDrd2KO females are hyperprolactinemic. Food intake levels are significantly increased, although obesity is not evident since body weight is only marginally affected. Ten-month old lacDrd2KO female mice remain hyperprolactinemic, and are obese. Ongoing endogenous prolactin signaling in lacDrd2KO mice compared to controls was evidenced by increased basal phosphorylation of STAT5b in hypothalamic areas related to food intake, the arcuate (ARN), dorsomedial (DMN) and ventromedial nucleus (VMN). Orexigenic, anorexigenic, and metabolic related gene expression was therefore studied. In the ARN of 5-month old lacDrd2KO female mice there were higher *Prlr* levels, and in 10-month old lacDrd2KO mice we evidenced increased expression of the orexigenic genes *Neuropeptide Y* (*Npy*) and *Agouti related peptide*, compared to controls. Furthermore, *Npy* expression was increased in the DMN, which may contribute to increased food intake and decreased expression of *Uncoupling protein-1* (*Ucp1*) found in brown adipose tissue, both events favouring weight gain. Results pointed to an interaction of prolactin and leptin. Leptin resistance in 10-month old lacD2RKO female mice was evidenced by its failure to lower food intake consistent with a dampened response of STAT3 phosphorylation, specifically in the mediobasal hypothalamus (which includes the ARN and VMN but not the DMN).

In order to evidence significant phenotypic changes that may be masked by the homeostatic control of energy balance, we challenged 3-month old lacDrd2KO and control female mice with two months of high fat diet. Five-month old lacDrd2KO females who received a high-fat diet had higher levels of food intake and caloric intake than control females under the same treatment. Surprisingly, we found that control and lacDrd2KO female mice that received regular food, maintained their weight constant throughout the protocol, while lacDrd2KO mice that received a high fat diet had larger white and brown adipose tissue depots, and significantly greater weight gain. Likewise, we observed that in lacDrd2KO mice there was decreased *Ucp1* expression in interscapular brown adipose tissue, indicating reduced thermogenic capacity. Failure in this compensatory mechanism that maintains energy homeostasis, could explain, in part, the increase in body weight. On the other hand, *Prlr* mRNA expression levels in this tissue were significantly increased, suggesting a potential direct prolactin action on brown adipocytes.

Our results suggest that pathological chronic high prolactin levels may impact on specific hypothalamic nuclei to mediate alterations in the levels of expression of orexigenic, anorexigenic genes, leptin resistance and increased food intake, and disrupt hypothalamic neuronal circuits controlling energy balance. This work reveals an important role of prolactin in food intake and adiposity accretion, which is fundamental for metabolic adaptations in pregnancy and lactation, but can be detrimental in conditions of pathological hyperprolactinemia.

**Key words:**

Energy balance

Prolactin

Leptin

Hypothalamus

Adipose Tissue

*A mi amada Tita*

**Los resultados presentados en esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:**

1. "CHRONICALLY HIGH PROLACTIN LEVELS IMPACT ON GENE EXPRESSION AT DISCRETE HYPOTHALAMIC NUCLEI INVOLVED IN FOOD INTAKE AND MODIFY LEPTIN AND PROLACTIN RESPONSIVENESS" **Lopez-Vicchi Felicitas**, Sharon Ladyman, Ornstein Ana Maria, Pene Knowles, Guillermina Maria Luque, David R. Grattan, Damasia Becu Villalobos. **Faseb J.** 2020, doi: 10.1096 En prensa.
2. "PROLACTIN THE BRIGHT AND THE DARK SIDE" **Lopez Vicchi Felicitas**, Becu- Villalobos Damasia. **Endocrinology.** 2017, 158(6):1556-1559.
3. "CHRONIC HYPERPROLACTINEMIA EVOKED BY DISRUPTION OF LACTOTROPE DOPAMINE D2 RECEPTORS IMPACTS ON LIVER AND ADIPOCYTE GENES RELATED TO GLUCOSE AND INSULIN BALANCE". Luque GM\*, **Lopez-Vicchi F\***, Ornstein AM, Brie B, De Winne C, Fiore E, Perez-Millan MI, Mazzolini G, Rubinstein M, Becu-Villalobos D. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.** 2016; Vol. 311 no. 6, E974-E988 \*Primer autoría compartida.
4. "DOPAMINERGIC DRUGS IN TYPE 2 DIABETES AND GLUCOSE HOMEOSTASIS" **Lopez Vicchi F**, Luque GM, Brie B, Nogueira JP, Garcia Tornadu I, Becu-Villalobos D. **Pharmacol Res.** 2016; 109:74-80. doi: 10.1016



*Esta tesis se realizó con el apoyo de CONICET y ANPCyT*



# CONTENIDO

ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	12
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	15
SISTEMA HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO .....	16
HIPOTÁLAMO .....	17
HIPÓFISIS.....	25
PROLACTINA.....	27
SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE PROLACTINA .....	28
RECEPTORES DE PROLACTINA .....	30
FUNCIONES METABÓLICAS DE LA PROLACTINA.....	33
PROLACTINA Y DESBALANCE ENERGÉTICO: PATOLOGÍAS .....	35
LEPTINA.....	36
LEPTINA COMO FACTOR REGULADOR DEL PESO CORPORAL .....	36
ACCIÓN DE LA LEPTINA EN EL HIPOTÁLAMO EN EL CONTROL DEL BALANCE ENERGÉTICO .....	36
INTERACCIONES LEPTINA Y PROLACTINA .....	38
OBJETIVOS GENERALES.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
ANIMALES .....	43
RATONES <i>lacDrd2KO</i> .....	43
GENOTIPIFICACIÓN DE RATONES .....	44
INGESTA .....	47
EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE ATRACÓN ( <i>Binge-eating</i> ) .....	47
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	48
PESO DE LOS TEJIDOS .....	48
HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA .....	49
MEDICIÓN DE GLUCEMIA BASAL.....	49
TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA .....	49
ELISA INSULINA .....	49
LEPTINA.....	50
ELISA LEPTINA.....	50
TEST DE SENSIBILIDAD A LEPTINA .....	50
PROTOCOLOS DE ALIMENTACIÓN CON DIETA GRASA .....	51

RADIOINMUNOENSAYO (RIA) .....	52
HISTOLOGIA .....	53
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS .....	53
COLORACIONES .....	53
INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) .....	54
INMUNOTINCIÓN PARA INSULINA Y GLUCAGON EN PÁNCREAS .....	54
ACTIVACIÓN DE pSTAT3 EN NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS ESPECÍFICOS EN RESPUESTA A LEPTINA .....	56
ACTIVACIÓN DE pSTAT5 EN NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS ESPECÍFICOS EN RESPUESTA A PROLACTINA .....	57
EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE cDNA .....	59
DISEÑO DE PRIMERS .....	60
PCR EN TIEMPO REAL.....	62
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	64
CAPÍTULO 1 .....	65
INTRODUCCIÓN.....	66
HIPERPROLACTINEMIA Y PROLACTINOMAS.....	66
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERPROLACTINEMIA CRÓNICA .....	67
PROLACTINA Y GLÁNDULA MAMARIA.....	68
PROLACTINA E INGESTA.....	72
PROLACTINA Y TEJIDO ADIPOSO .....	73
PROLACTINA E HÍGADO.....	78
PROLACTINA Y PÁNCREAS.....	79
OBJETIVOS.....	82
RESULTADOS .....	83
PERFIL HORMONAL.....	83
HIPERPLASIA HIPOFISARIA .....	84
GLÁNDULA MAMARIA.....	84
COMPORTAMIENTO DE INGESTA Y PESO CORPORAL .....	87
LEPTINA .....	89
ANÁLISIS DE LOS DEPÓSITOS DE TEJIDO ADIPOSO.....	89
HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA .....	92
TRIGLICÉRIDOS .....	94
DISCUSIÓN .....	95

CAPÍTULO 2 .....	101
INTRODUCCIÓN .....	102
CONTROL NEUROENDOCRINO DEL BALANCE ENERGÉTICO .....	102
PARTICIPACIÓN DE LA PROLACTINA EN EL CONTROL NEUROENDOCRINO DEL BALANCE ENERGÉTICO .....	107
PARTICIPACIÓN DE LA LEPTINA EN EL CONTROL NEUROENDOCRINO DEL BALANCE ENERGÉTICO .....	110
OBJETIVOS.....	112
RESULTADOS .....	113
SENSIBILIDAD CENTRAL A PROLACTINA.....	113
PREDICCIÓN <i>IN SÍLICO</i> DE SITIOS DE UNIÓN PARA STAT5b y STAT3 .....	115
EXPRESIÓN GÉNICA EN NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS.....	116
SENSIBILIDAD CENTRAL A LEPTINA.....	119
DISCUSIÓN .....	124
CAPÍTULO 3 .....	129
INTRODUCCIÓN.....	130
CARACTERIZACIÓN DE LOS DEPÓSITOS DE TEJIDO ADIPOSO .....	130
INDUCCIÓN DE LA CAPACIDAD TERMOGÉNICA COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA.....	137
ROL DE LA AUTOFAGIA EN LA PLASTICIDAD DEL TEJIDO ADIPOSO .....	138
PROLACTINA Y OBESIDAD .....	140
OBJETIVOS.....	143
RESULTADOS .....	144
COMPOSICIÓN DE LA DIETA .....	144
EFECTO DE DIETA GRASA SOBRE EL PESO CORPORAL Y LOS NIVELES DE INGESTA .....	144
PESO TEJIDOS .....	148
HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA .....	152
EXPRESIÓN GÉNICA.....	155
ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL TEJIDO ADIPOSO PARDO .....	161
DISCUSIÓN .....	163
DISCUSIÓN GENERAL.....	176

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>3V</b>	Tercer ventrículo
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AgRP</b>	Péptido relacionado con la proteína Agoutí
<b>AKT</b>	Proteína Kinasa B
<b>ARC</b>	Núcleo arcuato
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>AVPV</b>	Núcleo anteroventral periventricular
<b>BDNF</b>	<i>Brain derived neurotrophic factor</i> (Factor neurotrófico derivado del cerebro)
<b>C</b>	Dieta balanceada regular
<b>C/EBPb</b>	Enhancer CCAAT beta
<b>CART</b>	<i>Cocaine and amphetamine-regulated transcript</i> (Transcripto regulado por cocaína-anfetamina)
<b>CC</b>	<i>Corpus callosum</i> (Cuerpo calloso)
<b>CCX</b>	Corteza cerebral
<b>CIDEA</b>	<i>Cell death inducing activator</i> (Activador de muerte celular)
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de corticotropina
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i> (Ciclo umbral)
<b>DG</b>	Dieta rica en grasa
<b>DMN</b>	Núcleo dorsomedial
<b>GH</b>	Hormona de crecimiento
<b>GHR</b>	Receptor de hormona de crecimiento
<b>GHRH</b>	Hormona liberadora de hormona de crecimiento
<b>GK</b>	Glucoquinasa
<b>GLP-1</b>	Péptido similar al glucagon-1
<b>GLUT 2</b>	Transportador de glucosa 2
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropina
<b>GTT</b>	Test de tolerancia a la glucosa
<b>GWAS</b>	<i>Genome wide Association studies</i> (Estudio de asociación del genoma completo)
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>INSRA</b>	<i>Insulin receptor type A</i> (Receptor de insulina A)

<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>JAK</b>	<i>Janus Kinase</i> (Quinasa de Janus)
<b>Kda</b>	Kilodalton
<b>lacDrd2KO</b>	Ratón <i>knockout</i> para el RD2 solamente en lactotrofos
<b>LCFA</b>	Ácidos grasos circulantes de cadena larga
<b>Lepr</b>	Receptor de leptina
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>LHA</b>	Hipotálamo lateral
<b>MBH</b>	Hipotálamo medio basal
<b>MC<sub>3</sub>R</b>	Receptor de melanocortinas 3
<b>MC<sub>4</sub>R</b>	Receptor de melanocortinas 4
<b>ME</b>	Median eminence (Eminencia media)
<b>MSH</b>	Hormona estimulante de melanocitos
<b>NAFLD</b>	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
<b>NPY</b>	Neuropéptido Y
<b>NTS</b>	Núcleo del tracto solitario
<b>O.N.</b>	<i>Over night</i> (durante toda la noche)
<b>ob</b>	Gen que codifica para leptina
<b>OC</b>	<i>Optic chiasm</i> (Quiasma óptico)
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PET</b>	Tomografía por emisión de positrones
<b>PeVN</b>	Núcleo periventricular
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Co-activador gamma del receptor activado por proliferador de peroxisomas 1-alfa
<b>POA</b>	Área preóptica
<b>POMC</b>	Propiomelanocortina
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma
<b>Primers</b>	Cebadores
<b>PRLR</b>	<i>Prolactin receptor</i> (Receptor de prolactina)
<b>PRLR-L</b>	Isoforma larga del receptor de prolactina
<b>PRLR-S</b>	Isoforma corta del receptor de prolactina
<b>PVN</b>	Núcleo paraventricular
<b>RD2</b>	<i>Dopamine receptors</i> (Receptores de dopamina D2)
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo

<b>rRPa</b>	Núcleo del rafe pallidus
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SE</b>	<i>Septum</i> (Tabique)
<b>SF-1</b>	<i>Steroidogenic factor 1</i> (Factor esteroideogénico 1)
<b>SOCS</b>	<i>Suppressors of cytokine signaling</i> (proteínas supresoras de la señalización por citoquinas)
<b>SON</b>	Núcleo supraóptico
<b>STAT</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción
<b>STT</b>	Somatostatina
<b>TH</b>	<i>Thalamus</i> (Tálamo)
<b>TIDA</b>	Neuronas tuberoinfundibulares del núcleo arcuato
<b>TrkB</b>	Receptor de BDNF
<b>UCP<sub>1</sub></b>	<i>Uncoupling protein 1</i> (Proteína desacoplante de mitocondrias 1)
<b>ULK-1</b>	Quinasa activadora de autofagia tipo Unc-51
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Factor de crecimiento del endotelio vascular)
<b>VLDL</b>	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteínas de muy baja densidad)
<b>VMN</b>	Núcleo ventromedial
<b>α-MSH</b>	Hormona estimulante de melanocitos

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## SISTEMA HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO

Los organismos pluricelulares complejos requieren sistemas de coordinación que puedan regular e integrar funciones y señales de los diferentes tipos celulares. Existen dos grandes sistemas de coordinación, el sistema nervioso y el sistema endócrino. El primero utiliza señales eléctricas para transmitir muy rápidamente la información entre células; mientras que el segundo utiliza hormonas, señales químicas que circulan por el torrente sanguíneo hasta alcanzar las células blanco sobre las que ejercen un efecto regulador a través de su unión a receptores específicos (Norris 2007).

Ambos sistemas, nervioso y endócrino, se encuentran estrechamente relacionados. El sistema endocrino está formado por glándulas productoras de hormonas, que son reguladas por el sistema nervioso configurando de manera conjunta el sistema neuroendocrino. El sistema neuroendocrino de vertebrados está constituido por el hipotálamo, la hipófisis y las glándulas endócrinas blanco, tales como la glándula tiroides, paratiroides, corteza adrenal, gónadas, glándula mamaria, y también órganos metabólicos blanco de las hormonas hipofisarias como el tejido adiposo, páncreas e hígado (Norris 2007).

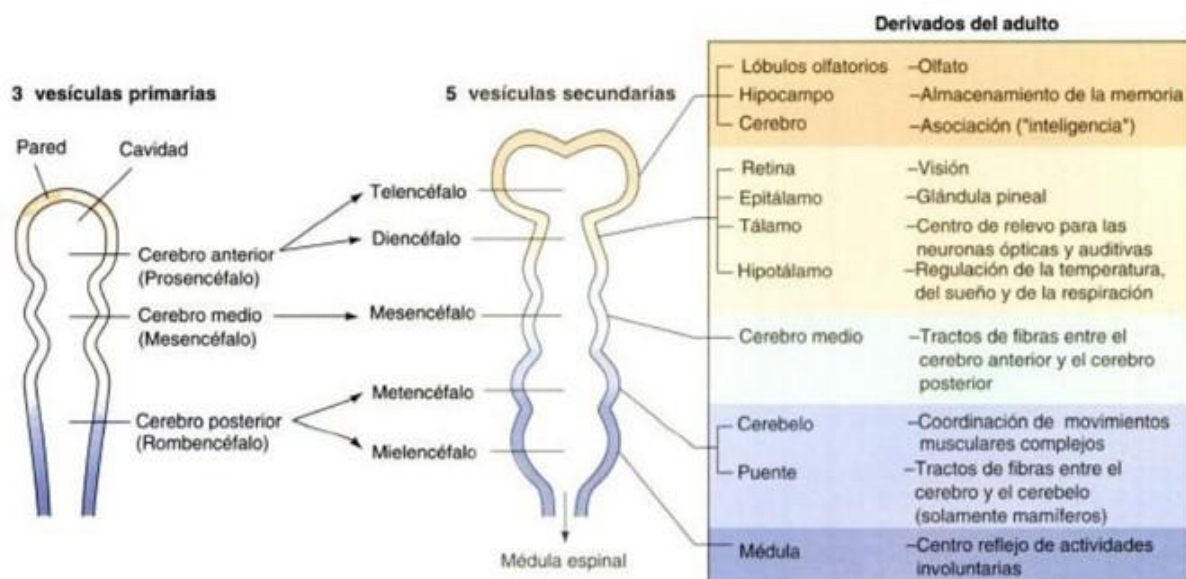
En particular, el hipotálamo es el responsable de vincular los sistemas nervioso y endócrino a través su acción sobre la glándula hipófisis. Grupos específicos de neuronas hipotalámicas conocidas como neuronas neurosecretoras son capaces de sintetizar y secretar hormonas o neurotransmisores, que son liberados a vasos sanguíneos portales-hipofisarios especializados. Algunas de estas neurohormonas controlan la secreción de péptidos y hormonas proteicas por parte de la hipófisis, que actúan sobre glándulas endócrinas (Pocock & Richards 2005), regulando la reproducción, la respuesta al estrés, la producción de hormonas tiroideas, el crecimiento, lactancia, preñez, y diversas funciones homeostáticas como el hambre, la sed, la temperatura corporal, la homeostasis de la glucosa y los ritmos circadianos, entre otras múltiples funciones. En particular, el neurotransmisor dopamina, también es liberado por el hipotálamo y controla a síntesis y liberación de prolactina.



## HIPOTÁLAMO

### Desarrollo embrionario del hipotálamo

Durante el desarrollo embrionario pueden distinguirse tempranamente en el cerebro de los vertebrados tres vesículas cerebrales primarias que se comunican ampliamente entre sí: prosencéfalo (cerebro anterior), mesencéfalo (cerebro medio), rombencéfalo (cerebro posterior). A medida que avanza el desarrollo, el cerebro anterior y posterior se subdividen, el prosencéfalo se divide en telencéfalo y diencefalo, el romboencéfalo se divide en metencéfalo y mielencéfalo, mientras que el mesencéfalo no sufre ninguna división. Cada una de estas regiones luego se diferencia en diferentes componentes del cerebro adulto (Norris 2007) (Figura 1). El hipotálamo es de origen diencefálico, y se extiende bajo el tálamo comprendiendo la zona gris que rodea ventralmente al tercer ventrículo. En la porción ventral adquiere una disposición infundibular que se continúa con el tallo hipofisario finalizando en el lóbulo neural (Vianna & Coppari 2011).



**Figura 1.** Desarrollo temprano del cerebro humano. Tomada y modificada de Gilbert, *biología del desarrollo*, Séptima edición. Editorial médica Panamericana (Gilbert 2005).

### Anatomía del hipotálamo

Utilizando criterios filogenéticos y el estudio al microscopio de la composición celular del hipotálamo, es posible reconocer en el hipotálamo de vertebrados cuerpos neuronales agrupados en núcleos hipotalámicos discretos y tractos de fibras nerviosas asociadas que permiten la continua

comunicación entre neuronas del hipotálamo y entre núcleos hipotalámicos y otras áreas del cerebro (RAFF 2013). Asimismo, dichos núcleos integran tres zonas principales que incluyen el hipotálamo lateral (LHA), medial y periventricular, cada una con características morfológicas y funcionales distintas (Tabla 1). Tanto el hipotálamo medial como el periventricular de los mamíferos contienen una alta densidad de cuerpos celulares neuronales organizados en núcleos que intervienen en el control del metabolismo mediante la regulación de la síntesis y secreción de hormonas hipofisarias. El hipotálamo medial también contiene núcleos que relevan información proveniente de la neocorteza, el sistema límbico y de núcleos sensoriales del tronco encefálico involucrados en las fases de iniciación de comportamientos homeostáticos específicos como la sed, el hambre, la termorregulación, ciclos sueño-vigilia y el comportamiento reproductivo (Anders Bjorklund 1987). El LHA ocupa la mayor parte del volumen del hipotálamo, sin embargo, no contiene núcleos distinguibles, sino que consiste en neuronas de axón corto que rodean el haz central del prosencéfalo medial. Es a través de este sistema de fibras que la información del prosencéfalo medial (amígdala, hipocampo, tabique, sistema olfativo, neocorteza) y el tronco encefálico, se transporta a las subdivisiones hipotalámicas medial y periventricular, delegando un papel importante al LHA para influir en los sistemas de control homeostáticos.

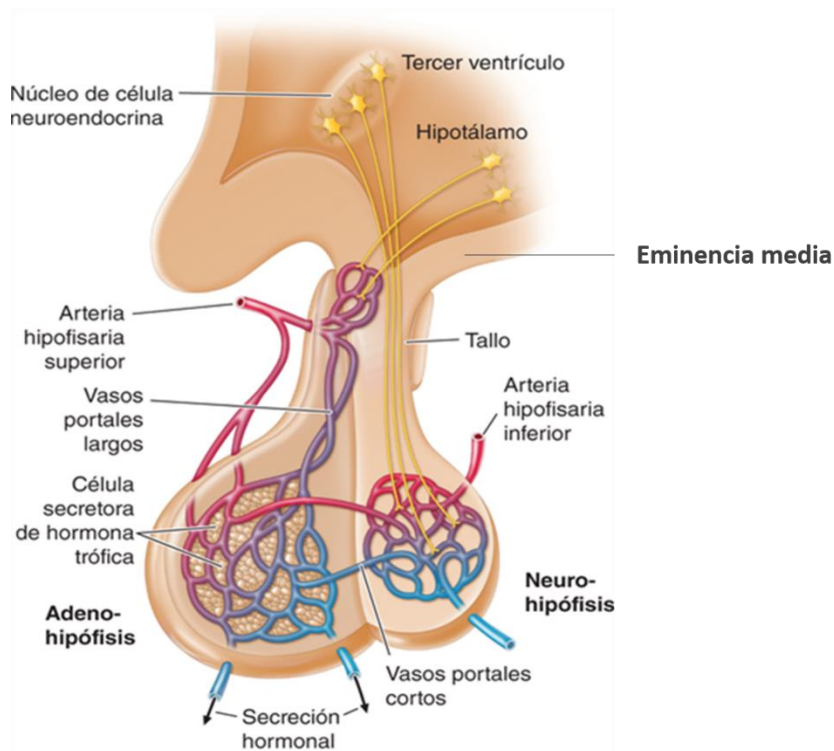
<b>Zona periventricular</b>	Núcleo periventricular
	Núcleo supraquiasmático
	Núcleo paraventricular
	Núcleo arcuato
<b>Zona medial</b>	Núcleo preóptico medial
	Área hipotalámica anterior
	Núcleo dorsomedial
	Núcleo ventromedial
	Núcleo premamilar
	Núcleo mamilar
	Área hipotalámica posterior
<b>Zona lateral</b>	Área hipotalámica lateral
	Núcleo preoptico lateral
	Núcleo supraóptico

**Tabla 1.** Basada en la clasificación anatómica de Nauta WJH and Haymaker W, *Hypothalamic nuclei and fiber connections.*: Haymaker W, Anderson E, Nauta WJH (eds); *The Hypothalamus*, Charles C Thomas Publisher, 1969, pp 136-209.) (Lechan & Toni 2000).

### ***Centro regulador de la secreción hipofisaria***

El hipotálamo reúne e integra señales de diversos orígenes, estímulos recibidos de los medios externo e interno, y envía señales precisas hacia la hipófisis, conocidas como neurohormonas, capaces de regular la síntesis, almacenamiento y secreción de hormonas tróficas adenohipofisarias (Halasz 2000; Fink 2000). La mayoría de estas neurohormonas son oligo- o polipéptidos sintetizados en núcleos hipotalámicos discretos (Setalo *et al.* 1978; Fink 2000), algunos de los cuales también actúan como neurotransmisores o neuromoduladores en el sistema nervioso central. Algunas de las neurohormonas liberadas por el hipotálamo son: la hormona liberadora de corticotropina (CRH), hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), la hormona inhibitoria de la liberación de hormona de crecimiento (somatostatina – STT), la hormona liberadora de tirotropina, la oxitocina, la vasopresina, y la dopamina, que no es un péptido sino una amina, (DA) y es la responsable de inhibir la liberación de prolactina del lóbulo anterior de la hipófisis.

La comunicación entre el sistema nervioso y el sistema endócrino permite mantener la homeostasis fisiológica y se da a través de la eminencia media (ME), estructura ubicada en la base del hipotálamo que se encuentra en contacto íntimo con el tallo hipofisario. Las neurohormonas sintetizadas en los cuerpos neuronales del hipotálamo llegan a las terminales axonales en la ME y son vertidas directamente en los vasos portales del tallo hipofisario que transportan sangre del tejido neurosecretor al tejido glandular de la hipófisis anterior (adenohipófisis). Una vez en la glándula estos vasos forman una red de capilares fenestrados en íntimo contacto con las células glandulares donde vuelcan la secreción (Figura 2).



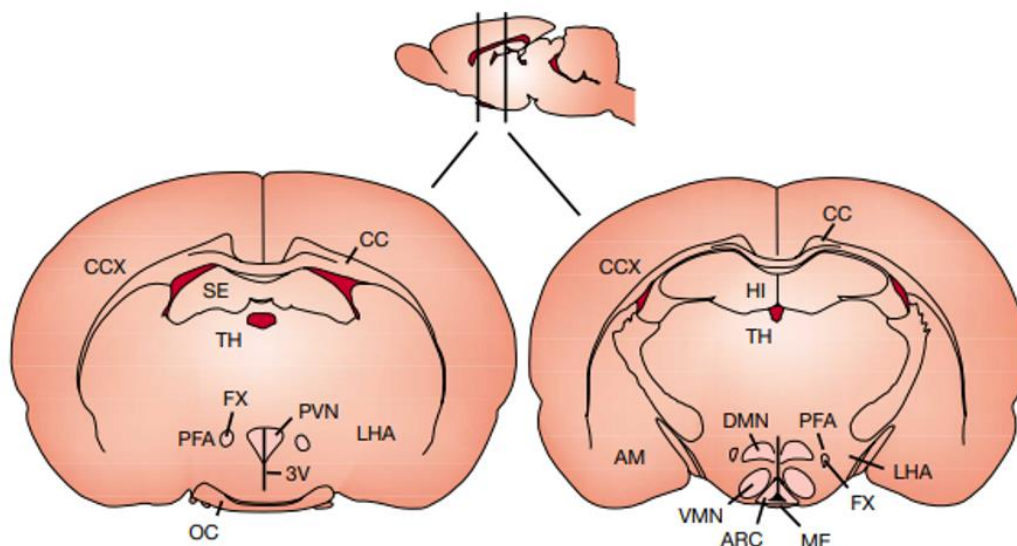
**Figura 2.** Plexo portal hipotálamico-hipofisario. Imagen tomada de Dennis L. Kasper, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo: Harrison. Principios de Medicina Interna, Edición.19: [www.accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com).

El plexo portal hipotálamico-hipofisario permite una comunicación fluida y directa entre el hipotálamo y la hipófisis, y así, muy bajas concentraciones de neurohormonas producen efectos sobre la hipófisis, evitando una posible dilución de la concentración de las mismas por el sistema circulatorio general (Fink 2000). Finalmente, las células hipofisarias expuestas a factores liberadores o inhibidores, responden liberando hormonas hacia la circulación sistémica o incrementando la síntesis de las mismas (Dennis Kasper 2016). Estas acciones coordinadas impulsan una amplia diversidad de acciones biológicas y median múltiples funciones reguladoras que involucran a todos los sistemas de órganos.

### Centro regulador de la ingesta y el metabolismo

El hipotálamo es un área clave del cerebro que sensa la disponibilidad de energía del organismo y media modificaciones apropiadas para mantener el balance energético. Las conexiones neuronales del hipotálamo son múltiples y complejas, siendo en su mayoría recíprocas formando circuitos dentro de los núcleos hipotalámicos, entre núcleos y áreas hipotalámicas, así como también, entre regiones hipotalámicas y diferentes regiones extra-hipotalámicas (Halasz 2000; Palkovits 1999).

Nutrientes, como la glucosa o ácidos grasos, hormonas sintetizadas por el sistema gastrointestinal (péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), colecistoquinina (CCK) y péptido YY, entre otras), señales relacionadas con la adiposidad (leptina, adiponectina, ghrelina e insulina, entre otras), y las señales de los centros sensoriales y de recompensa del cerebro, comunican la información sobre el estado energético del organismo a neuronas especializadas del hipotálamo y el tronco encefálico que finalmente las traducen en señales aferentes nerviosas y hormonales que modulan múltiples procesos fisiológicos y conductuales. Estos cambios en el comportamiento y el metabolismo energético inducidos por el hipotálamo son el resultado de la actividad integrada de varias poblaciones de neuronas definidas sensibles a los indicadores de disponibilidad energética mencionados. Los principales núcleos hipotalámicos involucrados son el núcleo arcuato (ARC), núcleo ventromedial (VMN), dorsomedial (DMN) y paraventricular (PVN). (Figura 3)



**Figura 3.** Diagramas de cerebro de rata, mostrando principales regiones hipotalámicas implicadas en la regulación del balance energético. La pequeña figura en la parte superior es una vista longitudinal de un cerebro de rata, con el bulbo olfatorio en el extremo anterior a la izquierda y el cerebro caudal o posterior a la derecha. Abajo se muestran secciones de cerebro a dos niveles (indicados por las líneas verticales). Las neuronas de primer orden que responden a señales que indican el estado energético se ubican en el núcleo

*arcuato (ARC) y proyectan hacia el núcleo paraventricular (PVN). Otras regiones involucradas en la regulación de la ingesta y el gasto energético son el núcleo ventromedial (VMN) y el dorsomedial (DMN). Abreviaturas de otras estructuras cerebrales: AM, amígdala; CC, corpus callosum; CCX, corteza cerebral; HI, hipocampo; LHA, hipotálamo lateral; ME, eminencia media; OC, quiasma óptico; SE, tabique; TH, tálamo; 3V, tercer ventrículo.*

Principales núcleos hipotalámicos que participan de la regulación de la ingesta

- El núcleo arcuato (ARC)

El ARC es un núcleo hipotalámico ampliamente estudiado. Se localiza cerca de la ME, que al estar desprovista de barrera hematoencefálica, permite una comunicación fluida entre el sistema nervioso central y el periférico. Las neuronas que residen allí se denominan neuronas de primer orden ya que son las primeras en responder a las señales circulantes de hambre y saciedad siendo la leptina y la insulina, dos de las más importantes. Primordialmente, se han identificado dos poblaciones neuronales dentro del ARC de roles opuestos y críticos en la regulación de la ingesta de alimentos, las neuronas orexigénicas que co-expresan el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con la proteína agouti (AgRP) y las neuronas anorexigénicas que coexpresan proopiomelanocortina (POMC) y el transcripto de cocaína y anfetamina (CART).

POMC es un oligopéptido precursor de múltiples péptidos bioactivos en el hipotálamo, entre ellos la hormona estimulante de melanocitos ( $\alpha$ -MSH), que ejercen potentes efectos anorexigénicos al unirse a los receptores de melanocortinas 3 (MC3R) y 4 (MC4R) (Mercer *et al.* 2013). Los niveles de expresión de *Pomc* y  $\alpha$ -*Msh* aumentan durante la ingesta de alimentos y disminuyen en condiciones de ayuno (Schwartz *et al.* 1999; Schwartz *et al.* 1997). La administración central de  $\alpha$ -MSH inhibe la ingesta de alimentos y reduce el peso corporal (Wirth *et al.* 2001; Poggioli *et al.* 1986). Resulta evidente que POMC tiene un papel clave en el control de la homeostasis energética, ya que los ratones que carecen de *Pomc*, péptidos de melanocortina o sus receptores, o neuronas *Pomc*<sup>-/-</sup> desarrollan obesidad (Gropp *et al.* 2005; Xu *et al.* 2005; Smart *et al.* 2006; Yaswen *et al.* 1999). Asimismo, mutaciones en el gen de *POMC* se asocian a un fenotipo de obesidad mórbida en humanos (Lee *et al.* 2006; Krude *et al.* 1998).

Por otro lado, NPY es la señal orexigénica endógena más potente. Contrariamente a lo que se observa para POMC, la síntesis y secreción de NPY responde a cambios en el estado energético, disminuyendo durante la alimentación y aumentando en condiciones de ayuno (Kalra *et al.* 1991) (Beck *et al.* 1990). Asimismo, aumentar los niveles de NPY farmacológicamente resulta en un fenotipo hiperfágico y gasto energético reducido como consecuencia de una termogénesis alterada (Egawa *et*

al. 1991) (Stanley *et al.* 1986) (Clark *et al.* 1984). AgRP también es un péptido orexigénico y un antagonista endógeno de la  $\alpha$ -MSH en los receptores centrales de melanocortinas (Schneeberger *et al.* 2014). La administración intracerebroventricular crónica de AgRP o la inducción de su sobreexpresión estimulan la ingesta de alimentos y la reducción del gasto energético causando obesidad (Ollmann *et al.* 1997; Small *et al.* 2003; Graham *et al.* 1997).

- El núcleo paraventricular (PVN)

El PVN se encuentra justo por encima del tercer ventrículo, y expresa altos niveles de *Mc3r* y *Mc4r*. Recibe inervación no solo de las neuronas AgRP y POMC del ARC sino también de regiones extra-hipotalámicas como el núcleo del tracto solitario (NTS). El PVN es un sitio de integración importante involucrado en la regulación de la homeostasis de energética. Esto se evidencia en las múltiples entradas aferentes y su contundente respuesta a la administración de neuropéptidos involucrados en la regulación de la ingesta de alimentos como son NPY, AgRP y  $\alpha$ -MSH, entre otros (Stanley *et al.* 1986; Kim *et al.* 2000).

- El núcleo ventromedial (VMN)

La ablación experimental del VMN, produce hiperfagia y obesidad (Schwartz *et al.* 2000). Las neuronas AgRP y POMC del ARC también proyectan hacia el VMN. Estudios de microdissección por captura láser han evidenciado que las neuronas del VMN tienen altos niveles de expresión de *factor esteroideogénico 1 (Sf1)* (Segal *et al.* 2005) y *factor neurotrófico derivado del cerebro (Bdnf)* (Lyons *et al.* 1999; Yeo *et al.* 2004). Ratones con delección específica de *Sf1* en el VMN son susceptibles a la obesidad inducida por dieta rica en grasa, y además muestran termogénesis alterada tras una exposición aguda a una dieta hipercalórica. Esto demuestra que el VMN juega un papel importante en el control del equilibrio energético, regulando la termogénesis, especialmente tras un consumo excesivo de calorías (Kim *et al.* 2011b). Como dijimos previamente, otra proteína muy representada en el VMN es BDNF. La falta de BDNF o su receptor (TRKB) conducen a hiperfagia y obesidad en humanos y ratones (Lyons *et al.* 1999; Yeo *et al.* 2004). Por el contrario, la administración central o periférica de BDNF estimula la pérdida de peso corporal y la reducción de la ingesta de alimentos a través de la señalización vía MC4R (Xu *et al.* 2003).

- El núcleo dorsomedial (DMN)

El DMN está involucrado en una variedad de procesos fisiológicos, que incluyen el apetito, la termorregulación, el estrés y los ritmos circadianos. Recibe proyecciones de la mayoría de los núcleos hipotalámicos, especialmente el ARC, y envía proyecciones al PVN. Tanto NPY como CRH y una serie de receptores de péptidos involucrados en el control del apetito y el equilibrio energético se expresan en el DMN. Se evidenció un mayor nivel de expresión de *Npy* en el DMN en varios modelos de

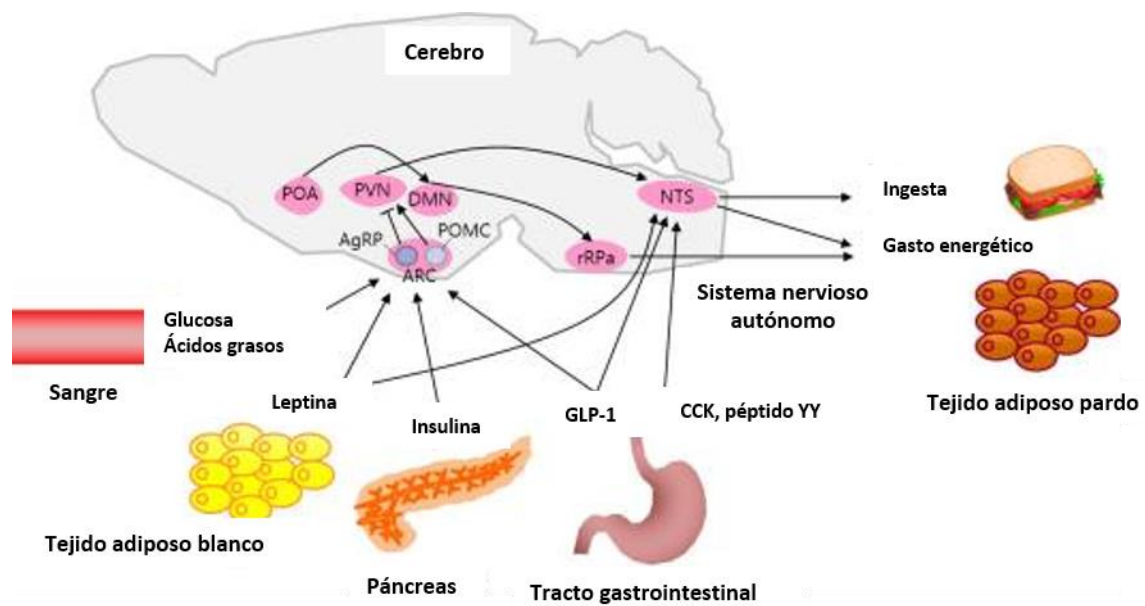
obesidad en roedores (Bi *et al.* 2001; Guan *et al.* 1998) y se ha sugerido que la ablación de NPY induce termogénesis y previene la obesidad inducida por dieta (Chao *et al.* 2011).

Mecanismos hipotalámicos de regulación del balance energético.

Como se explicó previamente, el hipotálamo mantiene el balance energético controlando diversos aspectos del metabolismo tales como, la ingesta de alimentos y bebidas, el vaciamiento gástrico, absorción de nutrientes en el intestino, gasto energético por termogénesis, secreción de insulina pancreática, acción de insulina en hígado, tejido adiposo y músculo esquelético (Lopez *et al.* 2010).

En líneas generales, nutrientes y hormonas indicadoras del estado energético del organismo, como son la leptina e insulina, activan a las neuronas anorexigénicas POMC e inhiben a las neuronas orexigénicas NPY/AgRP del ARC. Cuando se activan, las neuronas POMC secretan  $\alpha$ -MSH (un producto de escisión proteolítica de POMC), que es un agonista de MC3R y MC4R en neuronas anorexigénicas del PVN y el VMN, lo que conduce a una disminución en los niveles de ingesta y a un mayor gasto energético. De manera similar, la grelina es una hormona secretada por el estómago durante períodos de ayuno y actúa a nivel central alertando al hipotálamo de la necesidad de inducir la ingesta de alimentos. La acción orexigénica de la grelina es mediada por las neuronas NPY/AgRP que secretan AgRP, un péptido antagonista de los receptores de melanocortinas, que induce hiperfagia y aumento de peso al inhibir la unión de  $\alpha$ -MSH a MC3R/MC4R. A su vez, el PVN y el VMN proyectan hacia el NTS en el tronco encefálico. El NTS responde a las señales de saciedad a través de entradas directas al NTS e indirectas al hipotálamo y activa aferentes vagales para reducir la ingesta de alimentos. El área preóptica (POA) en el hipotálamo recibe señales sensoriales térmicas de la exposición al frío y activa la vía del POA- DMN- núcleo del rafe pallidus (rRPa) para promover la termogénesis en el tejido adiposo pardo o marrón. El rRPa contiene neuronas premotoras simpáticas que transmiten señales térmicas desde el POA y el DMN para influir en el flujo de salida simpático hacia el tejido adiposo pardo para producir calor. El sistema hipotalámico de melanocortina también participa en la termorregulación (Figura 4).



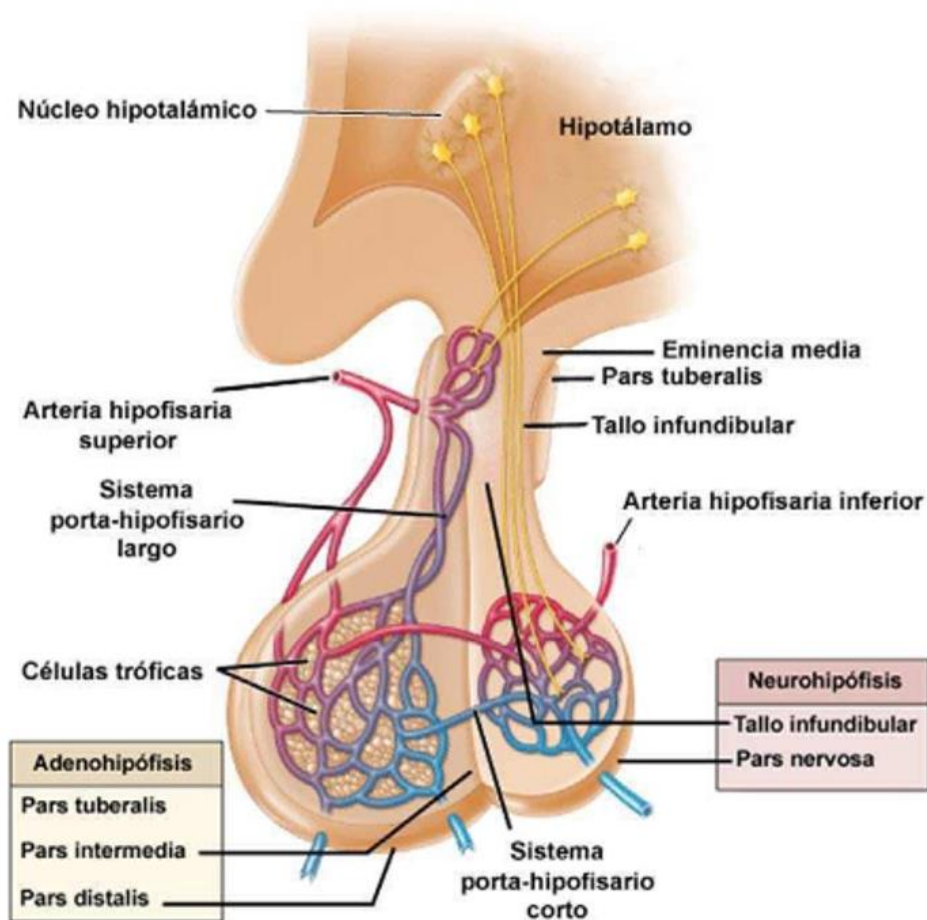


**Figura 4.** Modelo de la regulación central del metabolismo energético. Abreviaturas de áreas del sistema nervioso central involucradas: POA, Área preóptica; PVN, núcleo paraventricular; DMN, núcleo dorsomedial; NTS, núcleo del tracto solitario; rRPa, núcleo del rafe pallidus; ARC, núcleo arcuato; AgRP, proteína agoutí; POMC, propiomelanocortina. Imagen tomada y adaptada de (Roh & Kim 2016).

## HIPÓFISIS

La hipófisis o glándula pituitaria es una glándula endócrina que regula diversas funciones fisiológicas básicas incluyendo crecimiento, reproducción, y homeostasis metabólica. Se encuentra ubicada ventral al cerebro y posterior al quiasma óptico (OC), sobre el bolsillo o fosa del hueso esfenoides denominada silla turca; y permanece unida al hipotálamo por un tallo o pedículo. La hipófisis de mamíferos está compuesta por dos porciones que interactúan íntimamente entre sí, y que difieren en su origen embriológico: la hipófisis posterior o neurohipófisis, y la hipófisis anterior o adenohipófisis. La neurohipófisis deriva del neuroectodermo mientras que la adenohipófisis del llamado placode hipofisario. En ambos casos, el origen es ectodérmico (Zhu *et al.* 2007).

La adenohipófisis posee una estructura epitelio-glandular y puede ser subdividida en tres regiones anatómicas: *pars distalis*, *pars tuberalis*, y *pars intermedia* (ausente o vestigial en humanos). Cada región de la adenohipófisis se distingue por sus características histológicas así como también por su relación con la neurohipófisis, en la cual se distinguen tres regiones: ME, *pars nervosa* y tallo infundibular siendo este último el que conecta ambas estructuras (Norris 2007) (Figura 5).



**Figura 5:** Representación esquemática de la glándula hipofisiaria. Tomado de tesis doctoral (Pocock & Richards 2005).

Las funciones endócrinas de la glándula son llevadas a cabo por diferentes tipos celulares ubicados en la adenohipófisis. Estos se encuentran definidos de acuerdo a la hormona que producen y secretan. La *pars distalis* está compuesta por somatotropos que producen hormona de crecimiento (GH), lactotropos productores de prolactina, tiotropos que secretan hormona tiroideo estimulante, corticotropos productores de hormona adrenocorticotrófica y gonadotropos secretores de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (Quereda & Malumbres 2009). La *pars intermedia* se encuentra altamente inervada por terminales de neuronas hipotalámicas adrenérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas, que contactan con células denominadas melanotropos. Estas últimas secretan mayoritariamente  $\alpha$ -MSH, como también otras melanocortinas ( $\beta$ -MSH,  $\gamma$ -MSH, CLIP,  $\beta$ -endorfina). La secreción de  $\alpha$ -MSH es inhibida por las fibras dopaminérgicas provenientes del ARC que forman parte del tallo neural (Fink 2000). La función principal de este lóbulo se relaciona con la

pigmentación. La *pars tuberalis* está compuesta principalmente por: gonadotropos, corticotropos y tirotropos.

Otro tipo celular presente en la glándula hipófisis son las células folículo estrelladas, no secretoras de hormonas, pero que sintetizan numerosos factores con funciones autocrinas y paracrinas, entre ellos el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF).

A diferencia de la adenohipófisis, la neurohipófisis permanece conectada con el hipotálamo a través de un tracto nervioso (el tracto nervioso hipotálamo- hipófisario). La neurohipófisis secreta dos hormonas, la oxitocina y la hormona antidiurética o vasopresina. Ambas son sintetizadas dentro de los cuerpos celulares de grandes neuronas que se extienden en los núcleos supraóptico (SON) y PVN del hipotálamo. Son transportadas unidas a proteínas específicas, a lo largo de los axones de estas neuronas hasta las terminaciones nerviosas que se extienden dentro de la neurohipófisis. Estas hormonas son secretadas a los capilares que irrigan el lóbulo neural como respuesta a los impulsos nerviosos originados en el SON y PVN (Pocock & Richards 2005)

En el presente trabajo, nos centraremos principalmente en las células hipófisarias que sintetizan y liberan prolactina, los lactotropos.

## PROLACTINA

La prolactina es una hormona polipeptídica formada por 197 aminoácidos en rata y ratón y 199 en humanos, con un peso molecular de 23 kilodaltons (kDa), aunque este valor puede variar ligeramente según la especie. El gen que codifica para prolactina es único y se ha encontrado en todos los vertebrados (Goffin *et al.* 2002) lo que la convierte en una hormona filogenéticamente muy antigua. Sus efectos en distintas especies son variados, por ejemplo, en peces y anfibios, mantiene el equilibrio electrolítico a través de las barreras epiteliales, en aves, particularmente palomas, estimula la proliferación de las células del buche y la secreción de nutrientes y electrolitos por parte de estas células epiteliales para producir la leche que alimenta a las crías (Lopez-Vicchi & Becu-Villalobos 2017). En mamíferos, presenta múltiples y diversas funciones biológicas, lo que condice con la amplia distribución de receptores de prolactina (PRLR) en el organismo. Además de estar presentes en glándula mamaria, los PRLR se pueden encontrar en numerosos órganos y tipos de células, incluidos los huesos, el tracto reproductivo, el tejido adiposo, el intestino, la piel, el sistema inmunológico, la hipófisis y el cerebro (Goffin *et al.* 2002). Esto sugiere que además de su conocida acción de favorecer la lactogénesis en glándula mamaria, la prolactina lleva adelante acciones complementarias en otros

tejidos que incluyen osmoregulación, inmunorregulación, reproducción, crecimiento, comportamiento y metabolismo e indica que altos niveles de prolactina séricos implican un potencial impacto en una amplia variedad de sistemas.

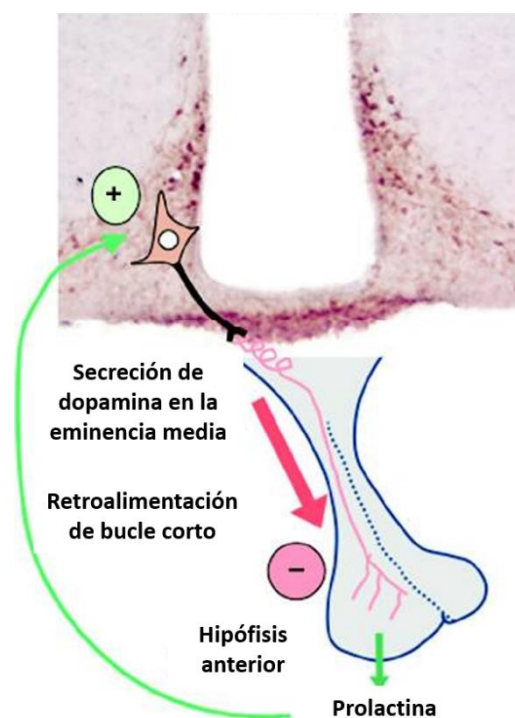
## SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE PROLACTINA

La prolactina es sintetizada y secretada principalmente por lactotrofos. Estos se encuentran presentes en la hipófisis anterior (Freeman *et al.* 2000) y en humanos sanos representan del 15-25% de las células hipofisarias. El número de lactotrofos es similar en ambos sexos y no se modifica con la edad (Bernard *et al.* 2019). En el ser humano esta hormona es también producida por otros tejidos tales como, tejido adiposo, diferentes regiones del cerebro, miometrio, endometrio, placenta, donde es regulada de manera específica y actúa como una citoquina (Ben Jonathan *et al.* 1996; Ben Jonathan *et al.* 2008). Sin embargo, generalmente los niveles producidos por tejidos no hipofisarios no modifican las concentraciones séricas de la hormona.

Los niveles de prolactina circulantes no son constantes a lo largo de la vida de un individuo. En el desarrollo, se detecta presencia de prolactina en la hipófisis fetal en el día 16 en el embrión de ratón, día 17 en la rata y en las semanas 12 a 15 del desarrollo embrionario humano. En el ser humano, el contenido hipofisario de prolactina en el feto aumenta a partir de la mitad de la gestación hasta el fin de la misma, sin existir una diferencia aparente entre sexos. Consecuentemente, los niveles séricos fetales también aumentan progresivamente y alcanzan un pico antes del nacimiento. Luego de la pubertad, las concentraciones séricas de esta hormona resultan el doble en mujeres que en hombres de la misma edad. En el embarazo, la prolactina circulante aumenta progresivamente hasta alcanzar niveles 7-10 veces mayores que los presentes en mujeres no embarazadas. Este aumento es fundamental para el correcto desarrollo mamario necesario para la posterior lactancia (Ben Jonathan *et al.* 2008; Freeman *et al.* 2000).

Los lactotrofos presentan una alta actividad espontánea intrínseca de síntesis y secreción de prolactina (Ben Jonathan *et al.* 2008). El control hipotalámico de la secreción de prolactina es diferente al de otras hormonas de la hipófisis anterior ya que es predominantemente inhibitorio, y es ejercido principalmente por dopamina. Neuronas tuberoinfundibulares del ARC (TIDA) proyectan terminales nerviosas dopaminérgicas a la ME y liberan dopamina al plexo portal hipotalámico-hipofisario. La dopamina, actuando como hormona hipotalámica, no como neurotransmisor, activa los receptores de dopamina D2 en los lactotrofos (RD2s) de la adenohipófisis produciendo la inhibición de la síntesis

y secreción de prolactina, así como también de la proliferación de células lactotropas (Lamberts & MacLeod 1990; Melmed 2003). Se ha demostrado que ratones con ausencia de receptores de dopamina D2 son hiperprolactinémicos (Kelly *et al.* 1997; Saiardi *et al.* 1997), y que variaciones en los niveles de dopamina correlacionan con cambios en los patrones de secreción de prolactina (Ben-Jonathan *et al.* 1980; Gibbs & Neill 1978; de Greef & Neill 1979; Ben Jonathan *et al.* 1977) lo que constituye evidencia sólida en favor de que la dopamina tiene un rol crítico en la supresión de la secreción de prolactina endógena. La prolactina no tiene un único tejido diana, por lo que no tiene la típica vía de retroalimentación negativa (*feedback* negativo) para regular su secreción. En cambio, está regulada por un mecanismo conocido como bucle corto de regulación por retroalimentación negativa, en el cual la hormona misma actúa a nivel hipotalámico estimulando la síntesis de dopamina y, por lo tanto, inhibiendo su propia secreción a nivel hipofisario (Grattan 2015) (Figura 6). La presencia de receptores de prolactina en las neuronas dopaminérgicas (Grattan 2001; Kokay & Grattan 2005; Lerant & Freeman 1998) fue predicha por los primeros estudios neuroquímicos que mostraban que prolactina exógena era capaz de estimular la síntesis de dopamina hipotalámica (Hokfelt & Fuxe 1972) y la secreción de dopamina a sangre portal hipofisaria (Gudelsky & Porter 1979). En contraste, la hipoprolactinemia inducida por la administración de agonistas dopaminérgicos resultaba en la inhibición de la secreción de dopamina indicando que la actividad basal de estas neuronas depende de los niveles séricos de prolactina (Arbogast & Voogt 1991). Es así que no solamente ratones con delección del receptor dopaminérgico desarrollan hiperprolactinemia crónica, sino también aquellos con delección global del receptor de prolactina (*Prlr*) (Schuff *et al.* 2002).



**Figura 6.** Representación esquemática de la regulación neuroendocrina de la secreción de prolactina. La liberación de prolactina de la hipófisis anterior es inhibida por la dopamina proveniente de las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA). Como se observa en la inmunohistoquímica en corte coronal del cerebro contra tirosin hidroxilasa, los cuerpos neuronales se localizan en el ARC y sus axones se proyectan hacia la ME. La prolactina estimula la secreción de dopamina, para inhibir su propia secreción mediante retroalimentación de bucle corto. Imagen tomada y modificada de (Grattan 2015).

Los mecanismos de regulación de secreción de prolactina son plásticos y están determinados fundamentalmente por el estado fisiológico del animal. Esto se debe a que la síntesis y secreción de prolactina adenohipofisaria está afectada por numerosos estímulos, tanto externos como internos, los cuales son interpretados y traducidos por el hipotálamo. Cuando se evalúa la liberación de prolactina a nivel de células individuales, se observa que el patrón de secreción de prolactina de los lactotrofos muestra dimorfismo sexual. En general, un poco más de la mitad de los lactotrofos de las ratas hembra secretan prolactina en un patrón continuo, mientras que los de los machos secretan en un patrón discontinuo o intermitente (Castano & Frawley 1995). Los estímulos fisiológicos más importantes que modifican la secreción de dicha hormona son, el ritmo circadiano, el estado reproductivo, hormonas esteroideas (el ciclo estral y menstrual, lactancia preñez) y el estrés (Freeman *et al.* 2000).

## RECEPTORES DE PROLACTINA

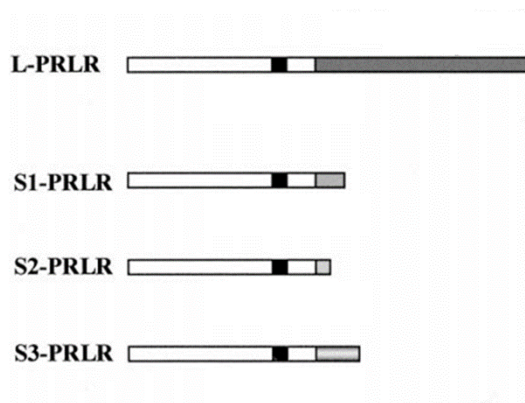
El PRLR pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas de clase I, junto con el receptor de hormona de crecimiento (GHR), compartiendo ambos receptores numerosas características estructurales y funcionales (Bole-Feysot *et al.* 1998).

El PRLR es un receptor de membrana ampliamente distribuido en los vertebrados (Bole-Feysot *et al.* 1998). Múltiples isoformas producto del *splicing* alternativo de un transcripto primario de ARC han sido identificadas en numerosos tejidos y tipos celulares de humanos y roedores (Kline *et al.* 1999; Hu *et al.* 2001; Trott *et al.* 2004). Además de estar presentes en glándula mamaria, los PRLR se pueden encontrar en numerosos órganos y tipos de células, incluidos los huesos, órganos reproductores, hígado, páncreas, el tejido adiposo, el intestino, la piel, el sistema inmunológico, la hipófisis y el cerebro (Goffin *et al.* 2002). La amplia distribución de receptores convierte a la prolactina en una

hormona pleiotrópica capaz de actuar como modulador fisiológico de múltiples funciones en el organismo.

El PRLR está formado por un dominio extracelular de unión a ligando, una porción transmembrana helicoidal y una región intracelular. Todas las isoformas comparten un dominio extracelular, pero difieren en la longitud y secuencia del dominio intracelular (Ormandy *et al.* 1998).

Hasta el momento se han identificado en el ratón, una isoforma larga (PRLR-L) y tres cortas (PRLR-S1, -S2 y -S3) del receptor (Ling *et al.* 2000) (Figura 7).



**Figura 7:** Representación esquemática (no hecha a escala) de las cuatro isoformas de ARNm del Prlr de ratón (*Prlr-l*, *Prlr-s1*, *Prlr-s2* y *Prlr-s3*): se visualizan el dominio extracelular (blanco), el dominio transmembrana (negro), la porción común del dominio citoplasmático (blanco), y la región única del dominio citoplasmático (gris). Tomado y modificado de (Ling *et al.* 2000).

El análisis cuantitativo por RT-PCR ha permitido estudiar los niveles de expresión de ambas isoformas del receptor a nivel central y periférico.

Se ha descrito que los niveles de expresión de las diferentes isoformas del PRLR varían según el tejido y el estado fisiológico y hormonal del organismo (Ling *et al.* 2000), indicando regulación diferencial.

A nivel periférico, por ejemplo, si bien en el hígado de rata se expresan ambas isoformas, la isoforma corta es la predominante. En timo y riñón ambas isoformas se expresan por igual, pero en la mayoría de los tejidos tales como como ovario, útero, glándula suprarrenal, páncreas, corazón y pulmón se expresa predominantemente la isoforma larga (Nagano & Kelly 1994). Por otra parte, también se ha publicado evidencia contundente acerca de la presencia de PRLR en el tejido adiposo

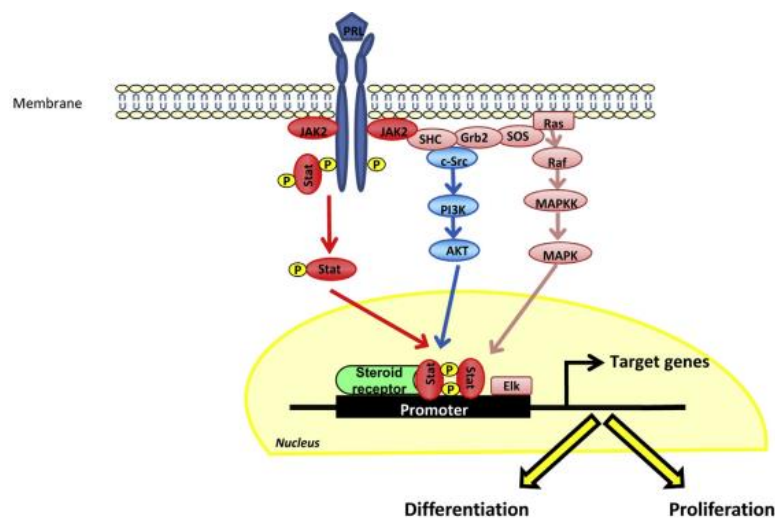
blanco y pardo de roedores. En particular, en tejido adiposo blanco, sólo las isoformas PRLR-S2, PRLR-S3 y PRLR-L han sido descritas, siendo la isoforma predominante la PRLR-L (Ling *et al.* 2000)

Las isoformas larga y corta del PRLR también se encuentran diferencialmente expresadas en los diferentes núcleos hipotalámicos. Se han encontrado PRLR en numerosos núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación homeostática de la ingesta y el metabolismo energético, tales como el SON, ARC, VMN, periventricular (PeVN), PVN (Bakowska & Morrell 1997b; Pi & Grattan 1998b; Brown *et al.* 2010a; Pi & Grattan 1998a; Brown *et al.* 2010b), DMN (Chen & Smith 2004) y el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) (Grattan *et al.* 2007a). Si bien el estudio del hipotálamo completo arrojó que la isoforma PRLR-L se expresa aproximadamente 1.6 veces más que PRLR-S en ratas hembra (Nagano & Kelly 1994), cuando se evaluaron los niveles de expresión de ambas isoformas en núcleos hipotalámicos discretos, se encontró que las isoformas corta y larga no se expresan siguiendo esa proporción a lo largo de todo el hipotálamo. La isoforma corta se expresa mayoritariamente en el PVN y en el SON, mientras que la isoforma larga es predominante en los núcleos hipotalámicos restantes (Pi & Grattan 1998c).

El PRLR humano es capaz de unir tres ligandos (prolactina, lactógeno placentario y GH). Homodímeros de PRLR (o heterodímeros en caso de que se co-expresen la isoforma corta y larga del receptor en la misma célula) están presentes constitutivamente en la membrana celular, asociados a través de su dominio transmembrana. Estudios estructurales de la molécula de prolactina permitieron identificar dos sitios de unión en la hormona, llamados dominio de unión 1 y 2, cada uno capaz de interactuar con un de los receptores del dímero (Broutin *et al.* 2010). La señalización intracelular se inicia cuando una única molécula de prolactina se une a dos moléculas PRLR a través de los sitios 1 y 2, induciendo cambios conformacionales en la región intracelular del dímero. Este dominio se encuentra constitutivamente asociado a janus quinasa 2 (JAK2) y la unión del ligando al receptor induce la asociación de dos moléculas de JAK2. En este punto ocurre la transfosforilación de JAK2 que termina por fosforilar los residuos de tirosina ubicados en el extremo C-terminal del PRLR (Freeman *et al.* 2000) Las fosfotirosinas son requeridas para la activación de las vías de señalización porque son potenciales sitios de unión a moléculas de transducción de señales que contengan un dominio SH2. Estudios sobre la arquitectura del PRLR humano revelaron múltiples motivos en la porción intracelular del receptor lo que sugiere que es capaz de interactuar con diferentes moléculas de transducción de señal, para inducir múltiples respuestas celulares. Esto posiciona a la prolactina como una hormona pleiotrópica y propone al dominio intracelular como un actor fundamental en la cascada de transducción de señal. Existen varias vías de señalización intracelular que se conoce son activadas por prolactina y median procesos de diferenciación, proliferación y supervivencia en los diferentes tejidos,



la vía JAK/STAT (vía de la quinasa de Janus (JAK) y el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT)) (Bole-Feysot *et al.* 1998), la vía de las MAP Kinasas (proteínas quinasas activadas por mitógenos) (Maroni *et al.* 2004) y vía de las AKT (proteínas serina/treonina quinasas) (Figura 8). Diversos estudios han sugerido que la isoforma larga activa las vías de las JAK/STAT (Frasor *et al.* 2001), AKT (Tessier *et al.* 2001) y MAPK interviniendo en procesos de diferenciación, supervivencia y metabolismo celular, mientras que se ha propuesto que las isoformas cortas pueden actuar como dominantes negativos inhibiendo la función de las isoformas largas (Berlanga *et al.* 1997; Perrot-Appianat *et al.* 1997), o bien regular la actividad transcripcional de múltiples genes, ya sea activando o reprimiéndolos factores de transcripción de manera tejido específica (Devi *et al.* 2009).



**Figura 8.** Posibles vías de señalización activadas por prolactina. La unión de prolactina induce la activación del PRLR iniciando tres posibles cascadas, siendo la vía JAK2/STAT predominante en la mayoría de los tejidos. Tomado de (Carre & Binart 2014).

Dada la mencionada distribución generalizada de los PRLR en el organismo, la desregulación de los niveles de esta hormona resulta un riesgo potencial para las múltiples funciones que coordina. Luego, ciertas funciones de la prolactina que se consideran adaptativas durante la preñez y la lactancia, pueden resultar perjudiciales si los niveles de dicha hormona se elevan por fuera de estas ventanas temporales.

## FUNCIONES METABÓLICAS DE LA PROLACTINA

Los receptores de prolactina se expresan en múltiples tejidos implicados en la regulación metabólica, incluidos el hígado, el tejido adiposo, el páncreas y el cerebro.

El hígado tiene una gran cantidad de PRLR. Durante la vida adulta, la prolactina estimula el crecimiento y la regeneración del hígado promoviendo la proliferación de adipocitos y la angiogénesis (Moreno-Carranza *et al.* 2018). Por otro lado, se ha propuesto que la prolactina puede ser protectora en hígado (Moreno-Carranza *et al.* 2013). El PRLR hepático tiene una utilidad clínica potencial para proteger el hígado de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), prevenir el cáncer de hígado en pacientes de alto riesgo y modificar el metabolismo de fármacos (Moreno-Carranza *et al.* 2018). Por el contrario, se sugiere que la disminución en los niveles de expresión de *Prlr* en el hígado estaría involucrada en la esteatosis hepática y en la ocurrencia de NAFLD en pacientes obesos (Shao *et al.* 2018).

En el tejido adiposo, la prolactina es esencial en la adipogénesis y la diferenciación de adipocitos tanto blancos como pardos, así como en la regulación del metabolismo lipídico. También regula la secreción de adipoquinas, estimula la secreción de leptina e inhibe la producción de adiponectina (Ben-Jonathan *et al.* 1980; Carre & Binart 2014).

En el páncreas, promueve el crecimiento de islotes durante el desarrollo (Freemark *et al.* 2002) y aumenta la expresión de insulina y la secreción de insulina estimulada por glucosa. También aumenta los niveles de expresión del *transportador de glucosa 2 (GLUT 2)* promoviendo la entrada de glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas (Petryk *et al.* 2000; Sinha & Sorenson 1993; Brelje *et al.* 1994). Esto activa a la glucoquinasa, enzima sensible a la glucosa de rol clave en la regulación de la homeostasis de glucosa en el organismo, cuya expresión también es regulada por prolactina (Weinhaus *et al.* 2007; Petryk *et al.* 2000).

Tanto en el tejido adiposo como en el páncreas, las acciones atribuidas a la prolactina previamente destacadas, son muy importantes durante el embarazo y la lactancia. En estas ventanas de tiempo el metabolismo lipídico está alterado, y existe una mayor movilización de lípidos desde los depósitos de tejido adiposo hacia la glándula mamaria promovida por prolactina, lo que favorece la utilización de las reservas energéticas para la producción de leche materna (Barber *et al.* 1992). Los cambios adaptativos en la homeostasis de la glucosa también son importantes en el embarazo (Rieck & Kaestner 2010). Los tejidos maternos desarrollan resistencia a la insulina para dirigir preferentemente la glucosa al feto en desarrollo (Herrera 2000). Por otra parte, para garantizar que los tejidos maternos continúen recibiendo los nutrientes necesarios, existe una mayor demanda de secreción de insulina materna. Para adaptarse a esta demanda alterada, hay una proliferación significativa de células  $\beta$  en los islotes pancreáticos (Parsons *et al.* 1992) una mayor síntesis de insulina (Bone & Taylor 1976) y un umbral disminuido para la secreción de insulina estimulada por glucosa, y una leve resistencia periférica a la insulina (Sorenson & Parsons 1985). La prolactina juega un rol

adaptativo crítico en la promoción de todos estos cambios (Newbern & Freemark 2011) y fallas en estas respuestas adaptativas pueden resultar en diabetes gestacional (Ramos-Roman 2011).

Estas acciones periféricas de la prolactina en el metabolismo energético se complementan con acciones a nivel del sistema nervioso central para promover el apetito y regular la homeostasis de la glucosa. De hecho, el *Prlr* se expresa en muchos de los núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación de la ingesta de alimentos, incluidos el ARC, VMN, DMN, PVN (Bakowska & Morrell 1997a; Pi & Grattan 1998d; Brown *et al.* 2010c). Se observa que la administración sistémica de prolactina aumenta la ingesta de alimentos en un gran número de especies (Gerardo-Gettens *et al.* 1989; Noel & Woodside 1993; Buntin *et al.* 1999) (Moore *et al.* 1986) por lo que se propone que, el aumento de los niveles de prolactina séricos posiblemente contribuyen al rápido aumento de la ingesta de alimentos que se evidencia durante el embarazo (x)(Shirley 1984; Ladyman & Grattan 2004; Ladyman *et al.* 2012) y a la hiperfagia observada durante la lactancia (Woodside 2007; Woodside *et al.* 2012) La prolactina también induce resistencia funcional a la leptina, lo que contribuiría a una mayor ingesta de alimentos (Naef & Woodside 2007; Augustine & Grattan 2008), y explicaría la resistencia a leptina observada durante la preñez, un período de hiperprolactinemia fisiológica (Grattan *et al.* 2007b; Augustine *et al.* 2008; Ladyman 2008; Ladyman *et al.* 2010).

## PROLACTINA Y DESBALANCE ENERGÉTICO: PATOLOGÍAS

La hiperprolactinemia puede no solamente regular el metabolismo energético, sino que también puede resultar patogénica. En este sentido, la hiperprolactinemia patológica predispone a la obesidad en humanos y podría generar aumento de peso y alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Estudios en hombres y mujeres, demostraron que la presencia de prolactinomas se asocia a una prevalencia más alta a la obesidad y alteraciones metabólicas tales como dislipidemia, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, y que muchas de estas alteraciones se mejoran al bajar los niveles de prolactina con agonistas dopaminérgicos (Ben-Jonathan *et al.*, 2006, Berinder *et al.*, 2011, Ciresi *et al.*, 2013, Doknic *et al.*, 2002, dos Santos Silva *et al.*, 2011, Greenman *et al.*, 1998, Pala *et al.*, 2015, Peric *et al.*, 2016). Aspectos patológicos en relación al metabolismo se ejemplifican en la asociación del locus de *PRL* (6p22.2–p21.3) y la variaciones en el índice de masa corporal identificados por GWAS (Nilsson *et al.*, 2011). Más aun, SNPs ubicados en cercanía a los gene de *PRL* *PRLR* se asocian a un riesgo aumentado de obesidad y diabetes gestacional (Le *et al.*, 2013). Es decir que el rol protector versus el patológico de la prolactina en la regulación de la adiposidad y obesidad es un tema de gran interés.

# LEPTINA

## LEPTINA COMO FACTOR REGULADOR DEL PESO CORPORAL

Además de la prolactina, la leptina es también un potente regulador del metabolismo energético. Se trata de una hormona polipeptídica de 146 aminoácidos y secuencia altamente conservada en todas las especies de mamíferos. Es sintetizada principalmente por células del tejido adiposo blanco de forma proporcional a la masa de grasa corporal aunque existe evidencia reciente que ha encontrado síntesis de leptina en otros tejidos tales como el tejido adiposo marrón (Margetic *et al.* 2002).

Más allá de su conocido papel en el mantenimiento de la homeostasis energética, la leptina es una hormona pleiotrópica que participa de una gran variedad de funciones fisiológicas que incluyen, reproducción, función gastrointestinal, hematopoyesis, activación simpática, inmunidad, remodelación ósea, desarrollo de células pulmonares y angiogénesis, entre otras (JM.Quesada Gomez 2006).

La leptina es un indicador de adiposidad por dos motivos, los niveles circulantes de la hormona en humanos y roedores correlacionan positivamente con la adiposidad corporal y se modifican de acuerdo con el estado nutricional (Maffei *et al.* 1995; Considine *et al.* 1996). La leptina comunica al sistema nervioso central el estado nutricional del organismo a núcleos hipotalámicos específicos involucrados en el control de la ingesta y el gasto de energía lo que la convierte en una señal importante en la regulación del balance energético (Augustine *et al.* 2008; Kalra *et al.* 1999; Schwartz *et al.* 2000; Zigman & Elmquist 2003; Campfield *et al.* 1995; Friedman & Halaas 1998; Sahu 2003). La administración de leptina, ya sea central o periféricamente, disminuye la ingesta de alimentos y el peso corporal. Asimismo, la falta de acción de la leptina debido a una mutación en el gen de la que codifica para la hormona (ob) o el receptor de leptina (OBR o LepR) se asocia con obesidad mórbida en humanos y roedores (O'Rahilly *et al.* 2003; Friedman & Halaas 1998).

## ACCIÓN DE LA LEPTINA EN EL HIPOTÁLAMO EN EL CONTROL DEL BALANCE ENERGÉTICO

Los hallazgos iniciales que mostraban que las inyecciones centrales de leptina eran más potentes que las inyecciones periféricas sugirieron claramente que el hipotálamo era el principal sitio de acción de la leptina para controlar la homeostasis energética (Campfield *et al.* 1995; Schwartz *et*

al. 2000; Zigman & Elmquist 2003; Sahu 2003). Estudios posteriores que evidenciaban una alta expresión del *LepR* en el hipotálamo, y la identificación de grupos neuronales que sintetizan péptidos orexigénicos y anoréxicos como blancos de la señalización de leptina, establecieron al hipotálamo como un sitio primario de la acción anorexigénica de la hormona en la regulación del peso corporal. El LepR existe en al menos 6 isoformas, producto de procesamientos alternativos del mensajero, que se denominan LepR a-f. Pertenecen a la familia de receptores de citoquinas, y al unirse la leptina se produce la dimerización del receptor, activando la vía JAK-STAT, y dentro de las STAT señala principalmente por la STAT3. Todas las isoformas presentan el mismo dominio extracelular de unión a ligando, pero difieren en el dominio citoplasmático. La isoforma más importante es la LepR-b, denominada también isoforma larga, puesto que traduce las señales al interior de la célula dado que contiene los motivos intracelulares necesarios para la activación de la vía JAK-STAT (Ahima & Flier 2000b). La isoforma LepR-e no presenta dominio intracelular y circula como proteína de unión a leptina en plasma.

Las neuronas diana de leptina se localizan principalmente en los núcleos ARC, PVN, VMN, DMN y el LHA que se conoce, son sitios importantes de síntesis e integración de señales neuronales involucradas en la homeostasis energética (Schwartz *et al.* 2000; Zigman & Elmquist 2003; Sahu 2003). La leptina actúa sobre el ARC activando dos vías distintas independientes pero paralelas. Por un lado, actúa sobre una población neuronal secretora de GnRH, modulando de esta manera el eje reproductivo y, por otro lado, actúa sobre dos poblaciones neuronales que controlan el balance energético. Una de estas poblaciones neuronales que incluye a aquellas neuronas que co-expresan dos neuropéptidos orexigénicos el *Npy* y el *Agrp*, es inhibida por leptina, mientras que la otra población de neuronas que expresan *Pomc* y el transcritto regulado por cocaína-anfetamina (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript* – CART), dos péptidos anorexigénicos, es activada por dicha hormona (Jequier 2002).

En las neuronas POMC, la leptina estimula la producción de  $\alpha$ -MSH, producto del procesamiento de POMC, que actúa sobre MC3R y MC4R presentes en el PVN y el VMN, lo que resulta en una disminución del apetito y aumento del gasto energético (Mountjoy 2015). El ARNm de *Pomc* aumenta con la administración de leptina y disminuye durante el ayuno cuando los niveles de leptina también son bajos. Evidencia previa muestra que el ARNm de *Npy* y *Agrp* en el ARC, están regulados negativamente por la leptina. NPY es uno de los factores orexigénicos más potentes del sistema nervioso central. Contrariamente a lo que sucede con *Pomc*, el ARNm de *Npy* aumenta durante el ayuno cuando la leptina es baja y la administración de leptina lo disminuye. Por otro lado, AgRP es un antagonista endógeno del MC4R y, por lo tanto, bloquea el efecto anorexigénico de  $\alpha$ -MSH (Ladyman

*et al.* 2010). En conclusión, la leptina reduce la ingesta al suprimir los péptidos orexigénicos y estimular los anorexigénicos (Jequier 2002).

Estudios recientes se han enfocado en el rol del VMN en el metabolismo energético (King 2006). Este núcleo fue una de las primeras áreas hipotalámicas a la que se le identificó un rol en el control del peso corporal, y en base a la observación de que lesiones experimentales en el VMN daban lugar a obesidad mórbida, se lo propuso como el centro de saciedad del cerebro (x). Se ha identificado expresión del *Lepr* en el VMN, particularmente en la porción dorsomedial de dicho núcleo por lo que este núcleo también resulta blanco de los indicadores del estado nutricional periféricos (Hubschle *et al.* 2001). La delección del LepR de poblaciones neuronales dentro del VMN resultan en un fenotipo obeso evidenciando el rol de la leptina en el control del peso corporal (Dhillon *et al.* 2006). Cabe destacar que la respuesta del ARC y el VMN a la acción de leptina tiene cursos temporales diferentes (Faouzi *et al.* 2007).

El PVN es otro núcleo hipotalámico importante involucrado en el control del peso corporal. Es un blanco directo de la leptina ya que se han encontrado LepR en las neuronas parvocelulares y magnocelulares del PVN. Que incluyen las neuronas que liberan oxitocina, la hormona liberadora de corticotropina y la hormona liberadora de tirotropina (Hakansson *et al.* 1998). Además, el PVN recibe terminales provenientes de las neuronas POMC y las neuronas NPY/ArRP y expresan altos niveles de MC4R (Mountjoy *et al.* 1994; Kishi *et al.* 2003) y receptores de NPY (Cowley *et al.* 1999).

Se han identificado poblaciones de neuronas en el DMN que expresan *Lepr* y participan de circuitos neuronales que controlan el gasto energético regulando el proceso de termogénesis en el tejido adiposo marrón (Rezai-Zadeh *et al.* 2014). Estas poblaciones son suficientes y necesarias para inducir un aumento en el gasto energético de manera robusta y disminuir el peso corporal. También se ha demostrado que la expresión de *Lepr* en el DMN es necesaria para mantener el peso corporal, gasto energético y la temperatura corporal.

## INTERACCIONES LEPTINA Y PROLACTINA

Al igual que el PRLR, LepR es un receptor dependiente de JAK2 que activa a STAT como su principal vía de señalización. El LepR activa principalmente STAT3, mientras que el PRLR fosforila a STAT5. Numerosos estudios proponen un diálogo entre las vías de señalización de leptina y prolactina en el control de la ingesta y el metabolismo. Las vías de transducción similares de las dos hormonas, la distribución semejante de los LepR y PRLR descrita en el hipotálamo y el tronco encefálico de

roedores (Brown *et al.* 2010c; Nagaishi *et al.* 2014) y la presencia de neuronas en el VMN y el ARC que responden a ambas hormonas (Nagaishi *et al.* 2014), son algunas de las evidencias que apuntan a una interacción en sus efectos. Se ha propuesto que el diálogo entre ambas hormonas podría conducir en última instancia a la resistencia a leptina observada a nivel central, en contextos de hiperprolactinemia fisiológica como la preñez y lactancia. Como la administración de prolactina aumenta la expresión hipotalámica de SOCS (Steyn *et al.* 2008), proteína que inhibe la vía de señalización de JAK/STAT que se activa también en respuesta a leptina (Krebs & Hilton 2001), y dado que una gran población de neuronas que expresan *Lepr* responden a prolactina (Nagaishi *et al.* 2014), podría explicar cómo niveles elevados de prolactina observados durante la preñez y la lactancia, podrían disminuir la sensibilidad a leptina. De hecho, la administración crónica de prolactina intracerebroventricular, bloquea los efectos anorexigénicos de leptina administrada exógenamente (Augustine & Grattan 2008; Trujillo *et al.* 2011). Interesantemente, la inactivación de SOCS3 en células que expresan *Lepr*, aumenta la sensibilidad a leptina y reduce la ingesta de alimentos y la ganancia de peso durante preñez y lactancia (Zampieri *et al.* 2015).

Se ha descrito sensibilidad núcleo-específica a prolactina y leptina en el hipotálamo. En roedores, se observa sensibilidad a leptina reducida en el VMN pero no en el ARC durante la preñez (Ladyman *et al.* 2012). En ratas pseudopreñadas, el tratamiento con prolactina reduce la sensibilidad a leptina tanto en el VMN como en el ARC (Augustine *et al.* 2019). Por otro lado, en ratones en diestro, las neuronas del ARC son más sensibles a prolactina que neuronas en el PVN o POA (Sapsford *et al.* 2012) y la prolactina aumenta pStat5B específicamente en el ARC, AVPV, VMN, DMN (Yip *et al.* 2019). Además, en ratones con experiencia reproductiva, se observa una mayor sensibilidad a la prolactina en el ARC, a bajas dosis de la hormona, y mayor sensibilidad en el POA, PVN y el SON, a altas dosis de la hormona, en comparación con los animales vírgenes (Sjoeholm *et al.* 2011). Estos ejemplos resaltan las diferencias en la capacidad de respuesta de cada núcleo hipotalámico a prolactina y leptina en diferentes situaciones fisiológicas, y tienen implicaciones sobre la función de cada población celular dentro del hipotálamo.

# OBJETIVOS GENERALES



La prolactina es una hormona metabólica de funciones fisiológicas durante la preñez, lactancia y el desarrollo. Sin embargo, nuestra hipótesis propone que, si los niveles de prolactina se encuentran crónicamente elevados, como ocurre en hiperprolactinémica patológica o farmacológica, estas mismas funciones se tornan negativas para el metabolismo.

En este marco proponemos el estudio del efecto de la hiperprolactinemia crónica sobre el metabolismo energético. A diferencia de otros estudios que han utilizado aproximaciones farmacológicas o quirúrgicas, utilizaremos un ratón hembra con delección específica del receptor dopaminérgico únicamente en lactotropos, el ratón *lacDrd2KO*. Estas hembras son hiperprolactinémicas desde el primer mes de vida.

Nuestros objetivos generales son:

Validar el fenotipo metabólico en nuestra cohorte y determinar la temporalidad de aparición de las alteraciones metabólicas. Para ello evaluaremos: peso corporal, comportamiento de ingesta, metabolismo de la glucosa, distribución y peso de depósitos de tejido adiposo y niveles de hormonas metabólicas en circulación, comparativamente en hembras *lacDrd2KO* y sus controles a los 5 y 10 meses de edad.

Jerarquizando el rol del hipotálamo sobre el control de los niveles de ingesta del modelo hiperprolactinémico, estudiaremos la activación núcleo-específica de las vías de señalización de prolactina y leptina en ambos genotipos. Estudiaremos la posible desensibilización núcleo-específica a una sobrecarga de prolactina y leptina, y caracterizaremos los cambios en los niveles de expresión de genes orexigénicos y anorexigénicos en cada núcleo hipotalámico relacionado con el metabolismo energético. Estableceremos la posible relación de estos cambios en la expresión de génica con cambios en el comportamiento de ingesta y marcadores termogénicos de tejido adiposo pardo.

Finalmente habiendo evaluado el desarrollo del fenotipo metabólico, desafiaremos a los ratones con dietas ricas en grasa a edades tempranas (3 meses), edad a la cual aún no se evidencia aumento de peso ni adiposidad manifiesta. De esta manera, podremos determinar si un doble desafío (contexto hiperprolactinémico y una dieta enriquecida) acelera los cambios metabólicos observados. Para ello, a largo del experimento, se evaluará el peso corporal, comportamiento de ingesta, ingesta grasa y calórica, peso y perfil de expresión génica de los depósitos de tejido adiposo blanco y pardo, en forma comparativa en hembras de ambos genotipos alimentadas con dieta regular balanceada o dieta enriquecida en grasa.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## ANIMALES

### RATONES lacDrd2KO

Los ratones lacDrd2KO se generaron cruzando ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  (los cuales poseen el exón 2 flanqueado por secuencias loxP) (Noain *et al.* 2013b) con ratones transgénicos que expresan la enzima recombinasa Cre bajo el promotor de prolactina de ratón, Tg (Prl-cre)<sup>1Mrub</sup> (33). La expresión tejida específica de la recombinasa Cre en los ratones transgénicos (Tg (Prl-cre)<sup>1Mrub</sup>) se analizó mediante PCR en tiempo real. Se observó expresión de recombinasa Cre en hipófisis y muy bajos niveles en hipotálamo, hígado, riñón, ovario y pulmón (Perez-Millan *et al.* 2014). Se evaluó funcionalidad de recombinasa Cre en hipófisis, y se encontró actividad en el 96% de células productoras de prolactina de la hipófisis anterior, de manera altamente selectiva (Noain *et al.* 2013a). Los ratones lacDrd2KO tienen conservado el eje GHRH-GH y presentan hiperprolactinemia.

Se utilizaron parejas reproductoras de ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  hembra y  $Drd2^{loxP/loxP}$ .Tg (Prl-cre) machos para generar las camadas de  $Drd2^{loxP/loxP}$  (control) y  $Drd2^{loxP/loxP}$ .Tg (Prl-cre) (lacDrd2KO), que se incluyeron en cada experimento. Los ratones lacDrd2KO y sus controles ( $Drd2^{loxP/loxP}$ ) son congénitos con la cepa C57BL/6J. Ratones de ambos genotipos se alojaron en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET) en grupos de 4 o 5 por jaula, en una sala con temperatura controlada (22°C), un fotoperíodo de 12 horas (7.00 a.m. a 7.00 p.m.) y ventilación permanente. Se les proporcionó alimento balanceado (Gepsa) y agua de grifo *ad libitum*. Tuvieron acceso libre a agua del grifo y comida del laboratorio, excepto cuando indicado. Debido a que en los ratones machos no se observó un aumento significativo en los niveles de prolactina, y no hubo diferencias en el peso corporal, hipofisario, en la masa de grasa corporal, o niveles de ingesta (Perez-Millan *et al.* 2014), se utilizaron únicamente ratones hembra.

Los ratones se sometieron a eutanasia por decapitación a los 5-6 o a los 9-10 meses de edad. Se recolectaron los sueros para las mediciones de prolactina, GH, triglicéridos, leptina e insulina. Se pesaron tejido adiposo blanco (gonadal, mesentérico, subcutáneo) y marrón (interescapular) se procesaron para PCR en tiempo real o se incluyeron en parafina para análisis histológicos. Los cerebros se procesaron para PCR en tiempo real, western blot o inmunohistoquímica, como se detalla a continuación.

Todos los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por el comité institucional de cuidado y uso de animales del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME),

Buenos Aires de acuerdo a las normas de la Oficina de Bienestar animal NIH, con el protocolo NIH, A#5072-01,

## GENOTIPIFICACIÓN DE RATONES

### *Extracción de ADN genómico*

Las crías de ratones se destetaron a los 21 días de su nacimiento y se separaron por sexo hasta que su genotipo fue determinado. Éstas se identificaron con una marcación según un código de perforaciones en las orejas. Para determinar los genotipos se realizaron biopsias de la porción terminal de la cola con un bisturí. Los segmentos de cola u orejas obtenidos se incubaron a 55°C en 20 µl de *buffer* de digestión (TrisHCl 50 mM pH 8; EDTA 100 mM; SDS 0,5%; 0,5 mg/ml de proteínaasa K) durante 12 horas. Se precipitó el ADN en frío, durante 40 minutos a -70°C y se centrifugó a 12000 g por 40 minutos a 4°C, para su extracción. Finalmente, se descartó el pellet y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su utilización.

La presencia del transgén se detectó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores (*primers*) específicos de las secuencias transgénicas como se detalla a continuación.

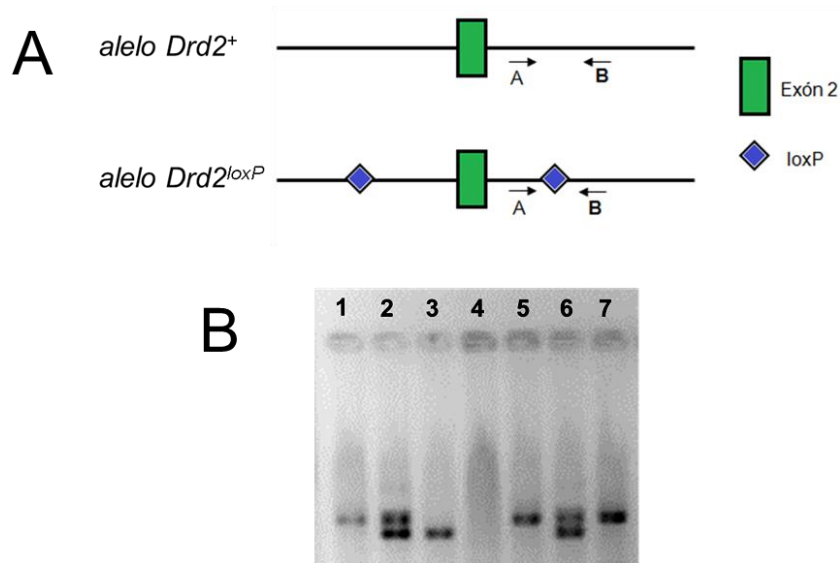
### *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Para la genotipificación de los ratones lacDrd2KO y sus pares *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> deben realizarse dos PCRs diferentes:

En primer lugar, se realiza una para determinar la presencia de sitios loxP. Para la misma, se utilizó un par de *primers* sentido y antisentido complementarios al intrón 2 del gen RD2 (Invitrogen Life Technologies), cuyas secuencias se muestran en la Tabla 2. Si existe un alelo mutado el par de *primers* del intrón 2 amplifica un producto de 452 pares de bases (pb) y en caso de haber un alelo normal amplifican fragmento de 354 pb (Figura 9). Las condiciones de esta PCR se detallan en la Tabla 3.

Gen		Secuencia (5' - 3')
<i>LoxP</i>	Sentido	GCTTCACAGTGTGCTGCCTA
	Antisentido	CCATTGCTGCCTCTACCAAG
<i>Prl-Cre</i>	Sentido	CCTTCATTTCTGGCCAATG
	Antisentido	AGGCAATTTTGGTGTACGG

**Tabla 2:** Primers utilizados para las reacciones de PCR realizadas para la genotipificación de los animales.



**Figura 9: A)** Fragmentos amplificados por la reacción de PCR para la genotipificación de los animales con un alelo normal: *Drd2*<sup>+</sup> (fragmento de 354 pb) y otro alelo mutado: *Drd2*<sup>loxP</sup> (fragmento de 452 pb). La letra **A** representa el primer sentido del intrón 2, y la letra **B** el primer antisentido del intrón 2. Los rombos azules corresponden a los sitios *loxP*, mientras que el rectángulo verde representa el exón 2 del gen del RD2. **B)** Gel de agarosa con productos de reacción de PCR de genotipificación para determinar presencia de sitios *loxP*. La calle 1 corresponde al control positivo *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup>, la calle 2 es el control positivo *Drd2*<sup>loxP/+</sup>, la calle 3 es el control positivo *Drd2*<sup>+/+</sup>, y la calle 4 es el blanco (control negativo, sin ADN). El patrón de bandas de las calles 5 y 7 corresponden a animales *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup>, mientras que la calle 6 representa un patrón de bandas de un animal heterocigoto *Drd2*<sup>loxP/+</sup>.

MIX PCR	Concentración	Programa		
Primers sentido y antisentido	2 $\mu$ M	Temperatura (°C)	Tiempo	
MgCl <sub>2</sub>	1,5 Mm	95	5'	
ADN	200 ng	34 ciclos: de desnaturalización-apareamiento y extensión	95	30''
dntp's	0,2 Mm		62	20''
Buffer	TrisHCl 20mM; KCl 50Mm		72	20''
Taq polimerasa	1 UE	1 ciclo de extensión final	72	5'
H <sub>2</sub> O	Vf= 30ul			

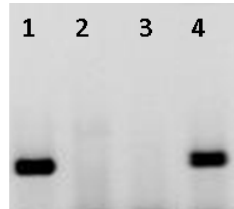
**Tabla 3:** Reacción de PCR para la genotipificación de los animales transgénicos control

En segundo lugar, se lleva a cabo una PCR para la detección del transgen Prl-Cre, en la cual se utilizó un par de *primers* conformado por una secuencia complementaria a una porción del promotor de prolactina (*primer* sentido), y una secuencia complementaria a la recombinasa Cre (*primer* antisentido). Las secuencias se muestran en la Tabla 2 (Invitrogen Life Technologies) y las condiciones de esta PCR se detallan en la Tabla 4. En este caso se evidencia simplemente presencia o ausencia del transgen, es decir, presencia o ausencia de producto amplificado.

MIX PCR	Concentración	Programa		
Primers sentido y antisentido	1 $\mu$ M	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
MgCl <sub>2</sub>	1,5 Mm	95	3	
ADN	200 ng	35 ciclos: de desnaturalización-apareamiento y extensión	94	1
dntp's	0,2 Mm		56	1
Buffer	TrisHCl 20mM; KCl 50mM		72	1
Taq polimerasa	1 UE	1 ciclo de extensión final	72	5
H <sub>2</sub> O	Vf= 30ul			

**Tabla 4:** Reacción de PCR para la genotipificación de los animales transgénicos Prl-Cre

En todos los casos, los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron en un transiluminador (Figura 9 y 10). Se sembró un volumen final de 15  $\mu$ l por calle conteniendo 11  $\mu$ l del producto de PCR, 2  $\mu$ l de *buffer* de siembra (conteniendo azul de bromofenol y glicerol) y 2  $\mu$ l de SYBR-Green (Invitrogen Life Technologies) diluido 1:1000 en DMSO, a partir de la concentración del stock comercial.



**Figura 10:** Gel de agarosa con productos obtenidos en una reacción de PCR realizada para la determinación del transgen *Prl-Cre*. La calle 1 corresponde al control positivo para la banda *Prl-Cre* y la calle 2 es el blanco (control negativo, sin ADN). En la calle 3 se puede identificar un ratón *Prl-Cre* negativo, mientras que la calle 4 presenta el producto de PCR de un ratón que posee el transgen *Prl-Cre* (*Prl-Cre* positivo).

## INGESTA

Los niveles de ingesta fueron determinados en ratones hembra de ambos genotipos (*Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y *lacDrd2KO*), a los 5 y 10 meses de edad. Para ello, se colocaron los ratones en jaulas de manera individual y se les proveyó una cantidad conocida (100 g. aproximadamente) de *pellets* de alimento balanceado regular Gepsa Feeds (Grupo Pilar, Pilar, Buenos Aires, Argentina, [www.gepsa.com](http://www.gepsa.com)). La información nutricional del alimento es: carbohidratos 42%, proteínas 24%, grasa 6%, fibras, minerales y humedad 28%.

Durante 8 días consecutivos, el alimento residual fue pesado a la misma hora (3.00 p.m.).

## EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE ATRACÓN (*Binge-eating*)

Se evaluó el comportamiento de atracón o *binge-eating* en hembras *lacDrd2KO* y hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* de 10 meses de edad. El alimento balanceado regular y la dieta rica en grasa fueron proporcionados por Gepsa Feeds (Grupo Pilar, Pilar, Buenos Aires, Argentina, [www.gepsa.com](http://www.gepsa.com)). Los *pellets* de dieta regular proporcionaban 3.2 kcal / g de energía y su composición era la siguiente:

carbohidratos 42%, proteínas 24%, grasa 6%, fibras, minerales y humedad 28%. Los pellets de dieta rica en grasa fueron preparados por Gepsa Feeds específicamente para el protocolo y proporcionaron 3,9 kcal / g de energía. La composición de la dieta rica en grasa era la siguiente: carbohidrato 22.5%, proteínas 22.8%, grasa 21.1%, fibras 23%, minerales 5.6% y humedad 5.0%. Los principales componentes grasos de los pellets de dieta grasa eran ácidos grasos monoinsaturados (44,7%), ácidos grasos saturados (29,8%) y ácidos grasos poliinsaturados (20,9%), entre otros (Valdivia *et al.* 2014). Es importante destacar que el color, la textura y el aspecto general de los pellets de dieta rica en grasa son similares a los de alimento balanceado. Se siguió el protocolo publicado en (Valdivia *et al.* 2014) con algunas modificaciones. En la mañana del día experimental (9.00 a.m.), las hembras lacDrd2KO y hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* de 10 meses de edad fueron expuestas a un pellet de alimento balanceado o rico en grasa, según sea el caso, colocado sobre la viruta, durante 2 horas. Además, en paralelo, los animales tuvieron libre acceso al alimento balanceado que consumen diariamente. La cantidad de pellet consumido, dispuesto en la base de la jaula, se registró una vez completadas las 2 horas. También se registró el peso del alimento en la jaula.

## RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Los ratones de ambos genotipos fueron eutanasiados por decapitación a los 5 y 10 meses de edad según correspondía. Muestras de suero fueron recolectadas para mediciones de prolactina, GH y triglicéridos. Para el caso particular de prolactina y GH, con aproximadamente 100 µl de sangre se obtuvo suficiente plasma para la medición de las hormonas, por duplicado, por radioinmunoensayo (RIA). A su vez, se tomaron muestras de tejidos (cerebro, hipófisis, tejido adiposo blanco subcutáneo, gonadal y mesentérico, tejido adiposo pardo, hígado, páncreas, mama) y se procesaron para histología clásica, PCR en tiempo real, inmunohistoquímica (IHQ) o RIA, como se detalla más adelante.

## PESO DE LOS TEJIDOS

A los 5 y 10 meses de edad, los animales fueron eutanasiados y se determinaron los pesos de los depósitos de tejido adiposo (gonadal, mesentérico, subcutáneo, pardo), páncreas, hígado. Para ello se disecaron cuidadosamente, quedando libres de tejido circundante. Las mamas fueron incluidas en parafina para su posterior tinción.



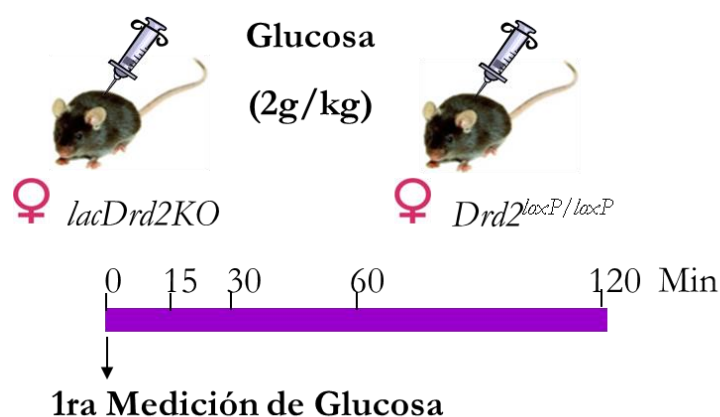
## HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

### MEDICIÓN DE GLUCEMIA BASAL

Los niveles de glucosa en sangre se midieron a las 3.00 p.m. en ratones ayunados durante 8 horas. Las mediciones se hicieron con un glucómetro de mano (Dex-II; Bayer) en sangre de la cola.

### TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

El GTT fue realizado en ratones hembra *lacDrd2KO* y *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* de 5 y 10 meses de edad. Los animales fueron ayunados durante 8 horas (12.00 p.m. – 8.00 a.m.), luego de las cuales fueron inyectados con glucosa intraperitoneal (ip) 2 g/kg. Los niveles de glucosa se examinaron previo a la inyección de glucosa y a los 15, 30, 60 y 120 minutos post-inyección (Figura 11). Para ello se tomaron 2  $\mu$ l de sangre por medio de un corte con bisturí en el extremo de la cola, y el valor de glucosa se obtuvo con un medidor electrónico (Dex-II, Bayer).



**Figura 11:** Esquema representativo de un GTT.

### ELISA INSULINA

Los niveles de insulina sérica de ratón se evaluaron usando un kit ELISA de insulina para ratón (Crystal Chem, Chicago, IL), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron alícuotas de 5  $\mu$ l de suero por duplicado. El límite inferior de sensibilidad del ensayo fue de 0,1 ng / ml.

## LEPTINA

### ELISA LEPTINA

Las concentraciones séricas de leptina fueron analizadas utilizando un ELISA específico en el cual se siguieron las instrucciones del fabricante (mouse leptin ELISA kit, Crystal Chem. Catalog#: 90030). Alícuotas de 5  $\mu$ l de suero fueron utilizadas por duplicado. El límite inferior de detección del ensayo fue de 0,2 ng/ml.

### TEST DE SENSIBILIDAD A LEPTINA

En un día aleatorio del ciclo estral, los ratones se pesaron y se mantuvieron en ayuno durante 16 horas. Este período se usó para reducir la señalización endógena de leptina en todos los grupos a niveles similares (Tanner *et al.* 2010; Billes *et al.* 2012). A las 10.00 a.m. del día siguiente, se pesaron y recibieron una inyección ip de leptina (2,5 mg / kg de peso corporal, disuelta en el vehículo; mleptin AFP362C NIDDK; Dr. AF Parlow, Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis, Torrance, CA) o vehículo (PBS, pH 7,4), y se devolvió el alimento. La ingesta de alimentos y el peso corporal se midieron 1 hora después. Una semana más tarde, se repitió el experimento, pero los ratones recibieron el otro tratamiento, por lo que sirvieron como sus propios controles (Figura 12).



**Figura 12:** Esquema representativo del test de sensibilidad a leptina.

## PROTOCOLOS DE ALIMENTACIÓN CON DIETA GRASA

Se evaluó el impacto de dos meses de exposición a una dieta rica en grasa sobre el metabolismo de hembras lacDrd2KO y hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* de 3 meses de edad alojadas en jaulas individuales. Se realizaron dos protocolos de dieta rica en grasa en los cuales se utilizaron dietas distintas y se evaluaron parámetros metabólicos diferentes,

En uno de los protocolos, un grupo de hembras recibió una dieta rica en grasa, preparada en el laboratorio, mientras que un segundo grupo continuó recibiendo alimento balanceado regular proporcionado por Gepsa Feeds (Grupo Pilar, Pilar, Buenos Aires, Argentina, [www.gepsa.com](http://www.gepsa.com)). Los pellets de dieta regular proporcionaban 3.2 kcal / g de energía y su composición era la siguiente: carbohidratos 42%, proteínas 24%, grasa 6%, fibras, minerales y humedad 28%. El alimento rico en grasa fue preparado en el laboratorio embebiendo el alimento regular en grasa marca *Fatty* (primer jugo bovino) previamente fundida en microondas. El alimento sumergido en grasa fundida se incubó una hora en estufa a 55°C. Finalmente, se descartó el exceso de grasa líquida y se dejaron secar los pellets a temperatura ambiente. El alimento rico en grasa obtenido contenía 4.5 kcal/g de energía y estaba enriquecido en un 31% de grasa con respecto al alimento control. La composición de los pellets de dieta grasa era la siguiente: carbohidratos 28%, proteínas 16%, grasa 37%, fibras, minerales y humedad 19%. Al cabo de cada semana, se evaluó la cantidad de alimento, calorías, y grasa consumidos y el peso corporal y los animales fueron ayunados durante 8 horas previas (7 a.m. – 3 p.m.) para luego medir la glucemia. Los animales fueron sacrificados una semana después de haber completado el protocolo. Se obtuvo sangre troncal y se pesaron y congelaron el tejido adiposo blanco gonadal y pardo, el hígado, el páncreas. También se congelaron la hipófisis y el cerebro de cada animal.

En el segundo protocolo, un grupo de hembras recibió una dieta rica en grasa comercial, (D124521, 45 kcal% fat; RESEARCH DIETS, INC. 20 Jules Lane, New Brunswick, USA) mientras que un segundo grupo recibió alimento balanceado regular (D12450H, 10 kcal% fat D12451 Match 17% Sucrose; RESEARCH DIETS, INC. 20 Jules Lane, New Brunswick, USA). Los pellets de dieta regular proporcionaban: 3.85 kcal / g de energía y su composición era: carbohidratos 70%, proteínas 20%, grasa 5%, fibras, minerales y humedad 5%. Por otro lado, los pellets de dieta grasa proporcionaban 4.73 kcal / g de energía y su composición era la siguiente: carbohidratos 41%, proteínas 23%, grasa 24%, fibras, minerales y humedad 12%. Al cabo de cada semana, se evaluó la cantidad de alimento consumido y el peso corporal y se completó con más alimento. Una vez completado el protocolo, se realizó un GTT y los animales fueron sacrificados a la semana siguiente. Se obtuvo sangre troncal y se

pesaron y congelaron el tejido adiposo blanco gonadal, subcutáneo y mesentérico, el tejido adiposo pardo, el hígado y el páncreas. También se congelaron la hipófisis y el cerebro de cada animal.

## RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

Se evaluaron los niveles de prolactina y GH en suero de ratones de 5 y 10 meses de edad obtenido por decapitación utilizando un kit proporcionado por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK; Dr. AF Parlow, National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA). Los resultados se expresan en términos del estándar de prolactina de ratón RP3 o estándar de GH de ratón AFP-10783B. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 7.2% y 12.8%, y 8.4% y 13.2%,

La curva de concentraciones del estándar de referencia y la dilución de las muestras fueron realizadas en *buffer* de ensayo: PBS (*buffer* fosfato 0,01M, NaCl 0,15M y 0,01% azida sódica, pH final de 7,4) con 1% de albúmina de huevo (EA). Tanto los puntos de la curva (llevados a cabo a partir del estándar) como las muestras se analizaron por duplicado.

El primer anticuerpo (IgG policlonal de conejo anti-prolactina de ratón, NHPP-NIDDK, dilución de trabajo 1:100000, IgG policlonal de conejo anti-GH de rata, NHPP-NIDDK, dilución de trabajo 1:3000) y la hormona marcada (aproximadamente 18000 cpm/tubo) fueron agregados a los tubos patrones y de muestra, los cuales fueron posteriormente incubados a temperatura ambiente durante 24 horas. Al día siguiente, el segundo anticuerpo (suero policlonal de oveja anti-IgG de conejo, dilución de trabajo 1:100) fue agregado al ensayo e incubado a temperatura ambiente durante 2 horas y 30 minutos a 4°C. Luego de esta incubación se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo específico por centrifugación refrigerada (4°C, Beckman Instruments) a 2000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante fue aspirado y se midió la radioactividad asociada al precipitado (correspondiente al complejo hormona-anticuerpo) en un contador Gamma automático modelo de mesa WIZARD, de dos pozos, 550 muestras, 100-240V – 50/60Hz.

## HISTOLOGIA

En el caso particular de las mamas de hembras lacDrd2KO y control *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> de 10 meses, y de tejido pardo se contrató un servicio de procesamiento de muestras y coloración brindado por la Universidad Maimónides.

### PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Cada tejido tuvo un protocolo de procesamiento específico.

Las **hipófisis**, una vez obtenidas, fueron fijadas en formalina (4%) durante 3 horas, y deshidratadas por pasajes sucesivos en alcoholes de concentración creciente. Etanol 70° durante 1 hora, etanol 96° ON (*over night*) y dos pasajes por etanol 100° de media hora cada uno. Luego se realizaron dos pasajes por xileno (30 minutos cada uno) para ser posteriormente incluidas en parafina (3 horas a 56°C).

Las porciones de **tejido adiposo blanco y pardo** fueron fijadas en formalina (4%) durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron los tejidos con agua destilada, se traspasaron a etanol 50° por dos horas y luego a etanol 70° por 24 horas. Luego pasaron 2 horas por etanol 90° y quedaron 24 horas en etanol 96°. Al día siguiente, se hicieron dos pasajes por etanol 100° de 1 hora cada uno, dos pasajes por xileno de media hora cada uno y posteriormente permanecieron en una mezcla en partes iguales de xilol: parafina durante 2 horas. Fueron incluidas en parafina a 56°C (se hicieron tres pasajes de dos horas cada uno). En el caso del **páncreas** se llevó a cabo el mismo protocolo de inclusión recién mencionado, con la diferencia de que este tejido se extrae completo (en lugar de una porción) y se incluye estirado sobre un papel para que no se pliegue sobre sí mismo.

En todos los casos, se cortaron secciones del taco de parafina de 4 µm de espesor en un micrótopo, se montaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente y se dejaron secar toda la noche a 37°C.

### COLORACIONES

Cortes en parafina de **hipófisis** fueron coloreados con hematoxilina/eosina para un posterior análisis histológico. Los cortes se desparafinaron en xileno (se hicieron dos pasajes de 10 minutos cada

uno) y fueron luego, re-hidratados por pasajes sucesivos en alcoholes de concentración decreciente: 100°, 96°, 80° y 50° (10 minutos cada uno), hasta que finalmente fueron lavados con agua corriente. Se realizó una coloración con hematoxilina durante 7 minutos, y luego de un lavado con agua, se prosiguió a colorear con eosina acuosa durante 30 segundos. Finalmente, los cortes de tejido fueron deshidratados y montados con medio de montaje DPX.

Cortes en parafina de **tejido adiposo pardo** fueron coloreados con hematoxilina/eosina para un posterior análisis histológico. Los cortes se desparafinaron en xileno (se hicieron tres pasajes de 10 minutos cada uno) y fueron luego, re-hidratados por pasajes sucesivos en alcoholes de concentración decreciente: 100°, 96°, 90° y 70° (10 minutos cada uno), hasta que finalmente fueron lavados con agua corriente. Se realizó una coloración con hematoxilina durante 1 minuto 40 segundos, y luego de un lavado con agua, se prosiguió a colorear con eosina acuosa durante 5 minutos. Finalmente, los cortes de tejido fueron deshidratados y montados con medio de montaje DPX.

## INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

### INMUNOTINCIÓN PARA INSULINA Y GLUCAGON EN PÁNCREAS

Para la inmunomarcación se calentó la muestra en horno microondas sumergida en *buffer* Citrato 0,01 M para la recuperación antigénica y se usó el método de streptavidina-biotina peroxidasa como sistema de revelado. El protocolo básico empleado se muestra en la Tabla 5.

<b><i>Se desparafinó e hidrató:</i></b>	
Xilol	2 pasajes de 10 min c/u
Alcohol 100°	10 min
Alcohol 96°	10 min
Alcohol 90°	10 min
Alcohol 70°	10 min
PBS	2 pasajes de 10 min c/u
<b><i>Recuperación antigénica:</i></b>	
Se calentó en horno microondas el Buffer Citrato 0,01 M, pH:6	Se calentó el buffer 3 min a 100% de potencia, se agregaron las muestras y se calentó 10 min y 20 min apagado.
PBS	2 pasajes de 10 min c/u
<b><i>Inhibición de peroxidasa endógenas:</i></b>	
Agua oxigenada 3% en PBS	30 min
PBS	2 pasajes de 10 min c/u
<b><i>Bloqueo de uniones inespecíficas:</i></b>	
Leche en polvo descremada 5% en PBS	1 h
<b><i>Anticuerpo primario:</i></b>	
Se incubó con el anticuerpo específico	ON (en cámara húmeda) a 4°C
PBS	2 pasajes de 10 min c/u
<b><i>Anticuerpo secundario:</i></b>	
Anticuerpo secundario biotinilado	1 h (en cámara húmeda)
PBS	2 pasajes de 10 min c/u
<b><i>Sistema de revelado:</i></b>	
ABC (1/50 A + 1/50 B en PBS)	30 min (en cámara húmeda)
PBS	2 pasajes de 10 min c/u
Sustrato enzimático ( 5 µl de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) + cromógeno (2,5 mg de diaminobencidina: DAB) disuelto en 10 ml de PBS	3 min
Agua	2 pasajes de 10 min c/u
<b><i>Se contracoloró. Se deshidrataron y montaron las muestras</i></b>	

**Tabla 5:** Protocolo básico de IHQ.

En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad sustituyendo el anticuerpo primario por PBS.

Se realizaron inmunomarcaciones diferentes en cortes seriados de páncreas enteros. Para cada animal se realizó una IHQ contra insulina en una sección de tejido, y la siguiente sección contra glucagón.

En las Tabla 6 y 7 se describen los reactivos utilizados en cada caso.

Anticuerpo primario	<b>anti-Insulina*</b>
Dilución utilizada	1:300
Anticuerpo secundario	anticobayo
biotinilado	
Dilución utilizada	1:200
Cromógeno empleado	DAB
Contracoloración	Hematoxilina

**Tabla 6:** Reactivos utilizados. \*Proveedor: Sigma, Saint Louis, MO.

Anticuerpo primario	<b>anti-Glucagon*</b>
Dilución utilizada	1:300
Anticuerpo secundario	anticonejo
biotinilado	
Dilución utilizada	1:100
Cromógeno empleado	DAB
Contracoloración	Hematoxilina

**Tabla 7:** Reactivos utilizados. \*Proveedor: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA.

Para la obtención de las imágenes se utilizó una cámara digital Canon PowerShot G6 acoplada a un microscopio Zeiss Axiostar plus. Se obtuvieron tantas imágenes como fueran necesarias para cubrir toda la sección de tejido de cada animal utilizando un objetivo de 5X. Luego se fotografiaron cada uno de los islotes identificados en cada animal, utilizando un objetivo 40X.

## ACTIVACIÓN DE pSTAT3 EN NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS ESPECÍFICOS EN RESPUESTA A LEPTINA

En un día aleatorio del ciclo estral, hembras lacDrd2KO y hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* de 10 meses de edad se pesaron y se mantuvieron en ayuno durante 16 horas. A las 10.00 a.m. del día siguiente, los ratones fueron pesados nuevamente y recibieron una inyección ip de leptina (1 mg / kg de peso corporal, disuelta en el vehículo; mleptin AFP362C NIDDK; Dr. AF Parlow, Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis, Torrance, CA) o vehículo (PBS, pH 7.4). Dos horas más tarde, se extrajeron los cerebros, se congelaron en hielo seco y se mantuvieron a -80 ° C hasta el momento de la microdissección de núcleos hipotalámicos utilizando una técnica de *micropunching*.

El tejido congelado se cortó en secciones coronales de 300 µm de espesor de Bregma -1.46 a -2.12 mm según (Paxinos & Franklin 2008; Paxinos & Franklin 2008) en un crióstato seteado a -9° C. Las secciones se montaron sobre portaobjetos de vidrio cargados e inmediatamente los núcleos



hipotalámicos específicos fueron aislados en frío, usando una aguja de punta roma (21G) y bajo lupa. Se aislaron cuatro áreas hipotalámicas: el MBH (que incluye el ARC y el VMN), el DMN, AVPV y PVN.

Para eliminar la posibilidad de contaminación cruzada entre los núcleos, se utilizaron agujas estériles diferentes para diseccionar cada área. Una vez obtenidos los núcleos hipotalámicos de interés, se validó la disección mediante el examen de las secciones descongeladas bajo microscopio óptico. Esto permitió confirmar la ubicación de los núcleos aislados analizando la posición de ciertos puntos de referencia tales como el fórnix, los nervios ópticos y el largo del tercer ventrículo. Para la técnica de western blot, el tejido se colocó en 40  $\mu$ l de Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8) que contenía dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%, una tableta de inhibidores proteasas (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), y dos inhibidores de proteasas adicionales: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1 mM) (PMFS) y ortovanadato de sodio (1 mM). Las muestras se sonicaron durante 2 minutos luego se almacenaron a -80 ° C. La concentración de proteínas se determinó mediante una modificación del método de Lowry utilizando un kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Después de la adición de *buffer* de carga que contenía 2- $\beta$  mercaptoetanol, las muestras se pusieron a 96 ° C durante 4 minutos e inmediatamente después, en hielo durante 1 minuto. Las muestras se sembraron y corrieron en un gel de SDS-PAGE al 7,5% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después de teñir con rojo Ponceau para confirmar la óptima transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (Odyssey® Blocking Buffer) durante media hora a temperatura ambiente. Luego se dejaron incubando simultáneamente con el anticuerpo específico de STAT3 fosforilado, pSTAT3 (dilución 1: 500; Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA) y el anticuerpo específico de beta-tubulina (dilución 1: 3000, Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA) en TBS que contenía 0,1% de Tween-20 y BSA 1%, a 4 ° C durante la noche. Al día siguiente, las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en anticuerpo secundario (dilución 1: 10000, anticuerpos secundarios de conejo y ratón marcados con fluoróforos IRDye (LI-COR)) en TBS-Tween-20 0,1%. Entre cada una de las incubaciones realizadas, las membranas se lavaron en TBS-Tween-20 al 0,1%. Finalmente, las membranas inmunomarcadas fueron visualizadas utilizando el sistema Odyssey. pSTAT3 se cuantificó en el MBH, DMN, PVN y AVPV como el cociente entre los niveles de pSTAT3 y los de b-tubulina detectada en cada muestra.

## ACTIVACIÓN DE pSTAT5 EN NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS ESPECÍFICOS EN RESPUESTA A PROLACTINA

A las 9.00 a.m. de un día aleatorio del ciclo estral, se inyectaron hembras lacDrd2KO y hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* de 10 meses de edad con prolactina ovina ip (5 mg / kg peso corporal; oPRL para

estudios biológicos, NHPP-oPRL-21, AFP-10692C, Dr. AF Parlow, National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA) disuelta en solución salina de pH 8.3 (n = 3 por genotipo) o vehículo (solución salina; n = 3 por genotipo). Los ratones se anestesiaron 45 minutos más tarde con una inyección ip de ketamina-xilazina (K, 150 mg / kg; X, 10 mg / kg) y se perfundieron primero con 25 ml de solución salina y luego con el mismo volumen de paraformaldehído al 4% en *buffer* fosfato 0,1 M (PBS), pH 7,3 preparado ese mismo día. Los cerebros se fijaron posteriormente a 4 ° C en el mismo fijador toda la noche, y luego se criopreservaron (se infiltraron secuencialmente con sacarosa al 10% y sacarosa al 20% hasta que se hundieron). Finalmente, los cerebros se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -80 ° C hasta el momento de la IHQ.

Se hicieron cortes coronales de cerebro congelado (30 µm de espesor) en crióstato seteado a -15° C, de bregma -1.46 a -2.12 mm según (Paxinos & Franklin 2008). Las secciones consecutivas se recolectaron a intervalos de 150 µm comenzando en bregma -1.46 (36) para generar una biblioteca de cinco conjuntos de secciones, de manera de que cada conjunto recorriera en profundidad las áreas hipotalámicas de interés. Las secciones se almacenaron en una solución crioprotectora a -20 ° C. Conjuntos seriales de secciones, que contienen el ARC, VMN y el DMN se inmunomarcaron para pSTAT5.

Las secciones se lavaron seis veces en TBS 0,05 M (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) para eliminar el crioprotector, y luego se hizo la recuperación antigénica, para lo cual, las secciones se calentaron durante 5 minutos a 90° C en Tris 0,01 M (pH 10). Una vez que las secciones alcanzaron la temperatura ambiente, se incubaron durante 10 minutos en solución de bloqueo (TBS 0,05 M + Triton X-100 al 0,3% + BSA al 0,25%). Las peroxidasas endógenas se bloquearon en metanol al 40%, peróxido de hidrógeno al 0.9% y luego las secciones se incubaron con anti-pSTAT5 hecho en conejo (Tyr694, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) diluído 1: 1000 en TBS 0.05M con 0.3% de TritonX-100, 0.25% BSA y 2% de suero normal de cabra durante 24 horas a 4 °C. Las secciones se lavaron en TBS y luego se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado IgG anticonejo de cabra (Santa Cruz; sc-2018) dilución 1: 300 durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de un lavado adicional, las secciones se incubaron con ABC (kit ABC Elite, Vector) durante 30 minutos. Finalmente, las secciones se hicieron reaccionar con 3,3'-diaminobencidina y se visualizó la marca de pSTAT5 como un precipitado nuclear marrón. Las secciones se ubicaron sobre portaobjetos cargados gelatinizados usando pincel y se secaron al aire durante la noche. Luego, se deshidrataron por medio de pasajes sucesivos en alcoholes de gradación creciente y finalmente se pasaron por xileno. Se montaron usando medio de montaje DPX.

Las imágenes digitales de los cortes de cerebro se tomaron con un objetivo de aumento 10X, un microscopio Zeiss Axiostar Plus y una cámara digital Canon PowerShot G6. Las secciones se ordenaron de acuerdo a su bregma usando puntos de referencia anatómicos según el atlas de Paxinos (Paxinos & Franklin 2008) para garantizar la consistencia en el procedimiento de análisis. Cada región se analizó contando el número total de núcleos positivos para pSTAT5 dentro de los límites establecidos para cada núcleo, utilizando la función de conteo de partículas del software ImageJ (NIH, Bethesda, MD). Los datos se presentaron como núcleos promedio por área hipotalámica (n = 3), y las imágenes mostradas son representativas de lo observado para cada condición y genotipo.

## EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE cDNA

Se sacrificaron ratones de 5 y 10 meses de edad, se extrajeron tejidos y se congelaron en hielo seco para almacenar a -80°C.

### Extracción ARN núcleos hipotalámicos

Se cortaron secciones coronales de cerebro (300 µm) en un crióstato a -9°C, luego se montaron en portaobjetos de vidrio y se volvieron a congelar. Se disectaron tres áreas hipotalámicas bajo lupa que forman parte de circuitos cerebrales asociados a la generación de prolactinomas y al desbalance metabólico producido por la hiperprolactinemia resultante, como son el (ARC, VMN, DMN) utilizando una aguja de microdissección de extremo romo de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (Paxinos & Franklin 2008).

Para eliminar la posibilidad de contaminación cruzada de tejido entre los núcleos, se utilizaron diferentes agujas estériles para aislar cada área. Después de la recolección de tejido, se validó la técnica mediante el examen de las secciones descongeladas bajo un microscopio óptico. Esto permitió identificar claramente dónde se había recogido tejido en las secciones tomando como referencia puntos anatómicos de ubicación conocida en el cerebro (por ejemplo, tracto óptico, el fórnix, y la extensión del 3V) (Ladyman & Grattan 2005) . En el caso particular de los núcleos hipotalámicos aislados por medio de la técnica de micropunching, una vez diseccionados, el tejido obtenido de ratones *Drd2<sup>loxP</sup> / loxP* y *lacDrd2KO* fue colocado en un *buffer* de lisis comercial y luego sonificado utilizando el Bioruptor Plus, provisto por la empresa. Diagenode. Se hicieron dos ciclos de sonificado en alta intensidad (“high intensity”) y un ciclo de sonificado en baja intensidad (“low intensity”). Los ciclos de sonificados son seteados 30 segundos ON y 30 segundos OFF. El tejido se guardó a -80°C y se procesó

para la extraer ARN total utilizando un kit de extracción de ARN por columnas (RNeasy Mini Kit, QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de ARN se cuantificó utilizando un fluorímetro Qubit, y kit Qubit RNA HS. La pureza del ARN se evaluó mediante la relación de absorbancia a 260/280 nm (> 1,8) y su integridad por electroforesis en gel de agarosa. El ARN extraído se mantuvo congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización. Cantidades iguales de ARN (0.2-1 $\mu\text{g}$ ) se retrotranscribieron en un volumen final de 40  $\mu\text{l}$  en presencia de deoxi-NTP 0,5 mM, 0.50  $\mu\text{g}$  oligo (dT) 15 (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) y 2 U de MMLV transcriptasa reversa (Invitrogen).

### **Extracción ARN tejido adiposo**

Se obtuvo tejido adiposo marrón de hembras  $\text{Drd2}^{\text{loxP/loxP}}$  y  $\text{lacDrd2KO}$  y se extrajo ARN total utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen). La concentración de ARN se determinó sobre la base de su absorbancia a 260 nm, su pureza se evaluó mediante la relación de absorbancia 260/280 nm (> 1,8) y su integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. El ARN se mantuvo congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizado. El ARN del tejido adiposo marrón (1  $\mu\text{g}$ ) se retrotranscribió en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  en presencia de deoxi-NTP 0,5 mM, 0,25  $\mu\text{g}$  oligo (dT) 15 (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) utilizando 1 U MMLV transcriptasa reversa (Promega Co., Madison, USA).

En todos los casos, la enzima transcriptasa reversa se omitió en las reacciones control; la ausencia de fragmentos amplificados por PCR en los controles indicó una extracción de ARN libre de ADN genómico. El cDNA se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para PCR en tiempo real. Los resultados de los ensayos se normalizaron al gen de referencia ciclofilina para eliminar posibles variaciones entre muestras que se debieran a diferencias en la calidad y cantidad de ARN de partida y la eficiencia de la RT. Los niveles de ciclofilina se analizaron de forma independiente y no variaron en ninguno de los grupos experimentales.

### **DISEÑO DE PRIMERS**

Los *primers* específicos para cada protocolo de amplificación empleado en este proyecto fueron diseñados con el software “Primer-BLAST” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), utilizando registros de secuencias de referencia como templatado del análisis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>). En el diseño se tuvo en cuenta que éstos amplificaran fragmentos que contuviesen al menos un intrón entre dos exones. De esta manera, se puede determinar la amplificación específica del transcripto y distinguir, en caso que la hubiese,

contaminación con ADN genómico, ya que, en dicho caso, el fragmento amplificado es de mayor tamaño dado que incluye la secuencia intrónica.

Para el análisis de las características de los *primers* diseñados se empleó el programa "OligoAnalyzer3.1", (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Se tuvo en cuenta que los *primers* no formen dímeros ni estructuras secundarias de alta estabilidad, y que no presenten repeticiones invertidas ni repeticiones de un mismo nucleótido. Se eligieron *primers* cuya temperatura de "annealing" estuviera entre 58 y 60°C. El tamaño de los fragmentos amplificados por el par de *primers* diseñados para la PCR en tiempo real no superó los 180 pb. En la Tabla 8 se detallan los *primers* utilizados.

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5' - 3')</b>	<b>Fuente</b>
<i>Adiponectina</i>	Sentido	ATCCTGGCCACAATGGCACA	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	CAAGAAGACCTGCATCTCTCT	
<i>Agrp</i>	Sentido	CTTTGGCGGAGGTGCTAGAT	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	AGGACTCGTGCAGCCTTACAC	
<i>BDNF</i>	Sentido	CTGGGTTAACTTTGGGAAATGC	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	GCCTTCATGCAACCGAAGTAT	
<i>Beclin</i>	Sentido	GGCCAATAAGATGGGTCTGA	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	CACTGCCTCCAGTGTCTTCA	
<i>CART</i>	Sentido	AGGAGCTGATCGAAGCGTTG	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	ACTTGGCCGTA CTCTCTCTCG	
<i>Ciclofilina</i>	Sentido	TTCTTCATAACCACAGTCAAGACC	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	ACCTTCCGTACCACATCCAT	
<i>Cidea</i>	Sentido	AACCATGACCGAAGTAGCCG	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	CCAGGCCAGTTGTGATGACT	
<i>Foxo1</i>	Sentido	AGTGGATGGTGAAGAGCGTG	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	GAAGGGACAGATTGTGGCGA	
<i>Glk</i>	Sentido	GGCAGATGCTGGATGACAGA	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	GTCTCCA ACTTCTGAGCCTTCT	
<i>Insr</i>	Sentido	TTCGAGGATTACCTGCACAA	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	ACATTCCCCACCTCTTCAAG	
<i>Lamp</i>	Sentido	GGTGCTGGTCTTTTCAGGCTTGATT	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	ACCACCCAATCTAAGAGCAGGACT	
<i>Lpl</i>	Sentido	CCCTACAAAGTGTTCCATTACCAA	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	TTGTGTTGCTTGCCATCCTCA	
<i>Npy</i>	Sentido	TACTCCGCTCTGCGACACTA	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	CTTCAAGCCTTGTCTGGGGG	
<i>Obrb</i>	Sentido	GCATGCAGAATCAGTGATATTTGG	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	CAAGCTGTATCGACACTGATTTCTTC	
<i>pgc1a</i>	Sentido	TCTCAGTAAGGGGCTGGTTG	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	TTCCGATTGGTCGCTACACC	

<i>Prlr</i>	Sentido Antisentido	CACAGTAAATGCCACGAACG GGCAACCATTTTACCCACAG	Diseñado con Primer Blast
<i>TrkB</i>	Sentido Antisentido	CCTGGAGTCTGACTACGAGACA AATGTCAGTTGGCGTGGTCC	Diseñado con Primer Blast
<i>Ucp1</i>	Sentido Antisentido	AGTACCCAAGCGTACCAAGC GACCCGAGTCGCAGAAAAGA	Diseñado con Primer Blast
<i>Ulk1</i>	Sentido Antisentido	CGTCCTCCAAGACGCTGTAT CCTGTTGCTTTCCTCAAAG	Diseñado con Primer Blast

**Tabla 8.** Secuencias de primers sentido y antisentido utilizadas

## PCR EN TIEMPO REAL

Brevemente, la expresión de genes asociados a la ingesta y el metabolismo, se evaluó en hipotálamo y tejido adiposo utilizando 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) Solis Biodyne (9,4 ul que contienen HOT FIREPol® DNA Polymerase, 5x EvaGreen qPCR *buffer*, 12,5 mM dNTPs, EvaGreen® dye, ROX dye), 100 ng de cDNA de casa muestra y 0.24 µM o 0.48 µM de *primers*, según conveniente, en un volumen final de 10,4 µl. Después de la desnaturalización a 95 ° C durante 15 minutos, el cDNA se amplificó 40 ciclos. Las condiciones del ciclado (desnaturalización, hibridación y extensión) para cada gen se detallan a continuación. La lectura óptica se realizó a 80 ° C durante 33 s. La amplificación y detección se hizo utilizando un termociclador marca Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, U.S.A), y los datos se almacenaron de forma continua durante la reacción.

Se pusieron a punto programas de amplificación específicos para cada tejido:

- **Hipotálamo:** El programa de amplificación estándar utilizado involucró los siguientes pasos: 1) Activación: 95°C por 15 minutos; 2) Desnaturalización: 95°C por 30 segundos; 3) Hibridación: 61°C por 1 minuto; 4) Extensión: 72°C por 30 segundos; 5) Lectura de datos: 88°C por 33 segundos. Los pasos 2 a 5 se repiten 40 veces.
- **Tejido adiposo blanco subcutáneo:** El programa de amplificación estándar utilizado involucró los siguientes pasos: 1) Activación: 95°C por 15 minutos; 2) Desnaturalización: 95°C por 30 segundos; 3) Hibridación: 63°C por 30 segundos; 4) Extensión: 72°C por 30 segundos; 5) Lectura de datos: 88°C por 33 segundos. Los pasos 2 a 5 se repiten 40 veces.
- **Tejido adiposo pardo:** El programa de amplificación estándar utilizado involucró los siguientes pasos: 1) Activación: 95°C por 15 minutos; 2) Desnaturalización: 95°C por 30 segundos; 3) Hibridación: 58°C por 30 segundos; 4) Extensión: 72°C por 30 segundos; 5) Lectura de datos: 88°C por 33 segundos. Los pasos 2 a 5 se repiten 40 veces. En el caso de *pgc1 α* el programa

de amplificación utilizado involucró los siguientes pasos: 1) Activación: 95°C por 15 minutos; 2) Desnaturalización: 95°C por 20 segundos; 3) Hibridación: 63°C por 1 minuto; 4) Extensión: 80°C por 33 segundos; 5) Lectura de datos: 88°C por 33 segundos. Los pasos 2 a 5 se repiten 40 veces.

El equipo de PCR en tiempo real, el cual mide el aumento de los niveles de fluorescencia en cada ciclo de PCR causados por la unión del SYBR Green al ADN doble cadena. El equipo determina un nivel de fluorescencia umbral dentro de la fase exponencial de la reacción. El número de ciclos que requiere cada muestra para alcanzar dicho umbral se conoce como Ct (*Cycle threshold*), el cual está directamente relacionado con la cantidad inicial de molde presente en la PCR. Dado que se obtiene una señal siempre que haya moléculas de ADN doble cadena, *a posteriori* del ensayo de PCR se realizaron curvas de disociación (Curva de *Melting*)

La expresión relativa de los transcritos evaluados se calculó usando Ciclofilina como control endógeno. La expresión matemática utilizada para calcular estas relaciones fue:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Dónde:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ referencia.}$$

$$\Delta Ct \text{ muestra} = Ct \text{ gen en estudio} - Ct \text{ gen endógeno.}$$

$$\Delta Ct \text{ referencia} = \text{promedio } \Delta Ct \text{ de las muestras control.}$$

Para todos los genes evaluados se realizaron previamente ensayos de estandarización de los protocolos empleados, que involucraron la evaluación de curvas de rango dinámico de amplificación del transcrito de interés y posteriores curvas de disociación.

Los resultados se validaron sobre la base de la calidad de las curvas de disociación (37) generadas al final de los ensayos de PCR aumentando la temperatura de las muestras de 60 a 95 ° C, mientras se recopilaban continuamente los datos de fluorescencia. Estas curvas permiten determinar la especificidad de la señal y así eliminar falsos positivos debidos a productos inespecíficos y dímeros de *primers*, entre otros.

La pureza del producto se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa. Cada muestra fue analizada por duplicado.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como promedios  $\pm$  error estándar de la media. Las diferencias entre las medias se analizaron mediante la prueba *t de Student* no pareada (en el caso de tratarse de dos grupos solamente) y se utilizó ANOVA de dos factores para medidas independientes para analizar la ingesta de alimentos, pSTAT3 y 5, en respuesta a inyección de leptina o prolactina, respectivamente (para los efectos del fármaco x genotipo). También se utilizó el ANOVA de dos factores (genotipo y edad) para el peso de los tejidos, y las hormonas en sangre a los 5 y 10 meses. En el caso del GTT se usó ANOVA de dos factores (tiempo y dieta; o tiempo y genotipo) para medidas repetidas. En el caso del efecto de las dietas sobre peso corporal, glucemia, ingesta, ingesta de grasa, o ingesta de caloría se usó ANOVA de tres factores para medidas repetidas (genotipo, dieta y tiempo). Lo mismo para el estudio de *binge eating* (factores de genotipo, dieta y tiempo). En todos los casos la prueba *post-hoc* de Tukey se empleó cuando fue necesario, para promedios simples o individuales, luego de analizar la interacción de los factores. Se utilizaron comparaciones paramétricas o no paramétricas según lo dictado por la distribución de datos. P menor a 0,05 fue considerado significativo.



# CAPÍTULO 1

Caracterización del fenotipo metabólico de un modelo transgénico de hiperprolactinemia crónica

# INTRODUCCIÓN

## HIPERPROLACTINEMIA Y PROLACTINOMAS

La hiperprolactinemia se define como una elevación persistente de los niveles circulantes de prolactina por encima del nivel superior normal, habitualmente 20-25 ng/ml. Es una de las alteraciones hipotálamo-hipofisarias más comunes de la práctica clínica endocrinológica y su importancia clínica está relacionada con su efecto sobre la función gonadal y mamaria, que causa infertilidad anovulatoria, trastornos menstruales, disfunción eréctil, acné, galactorrea y ginecomastia (Demssie & Davis 2008). Las causas de hiperprolactinemia pueden dividirse en fisiológicas, como el embarazo y la lactancia; farmacológicas, por fármacos que incluyen antipsicóticos (fenotiazinas, butirofenonas), antidepresivos (tricíclicos, inhibidores de la enzima mono amino oxidasa e inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina), opioides, antihipertensivos (verapamilo, metildopa y reserpina) y estrógenos, entre otros; y patológicas, vinculadas a la presencia de un adenoma hipofisario secretor de prolactina (prolactinoma). Se han descrito escasos casos de hiperprolactinemia por causas genéticas (Newey *et al.* 2013).

Los prolactinomas corresponden a los tumores hipofisarios secretantes más frecuentes representando aproximadamente el 40% de todos los tumores de hipófisis. Alteran el metabolismo, afectan la reproducción por la hiperprolactinemia resultante y producen alteraciones de tipo neurológico y/u oftálmico producto de la expansión tumoral (Cicarelli *et al.* 2005).

Considerando que la secreción de prolactina está regulada principalmente por un tono dopaminérgico inhibitorio, los prolactinomas se diferencian del resto de los tumores hipofisarios, pues, en su mayoría, son tratados con agonistas dopaminérgicos, logrando, en general, una reducción del tamaño tumoral con liberación de los síntomas de compresión y una normalización de los niveles de prolactina séricos (Bevan *et al.* 1992). Las principales drogas que se utilizan son la bromocriptina, y cabergolina (Gillam *et al.* 2006) que activan directamente al RD2, tanto del lactotrofo normal como tumoral, provocando la inhibición de la síntesis y secreción de prolactina y del crecimiento de los lactotrofos con la consiguiente reducción del tamaño del tumor (Saeger *et al.* 2007; Molitch 2003). Sin embargo, aproximadamente un 15% de los pacientes no responden a la terapia farmacológica. Éstos se consideran prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos, los cuales en muchas ocasiones se relacionan con una disminución en la expresión o función del RD2 (menor afinidad del RD2 por los agonistas de dopamina y/o problemas en la transducción de señales) (Caccavelli *et al.* 1994). En estos casos, se debe recurrir a un tratamiento quirúrgico mediante una cirugía por vía

transepto-esfenoidal o transcraneal (según el tamaño del tumor), en la cual se extirpa selectivamente el adenoma hipofisario conservando la porción de hipófisis normal. En caso de tumores con elevado índice de crecimiento, que no responden al tratamiento médico o generan recidivas post-quirúrgicas, se lleva a cabo una radioterapia.

En algunos casos, los pacientes con prolactinomas refieren alteraciones en el metabolismo que mejoran luego de la normalización de los niveles de prolactina. En este contexto, y el de la hiperprolactinemia crónicamente elevada por tratamientos farmacológicos, nuestro foco en la presente tesis se centró en dilucidar los efectos metabólicos de la prolactina.

## MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERPROLACTINEMIA CRÓNICA

La prolactina es una hormona polipeptídica/citoquina que fue identificada hace más de 80 años primeramente como un factor hipofisario que estimulaba el desarrollo de la glándula mamaria y la lactancia, función a la que le debe su nombre (Muthuswamy 2012). Dada la mencionada distribución generalizada de los PRLR en el organismo, la desregulación de los niveles de esta hormona resulta un riesgo potencial para las múltiples funciones que coordina, que incluyen, reproducción, osmorregulación, inmunorregulación, crecimiento y desarrollo, comportamiento, y metabolismo (Tovar & Dieguez 2014).

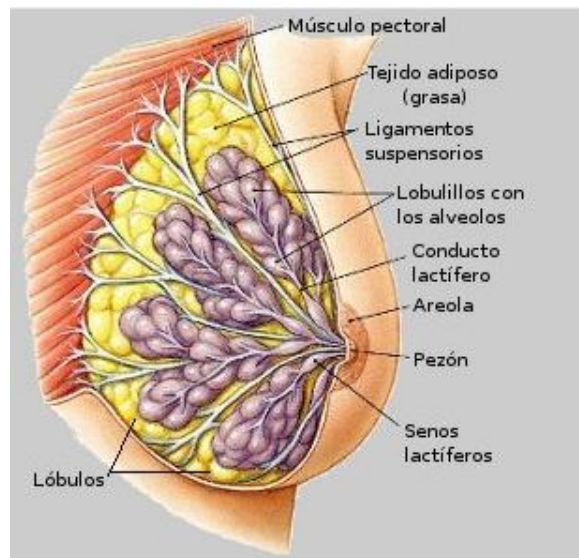
Con el objetivo de evaluar el rol de la prolactina sobre el metabolismo, nuestro laboratorio desarrolló un modelo experimental de hiperprolactinemia crónica: el ratón *lacDrd2KO*. Se trata de un *knockout* tejido específico generado mediante la tecnología *Cre/loxP*, que carece de RD2s funcionales solamente en lactotropos. En ausencia del tono inhibitorio que la dopamina ejerce sobre la síntesis y secreción de prolactina, las hembras *lacDrd2KO* desarrollan hiperprolactinemia crónica desde el primer mes de edad.

A los 5 meses de edad, la hiperprolactinemia está bien establecida y es crónica. Los niveles de ingesta se encuentran aumentados, aunque, la obesidad no es evidente ya que el peso corporal aumenta solo marginalmente. Por otra parte, a los 10 meses de edad, la hiperprolactinemia se mantiene, pero además los animales desarrollan hiperleptinemia y un fenotipo de obesidad mórbida (Perez-Millan *et al.* 2014; Luque *et al.* 2016; Luque *et al.* 2016; Luque *et al.* 2016). Para comprender el fenotipo de nuestro modelo experimental, que caracterizamos en nuestra cohorte en esta primera parte, se describen a continuación las acciones de la prolactina en distintos órganos.

## PROLACTINA Y GLÁNDULA MAMARIA

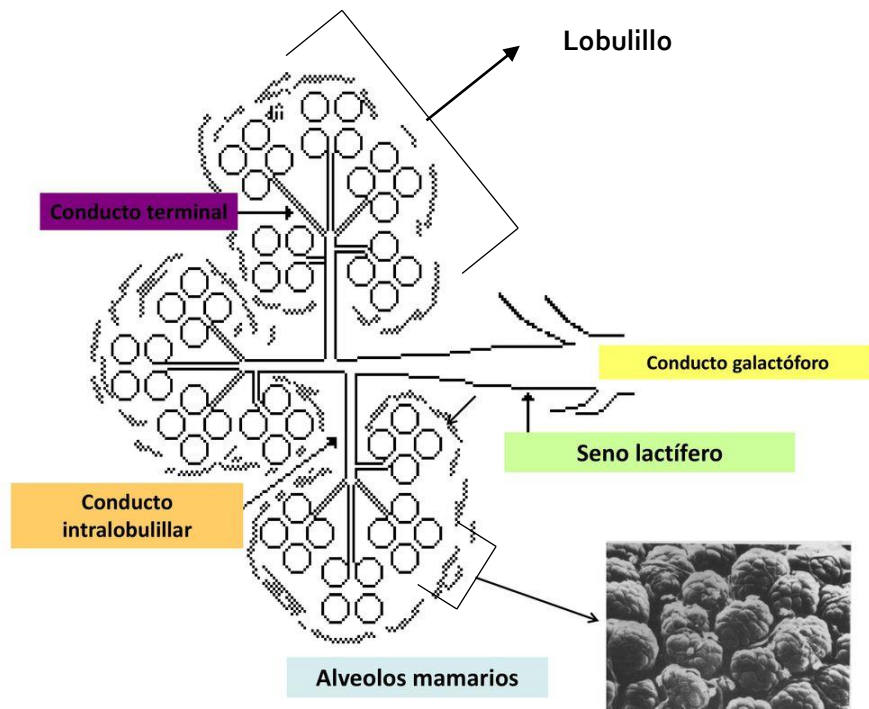
### *Anatomía de la glándula mamaria*

La glándula mamaria es una glándula exócrina de tipo túbulo-alveolar formada por un estroma, tejido conectivo con abundantes fibras elásticas y tejido adiposo, y un parénquima, tejido glandular mamario. Se compone de lóbulos irregulares que, a su vez, están subdivididos por tabiques de tejido conectivo y adiposo en unidades más pequeñas llamadas lobulillos (Figura 13). El tejido conectivo interlobulillar es un tejido fibroso denso, contiene abundantes fibras colágenas y grasa, mientras que el intralobulillar, que rodea a los conductillos terminales y acinos de los lobulillos, es laxo, sensible a estímulos hormonales, tiene pocas fibras colágenas y apenas contiene grasa (Michael H. Ross & Wojciech Pawlina 2006).



**Figura 13.** Anatomía de la glándula mamaria femenina. Tomado de <https://www.scribd.com/presentation/383120930/Cancer-de-mama-pptx>.

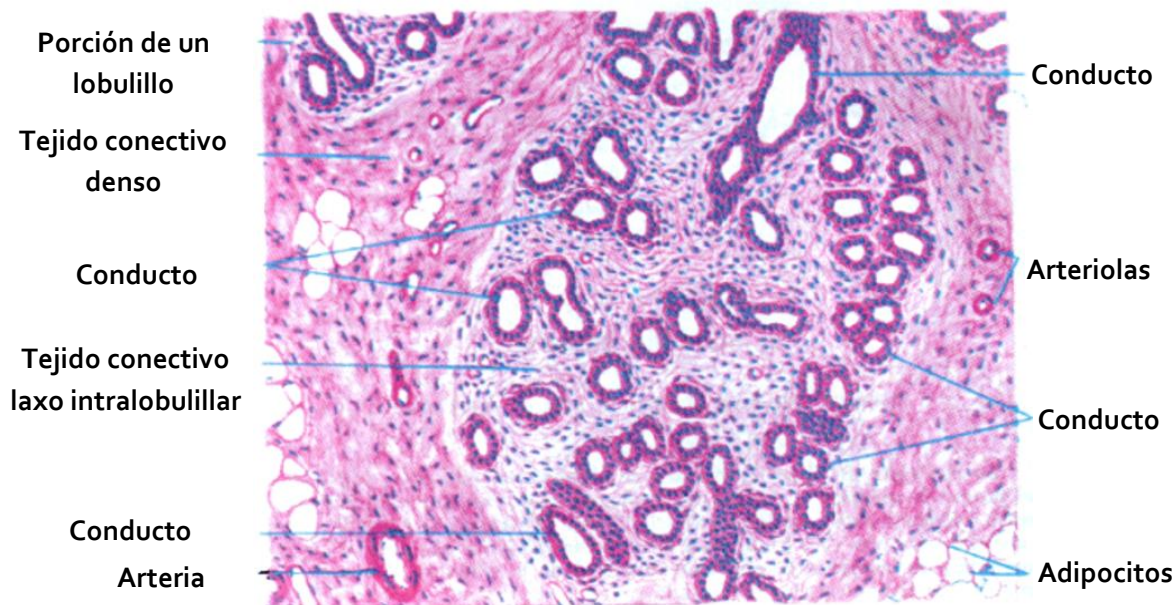
Los lobulillos contienen las unidades funcionales productoras de leche llamadas alvéolos glandulares o acinos, formados por un epitelio simple secretor luminal rodeado por células mioepiteliales. Éstas últimas pueden contraerse de forma similar al músculo liso, para permitir el flujo de la leche desde los alvéolos, a conductos de luz pequeña llamadas lactíferos que luego confluyen en un conducto central de epitelio escamoso y estratificado llamado galactóforo. Cada lóbulo desemboca en el pezón de manera independiente a través del conducto galactóforo (Figuras 13 y 14).



**Figura 14.** Esquema representativo de la estructura de un lóbulo de la glándula mamaria. Tomado y modificado de <https://slideplayer.es/slide/13457260/>.

### **Histología de la glándula mamaria**

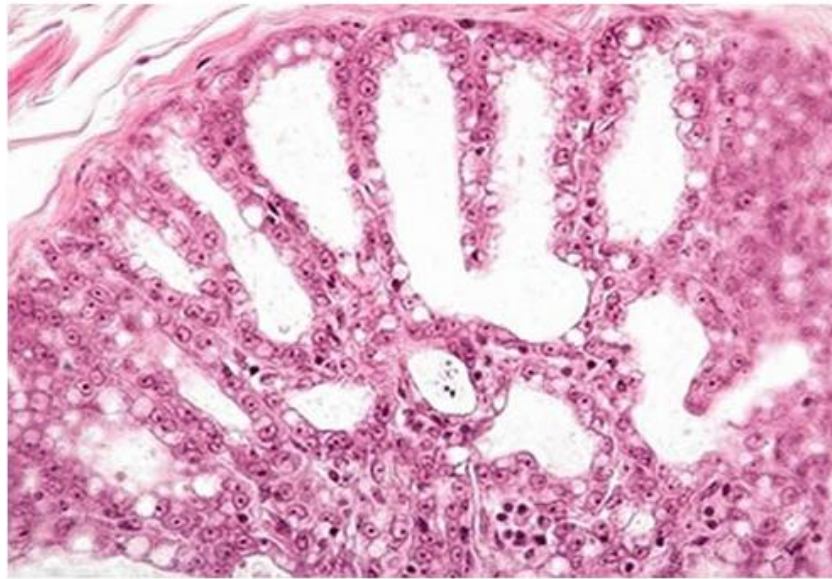
La estructura histológica de la mama según las condiciones fisiológicas del organismo y con la edad. La figura 15 representa un esquema de un corte de glándula mamaria inactiva o en reposo. El parénquima es escaso y está formado principalmente por conductos de luz pequeña, ubicados principalmente en el centro del campo. Los conductos están rodeados por tejido conectivo laxo y junto con el tejido conectivo circundante forman un lobulillo. Por fuera del lobulillo el tejido conectivo es más denso. Los conductos más pequeños están tapizados por epitelio cilíndrico simple, mientras que los de mayor tamaño están revestidos por epitelio cilíndrico bajo de dos capas de espesor. Al llegar al pezón, el conducto galactóforo tiene epitelio plano estratificado (Michael H. Ross & Wojciech Pawlina 2006).



**Figura 15.** Esquema de corte de glándula mamaria en reposo (Técnica: hematoxilina-eosina). Tomado y modificado de Atlas de Histología normal. Mariano Di Fiore. Editorial El Ateneo.

Se considera que las células epiteliales dentro del lobulillo de la mama en reposo están formando parte de los conductos. Habitualmente no hay alvéolos, sin embargo, sí están sus precursores en forma de engrosamientos celulares de la pared de los conductos. El epitelio del lobulillo en reposo es cúbico y además hay células mioepiteliales.

Durante el embarazo, las glándulas mamarias sufren una serie de cambios que las preparan para la lactancia. Conforme las células de la porción glandular proliferan por división mitótica, los conductos se ramifican y en sus extremos comienza a aparecer los alvéolos. El desarrollo alveolar se torna muy prominente durante las últimas etapas del embarazo, cuando en los alvéolos se acumula el producto de secreción. Al mismo tiempo los linfocitos y plasmocitos se vuelven más abundantes en el tejido conectivo laxo que rodea al lobulillo en desarrollo. Son muy prominentes los conductos de mayor calibre. Luego, durante la lactancia, la luz de los alvéolos se dilata y adopta forma sacular. La altura de las células alveolares puede variar de acuerdo a su estado funcional, pudiendo ser cilíndricas, cúbicas o casi planas (Michael H.Ross & Wojciech Pawlina 2006). En detalle, en su citoplasma pueden verse vacuolas de secreción que contienen albúmina y lípidos que secretan hacia la luz alveolar. El tejido conectivo que rodea las unidades secretoras muestra abundantes linfocitos y plasmocitos (Figura 16).



**Figura 16.** Corte de glándula mamaria durante la lactancia. Los alvéolos adquieren forma sacular y las células epiteliales muestran vacuolas de secreción. En el tejido conectivo que a los alvéolos se observan linfocitos y células plasmáticas (Técnica: hematoxilina-eosina). Tomado de <http://www.conganat.org/>

### ***Acción de prolactina sobre glándula mamaria***

La prolactina, hormona sintetizada tanto por la hipófisis como por la mama, actúa conjuntamente con la progesterona para generar una glándula mamaria competente para la lactancia. Participa de la morfogénesis de la glándula mamaria y de la lactogénesis, indirectamente, regulando la producción de progesterona del ovario y directamente, señalizando a través de propio receptor en células epiteliales.

El rol de la prolactina sobre la glándula mamaria ha sido investigado utilizando modelos de ratones *knockout* para prolactina (*Prl*  $-/-$ ) y para PRLR (*Prlr*  $-/-$ ) (Panchal *et al.* 2007; Srinivasan *et al.* 2003). Si bien el desarrollo embrionario y posnatal de la glándula mamaria en estos ratones es normal, en la pubertad se observa que tanto la ramificación lateral de los conductos mamarios como el desarrollo alveolar se encuentran alterados. Estos animales no pueden lactar. Durante el período periparto, la prolactina permite la diferenciación final del epitelio alveolar secretor y participa de la síntesis y secreción de leche (Macias & Hinck 2012).

## PROLACTINA E INGESTA

La ingesta de alimento es una función vital ya que proporciona las necesidades nutricionales y energéticas. Existe gran cantidad de evidencia que muestra que la prolactina es una hormona capaz de modular el balance energético regulando los niveles de ingesta. Niveles crónicamente elevados de prolactina, como sucede durante períodos de hiperprolactinemia fisiológica, como son preñez y lactancia, o no fisiológica, por tratamientos con fármacos que inhiben la acción inhibitoria de la dopamina o bien por la presencia de tumores hipofisarios, aumentan la ingesta, probablemente induciendo un estado de resistencia a la leptina, y predisponen a desarrollar obesidad (Krebs & Hilton 2001; Naef & Woodside 2007). Algunos autores sostienen que la comunicación cruzada entre la prolactina y la leptina es la responsable de inducir, en última instancia, insensibilidad central a leptina. Por ejemplo, se observa que la administración de prolactina aumenta la expresión hipotalámica de SOCS (Steyn *et al.* 2008). Debido a que las proteínas SOCS inhiben la señalización de leptina (Krebs & Hilton 2001) y la población de neuronas que expresan el *LepR* también responden a la prolactina (Nagaishi *et al.* 2014), niveles altos de prolactina pueden disminuir la sensibilidad a la leptina. Por otro lado, la inyección intracerebroventricular de prolactina bloquea los efectos anorexigénicos inducidos por un tratamiento agudo con leptina (Augustine & Grattan 2008; Trujillo *et al.* 2011). Además, la inactivación de SOCS3 en las células que expresan *LepR* aumenta la sensibilidad a la leptina y reduce la ingesta de alimentos y el aumento de peso observados durante el embarazo y la lactancia (Zampieri *et al.* 2015)

En línea con este rol propuesto para la prolactina sobre la ingesta, estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la delección selectiva de los RD2s en lactotrofos hipofisarios produce hiperprolactinemia crónica, aumento del peso corporal y de la adiposidad en hembras lacDrd2KO (Perez-Millan *et al.* 2014). En concordancia, se postula que la prolactina tiene un rol fundamental en la ingesta de alimentos durante al preñez y lactancia, el peso corporal y la masa de tejido adiposo es menor en ratones *knockout* para el *Prlr* (Freemark *et al.* 2001).

### *Binge-eating*

Existen, al menos, dos circuitos neuronales complementarios que regulan la ingesta: un circuito relacionado a los aspectos homeostáticos, dependiente del estado energético del organismo, que impulsa la ingesta de alimentos cuando las reservas energéticas están agotadas; y otro que regula aspectos hedónicos, impulsando la ingesta en función de la recompensa que generan, incluso cuando la incorporación de calorías resulta innecesaria (Berthoud 2012). Es importante destacar que los



circuitos cerebrales homeostáticos y hedónicos que regulan la ingesta de alimentos son sensibles a señales periféricas, entre ellas, prolactina, insulina, leptina y grelina (Schwartz & Zeltser 2013).

Los circuitos neuronales asociados a los aspectos homeostáticos de la ingesta, están ubicados principalmente en el ARC y el tallo cerebral. El ARC está formado por poblaciones neuronales orexigénicas (neuronas NPY/AgRP) y anorexigénicas (neuronas POMC/CART), que integran señales periféricas que indican el estado energético del organismo, tales como, grelina, leptina, insulina, el péptido YY, CCK, y otras derivadas del sistema para mantener la homeostasis energética (Sohn *et al.* 2013). La regulación homeostática de la conducta alimentaria controla la frecuencia y el tamaño de la comida y media la hiperfagia inducida por la restricción de alimentos. Se observa que la restricción de la dieta aumenta y disminuye la expresión génica de genes orexigénicos y anorexigénicos, respectivamente (Schwartz *et al.* 2000).

Los circuitos hedónicos de la ingesta, en cambio, están asociados con el componente emocional y motivacional de la recompensa. Estos circuitos incluyen principalmente los núcleos pertenecientes a la vía mesolímbica (Fulton *et al.* 2011; Fernandes *et al.* 2013), uno de los principales circuitos dopaminérgicos cerebrales. Al igual que los circuitos homeostáticos son también regulados por señales periféricas, y al ser activados aumentan la ingesta y la preferencia por alimentos con elevado contenido calórico, como las grasas y los azúcares, independientemente del balance energético del organismo (Zheng & Berthoud 2008).

El control de la ingesta de alimento puede sufrir alteraciones que derivan en diversas situaciones patológicas. Una de ellas es el llamado atracón alimentario (*binge eating*), que se observa con alta frecuencia y se define como un evento de hiperfagia en el que se consume una gran cantidad de alimento en un período corto de tiempo y con la sensación de una pérdida de control de lo que se está consumiendo. Este tipo de comportamiento se observa en una gran variedad de trastornos alimentarios humanos, entre ellos, la bulimia nerviosa, en personas con sobrepeso, y también en poblaciones no clínicas en circunstancias específicas como el estrés (Perello *et al.* 2014).

## **PROLACTINA Y TEJIDO ADIPOSO**

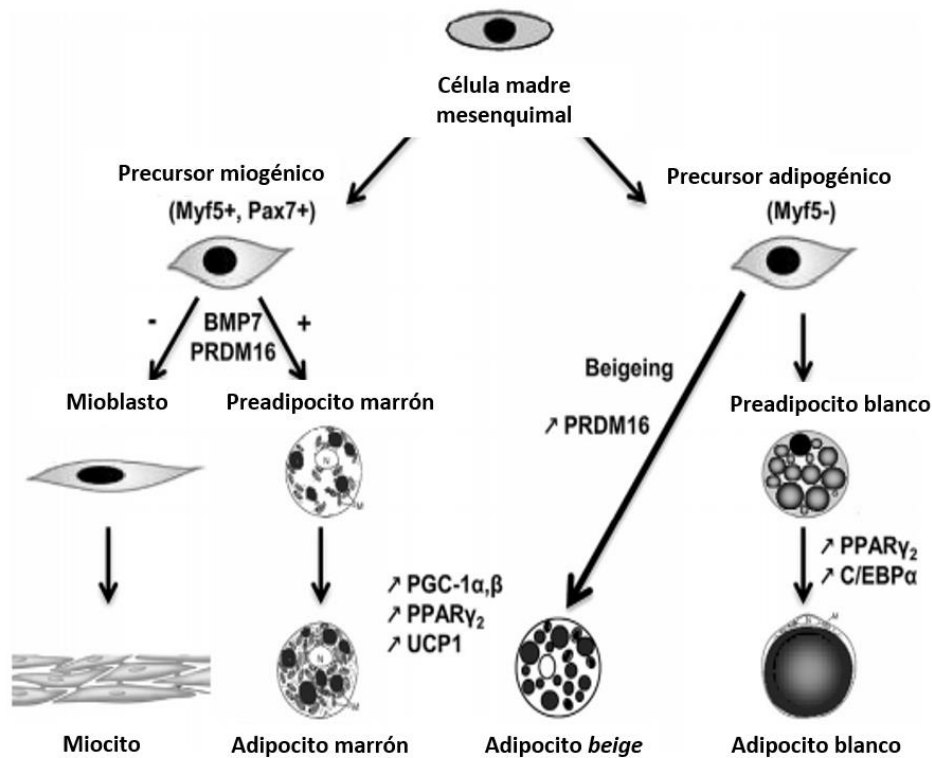
El tejido adiposo es actualmente definido como un órgano endocrino dinámico, que se encuentra ampliamente distribuido en el organismo. Se ha propuesto que juega un rol central en el diálogo entre el estado nutricional y el balance energético, y la desregulación de su actividad está

implicada en el desarrollo de patologías tales como diabetes y obesidad. Está comprendido principalmente por dos tipos de tejidos, el tejido adiposo blanco y el adiposo marrón.

El tejido adiposo blanco resulta el reservorio energético principal en mamíferos (Trayhurn & Bing 2006) En períodos de abundancia calórica, el tejido adiposo blanco acumula ácidos grasos libres en forma de triglicéridos, a través de su esterificación a glicerol, y los libera a circulación en momentos de déficit energético (Galic *et al.* 2010). Los triglicéridos, el componente celular principal del tejido adiposo blanco, son almacenados en una única gota lipídica que ocupa entre el 80-90% del volumen total del adipocito. Durante muchos años el tejido adiposo blanco fue considerado como un simple reservorio de energía, sin embargo, actualmente, es identificado como un órgano endócrino que expresa receptores asociados al control del balance energético y produce numerosas adipoquinas, hormonas y péptidos asociados a la regulación del apetito. Entre ellos se encuentran adiponectina, resistina, leptina, interleuquina-6, los cuales actúan como reguladores del metabolismo lipídico de manera autocrina, parácrina o endócrina (Galic *et al.* 2010) (Breton 2013).

Por otra parte, el tejido adiposo marrón es un órgano termogénico que está compuesto de adipocitos que contienen una gran cantidad de mitocondrias capaces de oxidar energía química (lípidos y glucosa) para producir calor. Este fenómeno que se activa en ambientes fríos y permite proteger contra la hipotermia, depende exclusivamente de la presencia de la proteína desacoplante de mitocondrias UCP1 (Townsend & Tseng 2014)

Se han identificado dos tipos de adipocitos marrones, los adipocitos marrones clásicos, que son los que residen en la región interescapular en roedores, que se originan a partir de progenitores mesenquimáticos *Myf5* positivos (Carre & Binart 2014) y los adipocitos *beige* distribuidos discretamente en depósitos de tejido adiposo blanco (Wu *et al.* 2012). Estas células presentan características de adipocitos marrones (abundantes mitocondrias, pequeñas gotas de lípidos en citoplasma y capacidad termogénica), pero comparten progenitor con los adipocitos blancos (*Myf5* negativos) (Seale *et al.* 2008). Este proceso por el cual adipocitos blancos adoptan el fenotipo y funcionalidad del tejido adiposo marrón se conoce como *beiging*. Las células *beige* se caracterizan por metabolizar los triglicéridos almacenados como reservorio energético para liberar energía en forma de calor (Figura 17).



**Figura 17.** Origen y expresión génica en distintas poblaciones de adipocitos. Adipocitos blancos, marrones y beige tienen un precursor común (célula madre mesenquimal) pero diferentes progenitores. Los adipocitos marrones derivan de un progenitor que expresa Myf5 y Pax7 mientras que los adipocitos blancos y beige derivan de un progenitor negativo para la expresión de Myf5. Tanto los adipocitos marrones como los beige se caracterizan por expresar Prdm16 y Ucp1. Tomado y modificado de (Carre & Binart 2014)

Si bien durante mucho tiempo se consideró que el tejido adiposo marrón podía encontrarse únicamente en la región interescapular de algunos mamíferos, como los roedores, o en bebés recién nacidos, evidencia reciente demuestra que ciertos estímulos tales como el estrés, exposición a frío o dieta rica en grasa, conducen a la aparición de células *beige* en depósitos de tejido adiposo blanco (Wu *et al.* 2012) (Beranger *et al.* 2013) (Carey *et al.* 2014) (Sidossis & Kajimura 2015). De manera importante, se ha demostrado que dicho fenómeno promueve el metabolismo de los triglicéridos almacenados como reservorio energético ya que los adipocitos *beige* utilizan lípidos como sustratos para la termogénesis, a expensas de una reducción de los depósitos de grasa blanca (Cannon & Nedergaard 2004). Bartelt *et al.* demostró que la exposición al frío acelera drásticamente la reducción de triglicéridos plasmáticos como resultado de la incorporación de triglicéridos por parte del tejido

adiposo pardo de los ratones, y que en entornos patofisiológicos, la exposición al frío corrige la hiperlipidemia y mejora sensibilidad a insulina (Bartelt *et al.* 2011). En este contexto, se proponen nuevas terapias para la obesidad que tienen como blanco la conversión o activación del tejido adiposo pardo (Wu *et al.* 2014; Liu *et al.* 2019).

Se ha documentado la presencia de ARNm de *Prlr* en los depósitos de tejido adiposo adulto de muchas especies proponiendo un papel regulador de prolactina en dicho tejido (Wittmann *et al.* 2002; Ling *et al.* 2003). Se demostró que los niveles de *Prlr* varían dependiendo del estado fisiológico. Por ejemplo, el nivel de expresión de *Prlr* aumenta durante la lactancia en el tejido adiposo de ratón (Ling *et al.* 2000) y durante la diferenciación de adipocitos (Brandebourg *et al.* 2007b). Este incremento podría deberse a un efecto directo de prolactina dado que se demostró que la prolactina es capaz de inducir la expresión de su propio receptor (Brandebourg *et al.* 2007a).

En el tejido adiposo, la prolactina es esencial en la adipogénesis y la diferenciación de adipocitos (Grattan 2015; Fleenor *et al.* 2006), así como en la regulación del metabolismo lipídico. La adipogénesis requiere de la activación secuencial de genes involucrados en la diferenciación de adipocitos. La proteína de unión al enhancer CCAAT beta (C/EBPb) y el receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR $\gamma$ ) son dos factores de transcripción que cumplen un rol importante en la diferenciación de adipocitos, siendo el primero importante para la primera etapa y el segundo en etapas más tardías. Nanbu-Wakao *et al.* demostró que la prolactina potencia la expresión de C/EBPb y PPAR $\gamma$  estimulando la diferenciación a adipocitos de células madre mesenquimales multipotentes NIH-3T3 (Nanbu-Wakao *et al.* 2000). Estudios *in vivo* demostraron que la ausencia de PRLR en ratones induce cambios en los depósitos de tejido adiposo y una reducción pequeña, aunque progresiva, en el peso corporal desde la semana 16. Las hembras se ven más afectadas que los machos, y los depósitos de tejido adiposo blanco visceral son los más afectados por menor cantidad de adipocitos (Flint *et al.* 2006). También se demostró que la activación de la isoforma larga del PRLR induce hipertrofia de los depósitos de tejido adiposo visceral lo que deriva en un fenotipo obeso (Le *et al.* 2011).

Por otro lado, se ha demostrado que la prolactina también cumple un rol importante en la diferenciación del tejido adiposo marrón. Ratones *knockout* para el *Prlr* exhiben depósitos tejido adiposo marrón de menor tamaño y los pre-adipocitos derivados de dicho tejido no son capaces de diferenciarse a adipocitos maduros. Sorprendentemente, este fenotipo puede ser revertido por la expresión ectópica del receptor (Viengchareun *et al.* 2008).

También se ha descrito que la prolactina, tiene un impacto crucial sobre el balance energético actuando sobre el tejido adiposo *beige*. Estudios recientes muestran que la prolactina podría modular el *beiging* dado que ratones *knockout* para *Prlr* son resistentes a la obesidad inducida por una dieta alta en grasas debido a un mayor gasto energético y una mayor tasa metabólica. Este fenotipo se acompaña de depósitos de grasa subcutánea reducidos pero con emergencia de focos de adipocitos *beige* que expresan *Ucp1* (Auffret *et al.* 2012). Estos resultados proponen un nuevo rol de la prolactina en adipogénesis, dado que además del rol propuesto de promover la diferenciación de adipocitos, demuestran que la ausencia de estimulación con prolactina induce la aparición de focos de *beiging*.

Por otro lado, se ha descrito una posible acción autocrina de la prolactina. Como se mencionó previamente, la prolactina no es únicamente producida por la hipófisis, sino que también puede ser secretada por otros tejidos tales como el tejido adiposo (Carre & Binart 2014). Se ha demostrado que la cantidad de prolactina liberada por el tejido adiposo depende de la localización del tejido y el índice de masa corporal. De esta forma, explantes de depósitos de tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos liberan más prolactina que los depósitos de tejido adiposo visceral y además se observa que la cantidad de prolactina liberada por el tejido adiposo es menor que la observada para pacientes delgados (Hugo *et al.* 2008).

Todas las funciones metabólicas de la prolactina sobre los depósitos de tejido adiposo hasta aquí mencionadas, son adaptativas en el embarazo y la lactancia, períodos fisiológicos durante los cuales la prolactina promueve el depósito o la movilización de grasas, respectivamente, para abastecer los requerimientos energéticos del feto en crecimiento y un aumento del reservorio de grasa corporal que será utilizado durante la lactancia. Como mencionáramos, la prolactina desempeña un papel clave en el aumento de la ingesta de alimentos y la adiposidad durante el embarazo (Bernard *et al.* 2019; Woodside 2007) (Ben Jonathan *et al.* 2006). Evidencia experimental de nuestro laboratorio, muestra que ratones transgénicos con hiperprolactinemia crónica tienen un aumento marcado de la ingesta de alimentos y de deposición de tejido adiposo (Perez-Millan *et al.* 2014). En la clínica, cuando el aumento en los niveles de prolactina no es fisiológico, como se observa en individuos con hiperprolactinemia farmacológica o tumoral, los pacientes son propensos a mostrar un excesivo aumento de peso, que en muchos casos es revertido cuando se normalizan los niveles de prolactina sérica por tratamiento con agonistas dopaminérgicos (Lopez-Vicchi *et al.* 2016). Más aun, estudios recientes en humanos, revelaron una asociación genética entre la prolactina y la obesidad, sugiriendo que ciertas anomalías en la señalización de la prolactina pueden contribuir al sobrepeso (Nilsson *et al.* 2011; Meyre *et al.* 2009).

## PROLACTINA E HÍGADO

Dos de las principales funciones metabólicas del hígado son el metabolismo de carbohidratos y el metabolismo de lípidos.

El hígado es el principal tejido regulador del balance de glucosa. En momentos de hiperglucemia, la glucosa es almacenada en el hígado como glucógeno; mientras que, en estados de hipoglucemia, el glucógeno hepático es degradado, promoviendo la secreción de glucosa. El hígado es además el principal sitio de gluconeogénesis, ruta metabólica anabólica que permite la biosíntesis de glucosa a partir de aminoácidos, lípidos u otros carbohidratos. La lipogénesis hepática se encuentra íntimamente relacionada con el metabolismo de la glucosa ya que el hígado es capaz de convertir el exceso de carbohidratos en reservas lipídicas (Iizuka *et al.* 2004).

El hígado es la principal fuente de producción interna de triglicéridos en el organismo. Los hepatocitos son capaces de sintetizar lipoproteínas enriquecidas en triglicéridos denominadas VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*). Existen dos *pools* de triglicéridos en el hígado, los triglicéridos intracelulares del hepatocito y el VLDL que eventualmente será liberado a circulación sistémica (Coleman & Lee 2004). Por otra parte, los triglicéridos pueden incorporarse a través de una fuente externa, la dieta. Tras la ingesta de alimentos que contienen grasa, los triglicéridos son convertidos en NEFAs y dos moléculas de monoacilglicerol en el lumen del intestino. Una vez incorporados por el enterocito, los triglicéridos son sintetizados nuevamente y liberados a torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas que reciben el nombre de quilomicrones. Finalmente, los triglicéridos provenientes de ambas fuentes, interna y externa, circulan por la sangre en forma de lipoproteínas y abastecen de ácidos grasos al corazón, músculo esquelético y el tejido adiposo para generación de energía y almacenamiento.

Dislipidemia es una elevada concentración de lípidos, triglicéridos (hipertrigliceridemia) o colesterol (hipercolesterolemia) en sangre, que puede ser causada por obesidad. En este contexto, el tejido adiposo se vuelve resistente a insulina, por lo que presenta una elevada degradación de triglicéridos o lipólisis (Schenk *et al.* 2008). Por otro lado, el incremento de la llegada de ácidos grasos por vía portal al hígado, favorece la lipogénesis en el órgano, que provoca un aumento de la concentración de triglicéridos hepáticos, evidenciado como una mayor densidad de gotas lipídicas en los hepatocitos (esteatosis hepática) y, por otro lado, provoca el aumento de la síntesis de VLDL, que, al pasar a la sangre en grandes cantidades, eleva los niveles de triglicéridos séricos (Raúl Orlando Calderín Bouza *et al.* 2009)

Evidencia previa ha demostrado elevados niveles de expresión de *Prlr* en hígado, en especial, de las isoformas PRLR-L y PRLR-S3 (Corbacho *et al.* 2004) sugiriendo que la prolactina participa de la regulación del metabolismo hepático. Durante la vida adulta, la prolactina estimula el crecimiento y la regeneración del hígado promoviendo la proliferación de adipocitos y la angiogénesis (Moreno-Carranza *et al.* 2018) lo que le otorga un rol protector contra la esteatosis hepática y el hepatocarcinoma (Moreno-Carranza *et al.* 2018). Por el contrario, se sugiere que la disminución en los niveles de expresión de *Prlr* en el hígado estaría involucrada en la aparición de esteatosis hepática y en la ocurrencia de NAFLD en pacientes obesos (Shao *et al.* 2018). Como sucede con muchas de las acciones metabólicas de la prolactina, su función en el hígado es principalmente moduladora, y no una regulación maestra de los procesos hepáticos, y su acción protectora podría verse alterada en un contexto de hiperprolactinemia patológica (Luque *et al.* 2016).

## PROLACTINA Y PÁNCREAS

El páncreas es una glándula mixta formada por una porción exócrina, de función digestiva, caracterizada por la presencia de acinos pancreáticos, y una porción endócrina, constituida por islotes de Langerhans, con funciones metabólicas. Ésta última sintetiza y libera las principales hormonas involucradas en la homeostasis de la glucosa: insulina y glucagon. La insulina es sintetizada por células beta ( $\beta$ ) del páncreas y su función es la de facilitar el almacenamiento de sustratos e inhibir su liberación, disminuyendo así las concentraciones plasmáticas principalmente de glucosa, pero también de ácidos grasos libres, cetoácidos y aminoácidos. Los principales blancos de acción de la insulina son el hígado, el músculo y el tejido adiposo (Berne & Levy 1993). Por otro lado, el glucagón es una hormona polipeptídica sintetizada por las células alfa ( $\alpha$ ) de los islotes pancreáticos cuya función principal es estimular la generación de glucosa en el hígado, su principal órgano blanco.

La prolactina actúa sobre el páncreas a distintos niveles y sus efectos dependen de su concentración sérica y del estado fisiológico del organismo. La prolactina puede actuar sobre el páncreas gracias a la presencia de su receptor desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario.

### *Prolactina y diferenciación de islotes pancreáticos*

La evidencia demuestra que los efectos de la prolactina sobre la fisiología del páncreas cambian a lo largo del desarrollo y esto se explica por qué el PRLR se expresa primeramente en células del acino pancreático y ductos pancreáticos y luego aparece en células endócrinas que sintetizan insulina y

glucagon durante los períodos peri y post-natal (Freemark *et al.* 1997). En particular, la prolactina es esencial para la ontogénesis de células madre pancreáticas que permiten generar una reserva de células  $\beta$  (Bernard *et al.* 2019). Alteraciones en este proceso pueden conducir a futuras respuestas inadecuadas a estrés metabólico, tales como obesidad (LaPensee *et al.* 2006). Recientemente se ha demostrado la importancia del PRLR en el desarrollo de los islotes *in vivo* (Auffret *et al.* 2013; Bernard *et al.* 2019).

### ***Prolactina y expansión de islotes pancreáticos***

Existe una gran cantidad de evidencia en favor del rol clave que tiene el PRLR sobre la fisiología de las células del islote pancreático y sobre el metabolismo de la glucosa (Ouhtit *et al.* 1994). Durante la preñez, ratones *wild type* o salvajes exhiben una alta tasa de proliferación de células  $\beta$ . Por el contrario, la eliminación heterocigótica de *Prlr*, así como la eliminación condicional de *Prlr* específicamente de células  $\beta$ , evocan características distintivas de la diabetes gestacional, relacionadas con una expansión atenuada de células  $\beta$  y un menor contenido de insulina pancreática, lo que resulta en intolerancia a la glucosa (Huang *et al.* 2009; Freemark *et al.* 2002). Esto podría ser explicado por evidencia que muestra que la prolactina actúa sobre las células  $\beta$  pancreáticas favoreciendo su replicación y estimulando la síntesis y secreción de insulina (Vasavada *et al.* 2006; Freemark *et al.* 2002).

Otras acciones positivas de la prolactina sobre la fisiología del páncreas se han descrito en modelos animales, particularmente en ratas, en los que la administración de prolactina produce un descenso en el umbral de respuesta de la insulina a glucosa; y por ende, aumenta la secreción de insulina y el acoplamiento entre células beta. Asimismo, la prolactina estimula la liberación de insulina en islotes pancreáticos aislados (Matsuda *et al.* 1996).

### ***Hiperprolactinemia y metabolismo de la glucosa***

Estudios realizados en modelos animales hiperprolactinémicos, y validados por estudios *in vitro* (Park *et al.* 2011) demostraron que niveles de prolactina séricos crónicamente elevados, pueden alterar el mecanismo de señalización de la glucosa en el páncreas e impedir una liberación adecuada de insulina, lo que conduce a una intolerancia a la glucosa (Schuldiner 1994). En forma concordante en pacientes con hiperprolactinemia patológica, producto de la presencia de un prolactinoma, se observa que la prolactina es capaz de actuar sobre islotes pancreáticos humanos, regular la secreción de insulina y, además, modificar la sensibilidad periférica a la misma. Estos individuos tienen una mayor secreción de insulina estimulada por glucosa y una curva de tolerancia a la glucosa ligeramente



alterada, similar a la que se observa durante la preñez (Auriemma *et al.* 2019). Por otro lado, similar a lo que sucede durante el embarazo, se observa que la intolerancia a la glucosa está ligada a la resistencia periférica a insulina, y no a fallas en la funcionalidad de los islotes como se observa en los modelos murinos. Estos estudios clínicos revelan que la prolactina produce efectos diabetogénicos, y que en pacientes con prolactinomas la hiperprolactinemia está asociada a hiperinsulinemia y resistencia periférica a insulina (Serri *et al.* 2006; Yavuz *et al.* 2003; Gustafson *et al.* 1980). Sorprendentemente, en muchos casos los pacientes tratados con bromocriptina, un antagonista de la secreción de prolactina, muestran una normalización de los niveles de prolactina séricos, acompañada de una disminución del peso (Naliato *et al.* 2007) y de mejoras en la tolerancia a glucosa y en la sensibilidad a insulina (Gustafson *et al.* 1980). Es importante destacar que, si bien los niveles de prolactina en pacientes hiperprolactinémicos resultan elevados, son similares a los observados en la última etapa del embarazo.

En conclusión, niveles adecuados de prolactina son beneficiosos para la homeostasis de la glucosa con efectos sobre la expansión de células  $\beta$  pancreáticas, mejorando tanto la liberación de insulina inducida por glucosa, y como la sensibilidad periférica a insulina. Sin embargo, niveles patológicos de prolactina pueden alterar la tolerancia a la glucosa, modificar la señalización de glucosa en páncreas, e inducir resistencia a la insulina.

## OBJETIVOS

La dopamina inhibe la alta actividad espontánea intrínseca de secreción de prolactina de los lactotropos vía RD2. Previamente desarrollamos el ratón lacDrd2KO, modelo de hiperprolactinemia crónica con RD2 centrales conservados. La caracterización de nuestra cohorte de hembras lacDrd2KO y control  $Drd2^{LoxP / LoxP}$  de 5 y 10 meses de edad será fundamental para los objetivos de los capítulos posteriores, en los que se determinará el efecto de la hiperprolactinemia sobre el control del balance energético.

Los objetivos específicos del presente capítulo fueron:

- Validar y caracterizar el modelo de ratones lacDrd2KO analizando el entorno hormonal. Medir los niveles de prolactina y GH séricos en ratones hembra lacDrd2KO y  $Drd2^{LoxP / LoxP}$
- 
- Evaluar la acción de prolactina sobre la hipófisis y glándula mamaria. Caracterizar la anatomía de ambos órganos utilizando técnicas histológicas clásicas en hembras de ambos genotipos
- 
- Estudiar el impacto de la ausencia de RD2s en lactotropos sobre el peso corporal y los niveles de ingesta a hembras lacDrd2KO y  $Drd2^{LoxP / LoxP}$  a los 5 y 10 meses de edad.
- 
- Evaluar la concentración sistémica de leptina, hormona involucrada en la regulación de la ingesta y el peso corporal en hembras de 5 y 10 meses de edad de ambos genotipos en condición *ad libitum*. Estudiar la posible participación de la hiperprolactinemia en el comportamiento de atracón o *binge-eating*
- 
- Determinar el peso de tejidos con alto contenido lipídico (tejido adiposo gonadal, subcutáneo, mesentérico, pardo e hígado) en ratones hembra de ambos genotipos, a los 5 y 10 meses de edad. Medir los niveles de triglicéridos séricos como aproximación a la caracterización del perfil lipídico de ratones hembra  $Drd2^{loxP/loxP}$  y lacDrd2KO
- 
- Estudiar el impacto de la hiperprolactinemia, sobre la regulación del metabolismo de la glucosa. Analizar el peso y la histopatología del páncreas de ratones hembras de ambos genotipos Determinar los niveles de insulina y glucosa séricos en condiciones de ayuno. Realizar un GTT en ratones hembra  $Drd2^{loxP/loxP}$  y lacDrd2KO para evaluar los mecanismos de control homeostáticos de la glucemia en respuesta a una sobrecarga de glucosa.

## RESULTADOS

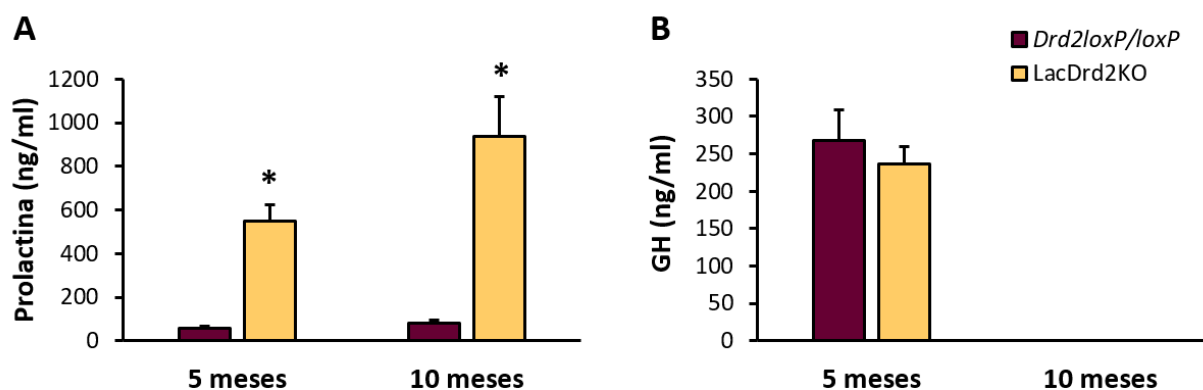
Caracterización de un modelo de hiperprolactinemia crónica: el ratón lacDrd2KO.

### PERFIL HORMONAL

Se midieron los niveles de prolactina séricos en ratones lacDrd2KO y  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  a los 5 y 10 meses de edad. Y los niveles de GH a los 5 meses.

Los ratones hembra lacDrd2KO presentaron niveles basales de prolactina superiores a los de las hembras controles  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  a los 5 y a los 10 meses de edad (Figura 18 A).

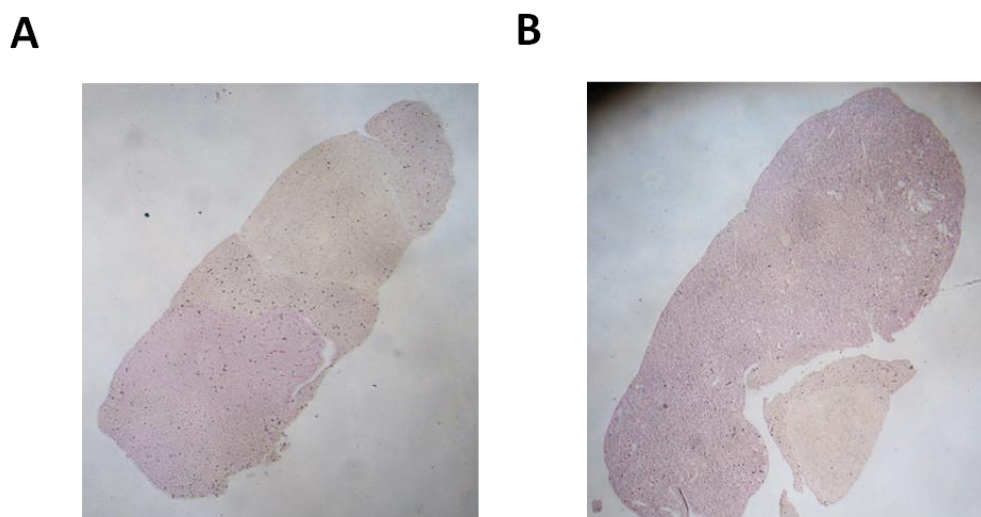
Por otra parte, no observamos diferencias significativas entre genotipos en los niveles séricos de GH a los 5 meses de edad (Figura 18 B). Resultados publicados anteriormente por nuestro laboratorio, demostraron que a los 10 meses no existían diferencias significativas entre ratones lacDrd2KO y  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  en la talla corporal, longitud del fémur, concentración de GH hipofisaria, porcentaje de somatotropos, niveles séricos y de ARNm hepático de *Igf-I*. En su conjunto estos resultados demostraron que los ratones hembra lacDrd2KO presentan un eje de crecimiento conservado (Noain *et al.* 2013a).



**Figura 18:** Niveles hormonales de prolactina (A) y de GH (B) en hembras  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  y lacDrd2KO de 5 y 10 meses de edad, Para prolactina N = 30,30,35y 26 (ratones  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  y lacDrd2KO de 5 y 10 meses de edad, respectivamente), Para GH N=6 y 8 (ratones  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  y lacDrd2KO de 5 meses de edad, respectivamente); a los 10 meses resultados previos del laboratorio demostraron un eje GH-IGF conservado [3329]. Anova en dos sentidos, p interacción NS; \* p 0.05 ≤ vs. ratones  $Drd2^{LoxP/LoxP}$ , de la misma edad.

## HIPERPLASIA HIPOFISARIA

Se evaluó la anatomía de la glándula hipofisaria utilizando la técnica clásica histológica de hematoxilina-eosina. Se visualizó hiperplasia de la adenohipófisis en cortes de hipófisis de hembras lacDrd2KO de 10 meses de edad (Figura 19).

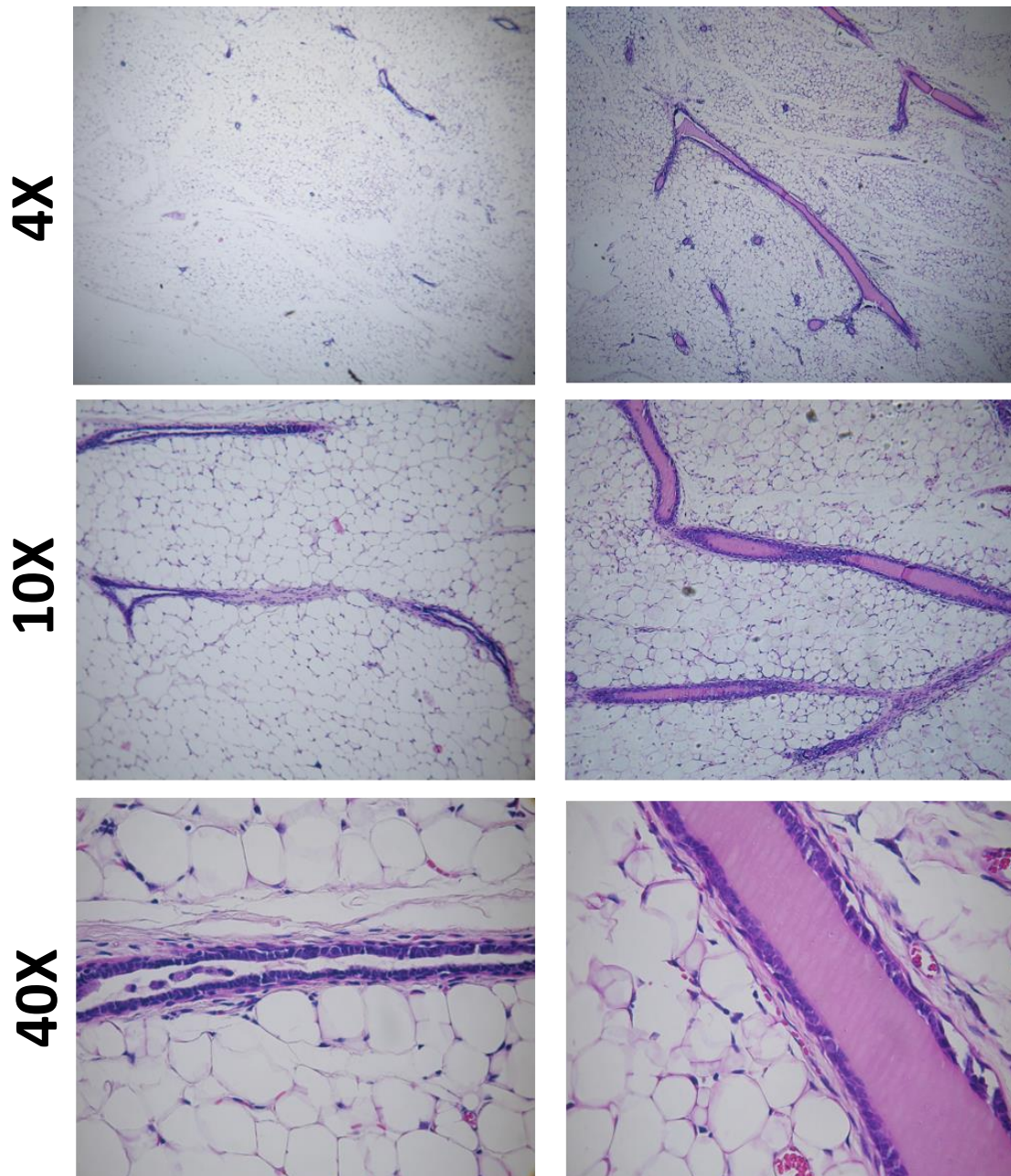


**Figura 19.** Detalle histológico de adenoma hipofisario. Hematoxilina-eosina representativa de hipófisis provenientes de A) hembras *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y B) *lacDrd2KO* de 10 meses de edad, donde se visualiza la hiperplasia de la adenohipófisis en los ratones *lacDrd2KO*. Imágenes representativas obtenidas por microscopía óptica utilizando un objetivo de aumento 4X.

## GLÁNDULA MAMARIA

Dado el rol descrito para la prolactina sobre la morfogénesis y lactogénesis en glándula mamaria, se evaluó la morfología de dicho órgano en nuestro modelo de hiperprolactinemia que presupone una estimulación crónica del tejido mamario. Para ello, se realizó un estudio histológico de cortes de mama de hembras *lacDrd2KO* y *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* de 10 meses de edad.

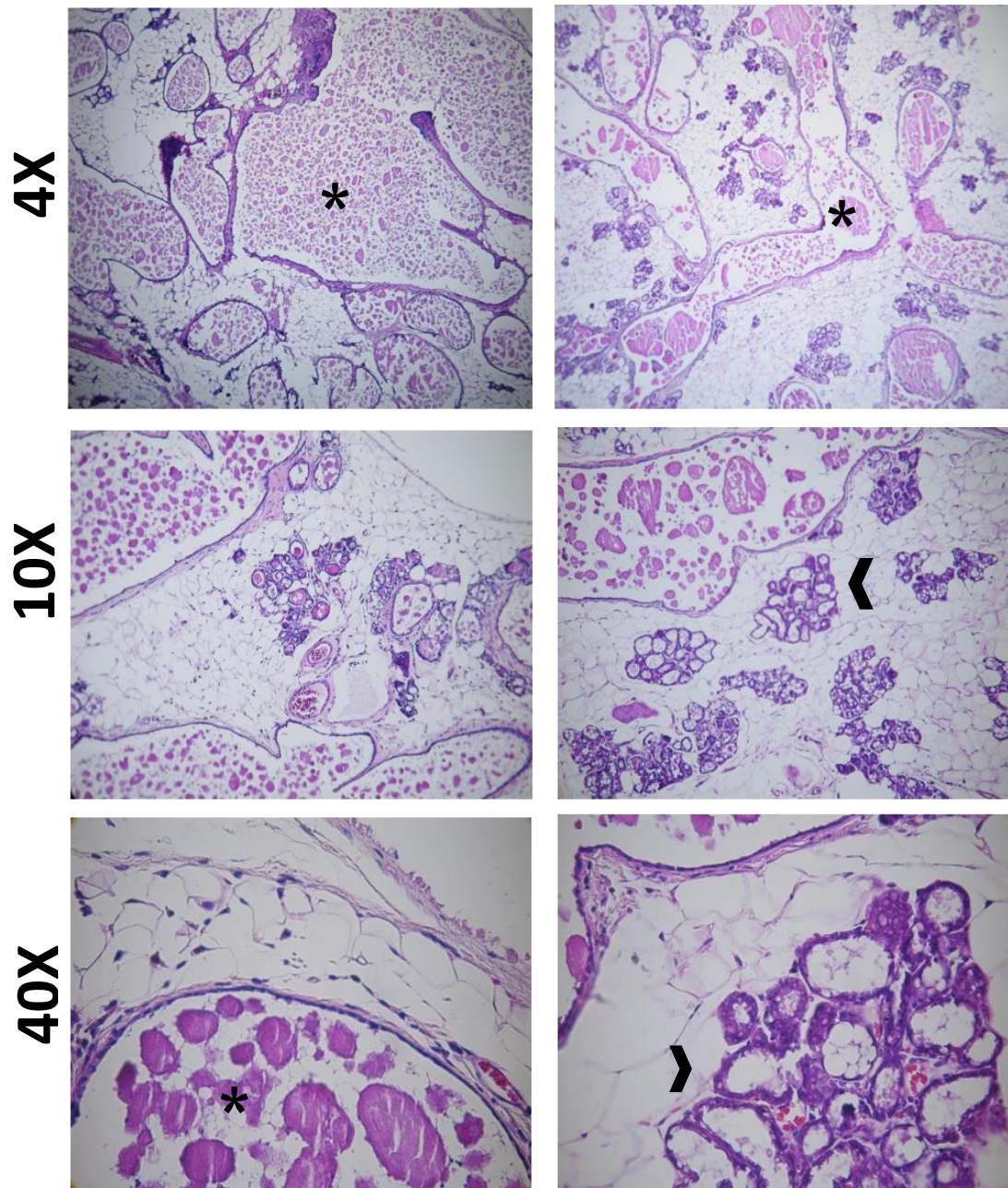
Las hembras control mostraron una glándula mamaria adulta en reposo, observándose pocos ductos de luz pequeña y epitelio cúbico simple rodeados por un estroma de abundantes células adiposas (Figura 20).



**Figura 20.** Imágenes obtenidas por microscopía óptica a distintos aumentos de cortes de mama de hembras control  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  de 10 meses de edad (Técnica: hematoxilina-eosina). Cada par de fotos se encuentra acompañada del respectivo aumento del objetivo utilizado para tomarla.

Por otra parte, consistente con la hiperprolactinemia crónica las hembras  $lacDrd2KO$  mostraron una **mama proliferativa símil lactante** (Figura 21). La hiperplasia lobulillar, o proliferación de lobulillos, observada evidenció la acción de la prolactina, aunque histológicamente no se trató de una mama lactante posiblemente por ausencia de estimulación con esteroides. Se observó una ectasia ductal intensa, que se define como una afección benigna de la glándula mamaria que ocurre cuando los conductos mamarios se ensanchan y acumulan secreción eosinófila en la luz. Se observaron conductos

mamarios parcialmente quísticos, dada su gran dilatación y el aplastamiento del epitelio. No se observaron cambios neoplásicos.

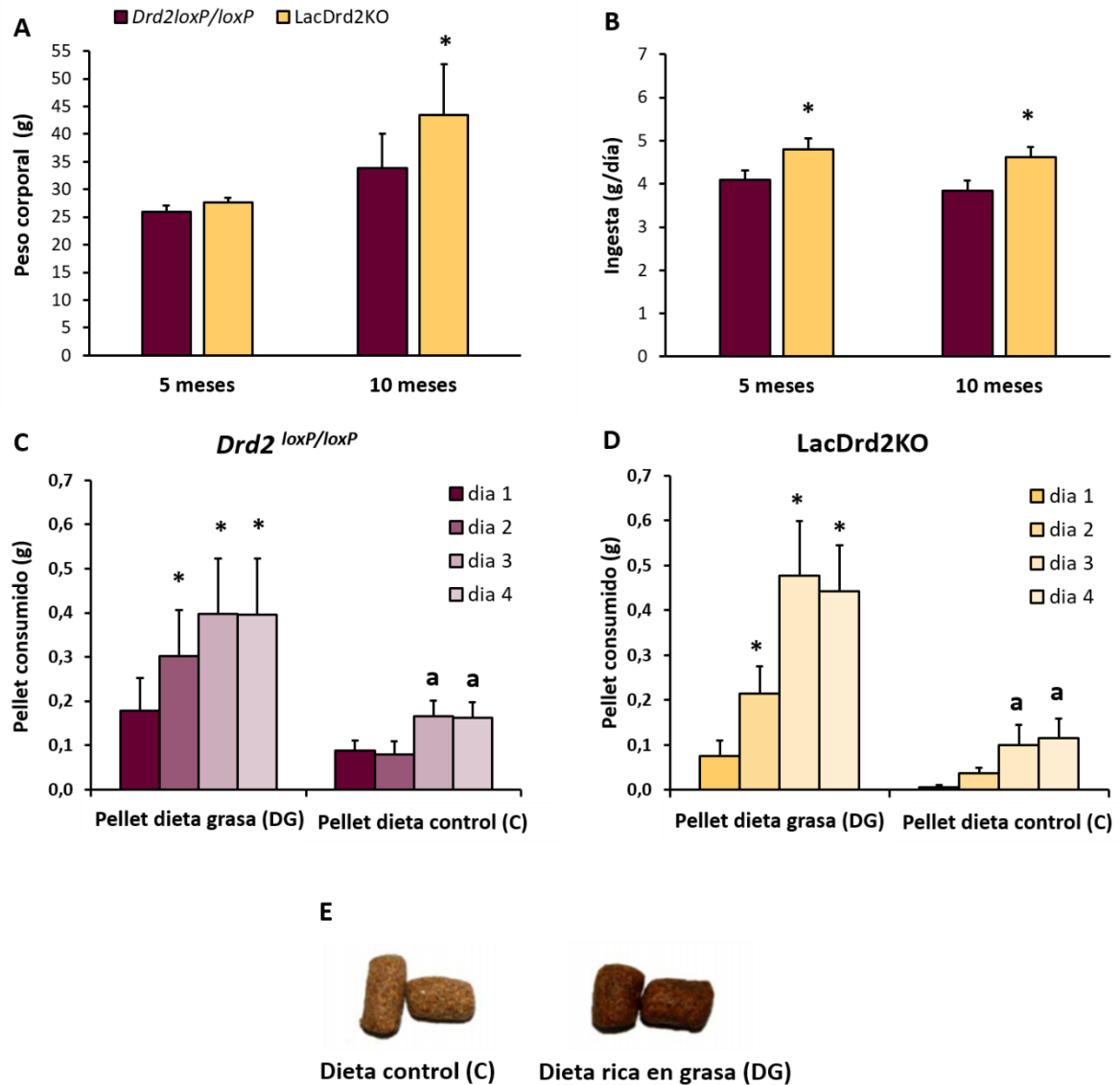


**Figura 21.** Imágenes obtenidas por microscopía óptica a distintos aumentos de cortes de mama de hembras *lacDrd2KO* de 10 meses de edad (Técnica: hematoxilina eosina). Cada par de fotos se encuentra acompañada del respectivo aumento del objetivo utilizado para tomarla. Los asteriscos indican conductos con secreción eosinófila y las flechas, alvéolos secretores.

## COMPORTAMIENTO DE INGESTA Y PESO CORPORAL

Se midieron el peso corporal y los niveles de ingesta en hembras lacDrd2KO y sus pares control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* a los 5 y 10 meses de edad. A los 5 meses de edad, las hembras lacDrd2KO mostraron niveles de ingesta significativamente aumentados (Figura 22 B), pero esto no se tradujo en un aumento en el peso corporal (Figura 22 A). Por otro lado, a los 10 meses de edad, tanto los niveles de ingesta como el peso corporal, fueron significativamente mayores en hembras lacDrd2KO en comparación con su contraparte control. Descartamos que el incremento en el peso corporal se debiera a una alteración en el eje de GH, dado que, como se detalló anteriormente, éste se encontraba conservado en las hembras hiperprolactinélicas.

Con el objeto de estudiar el comportamiento alimentario de las hembras lacDrd2KO, se utilizó un modelo animal de atracón. El atracón es considerado un síntoma del sobrepeso y la obesidad y el modelo utilizado intenta reproducir la sintomatología de los desórdenes alimentarios en humanos. Para ello, hembras *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y lacDrd2KO de 10 meses de edad alimentadas hasta el momento del experimento con alimento regular *ad-libitum*, permanecieron con ese alimento en sus cajas durante las dos horas que duró el experimento. Se evaluó la ingesta de alimento al ofrecerles, por un tiempo limitado, un pellet de dieta grasa (DG) o un pellet de dieta balanceada regular (C). Al cabo de las 2 horas, se cuantificó la cantidad total del pellet ingerido. Es importante destacar que el color, textura y apariencia de la DG utilizada es similar a la de la C, por lo que se supone que la elección de la dieta consumida es principalmente debido a sus características gustativas y olfativas (Figura 22 E). En el caso de exposición a un pellet graso, se observó el mismo comportamiento de ingesta en ambos genotipos. Hembras alimentadas con dieta regular *ad libitum* y expuestas a un pellet DG durante dos horas, cuatro días consecutivos, comieron cantidades significativamente crecientes de dicho pellet desde el día 2 (Figura 22 C, D). Asimismo, el grupo DG consumió una cantidad de pellet significativamente mayor que el grupo con acceso únicamente a dieta control los días 3 y 4, lo que indica que el acceso al pellet graso induce hiperfagia. Por otra parte, en el grupo expuesto a pellet control, no se evidenciaron variaciones en la cantidad de pellet consumido conforme transcurrieron los días de experimento. El ANOVA de tres factores para medidas repetidas no arrojó diferencias entre genotipos.

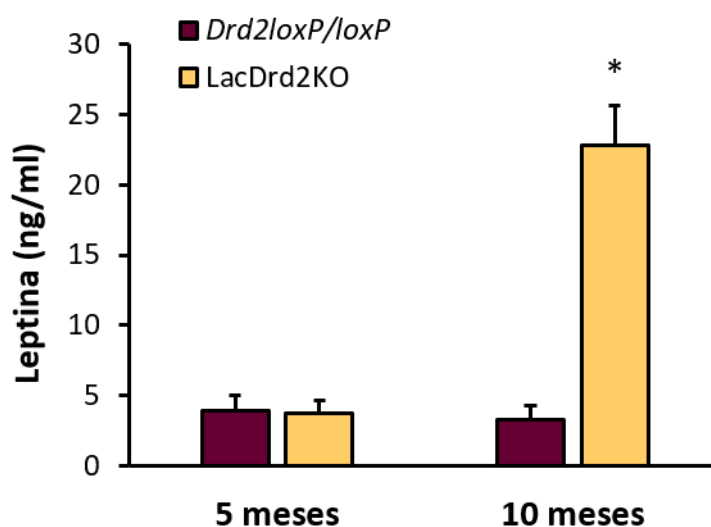


**Figura 22:** A) Peso corporal en gramos B) Ingesta de alimentos en g/día y C-D) Caracterización del comportamiento de atracón o binge eating en hembras *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 10 meses de edad. Para peso corporal  $N = 6, 7, 14$  y  $13$ , para consumo de alimento  $N = 6, 6, 10, 11$  (ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 5 y 10 meses de edad, respectivamente); para binge eating  $N = 6, 7$  para *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>*; y  $8, 6$  para *lacDrd2KO*, pellet DG y pellet C, respectivamente. El comportamiento de atracón se evaluó durante cuatro días consecutivos. Para los paneles A y B  $* p \leq 0.05$  vs. ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>*, de la misma edad, para los paneles C y D se realizó un ANOVA multifactorial para medidas repetidas para los efectos de día, genotipo y dieta;  $* p \leq 0.05$  vs. ratones del mismo genotipo y misma dieta en el día 1;  $^a p \leq 0.05$  vs. ratones del mismo genotipo, y en el mismo día, pero alimentados con DG.



## LEPTINA

Dado el comportamiento hiperfágico evidenciado en hembras lacDrd2KO, decidimos evaluar los niveles séricos de leptina en ambos genotipos. Determinamos que los niveles séricos de leptina en ratones hembra de 5 meses de edad con libre disponibilidad de alimento no diferían entre genotipos, mientras que a los 10 meses los ratones hembra lacDrd2KO presentaban niveles de leptina significativamente mayores que sus pares control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* ( $P < 0.00005$ ) (Figura 23).



**Figura 23.** Niveles de leptina séricos en hembras *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 5 y 10 meses de edad,  $N = 7,7,7,7$  (ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 5 y 10 meses de edad, respectivamente); \*  $p \leq 0.05$  vs. ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>*, de la misma edad

## ANÁLISIS DE LOS DEPÓSITOS DE TEJIDO ADIPOSO

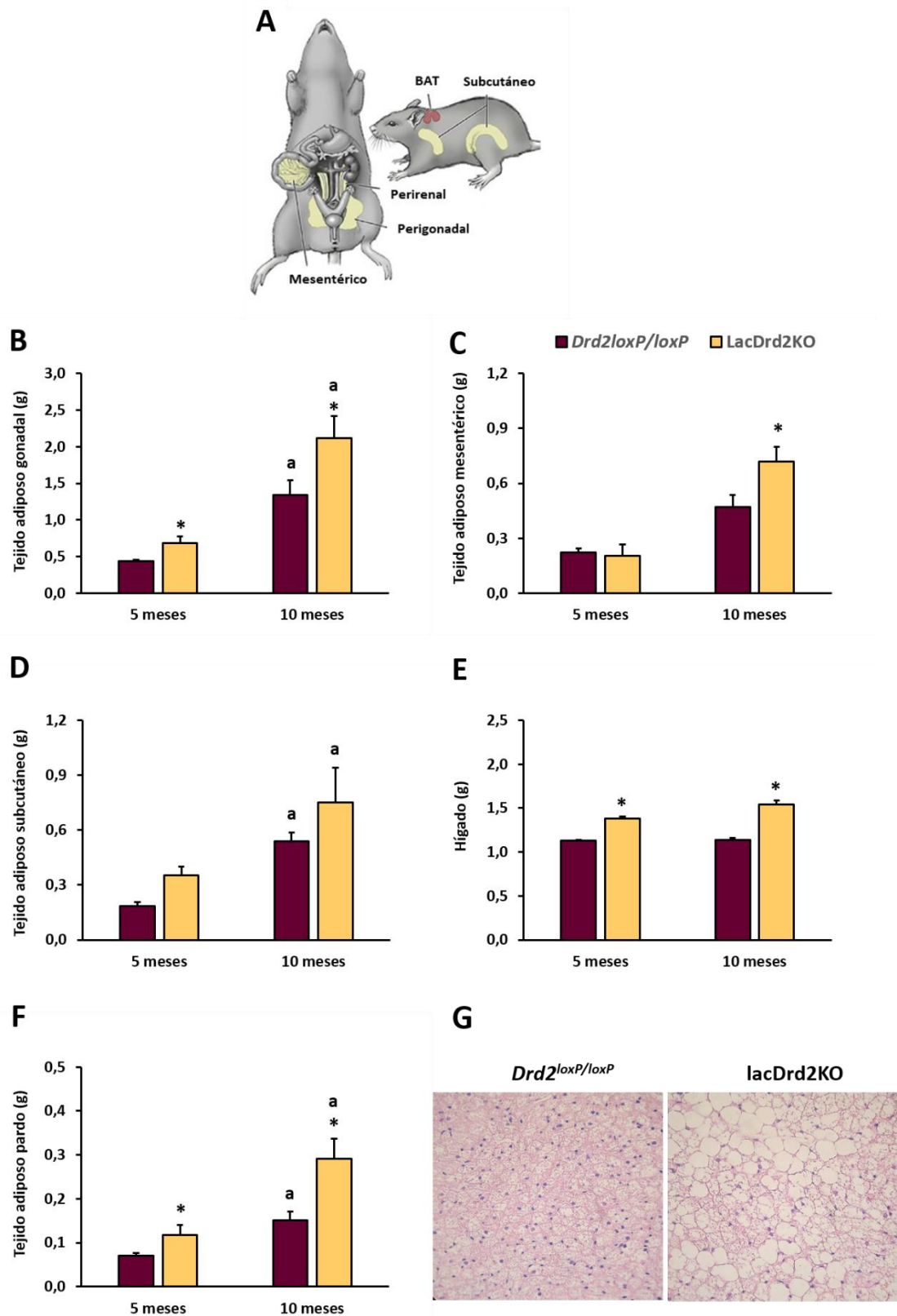
Considerando la obesidad de los ratones transgénicos, evaluamos el peso de tejidos con alto contenido lipídico (depósitos de tejido adiposo e hígado) en ratones hembra de ambos genotipos, a los 5 y 10 meses de edad. Es de destacar que cada depósito de tejido adiposo tiene un rol distinto en el mantenimiento de la homeostasis energética y se localiza en una zona anatómicamente bien definida (Figura 24 A).

Observamos que a los 5 meses de edad los ratones hembra lacDrd2KO presentaron un aumento en el peso del tejido adiposo gonadal ( $p=0.02$ ) y pardo ( $p=0.02$ ) respecto de sus pares control. En cambio, a los 10 meses de edad, observamos que tanto los depósitos de tejido adiposo visceral (incluye gonadal y mesentérico) como el pardo son más pesados en los animales

hiperprolactinémicos. El tejido adiposo blanco subcutáneo fue la excepción, dado que no se observaron diferencias significativas en el peso del tejido entre genotipos. En el caso de los depósitos de tejido adiposo gonadal, subcutáneo y pardo, observamos un aumento significativo de adiposidad con la edad en ambos genotipos ( $p \leq 0.005$ ) (Figura 24 B-F).

Por otra parte, el hígado de hembras lacDrd2KO fue significativamente más pesado que el de las hembras control, para las dos edades analizadas.

Se verificó histológicamente la presencia de depósitos de tejido adiposo pardo en la región interescapular de hembras *Drd2*<sup>LoxP/LoxP</sup> y lacDrd2KO de 10 meses de edad. Obtuvimos imágenes por microscopía óptica de cortes de tejido adiposo pardo o multilocular incluidos en parafina (Técnica: hematoxilina-eosina). Observamos numerosas gotas lipídicas en el citoplasma de los adipocitos marrones de hembras control *Drd2*<sup>LoxP/LoxP</sup> y el contenido lipídico del tejido aumenta notoriamente en los cortes de tejido de hembras lacDrd2KO. Esta diferencia observada correlaciona con la marcada diferencia de peso observada entre los depósitos de tejido adiposo pardo de ambos genotipos. Es de notar que los lípidos almacenados se solubilizan durante el procesamiento de la muestra y por eso su localización aparece ópticamente vacía (Figura 24 G).



**Figura 24.** A) Esquema de la distribución regional de los depósitos de tejido adiposo (TA) en ratón. B-F) Peso de los depósitos de tejido adiposo e hígado en hembras *Drd2*<sup>LoxP/LoxP</sup> y *lacDrd2KO* de 5 y 10 meses de edad. B) Tejido adiposo gonadal, N=12,11,13,14; C) tejido adiposo mesentérico, N= 6,5,5, D) Tejido adiposo

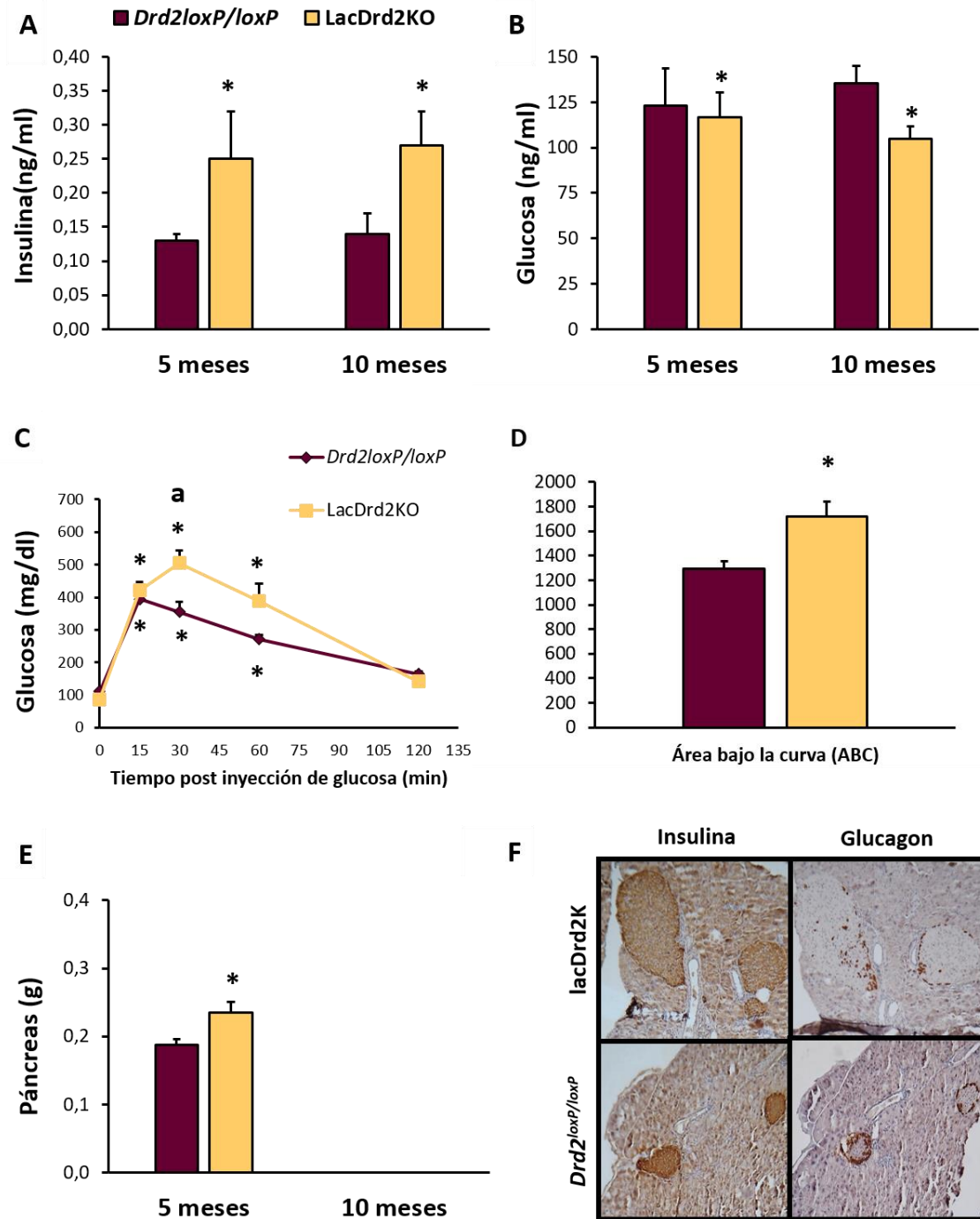
subcutáneo; N=5,4,5,3; E) Hígado; N=12,12,9,15 y F) Tejido adiposo pardo, N=8,10,19,22; \*  $P \leq 0,05$  vs. ratones  $Drd2^{LoxP/LoxP}$ , de la misma edad. "a"  $p \leq 0.05$  vs. mismo genotipo a los 5 meses. G) Histología del tejido adiposo pardo. Imágenes representativas tomadas al microscopio óptico con un objetivo de aumento 40X de la coloración hematoxilina-eosina realizada en secciones de tejido adiposo provenientes de ratones hembra  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  y  $lacDrd2KO$  de 10 meses de edad.

## HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

Considerando la obesidad de los ratones transgénicos decidimos investigar el impacto de los altos niveles de prolactina en forma crónica sobre la homeostasis de la glucosa *in vivo*. Los niveles de insulina séricos en ayuno fueron significativamente mayores en hembras  $lacDrd2KO$  de 5 y 10 meses de edad (Figura 25 A). Esta hiperinsulinemia basal aumentada podría explicar los menores niveles de glucosa en ayuno obtenidos en hembras  $lacDrd2KO$  de ambas edades (Figura 25 B). Por otro lado, el análisis del peso del páncreas mostró que los páncreas de hembras  $lacDrd2KO$  de 5 meses de edad eran más pesados que los de sus pares  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  (Figura 25 E).

Todos estos resultados evidenciaban posibles alteraciones en el metabolismo pancreático, lo que nos condujo a evaluar los mecanismos de control homeostáticos de la glucemia en respuesta a una sobrecarga de glucosa. Se observó una marcada intolerancia a la glucosa en hembras  $lacDrd2KO$  de 5 meses de edad, que se evidenció en GTT como niveles significativamente más altos de glucosa en sangre, en comparación con sus pares control  $Drd2^{LoxP/LoxP}$ , a los 30 minutos de haber recibido la inyección intraperitoneal de glucosa (Figura 25 C). En concordancia con este resultado, el área bajo la curva mostró que la glucemia permaneció más alta a lo largo de todo el experimento en hembras  $lacDrd2KO$  (Figura 25 D).

La inmunotinción para insulina y glucagon mostró un incremento del área positiva para insulina en ratones  $lacDrd2KO$ , en concordancia con los niveles basales de insulina en suero. También se observó una disminución del área positiva para glucagón en hembras  $lacDrd2KO$  (Figura 25 F).

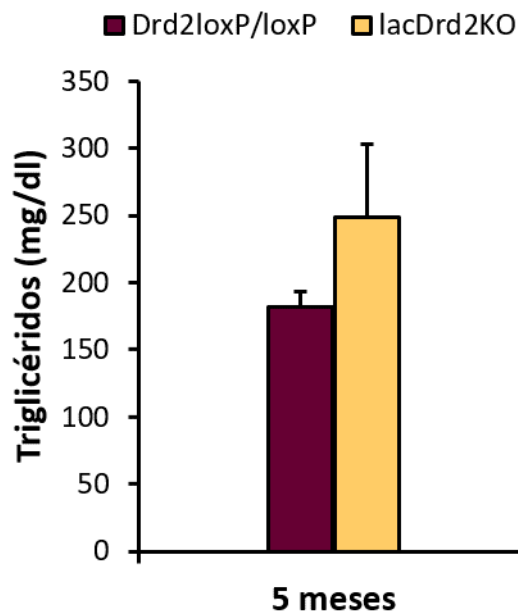


**Figura 25.** A) Insulina sérica y B) Niveles de glucosa en sangre tras 8 horas de ayuno en hembras *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 5 y 10 meses de edad; Análisis de varianza, los  $P_{interacción}$  no fueron significativos, y se realizaron tests post hoc para medidas simples; C) GTT en ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 5 meses de edad, se realizaron análisis de varianza para medidas repetidas.  $P_{interacción}$  (genotipo x tiempo) < 0,0017; D) Área bajo la curva (ABC) de glucosa en ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 5 meses de edad; E) Peso del páncreas en gramos en hembras de ambos genotipos de 5 meses de edad; F) IHQ representativa contra insulina y glucagón en ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 5 meses de edad. A) N=4,6,5,7; B) 7,7,5,5; C) 6,5; D) 6,5 y E)

12 y 11. Para A, B, D y E \*  $p < 0,05$  vs ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  de la misma edad; para C) "a"  $p < 0.05$  vs ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  en el mismo tiempo y \*  $p < 0.05$  vs ratones del mismo genotipo a tiempo 0.

## TRIGLICÉRIDOS

En la clínica, el sobrepeso y la diabetes son dos factores de riesgo que pueden conducir a dislipidemia. La caracterización de nuestro modelo experimental arrojó un marcado aumento de peso que se acentúa con la edad, aumento de adiposidad y mecanismos homeostáticos de regulación de la glucemia alterados. Las hembras  $lacDrd2KO$  con alimentación *ad libitum* de 5 meses de edad, presentaron un aumento no significativo en los niveles de triglicéridos séricos. (Figura 26).



**Figura 26. Perfil lipídico** Niveles de triglicéridos séricos de ratones hembra  $Drd2^{loxP/loxP}$  y  $lacDrd2KO$  de 5 meses de edad; ( $n = 6$ ).

## DISCUSIÓN

Con el objetivo de encontrar un modelo óptimo para la búsqueda de terapias alternativas a prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos, nuestro laboratorio desarrolló el ratón *Drd2<sup>-/-</sup>*. Demostramos que este modelo de ratón *knockout* para el RD2 al carecer del control dopaminérgico que la dopamina ejerce sobre los lactotrofos del lóbulo anterior de la hipófisis, promueve la formación de prolactinomas y su consiguiente hiperprolactinemia, lo que lo convierte en un buen modelo de prolactinomas resistentes (Cristina *et al.* 2006). Sin embargo, también demostramos que la dopamina no solamente actuaba sobre la regulación de la prolactina, sino que participaba activamente en la secreción de GHRH y GH y la homeostasis de la glucosa (García-Tornadu *et al.* 2010).

La multiplicidad de fenotipos solapados, nos planteó la necesidad de contar con una nueva herramienta genética que permitiera estudiar solamente el fenotipo asociado a la falta del RD2 hipofisario y consecuente hiperprolactinemia. Es por ello que desarrollamos el ratón *lacDrd2KO*. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio validaron que el ratón *lacDrd2KO* es un mutante tejido específico que carece completamente de RD2s funcionales en los lactotrofos hipofisarios, mientras que mantiene normales los RD2s del sistema nervioso central. La ausencia de control dopaminérgico inhibitorio sobre la síntesis y secreción de prolactina, promueve la formación de prolactinomas y el desarrollo de hiperprolactinemia crónica. Consistente con esto, las hipófisis de ratones hembra *lacDrd2KO* resultaron más pesadas, y la concentración de prolactina intrahipofisaria se encontró incrementada, indicando, ambos eventos, hiperplasia de lactotrofos (Perez-Millan *et al.* 2014). En los machos en cambio, no se observaron diferencias en los niveles séricos de prolactina, como tampoco en los pesos hipofisarios.

En el presente capítulo, recorrimos el perfil metabólico de los principales órganos involucrados en el control del metabolismo, páncreas, hígado y tejido adiposo, con el objetivo de validar nuestra cohorte experimental y el modelo de ratón *lacDrd2KO*, como una herramienta novedosa para diseccionar el **rol de la prolactina en el control de la ingesta y el balance energético**, área novedosa que carecía de un modelo experimental de hiperprolactinemia crónica no farmacológica. Se evaluó la progresión del fenotipo en dos edades, 5 y 10 meses (Perez-Millan *et al.* 2014).

Como medida principal observamos una franca hiperprolactinemia con valores séricos entre 400 y 1000 ng/ml, sin alteraciones en el eje GH. Como diana del efecto crónicamente elevado de prolactina estudiamos su acción sobre su tejido blanco más reconocido, la glándula mamaria. Observamos que las hembras *lacDrd2KO* de 10 meses de edad mostraban una mama proliferativa

símil lactante. Histológicamente no se trató de una mama en período de lactancia porque no se evidenció secreción de leche ya que la prolactina necesita actuar conjuntamente con progesterona para generar una glándula mamaria competente. No obstante, los cortes de glándula mamaria permitieron evidenciar hiperplasia ductal, caracterizada por una mayor ramificación lateral de los conductos mamarios que se presentan con luz dilatada y secreción eosinófila y una evidente proliferación de alvéolos. Es interesante destacar que no hubo signos de transformación o neoplasia a pesar de la estimulación constante de la mama con niveles altos de prolactina.

En segundo lugar, y validando nuestro modelo para el estudio de acciones metabólicas de la prolactina describimos un aumento significativo de la ingesta de alimentos en hembras lacDrd2KO con alimentación *ad libitum* a las dos edades estudiadas. Aunque poco se conoce acerca de la acción de la prolactina en los circuitos de la ingesta y la deposición de tejido graso, la capacidad orexigénica de la prolactina a nivel del sistema nervioso central, ha sido reportada tanto en humanos como en modelos animales como la responsable de promover un balance energético positivo, necesario en preñez y lactancia (Roy *et al.* 2007; Lisboa *et al.* 2006; Perez-Millan *et al.* 2014). Si bien a los 5 meses de edad el fenotipo hiperfágico estaba establecido, la obesidad no fue evidente ya que el peso corporal aumentó solo marginalmente. Este ligero aumento de peso podría explicarse por los depósitos de tejido adiposo gonadal y pardo significativamente más pesados. Sin embargo, a esta edad es probable que los mecanismos homeostáticos de control de la ingesta estén conservados, y que gradualmente se vayan perdiendo, como mostraremos a continuación. El hecho de que los niveles séricos de GH estaban conservados en hembras lacDrd2KO de 5 meses de edad, permiten descartar a dicha hormona como responsable de los cambios en el peso corporal y en el metabolismo lipídico y de glucosa.

Observamos también una tendencia a un aumento en los niveles de triglicéridos en sangre en hembras lacDrd2KO de 5 meses de edad, lo que condice con evidencia previa obtenida en nuestro laboratorio que mostraba que ratones hembra lacDrd2KO de 10 meses de edad presentaban niveles séricos significativamente incrementados tanto de triglicéridos como ácidos grasos no esterificados, comparado con sus pares control (Luque *et al.* 2016). La alteración en el perfil lipídico de nuestro modelo experimental se da en un contexto de aumento significativo del peso de los depósitos de tejido adiposo y un consecuente gradual aumento del peso corporal producto de dicho incremento de la adiposidad. A los 10 meses de edad, los animales habían desarrollado obesidad mórbida con aumento marcado de depósitos grasos. En este punto, los triglicéridos estaban significativamente aumentados indicando dislipidemia, patología típicamente encontrada en un paciente obeso (Klop *et al.* 2013). En este contexto se planteaba la necesidad de estudiar la evolución de las alteraciones en los mecanismos de control de la ingesta con la participación de prolactina, como describiremos en el Capítulo 2, y, por



otro lado, si un doble desafío como era agregar una dieta grasa al estado hiperprolactinéxico podía acelerar la aparición de un fenotipo hiperfágico y obeso, como describiremos en el Capítulo 3.

Existe vasta evidencia que muestra que existe una estrecha relación entre hiperprolactinemia y sobrepeso (Kok *et al.* 2004; dos Santos Silva *et al.* 2011). Por ejemplo, en humanos, la hiperprolactinemia causada por prolactinomas puede conducir a un aumento de peso, y este efecto resulta reversible en algunos pacientes con tratamientos con agonistas dopaminérgicos que intentan resolver el problema tumoral (Doknic *et al.* 2002a). Por otro lado, en ratas se describió que una hiperprolactinemia crónica está asociada con un aumento en los niveles de ingesta y de peso corporal, y que este efecto se puede revertir con la administración de un agonista dopaminérgico como la bromocriptina (Baptista *et al.* 2004; Gerardo-Gettens *et al.* 1989). Sumado al incremento robusto y sostenido de los niveles de prolactina, observamos que, a los 10 meses de edad, las hembras lacDrd2KO desarrollaron hiperleptinemia lo que sugiere una desregulación en aquellos mecanismos de control que la leptina ejerce sobre el metabolismo energético. La leptina es considerada una hormona metabólica que actúa inhibiendo la ingesta a nivel central (Ahima & Flier 2000a). Es sintetizada por el tejido adiposo, por lo que es de esperar que los niveles de leptina séricos incrementen conforme al tamaño de los depósitos de tejido adiposo blanco. Sin embargo, el aumento significativo observado en los niveles de ingesta de hembras lacDrd2KO de 10 meses de edad en comparación con los ratones control, no condice con la acción anorexigénica reportada para dicha hormona, por lo que proponemos una posible resistencia a la leptina a esta edad. Esta hipótesis se sostiene con evidencia proveniente de la literatura que asegura que en la mayoría de los individuos obesos se observa una resistencia a la leptina, es decir altos niveles pero falta de acción (Pfaffly *et al.* 2010). Por otra parte, existe evidencia que propone que la prolactina es la responsable de inducir la resistencia central a leptina en la preñez. Dicho efecto es fundamental para mantener los niveles de ingesta y el almacenamiento de energético elevados, para abastecer las demandas metabólicas del feto y la lactancia (Augustine & Grattan 2008).

En el presente capítulo demostramos que los ratones hembra lacDrd2KO presentan una adiposidad incrementada que correlaciona con el aumento del peso corporal y esta diferencia reportada vs. las hembras control se acentúa con la edad. A los 10 meses de edad todos los depósitos de tejido adiposo blanco caracterizados en hembras lacDrd2KO (gonadal, pardo, y mesentérico), fueron significativamente más pesados que los depósitos de hembras control. Numerosos trabajos demuestran que la prolactina es esencial en la adipogénesis y la diferenciación de adipocitos (Grattan 2015; Fleenor *et al.* 2006), así como en la regulación del metabolismo lipídico en el tejido adiposo blanco. Estudios *in vivo* demostraron que la ausencia de PRLR en ratones induce cambios en los

depósitos de tejido adiposo y una reducción pequeña, aunque progresiva, en el peso corporal. Las hembras se ven más afectadas que los machos y los depósitos de tejido adiposo blanco visceral son los que sufren la mayor reducción en la cantidad de adipocitos (Flint *et al.* 2006). También se demostró que la activación del PRLR-L induce hipertrofia de los depósitos de tejido adiposo visceral lo que deriva en un fenotipo obeso (Le *et al.* 2011). Otro argumento en favor del rol de la prolactina en adipogénesis es la regulación positiva de la expresión de su receptor durante la diferenciación de adipocitos (Brandebourg *et al.* 2007a). En lo referido al tejido adiposo pardo, observamos que hembras lacDrd2KO tienen un depósito de tejido adiposo pardo significativamente más pesado que sus contrapartes control. Como mencionamos anteriormente, también se ha demostrado que la prolactina cumple un rol importante en la diferenciación de dicho tejido. Ratones *knockout* para el PRLR exhiben depósitos de tejido adiposo pardo de menor tamaño y los pre-adipocitos derivados de dicho tejido no son capaces de diferenciarse a adipocitos maduros. Sorprendentemente, este fenotipo puede ser revertido por la expresión ectópica del receptor (Viengchareun *et al.* 2008).

Como se describió anteriormente, existen, al menos, dos circuitos neuronales complementarios que regulan la ingesta: un circuito relacionado a los aspectos homeostáticos, dependiente del estado energético del organismo, que impulsa la ingesta de alimentos cuando las reservas energéticas están agotadas, y otro que regula aspectos hedónicos, que impulsa la ingesta en función de la recompensa que generan alimentos específicos, incluso cuando la incorporación de calorías resulta innecesaria. Los circuitos neuronales asociados a los aspectos homeostáticos de la ingesta, están ubicados principalmente en el hipotálamo, mientras que los circuitos hedónicos de la ingesta están asociados con el componente emocional y motivacional de la recompensa e incluyen circuitos dopaminérgicos cerebrales. Dado el fenotipo de obesidad mórbida y comportamiento hiperfágico observado en hembras lacDrd2KO de 10 meses de edad, nos propusimos como objetivo disecar qué comportamiento, de la ingesta, se encontraba alterado.

En primer lugar, evaluamos la funcionalidad de los circuitos hedónicos para lo cual utilizamos un modelo de trastorno alimentario por atracón o *binge-eating*. Éste consiste en exposiciones diarias a un pellet de DG durante cuatro días consecutivos y siempre en la misma franja horaria. Estudios previos con modelos similares, han mostrado que la cantidad de alimento consumido escala conforme transcurren los días hasta que finalmente se estabiliza y se describe que la ingesta espontánea del pellet de DG activa centros de la vía mesolímbica. Se ha mostrado que la señalización de dopamina aumenta luego de la primera exposición al estímulo y luego de repetidas exposiciones en similares situaciones experimentales, el circuito se adapta y la dopamina pasa a convertirse en una señal predictiva del estímulo (Salamone & Correa 2012). Encontramos que la exposición de hembras

lacDrd2KO y controles de 10 meses de edad a un pellet de DG durante dos horas, una vez por día, durante cuatro días, sigue el mismo comportamiento de ingesta evidenciado por los modelos de la literatura que se caracteriza por el escalamiento en el consumo asociado a la pérdida de control durante la ingesta, y que puede ser homologado en gran medida a los episodios de atracción en humanos (Michael H. Ross & Wojciech Pawlina 2006; Perello *et al.* 2014). Por otro lado, el patrón observado parece depender de la naturaleza apetecible del estímulo, dado que dicho comportamiento no se observa en hembras que han sido expuestas a un pellet de C. Como no observamos diferencias entre genotipos, nuestros resultados sugieren que los circuitos hedónicos de la ingesta no se encuentran alterados en nuestro modelo de hiperprolactinemia crónica, pero sí los circuitos de ingesta homeostática, como demostraremos en el próximo capítulo.

La caracterización del fenotipo metabólico del ratón lacDrd2KO indicaba un aumento significativo en los niveles de ingesta, un progresivo aumento de peso corporal y acumulación de adiposidad, lo que podría favorecer una alteración en el metabolismo glucídico. Por ello nos propusimos evaluar los mecanismos de homeostasis de la glucosa en nuestro modelo de hiperprolactinemia crónica.

Encontramos que el páncreas es significativamente más pesado en hembras lacDrd2KO de 5 meses de edad y observamos que el tamaño de sus islotes es considerablemente mayor. Existe una gran cantidad de evidencia en favor del rol de la prolactina sobre la estructura del páncreas que podría explicar lo observado en nuestro modelo. Se ha demostrado que la prolactina estimula el crecimiento de islotes pancreáticos (Kim *et al.* 2010), y que la ausencia de PRLR trae aparejada una reducción en la densidad de islotes y en la masa de células  $\beta$ , producto de una disminución de la formación de islotes nuevos (Freemark *et al.* 2002). Por último, el tratamiento de hembras no preñadas con prolactina, potencia la fosforilación del factor de transcripción STAT5, lo que conduce a un aumento de la proliferación y la masa de células  $\beta$  (Crabtree *et al.* 2003).

Por otro lado, encontramos una marcada intolerancia a la glucosa en hembras lacDrd2KO de 5 meses de edad, resultados que van en línea con evidencia previa obtenida en nuestro laboratorio que demostraba que hembras de 10 meses también tienen una homeostasis de la glucosa alterada (Luque *et al.* 2016) y con evidencia previa que demuestra que niveles altos de prolactina inducen intolerancia a la glucosa en numerosas especies, entre ellas, ratas con hipófisis ectópicas (Reis *et al.* 1997). Cuando evaluamos los niveles de insulina séricos basales, nos sorprendió encontrar que se encontraban significativamente aumentados en hembras lacDrd2 a ambas edades. Este resultado va en línea con la hipertrofia de los islotes y las glucemias basales más bajas en nuestro modelo de hiperprolactinemia, pero no explicaba la contundente intolerancia a la glucosa observada. Sin

embargo, como describiéramos, la prolactina actúa sobre la expansión de los islotes y aumenta la síntesis de insulina, en concordancia con nuestros resultados de insulina sérica, pero su acción sobre el proceso de liberación de insulina depende de la concentración que impacta sobre el islote. Mientras que dosis fisiológicas de prolactina aumentan la sensibilidad de la insulina a la glucosa, dosis altas o patológicas alteran la señalización por fallas en la inducción de GLUT2 y glucoquinasa (GK), y producen la resistencia a la glucosa que se evidencia en un GTT alterado (Park *et al.* 2011), similar a nuestros resultados. Por otro lado, estudios previos muestran que una exposición a dieta rica en grasa o un fenotipo obeso, son dos condiciones que reducen los niveles de expresión de GLUT2 y GK (sensor de glucosa que integra los niveles de glucemia con la secreción de insulina) en las células beta, alterando la secreción de insulina estimulada por glucosa (Cerf 2007). Por lo tanto, los niveles crónicamente altos de prolactina, como los observados en nuestro modelo, y la obesidad incipiente pueden alterar la función de células  $\beta$ , desregulando la señalización implicada en la detección de glucosa de las mismas. Esta evidencia sugiere que las fallas registradas en la regulación de los niveles de glucemia tras una sobrecarga de glucosa en nuestro modelo, se explicarían por alteraciones en la secreción de insulina estimulada por glucosa.

# CAPÍTULO 2

Impacto de niveles crónicamente elevados de prolactina en núcleos hipotalámicos específicos involucrados en el control del metabolismo energético

# INTRODUCCIÓN

## CONTROL NEUROENDOCRINO DEL BALANCE ENERGÉTICO

El balance energético de un individuo se define como la diferencia existente entre la energía ingerida y la energía total empleada y esencialmente se encuentra bajo control hipotalámico y hormonal, mediado por hormonas metabólicas, como son la prolactina, leptina e insulina, que refieren al sistema nervioso central las señales necesarias para equilibrar el metabolismo. En condiciones fisiológicas, la ingesta está en equilibrio con el gasto, no obstante, la incapacidad del organismo de mantener la homeostasis energética es una de las causas principales que subyacen a las patologías de hiperfagia y obesidad.

Evidencia sustancial obtenida en modelos experimentales sugiere que el cerebro, particularmente el hipotálamo, es un sitio fundamental de integración y regulación de numerosos procesos fisiológicos, entre ellos, la regulación de la homeostasis energética y el metabolismo de la glucosa. El cerebro monitorea cambios en el estado energético del organismo sensando alteraciones en los niveles plasmáticos de hormonas metabólicas y nutrientes. Circuitos neuronales especializados que incluyen la participación del ARC, el VMN, DMN, y el PVN (LeBaron *et al.* 2007; Brown *et al.* 2010c; Kokay *et al.* 2018; Salais-Lopez *et al.* 2018; Sapsford *et al.* 2012) integran esas múltiples entradas metabólicas provenientes de la periferia para luego coordinar cambios adaptativos en los niveles de ingesta y gasto energético. Estas interacciones altamente coordinadas entre el cerebro y los órganos metabólicos periféricos son críticas para el mantenimiento del balance energético ya que un diálogo defectuoso entre estos actores principales contribuye al desarrollo de un fenotipo hiperfágico.

### ***Principales núcleos hipotalámicos que participan del control del balance energético***

#### Núcleo arcuato (ARC)

El rol del ARC es crítico para la regulación de la ingesta y el metabolismo energético (Roh & Kim 2016; Cannon & Nedergaard 2004; Myers, Jr. & Olson 2012). Se encuentra ubicado cerca de la ME un área circunventricular rica en capilares fenestrados, y el 3V, un área con una barrera hematoencefálica relativamente porosa. Esto le proporciona al ARC un acceso privilegiado a señales periféricas hormonales y nutricionales, y lo convierte en el principal centro hipotalámico de detección

del estado energético del organismo (Roh & Kim 2016). Existen dos poblaciones de neuronas dentro del ARC que ejercen efectos importantes, aunque antagónicos, en lo referido a la regulación de la ingesta, gasto energético y homeostasis de la glucosa. Estas neuronas, llamadas de primer orden, responden a señales metabólicas periféricas y se proyectan a neuronas de segundo orden del PVN, VMN, el área perifornical adyacente al fórnix, el LHA y las neuronas preganglionares autónomas en el tronco cerebral y médula espinal.

La primera de ellas, la población de neuronas POMC, co-expresan *Pomc* y *Cart*). Tras la ingesta de alimentos, dicha población neuronal se activa y libera  $\alpha$ -MSH, que como se mencionó anteriormente es producto del procesamiento post-traducciona l de la proteína POMC, precursora de múltiples péptidos.  $\alpha$ -MSH se une con gran afinidad a los receptores MC3R y MC4R en las neuronas de segundo orden (Cowley *et al.* 1999) y activa vías catabólicas, lo que resulta en una reducción de los niveles de ingesta y del peso corporal, dando cuenta de su acción anorexígena (Fan *et al.* 1997) y un mayor gasto de energía (Sanchez-Lasheras *et al.* 2010; Gropp *et al.* 2005; Balthasar *et al.* 2005). La importancia clave de esta población neuronal se manifiesta en ratones y humanos con delección de *Pomc* o de *Mc4r* que evidencian una obesidad mórbida (Vergoni *et al.* 2000; Krude *et al.* 1998; Yaswen *et al.* 1999).

Existe además una segunda población de neuronas que co-expresan dos péptidos, *el Npy* *Agrp*, ambos responsables de promover la ingesta e inhibir el gasto energético. NPY actúa sobre sus receptores, Y1 a Y5, presentes en el ARC, PVN y el VMN para incrementar la ingesta de alimentos (Beck 2006; Raposinho *et al.* 2001). AgRP es un antagonista competitivo de  $\alpha$ -MSH por el receptor MC3R, lo que reduce su señal promoviendo la ingesta (Ollmann *et al.* 1997). También se ha propuesto a AgRP como agonista inverso de ambos receptores (MC3R y MC4R) independiente de la presencia de  $\alpha$ -MSH (Haskell-Luevano & Monck 2001; Sanchez-Lasheras *et al.* 2010). La administración central de AgRP induce hiperfagia y aumento de peso al inhibir la unión de  $\alpha$ -MSH a MC3R / MC4R (Schwartz *et al.* 2000). La ablación selectiva de neuronas NPY/AgRP en ratones adultos produce anorexia y pérdida de peso (Luquet *et al.* 2005), lo que da cuenta del papel fundamental de estas neuronas en la regulación de la homeostasis energética

Tanto las neuronas POMC como NPY/AgRP en el ARC son sensores del estado nutricional del organismo. El nivel elevado de glucosa extracelular activa las neuronas POMC, mientras que las neuronas NPY/AgRP se activan en un contexto de baja glucosa. La baja concentración de glucosa extracelular en el hipotálamo inducida por la administración de 2-desoxi-D-glucosa, un derivado análogo de la glucosa que no es capaz de entrar en la ruta de la glucólisis, aumenta la ingesta de alimentos (Miselis & Epstein 1975). Los ácidos grasos circulantes de cadena larga (LCFA) actúan en el

hipotálamo como señales indicadoras de abundancia de nutrientes. La administración intracerebroventricular de LCFA, específicamente ácido oleico, inhibe la ingesta de alimentos al disminuir la expresión de *Agrp* y *Npy* hipotalámico (Obici *et al.* 2002)[7]. Los niveles circulantes elevados de metabolitos lipídicos, como el malonil CoA y el LCFA-CoA, son indicativos de un exceso de nutrientes y conducen a la reducción de los niveles de ingesta (Obici *et al.* 2002; Hu *et al.* 2003). El ARC responde también a señales de exceso de reservas lipídicas como son la leptina y la insulina. Tanto la leptina como la insulina activan las neuronas POMC, al tiempo que inhiben las neuronas NPY/AgRP (Elias *et al.* 1999; Baskin *et al.* 1999). La grelina es una hormona intestinal secretada por el estómago durante el ayuno, que señala al hipotálamo la necesidad de una mayor ingesta de alimentos. La acción orexigénica de la grelina está mediada únicamente por las neuronas NPY/AgRP (Andrews *et al.* 2008).

#### Núcleo paraventricular (PVN)

El PVN es otro de los núcleos hipotalámicos que participa del control del balance energético. En particular, media el control de la ingesta de alimentos regulando la actividad de del NTS mediante la liberación de oxitocina (Maejima *et al.* 2009). El PVN está densamente innervado por neuronas POMC y NPY/AgRP [12] y si bien el receptor MC4R se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro (Gantz *et al.* 1993; Liu *et al.* 2003), éste se encuentra principalmente representado en las neuronas del PVN por lo que se las propone como neuronas de segundo orden en la vía de las melanocortinas (Tao 2010; Krashes *et al.* 2016).

Estudios en ratones han demostrado que tanto la deficiencia del MC4R, específicamente en el PVN, como la ablación de dicho núcleo hipotalámico resulta en un fenotipo obeso por hiperfagia y gasto energético reducido, y además produce alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Leibowitz *et al.* 1981; Huszar *et al.* 1997; Balthasar *et al.* 2005) señalando el importante papel de las neuronas PVN en el control inhibitorio de la ingesta de alimentos. Además, el PVN media las acciones GLP-1, una importante señal de saciedad liberada por el intestino (Turton *et al.* 1996).

#### Núcleo ventromedial (VMN)

El VMN se propone como otro de los núcleos hipotalámicos que participan de los mecanismos homeostáticos que controlan la ingesta de alimentos y el peso corporal. Las neuronas del VMN reciben principalmente entradas neuronales del ARC y luego proyectan sus axones al ARC, PVN, LHA, DMN y el NTS. Habitualmente se lo identifica como un centro de saciedad, ya que numerosos estudios



muestran que la estimulación del mismo reduce la ingesta de alimentos y que lesiones en el VMN producen obesidad debido a un aumento en los niveles de ingesta y a gasto energético disminuido (King 2006). Además, se ha encontrado una correlación positiva entre el tamaño de la lesión del núcleo hipotalámico y el aumento de peso, y se observa que la hiperfagia y la ganancia de peso que resultan de la lesión bilateral del VMN son dramáticas (Ferguson & Keeseey 1971).

La mayor parte de las neuronas del VMN expresan el factor esteroideogénico-1 (SF-1) y el Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Parker & Schimmer 1997). Estudios genéticos en ratones evidencian que la mutación de genes clave que se expresan exclusivamente en el VMN, tales como SF-1, alteran la estructura del núcleo (Dellovade *et al.* 2000) y resultan en un fenotipo obeso (Majdic *et al.* 2002). Por otro lado, la delección selectiva de *Bdnf* en el VMN resulta en hiperfagia y obesidad en ratones (Unger *et al.* 2007). Además, mutaciones de pérdida de función de BDNF y TrkB causan hiperfagia y obesidad severa en humanos y roedores, indicando que BDNF es un factor importante de saciedad (Yeo *et al.* 2004; Gray *et al.* 2006).

El VMN proyecta axones al NTS del tronco encefálico. De esta manera, el NTS recibe *inputs* directamente del hipotálamo y activa aferentes del nervio vago para reducir la ingesta de alimentos, y establecer un diálogo con otros órganos. El nervio vago es uno de los nervios craneales más importantes ya que se trata del efector neural más predominante del sistema nervioso autónomo parasimpático. El VMN no solo regula la actividad del sistema nervioso autónomo parasimpático, sino que también del simpático. Evidencias demuestran que, la disfunción de este núcleo hipotalámico produce alteraciones que incluyen actividad parasimpática aumentada, aunque también actividad simpática reducida. (Bray & York 1979). Ratas con lesiones en el VMN muestran una actividad simpática reducida que se traduce en alteración en la movilización de reservas grasas (Bray & Nishizawa 1978), la movilización reducida de ácidos grasos libres (Nishizawa & Bray 1978), la actividad eléctrica reducida en los nervios simpáticos que inervan el tejido adiposo marrón (Nijijima *et al.* 1984; Bray & Nishizawa 1978) y el páncreas (Yoshimatsu *et al.* 1984), reducción de la producción de calor en el tejido adiposo marrón (Hogan *et al.* 1985; Vander Tuig *et al.* 1985), alteración en la respuesta al frío (Nijijima *et al.* 1984) y reducción de la termogénesis post ingesta (Monda *et al.* 1997). Todas estas respuestas producto de alteraciones en el funcionamiento simpático y parasimpático contribuyen al desarrollo de obesidad independiente de la hiperfagia.

El VMN también tiene un rol importante en el control de la ingesta de alimentos. Estudios recientes han implicado a las melanocortinas en la regulación de la conducta de alimentación dependiente del VMN: la ingesta de alimentos disminuye cuando las neuronas POMC del ARC activan las neuronas BDNF del VMN. También se ha observado hiperfagia moderada y obesidad en ratas

hembras con daño a las proyecciones eferentes desde la amígdala posterodorsal hasta el VMN. La alteración en los niveles de ingesta puede resultar del daño a las neuronas POMC del ARC que proyectan al VMN o bien a neuronas BDNF del VMN (King 2006).

El VMN es además un núcleo hipotalámico sensor de glucosa. El 25-40% de las neuronas del VMN responden a glucosa y se disponen espacialmente en el centro de dicho núcleo (ANAND *et al.* 1964; Oomura 1973; Oomura 1983; Song *et al.* 2001). La microinyección de glucosa directo en el VMN activa los nervios del sistema nervioso simpático que inervan el tejido adiposo marrón interescapular (Oomura 1983; Sakaguchi & Bray 1987b; Sakaguchi & Bray 1987a), mientras que la inyección de insulina disminuye la actividad simpática (Sakaguchi & Bray 1987a). Se propone que el VMN controla la saciedad monitoreando los niveles de glucosa sanguíneos por estudios realizados en ratones inyectados con auro-tioglucona. El oro es tóxico para las neuronas, luego si está unido a glucosa por medio de azufre, aquellas células que incorporan glucosa mueren. Se observa que 15 horas post-inyección, se daña gran parte del VMN y los ratones se vuelven hiperfágicos y obesos (MARSHALL *et al.* 1955; MARSHALL & MAYER 1956).

#### Núcleo dorsomedial (DMN)

Se postula al DMN como un núcleo fundamental en el metabolismo energético. Controla la ingesta de alimentos, y si es lesionado en ratas, se observa hipofagia y pérdida de peso (Bellinger & Bernardis 2002) Este núcleo contiene neuronas que expresan *Prlr* y *Npy*, y participan del control de la homeostasis energética vía regulación de la ingesta de alimentos y el gasto energético. Trabajos hechos en ratas OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima fatty) muestran que la sobreexpresión de *Npy* en el DMN aumenta los niveles de ingesta y el peso corporal, lo que deviene en obesidad y diabetes tipo 2. Este fenotipo puede ser revertido eliminando *Npy* de dicho núcleo hipotalámico mediante la técnica de ARN de interferencia (Yang *et al.* 2009). Además de participar en la regulación de la ingesta, este núcleo cumple un rol importante en la regulación de la termogénesis. Termogénesis implica la generación de calor para mantener la temperatura corporal, o para disipar el exceso de energía proveniente de la ingesta de alimentos, y es un componente crítico del gasto energético, ocurriendo especialmente en el tejido adiposo marrón (Cannon & Nedergaard 2004). La regulación central de la termogénesis depende del flujo de salida simpático al tejido adiposo. El POA en el hipotálamo recibe señales sensoriales térmicas de exposición al frío y activa la vía hipotalámica: POA- DMN- rRPa para promover la termogénesis. La norepinefrina liberada por las terminales nerviosas se une a los receptores B-adrenérgicos en los adipocitos y activa la vía de señalización del adenosín monofosfato

cíclico (AMPC), que a su vez activa aUCP-1 y promueve la termogénesis. Si bien durante mucho tiempo se consideró que el tejido adiposo pardo podía encontrarse únicamente en la región interescapular de algunos mamíferos, como los roedores, o en bebés recién nacidos, evidencia reciente demuestra que ciertos estímulos tales como el estrés, exposición a frío o dieta rica en grasa, conducen también a la aparición de células con capacidad termogénica distribuidas discretamente en los depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo (Wu *et al.* 2012; Carey *et al.* 2014; Sidossis & Kajimura 2015). Si bien estas células, conocidas como adipocitos *beige*, presentan características de adipocitos pardos (abundantes mitocondrias, pequeñas gotas de lípidos en citoplasma y capacidad termogénica), comparten progenitor con los adipocitos blancos (*Myf5* negativos) (Seale *et al.* 2008). Este proceso por el cual adipocitos blancos adoptan fenotipo y funcionalidad del tejido adiposo pardo se conoce como *beiging*. El *knockout* de *Npy* en el DMN en ratas Sprague Dawley tiene niveles de *Ucp1* aumentados en tejido adiposo pardo interescapular que explica la termogénesis aumentada observada. Por otro lado, también muestra evidencia de *beiging* en el tejido adiposo subcutáneo inguinal lo que previene la obesidad inducida por dieta (Chao *et al.* 2011). Además, se ha descrito que bajos niveles de expresión de *Npy* en el DMN correlacionan con un menor tamaño de los depósitos de grasa y previenen la obesidad inducida por una dieta rica en grasa (Chao *et al.* 2011) mientras que un aumento de *Npy* a nivel central suprime el flujo simpático en el tejido adiposo pardo interescapular en ratas (Egawa *et al.* 1991).

## **PARTICIPACIÓN DE LA PROLACTINA EN EL CONTROL NEUROENDOCRINO DEL BALANCE ENERGÉTICO**

En el primer capítulo, caracterizamos el fenotipo metabólico de las hembras lacDrd2KO. Como se explicó previamente, estos ratones tienen una delección selectiva de los receptores de dopamina D2 en lactotropos, por lo que en ausencia del control inhibitorio que la dopamina ejerce sobre la síntesis y secreción de prolactina desarrollan hiperprolactinemia crónica. Dadas las alteraciones observadas en el perfil hormonal y en la fisiología de los principales órganos metabólicos, hígado, páncreas y tejido adiposo, nos propusimos estudiar las posibles alteraciones en los mecanismos de control neuroendócrino del balance energético que subyacen al fenotipo observado.

Si bien el papel fisiológico de la prolactina en el metabolismo ha sido estudiado, hasta este momento, el efecto de la hipersecreción patológica de prolactina se ha evaluado utilizando enfoques farmacológicos, como la administración de prolactina exógena, o de antipsicóticos. En este contexto, proponemos que el ratón lacDrd2KO es un excelente modelo para diseccionar el rol de la prolactina

como responsable de las alteraciones metabólicas observadas en pacientes con prolactinomas o bajo tratamientos farmacológicos psiquiátricos.

De esta forma, nos propusimos tomar como punto de partida la gran cantidad de información existente en torno a la función de la prolactina en preñez y lactancia para delinear el camino hacia la comprensión de las alteraciones en el control neuroendocrino del balance energético en nuestro modelo de hiperprolactinemia patológica.

### **Hiperprolactinemia fisiológica**

En biología, se define como pleiotropía, al fenómeno por el cual el producto de un único gen, cumple funciones muy diversas en un mismo organismo. El rol de la prolactina en el control del balance energético es quizás el mejor ejemplo de una hormona con funciones pleiotrópicas. Como describimos en el capítulo anterior, el PRLR se expresa en múltiples tejidos periféricos involucrados en la regulación del metabolismo, tales como tejido adiposo, hígado, páncreas y cerebro. Sería muy ambicioso intentar describir todas las funciones metabólicas potencialmente sensibles a la acción de prolactina, por lo que en primer lugar nos enfocamos en aquellas que son reguladas específicamente en la preñez y la lactancia, dos ventanas de tiempo en las que se observan múltiples cambios adaptativos en presencia de altos niveles de prolactina o lactógeno placentario. Durante estos dos períodos, los mecanismos de control neuroendócrino del balance energético se modifican para cumplir con una mayor demanda metabólica. Dichas adaptaciones son orquestadas por las hormonas lactogénicas, prolactina y lactógeno placentario. Durante estas ventanas de tiempo se registra un comportamiento hiperfágico, un aumento de adiposidad e hiperleptinemia.

Tanto la prolactina como el lactógeno placentario señalizan vía el PRLR para activar todos los cambios adaptativos que se dan durante la preñez y la lactancia. En estos estados fisiológicos, tanto el metabolismo lipídico (Barber *et al.* 1992) como la homeostasis de la glucosa se ven alterados (Rieck & Kaestner 2010). Los tejidos maternos desarrollan resistencia a la insulina para dirigir preferentemente la glucosa al feto en desarrollo (Herrera 2000) y para garantizar que los tejidos maternos continúen recibiendo los nutrientes necesarios; existe una mayor demanda de secreción de insulina materna y aumenta la secreción de insulina estimulada por glucosa. Para adaptarse a esta demanda alterada, existe una proliferación significativa de células  $\beta$  en los islotes pancreáticos (Parsons *et al.* 1992). Aumenta la síntesis de insulina (Bone & Taylor 1976) y disminuye el umbral para

la secreción de insulina estimulada por glucosa (Sorenson & Parsons 1985). El fracaso de esta respuesta adaptativa da como resultado diabetes gestacional (Ramos-Roman 2011).

Las acciones de la prolactina sobre el tejido adiposo blanco son sumamente importantes durante el embarazo y la lactancia, dos períodos fisiológicos en los cuales las hormonas lactogénicas alteran el metabolismo lipídico promoviendo la adipogénesis y diferenciación de adipocitos en el tejido y estimulan la movilización de las reservas lipídicas hacia glándula mamaria para su utilización durante la lactancia. (Barber *et al.* 1992).

Estas acciones periféricas en el metabolismo se complementan con acciones de la prolactina a nivel del sistema nervioso central para promover el apetito y potencialmente regular la homeostasis de la glucosa. Las neuronas que responden a prolactina abundan en el hipotálamo. Se han encontrado PRLR en núcleos hipotalámicos discretos relacionados con el control de la ingesta, el gasto energético como el ARC, VMN y PVN (Bakowska & Morrell 1997a; Pi & Grattan 1998d; Brown *et al.* 2010c). La administración sistémica de prolactina aumenta la ingesta de alimentos (Moore *et al.* 1986; Gerardo-Gettens *et al.* 1989; Noel & Woodside 1993; Buntin *et al.* 1999) y esta acción es independiente de los esteroides ováricos (Noel & Woodside 1993; Naef & Woodside 2007; Sauve & Woodside 1996). Por lo tanto, es probable que la secreción elevada de hormonas lactogénicas contribuya al rápido aumento de los niveles de ingesta durante el embarazo (Shirley 1984; Ladyman & Grattan 2004; Ladyman *et al.* 2012) y al fenotipo hiperfágico observado durante la lactancia (Woodside 2007; Woodside *et al.* 2012).

### **Hiperprolactinemia patológica**

Hasta ahora vimos que acciones aparentemente diversas de las hormonas lactogénicas se pueden unificar en una única función adaptativa, establecer un balance energético positivo que permita cumplir con la demanda metabólica registrada durante la preñez y la lactancia (Augustine *et al.* 2008).

No obstante, las funciones descritas para la prolactina que se consideran adaptativas en mujeres embarazadas y lactantes, pueden contribuir al desarrollo de trastornos metabólicos, conforme elevados niveles de esta hormona se registren en sangre por fuera de dichas ventanas de tiempo.

La hiperprolactinemia causada por antagonistas de dopamina o tumores hipofisarios predispone a la obesidad en roedores ((Lacruz *et al.* 2000; Nagaishi *et al.* 2014); y los altos niveles de

prolactina en humanos pueden estar involucrados en un aumento de peso y un metabolismo de glucosa alterado. Por otra parte, la normalización de los niveles de prolactina usando agonistas de dopamina está asociado con la pérdida de peso (Greenman *et al.* 1998; Doknic *et al.* 2002a). Los aspectos patológicos del exceso de prolactina en humanos se ejemplifican en la asociación entre el locus *PRL* (6p22.2-p21.3) y las variaciones en el índice de masa corporal (Hofker & Wijmenga 2009); en niveles altos de insulina (Yavuz *et al.* 2003; Serri *et al.* 2006) o resistencia a la insulina (Gustafson *et al.* 1980; Tuzcu *et al.* 2009; Schernthaner *et al.* 1985) observada en pacientes con hiperprolactinemia severa, y en el aumento de peso y anormalidades metabólicas encontradas en algunos pacientes con prolactinomas (Ben Jonathan *et al.* 2006; Pala *et al.* 2015; Doknic *et al.* 2002b). Además, los SNP ubicados cerca del gen *PRL* o *PRLR* se han asociado con un mayor riesgo de obesidad (Nilsson *et al.* 2011) o diabetes gestacional (Le *et al.* 2013).

## **PARTICIPACIÓN DE LA LEPTINA EN EL CONTROL NEUROENDOCRINO DEL BALANCE ENERGÉTICO**

El peso corporal en la mayoría de las personas se mantiene relativamente estable, incluso frente a las fluctuaciones diarias en los niveles de ingesta y gasto energético, como resultado de la acción de reguladores del balance energético a corto y largo plazo. Las hormonas gastro-intestinales producidas por el estómago (grelina) y el intestino (CCK y péptido YY) son dos ejemplos de reguladores a corto plazo que modulan el apetito y marcan el inicio y la finalización de las comidas diariamente (Saper 2002). Por otro lado, entre los reguladores que mantienen el equilibrio energético durante períodos prolongados se incluye la leptina, un factor de adiposidad que se libera en proporción a los depósitos de tejido adiposo del organismo y se encarga de regular el peso corporal.

La leptina actúa principalmente sobre núcleos hipotalámicos específicos involucrados en el control del balance energético (Elmqvist *et al.* 1998; Friedman & Halaas 1998; Schwartz *et al.* 2000; Gao & Horvath 2007). El efecto de la leptina está mediado por LepR también llamados ObR, ampliamente distribuidos en el MBH, en el DMN y en el tronco encefálico (Mercer *et al.* 1996) (Schwartz *et al.* 1996) (Cheung *et al.* 1997) (Fei *et al.* 1997) (Elmqvist *et al.* 1998) tanto en humanos como en roedores. En el ARC, la leptina regula dos poblaciones neuronales diferentes, las neuronas orexigénicas NPY/AgRP y las neuronas anorexigénicas POMC (Mercer *et al.* 1996; Broberger *et al.* 1998). La leptina activa las neuronas POMC e inhibe las neuronas NPY/AgRP, ambas acciones reforzando la reducción del apetito y la ingesta de alimentos.

Paradójicamente, en pacientes obesos, los niveles de leptina séricos son elevados y correlacionan positivamente con la adiposidad (Maffei *et al.* 1995; Considine *et al.* 1996). A pesar de que la acción anorexigénica de la leptina está ampliamente descrita en la literatura, en condiciones de obesidad, la hiperleptinemia es incapaz de reducir los niveles de ingesta, fenómeno que se define como *resistencia a la leptina* (Campfield *et al.* 1995). La preñez, es otra condición en la que se ha descrito una resistencia a leptina transiente. Se caracteriza por hiperfagia e incremento de adiposidad, con un posterior desarrollo de resistencia a la leptina que permite mantener una ingesta aumentada incluso en un contexto de hiperleptinemia causada por depósitos de tejido adiposo en crecimiento. Tanto el incremento inicial en los niveles de ingesta, como el desarrollo de resistencia a leptina, están impulsados por cambios hormonales asociados a la preñez. Evidencia previa sugiere que el desarrollo de la placenta que secreta de forma crónica elevados niveles de lactógeno placentario, que como mencionamos previamente se trata es una hormona lactogénica que señala a vía PRLR, modifica los mecanismos homeostáticos de la madre para hacer frente a las demandas metabólicas del feto en crecimiento (Augustine *et al.* 2008) siendo la hormona responsable de la resistencia a leptina observada durante la etapa final del embarazo. Por otro lado, se ha demostrado que la administración intracerebroventricular de prolactina de forma crónica desencadena un estado de resistencia a leptina que se asocia a niveles más bajos de pSTAT3 en varios núcleos hipotalámicos (Augustine & Grattan 2008), efecto que se potencia si el perfil hormonal de las ratas es similar al observado durante los primeros meses de embarazo. Otra evidencia en favor del diálogo entre la prolactina y la leptina es la presencia de poblaciones de neuronas en el hipotálamo que expresan ambos receptores (Nagaishi *et al.* 2014; Ladyman *et al.* 2010), aunque no es claro que los efectos de la prolactina estén mediados por la acción directa de dicha hormona sobre las neuronas sensibles a leptina ya que el insensibilidad a leptina observada durante la preñez, se observa en el VMN, donde no hay superposición de receptores.

La leptina activa la cascada de señalización JAK2/STAT3. Evidencia proveniente de estudios en modelos animales demuestra que la insensibilidad a leptina observada durante la preñez, está asociada con una reducción en los niveles de pSTAT3 en el VMN de ratones hembras (Augustine *et al.* 2019), mientras que la resistencia a leptina en modelos de obesidad se da en el ARC y VMN de hembras que han sido expuestas a una dieta rica en grasa (Rizwan *et al.* 2017).

## OBJETIVOS

La caracterización metabólica de nuestro modelo experimental de hiperprolactinemia crónica mostró que las hembras lacDrd2KO de 10 meses de edad tienen un fenotipo hiperleptinémico e hiperfágico lo que sugiere una cierta resistencia central a la acción anorexigénica de la leptina. Por este motivo, en el presente capítulo nos propusimos investigar las alteraciones a nivel central que subyacen a la obesidad mórbida observada en nuestro modelo.

Los objetivos específicos del presente capítulo fueron:

- Analizar la respuesta basal y la sensibilidad frente a una sobrecarga de prolactina de núcleos hipotalámicos específicos involucrados en el control del metabolismo energético y con demostrada expresión de *Prhr* como son el ARC, VMN y DMN en hembras lacDrd2KO y control *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* de 10 meses de edad.
- 
- Evaluar la expresión de genes hipotalámicos asociados al control de ingesta y el balance energético en núcleos hipotalámicos específicos involucrados en el control del metabolismo como son el ARC, VMN y DMN. Estudiar el perfil de expresión sitio específico de factores hipotalámicos orexigénicos y anorexigénicos (*Npy*, *Agrp*, *Pomc*, *Cart*, *Bdnf*) genes involucrados en el control del metabolismo tales como *Prhr* receptor de insulina (*Ira o insra*), *Lepr*, y mediadores de la señalización de insulina y leptina como son *Foxo1*, *TrkB*, y *Gk*. en hembras lacDrd2KO y *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* control de 5 y 10 meses de edad.
- 
- Evaluar expresión de genes involucrados en el control del balance energético (*Ucp1*), en el tejido adiposo pardo, tejido con capacidad termogénica cuya actividad es regulada por el DMN en hembras lacDrd2KO y control *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* control de 10 meses de edad.
- 
- Evaluar el peso corporal y el comportamiento de ingesta en respuesta a una inyección de leptina ip en hembras lacDrd2KO y control *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* de 5 y 10 meses de edad y la sensibilidad central a leptina en núcleos que expresan *Lepr* como son el MBH, DMN, AVPV y PVN en hembras de 10 meses de edad de ambos genotipos.



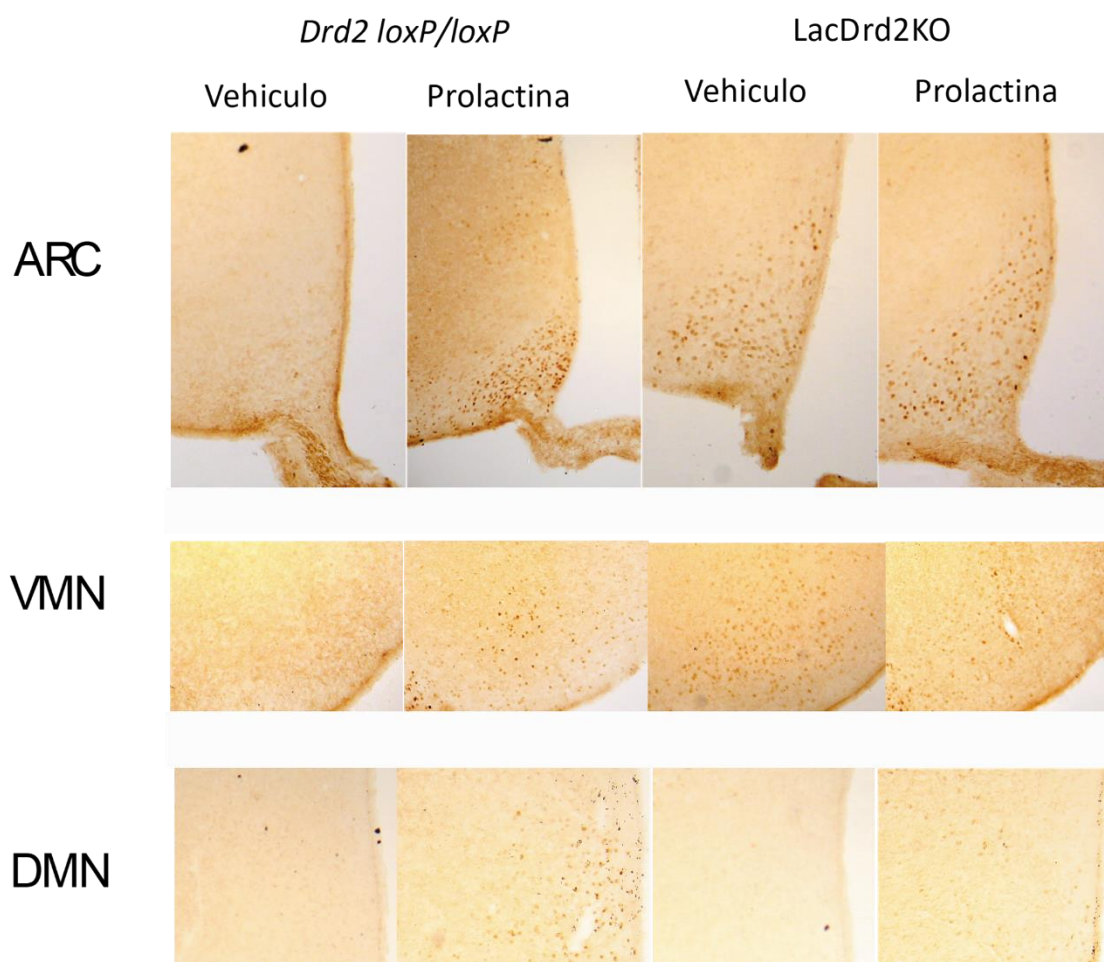
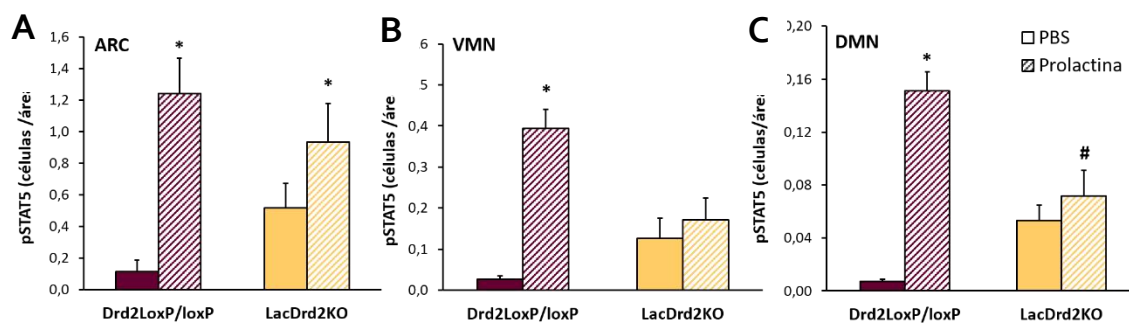
## RESULTADOS

Para poner en contexto los resultados obtenidos en este capítulo, en el capítulo anterior encontramos que los niveles de ingesta se encontraban significativamente aumentados en hembras lacDrd2KO de 5 y 10 meses de edad. El peso corporal aumentó solo un 7% en ratones lacDrd2KO a los 5 meses de edad en comparación con los controles, pero casi un 28% en animales de 10 meses de edad. Este aumento correlacionó con un mayor peso de los depósitos de tejido adiposo blanco y de tejido adiposo pardo y niveles de leptina séricos significativamente más altos solo en ratones lacD2RKO de 10 meses de edad.

Es por ello que profundizamos el estudio sobre los mecanismos regulados por prolactina que controlan la ingesta a nivel central, de forma de comprender cómo variaba temporalmente la respuesta a dicha hormona en el hipotálamo para lograr explicar el fenotipo hiperfágico y de obesidad mórbida que se desarrolla gradualmente en hembras lacDrd2KO.

### SENSIBILIDAD CENTRAL A PROLACTINA

Se evaluó la activación basal y en respuesta a prolactina de núcleos hipotalámicos específicos que participan del control del balance energético. Consideramos la fosforilación de STAT5 como un indicador de la activación neuronal en respuesta a prolactina. Se evidenció mayor fosforilación basal de STAT5b en el ARC, VMN (especialmente en la porción ventrolateral del núcleo ventromedial) y en el DMN de hembras lacDrd2KO de 10 meses de edad en relación a su contraparte control *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>*. La marca basal fue superior en animales lacDrd2KO en todos los núcleos, sin embargo, la diferencia con el grupo control no fue significativa en TWO ANOVA (Figura 27).



**Figura 27. Fosforilación de STAT5b inducida por prolactina en los núcleos ARC, VMN y DMN de ratones *Drd2* <sup>LoxP</sup> / <sup>LoxP</sup> y *lacDrd2KO* de 10 meses de edad. A) B) C) Células positivas para pSTAT5 por área (cuantificadas por ImageJ), en ratones *Drd2* <sup>LoxP</sup> / <sup>LoxP</sup> y *lacDrd2KO* de 10 meses de edad, inyectados ip con vehículo (barras sólidas) o prolactina (barras rayadas) 5 mg / kg peso corporal; N = 3 ratones, para cada genotipo y tratamiento. \*  $P \leq 0.05$  vs. ratones inyectados con solución salina del mismo genotipo, #  $P \leq 0.05$  vs. ratones de distinto genotipo bajo el mismo tratamiento; ARC: interacción genotipo X tratamiento,  $p = 0.16$ ,  $F_{1,8} = 2,40$ , efecto genotipo  $p = 0.0097$ ; VMN: interacción genotipo x tratamiento significativa,  $p = 0.0012$ ,  $F_{1,8} = 7.19$ ; prueba post-hoc:**

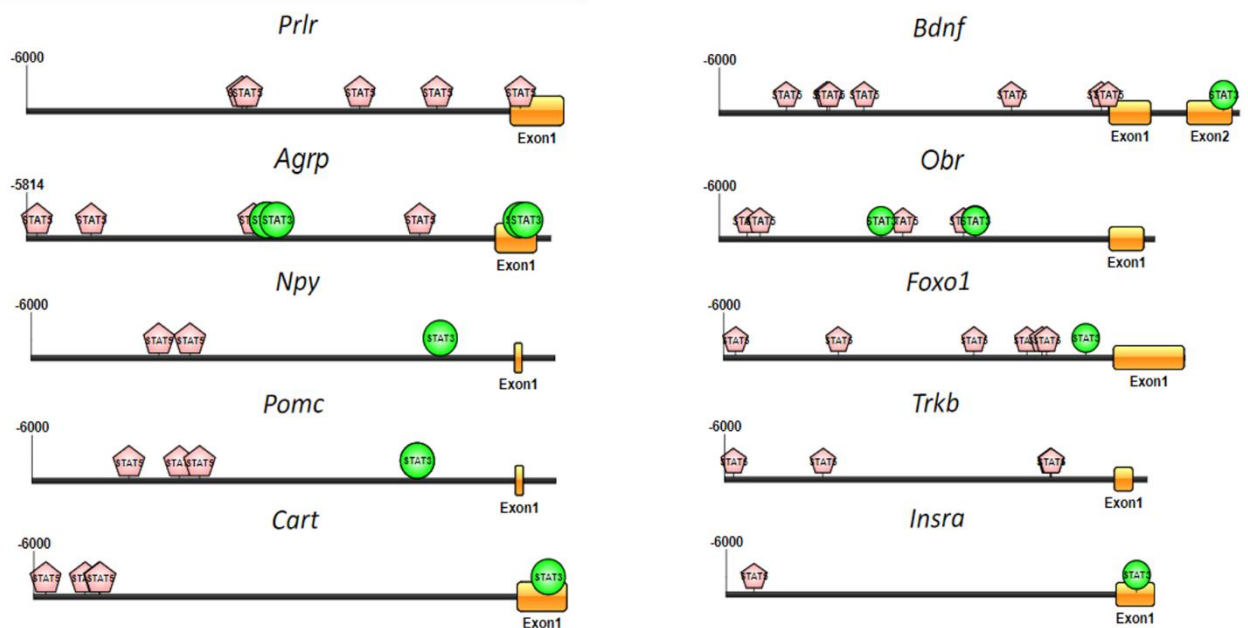
*Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>*, solución salina vs. prolactina,  $p = 0.0066$ ; DMN: interacción genotipo x tratamiento significativa,  $p = 0.020$ ,  $F_{1,8} = 8.37$ , prueba post-hoc: : *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>*, solución salina vs. prolactina,  $p = 0.00088$ ; prolactina *LacDrd2KO* vs. prolactina *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>*  $Pp = 0.0097$ ).; **Abajo** Imágenes representativas de la IHQ contra pSTAT5 en cortes de cerebro de hembras *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 10 meses de edad

La administración de prolactina exógena en forma ip aumentó significativamente el número de células positivas para pSTAT5 en el ARC, VMN y DMN de hembras *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* (Figura 27 A, B, C). En hembras *lacDrd2KO*, por otro lado, la respuesta a prolactina no se alteró en el ARC, mientras que en el VMN y el DMN no se evidenció respuesta, lo que probablemente refleja una activación continua de estos núcleos hipotalámicos por prolactina endógena que desensibiliza la respuesta a una sobrecarga de la misma

### PREDICCIÓN *IN SÍLICO* DE SITIOS DE UNIÓN PARA STAT5b y STAT3

Para la verificación de posibles blancos de la acción de prolactina y/o leptina, identificamos *in silico*, sitios de unión putativos para los factores de transcripción STAT5b y STAT3 en numerosos genes que se expresan en el hipotálamo y que están involucrados en el metabolismo. Para ello utilizamos el programa PROMO del grupo *Algorithmics and Genetics Group* (ALGGEN) (Messeguer *et al.* 2002), y analizamos los promotores proximales (-6000 a TSS) de *Prlr*, *Agrp*, *Npy*, *Pomc*, *Cart*, *Bdnf*, *Lepr*, *Foxo1*, *Trkb*, *Insra*.

Se detectaron en los promotores de dichos genes sitios de unión para los dos factores de transcripción (Figura 28) lo que justificaba su posterior análisis por PCR en tiempo real. En los genes *Prlr* y *Trkb* no se identifican sitios de unión a STAT3. Los sitios de unión a STAT5b, en cambio, se identifican en todos los genes estudiados, con mayor número de sitios en los promotores de *Agrp*, *Prlr*, *Obr*, *Foxo1* y *Trkb1*, y solo un sitio en el caso de *Insra*.



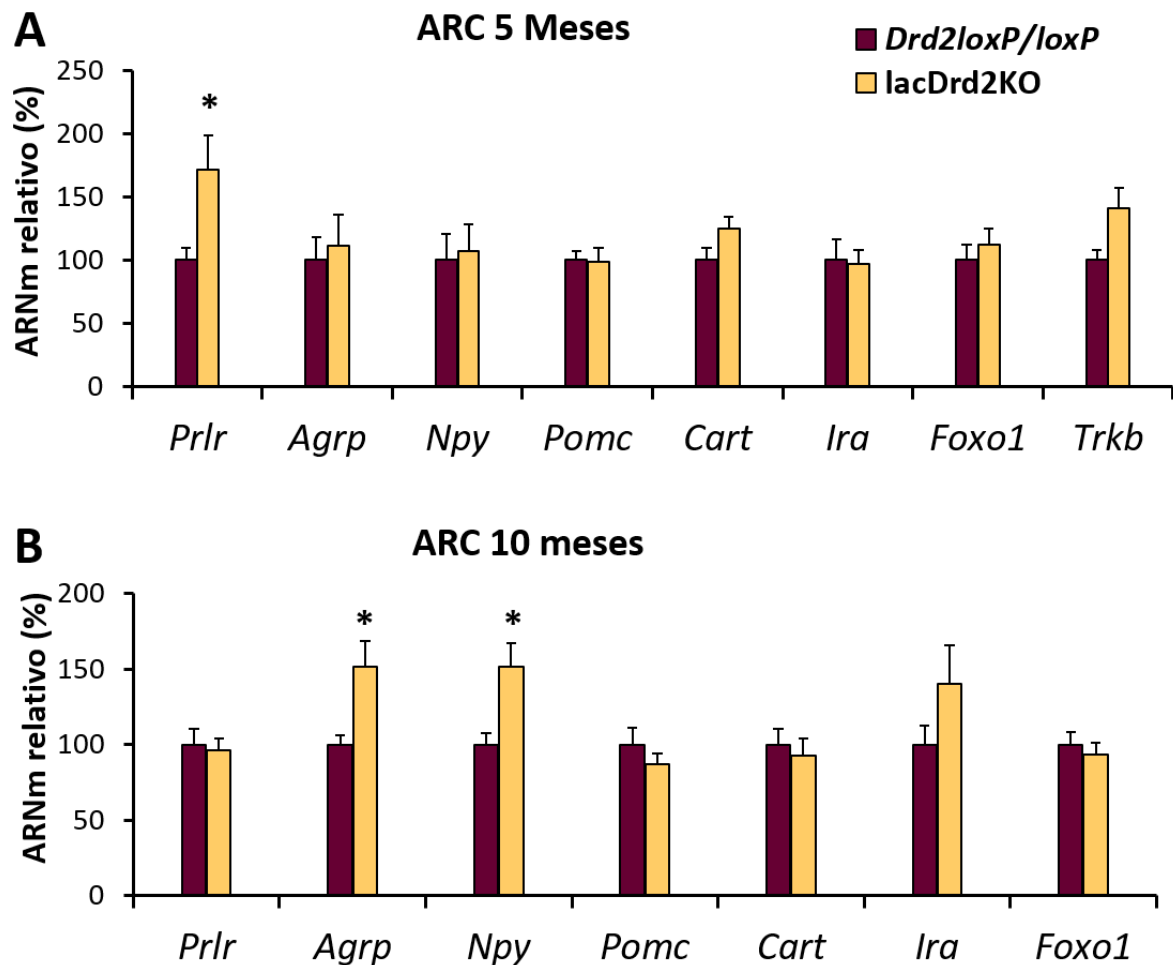
**Figura 28. Identificación de sitios de unión putativos para STAT5b (viñeta rosa) y STAT3 (viñeta verde) en promotores de genes clave en el control del metabolismo energético. Se utilizó el programa PROMO del grupo Algorithmics and Genetics Group (ALGGEN).**

## EXPRESIÓN GÉNICA EN NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS

Dado el fenotipo hiperprolactinéxico de hembras lacDrd2KO, decidimos evaluar la expresión génica en núcleos hipotalámicos específicos que participan de la regulación del balance energético y que expresan *Prlr*, lo que los convierte en potenciales blancos de la acción de los elevados niveles de prolactina. Se analizaron niveles de expresión génica a los 5 meses (peso corporal ligeramente aumentado) y a los 10 meses (obesidad mórbida).

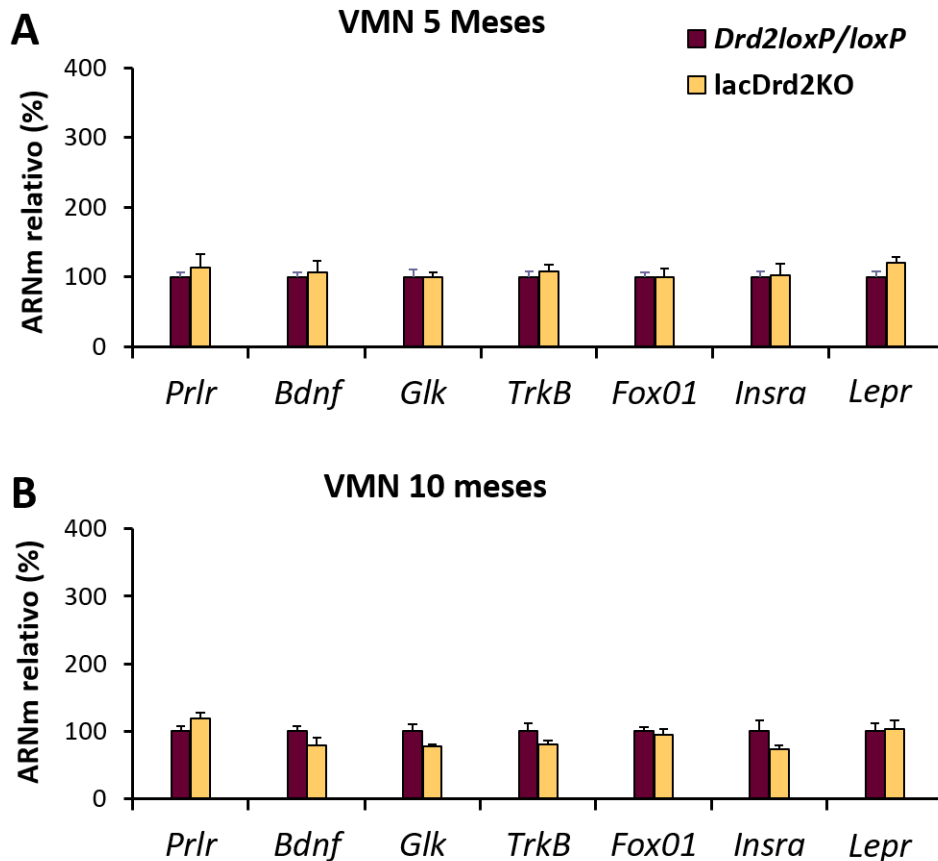
A los 5 meses de edad, *Prlr* se encontraba significativamente aumentado en el ARC de las hembras lacDrd2KO en comparación con los controles *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>*, y no se encontraron diferencias significativas entre genotipos en los niveles de expresión de genes orexigénicos (*Agrp*, *Npy*), anorexigénicos (*Pomc*, *Cart*), *Insra*, genes que participan de las vías de señalización de leptina e insulina (*FoxO1* o *Trkb*) (Figura 29 A). A los 10 meses, por otro lado, hubo un aumento significativo en los niveles de ARNm de los genes orexigénicos, *Agrp* y *Npy* en ratones lacDrd2KO ( $p = 0.013$  y  $0.011$ , respectivamente; Figura 29 B). Dado que previamente habíamos encontrado que los niveles de leptina séricos se encontraban significativamente aumentados en hembras lacDrd2KO (Capítulo 1), el aumento en los niveles de expresión de *Agrp* y *Npy* indicaban insensibilidad central a leptina, ya que

la leptina reduce la ingesta de alimentos, en parte, al inhibir *Npy* y *Agrp*. No se encontraron diferencias significativas entre genotipos en el resto de los genes analizados en este núcleo.



**Figura 29: Expresión génica en el ARC de ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de A) 5 y B) 10 meses de edad con alimentación ad libitum.** Los genes están relativizados al gen de control endógeno ciclofilina, y la expresión promedio de los ratones control *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* se consideró el 100%. N = 9 y 11 (ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO*, respectivamente) para cada gen a los 5 meses, y N=10-11 para *Prlr*, *Agrp* y *Npy*, y 5-6 para *Pomc*, *Cart*, *Ira* y *Foxo1* en ratones de 10 meses de edad. \*  $P \leq$  vs. ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>*.

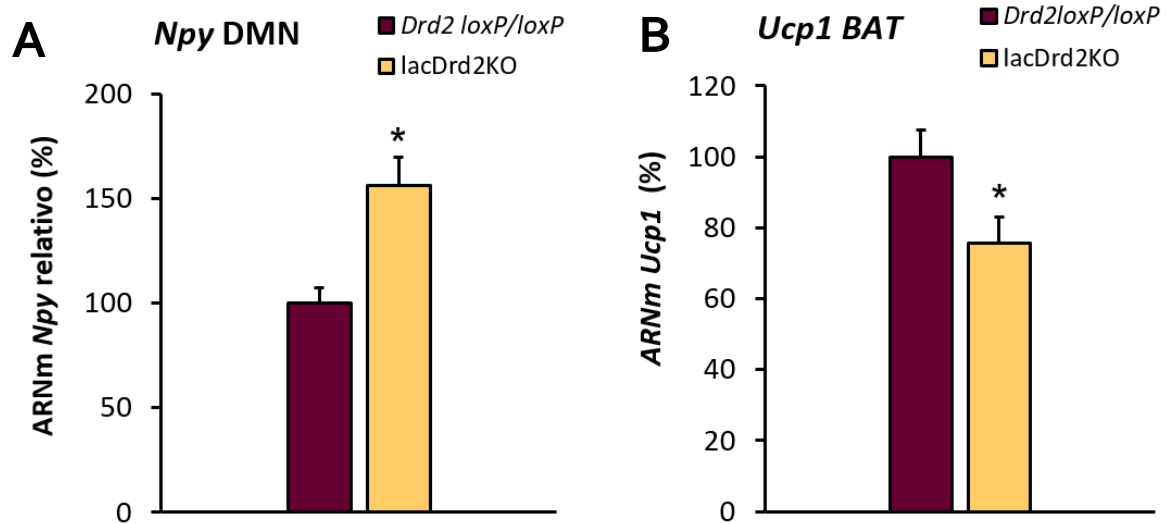
En el VMN, los niveles de ARNm de *Prlr*, *Bdnf*, *Gk* y *Trkb*, *Fox01*, *Lepr* e *Insra*, permanecieron inalterados a los 5 y 10 meses de edad (Figura 30)



**Figura 30: Expresión génica en el VMN de hembras *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de A) 5 y B) 10 meses de edad con alimentación *ad libitum*. Los genes se relativizaron al gen de control endógeno ciclofilina, y la expresión promedio de los ratones control *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* se consideró del 100%. N = 8-10 (ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO*, respectivamente) para cada gen a los 5 meses de edad, y 10-11 para *Prlr*, *Agrp* y *Npy*, y 6-7 para el resto de los genes en ratones de 10 meses de edad.**

Finalmente, se evaluaron los niveles de expresión de *Npy* en el DMN de ratones hembra de 10 meses de edad. Como mencionamos antes, se ha descrito que los niveles de *Npy* en este núcleo desempeñan un papel importante no solo en la regulación de la ingesta de alimentos, sino también en la termorregulación. Los ratones *LacDrd2KO* tenían aumentados los niveles de ARNm de *Npy* en el DMN a los 10 meses de edad ( $p = 0.0053$ ; Figura 31 A). Como describimos previamente, se observó un aumento del peso de grasa parda a esta edad (Figura 24 F, capítulo 1); pero en contraste, hubo una disminución de la expresión de *Ucp1* en dicho tejido ( $p = 0.047$ ; Figura 31 B), lo que indica una menor capacidad termogénica de este depósito de tejido adiposo. En forma concordante habíamos observado mayor cantidad de tejido adiposo blanco en este tejido adiposo marrón en los ratones

lacDrd2KO (Figura 24 G, capítulo 1) Según la literatura, el aumento de los niveles de expresión del gen orexigénico *Npy* en el DMN y la disminución de la termogénesis pueden favorecer la obesidad.



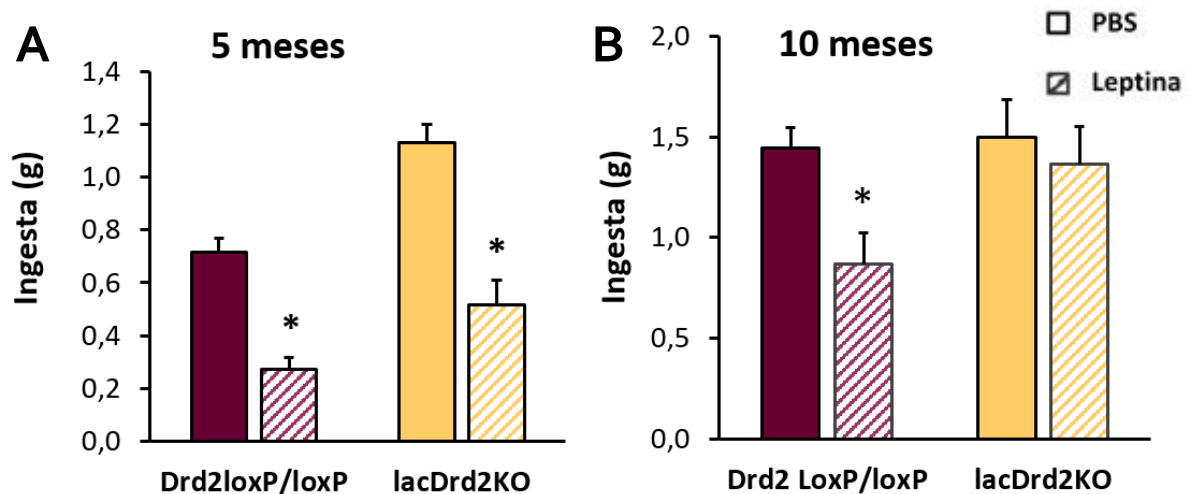
**Figura 31.** A) Niveles de expresión de *Npy* en el DMN de ratones hembra *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 10 meses de edad con alimentación *ad libitum*.  $N = 5, 5$ , \*  $P \leq 0.05$  vs. ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>*. B) Niveles de mRNA de *Ucp1* en tejido adiposo marrón (BAT) de ratones hembra *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 10 meses de edad.  $N = 5$  y  $7$ ;  $p = 0.047$  vs. ratones *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>*.

## SENSIBILIDAD CENTRAL A LEPTINA

En el capítulo 1 describimos que las hembras *lacDrd2KO* de 10 meses de edad presentaban un fenotipo hiperleptinémico e hiperfágico. Sustentados por los resultados obtenidos que parecían indicar que los altos niveles de leptina séricos no tenían acción anorexigénica, decidimos evaluar la sensibilidad a leptina en nuestro modelo de ratón. Una vez planteado dicho objetivo, evaluamos la reducción de la ingesta de alimentos inducida por leptina y la fosforilación de STAT3 en núcleos hipotalámicos específicos.

En primer lugar, se buscó caracterizar el comportamiento de ingesta en hembras *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 5 y 10 meses de edad en respuesta a una inyección de leptina *ip*. Hembras de ambos genotipos fueron ayunadas durante 16 horas tras lo cual recibieron una inyección de leptina o PBS *ip* y fueron realimentadas durante 1 hora. A los 5 meses de edad, las hembras *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* mostraron una supresión similar de la ingesta de alimentos inducida por leptina (efecto principal del

tratamiento  $p = 0.005$ ;  $p_{\text{interacción}} = 0.60$ , Figura 32 A). Por otro lado, a los 10 meses de edad, la leptina disminuyó la ingesta de alimentos únicamente en hembras  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  ( $p = 0.019$ ), mientras que los ratones  $lacDrd2KO$  fueron insensibles al tratamiento con leptina exógena (Figura 32 B) indicando que la sensibilidad a la leptina se encontraba disminuida en hembras hiperprolactinémicas 10 meses de edad.



**Figura 32:** A los 10 meses de edad, la leptina redujo la ingesta de alimentos de manera más eficiente en hembras control  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  en comparación con las hembras  $lacDrd2KO$ . Ingesta de alimentos (en gramos) durante 1 hora post ayuno prolongado y tratamiento agudo con leptina i.p (2.5 mg / kg de peso corporal) o administración de PBS en ratones  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  y  $lacDrd2KO$  a los A) 5 y B) 10 meses de edad.  $N = 4, 4, 4, 4$  y  $7, 7, 6, 6$  para ratones  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  y  $lacDrd2KO$ , respectivamente. \*  $P \leq .05$  vs animales inyectados con PBS de igual edad y genotipo.

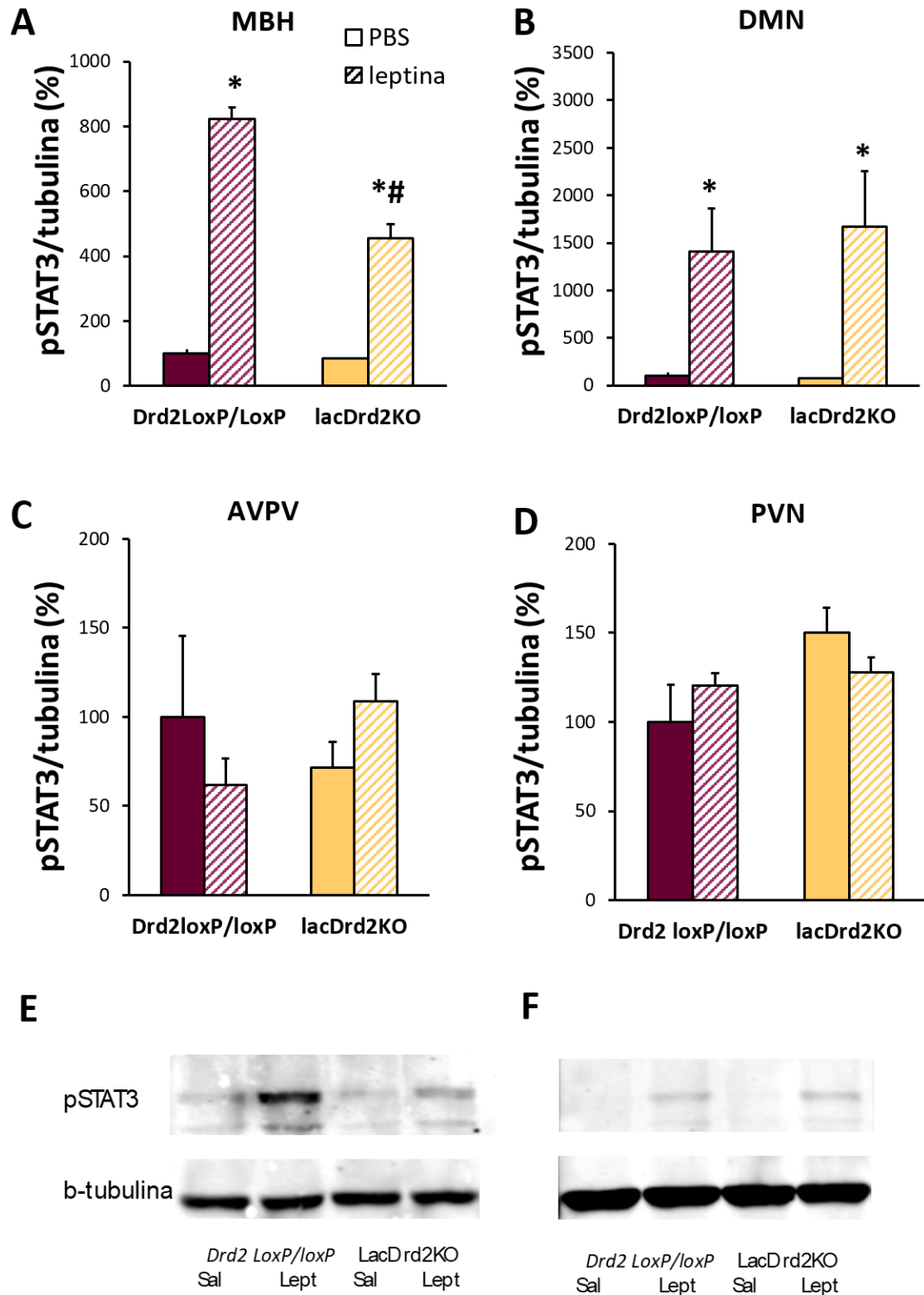
Tras el ayuno de 16 horas, los ratones  $lacDrd2KO$  perdieron más peso que los ratones  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  a los 5 y 10 meses de edad (en gramos:  $1.33 \pm 0.03$  y  $1.76 \pm 0.04$  para ratones de 5 meses; y  $2.57 \pm 0.09$  y  $3.39 \pm 0.10$  para ratones  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  y  $lacDrd2KO$  de 10 meses de edad,  $p = 0.001$  y  $0.022$ , respectivamente).

La fosforilación de STAT3 inducida por leptina, se evaluó por western blot tras un ayuno prolongado de 16 horas y dos horas post inyección de leptina. Se utilizaron hembras de 10 meses, porque previamente observamos que la insensibilidad a la leptina se evidenciaba a esta edad. En concordancia con los resultados anteriores, observamos una respuesta robusta a la leptina en el MBH de hembras  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  y la respuesta fue significativamente menor en los ratones  $lacDrd2KO$



(interacción genotipo X tratamiento,  $F_{1,18} = 17.06$ ,  $P = 0.006$ ; y prueba post hoc de Fisher para efectos simples *Drd2*<sup>LoxP/LoxP</sup> leptina vs. lacDrd2KO leptina  $P \leq 0.0005$ ; Figura 33 A). Por otro lado, en el DMN, el nivel de pSTAT3 inducido por leptina fue similar en ambos genotipos (la interacción genotipo X tratamiento no fue significativa, y el pde tratamiento  $p = 0,011$ ; Figura 33 B) indicando sensibilidad conservada a la acción de dicha hormona. Finalmente, en el PVN y AVPV no se obtuvo ningún aumento en los niveles de activación de la señalización de leptina en ninguno de los dos genotipos lo que sugiere que dichos núcleos no responden a leptina en las condiciones estudiadas (Figuras 33 C y D).

En conjunto, todos estos resultados indicaron que el fenómeno de desensibilización a leptina es núcleo específico.



**Figura 33: pSTAT3 inducido por leptina en núcleos hipotalámicos de ratones hembra *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 10 meses de edad.** Después de un período de ayuno de 16 horas, se inyectó leptina (1 mg / kg peso corporal) o PBS, y dos horas después se obtuvieron y congelaron los cerebros. Los núcleos hipotalámicos se microdisecionaron, y el pSTAT3 se midió mediante western blot. A) N = 7,5,5,6 para MBH, B) N = 3,3,2,4 para DMN, C) N = 3,5,2,5 para AVPV y D) N = 3,4,4,4 para PVN. \* P ≤ 0.05 vs. animales inyectados con PBS del

*mismo genotipo. #  $P \leq 0.05$  ratones  $Drd2^{LoxP/LoxP}$  inyectados con leptina. E-F) Imágenes representativas de las membranas de western blot obtenidas para el MBH reveladas con anticuerpo anti pSTAT3 y anti b-tubulina.*

## DISCUSIÓN

En el sistema nervioso central, las hormonas lactogénicas, prolactina y lactógeno placentario, regulan una coordinada red neuronal que prepara al cerebro materno para dos momentos de gran demanda metabólica, la preñez y la lactancia. Cabe destacar que muchas de las acciones a nivel del sistema nervioso central atribuidas a la prolactina, pueden ser inducidas por el lactógeno placentario, dado que ambas activan el PRLR.

La prolactina, inicia el comportamiento maternal actuando a nivel del POA (Bridges & Grattan 2018; Sjoeholm *et al.* 2011), modula la respuesta al estrés y la secreción de oxitocina actuando sobre las neuronas del PVN (Donner *et al.* 2007), controla su propia secreción activando las neuronas TIDA (Ma *et al.* 2005), y regula la ingesta y el gasto energético actuando a nivel de los núcleos ARC, VMN y DMN (Augustine *et al.* 2008; Ladyman *et al.* 2010; Bi *et al.* 2012a; Nagaishi *et al.* 2014). Estos núcleos hipotalámicos que coordinan las necesidades fisiológicas y metabólicas durante la preñez y la lactancia, son posibles blancos de los efectos de la hiperprolactinemia patológica.

En el presente capítulo, nos propusimos estudiar los efectos de la hiperprolactinemia crónica sobre los niveles de expresión génica en núcleos hipotalámicos específicos y la acción anorexigénica de la leptina a nivel central. Nos centramos en el estudio del ARC, VMN, DMN, PVN y AVPV porque se ha demostrado que expresan *Prlr* y/o *Lepr*, y son vitales en el control del balance energético. Utilizamos ratones hembra *lacDrd2KO* con delección específica de RD2 en lactotropos lo que evoca un fenotipo hiperprolactinémico y obeso. Por un lado, estudiamos los niveles de pSTAT5 y pSTAT3 en respuesta a prolactina y leptina, respectivamente, a los 10 meses de edad y los niveles de expresión de genes hipotalámicos que participan del control de la ingesta y el gasto energético a los 5 y 10 meses para caracterizar la progresión del fenotipo metabólico observado.

Como se detalló en el capítulo 1, a los 5 meses, los niveles séricos de prolactina y los niveles de ingesta, se encuentran significativamente elevados en hembras *lacDrd2KO* con alimentación *ad libitum*. Si bien a esta edad se establece un fenotipo hiperfágico, la obesidad no es evidente ya que el peso corporal aumenta solo marginalmente. A los 10 meses de edad, desarrollan obesidad mórbida, tienen depósitos de tejido adiposo gonadal, mesentérico y pardo más pesados, y mayores niveles de leptina e insulina séricos

En primer lugar, demostramos que, niveles de prolactina endógenos crónicamente elevados actúan de forma continua sobre el ARC, VMN y DMN de hembras *lacDrd2KO* de 10 meses de edad, resultado que se evidenció como un aumento basal de marca nuclear para pSTAT5 en dichos núcleos

hipotalámicos. Se han encontrado resultados similares en otros modelos experimentales de prolactina sérica alta o modelos de obesidad. Por ejemplo, se detectó marca basal alta de STAT5 fosforilada en el ARC, VMN y PVN de hembras preñadas (Ladyman *et al.* 2012), en el ARC, POA, AVPV y VMN de ratones alimentados con dieta rica en grasa (Buonfiglio *et al.* 2016) y en el ARC, VMN y DMN de hembras lactantes (Brown *et al.* 2011; Anderson *et al.* 2006), indicando similitudes y diferencias en el patrón espacial de activación basal de STAT5 en las diferentes situaciones fisiológicas estudiadas, con alta prolactina sérica o exposición a dieta rica en grasas.

En nuestro modelo experimental, en el que coexisten un fenotipo de obesidad mórbida con altos niveles de prolactina séricos, el aumento de fosforilación de STAT5 en respuesta a una sobrecarga de prolactina exógena se mantuvo en el ARC, indicando una capacidad de señalización intacta, a pesar de los altos niveles de prolactina endógenos basales. La respuesta a prolactina reducida en el VMN concuerda con lo observado en hembras alimentadas con dieta rica en grasa, en donde se observa una desensibilización a un estímulo de prolactina no solo en el VMN sino también en el POA, núcleo AVPV y ARC (Buonfiglio *et al.* 2016). Por otro lado, esta capacidad de respuesta atenuada a la prolactina no se observó en ratones *Ob/ob*, ratones obesos incapaces de sintetizar leptina, lo que sugiere que la leptina estaría involucrada en los mecanismos de resistencia a prolactina (Buonfiglio *et al.* 2016).

En este contexto, nos propusimos estudiar el impacto de la acción constante de los elevados niveles de prolactina endógena sobre el perfil de expresión sitio específico de factores hipotalámicos orexigénicos y anorexigénicos (*Npy*, *Agrp*, *Pomc*, *Cart*, *Bdnf*) genes involucrados en el control del metabolismo tales como *Prlr*, *Insra*, *Lepr*, y mediadores de la señalización de insulina y leptina como son *Foxo1*, *TrkB*, y *Gk*, en el ARC, VMN y DMN de hembras lacDrd2KO y control *Drd2<sup>LoxP/LoxP</sup>* de 5 y 10 meses de edad.

Evidencia previa muestra que el *Npy* estimula la ingesta de alimentos en el hipotálamo y se expresa principalmente en el ARC y en el DMN (Kamiji & Inui 2007). Por otro lado, BDNF y CART son dos potentes factores anorexigénicos, BDNF y su receptor TrKB son fundamentales para generar saciedad (Xu *et al.* 2003), y la pérdida de señalización BDNF-TRKB produce obesidad tanto en humanos como en ratones (Cordeira & Rios 2011; Lebrun *et al.* 2006). *Cart* inhibe la ingesta de alimentos y se co-expresa con *Pomc* en un subconjunto de neuronas del ARC (Lau & Herzog 2014). Otros genes metabólicos tales como *Gk*, *Insra* y el factor de transcripción *Foxo1* cumplen un rol central en el mantenimiento de la homeostasis metabólica. La *Gk* en el hipotálamo participa de los mecanismos de detección de glucosa y de la activación de respuestas para revertir una condición de hipoglucemia (Roh *et al.* 2016). Por otro lado, se ha descrito que el *Insra* hipotalámico puede mediar la saciedad

(Bellinger & Bernardis 2002), posiblemente modulando la vía de señalización AKT- FOXO1 (Jeon *et al.* 2016). FOXO1 actúa en el VMN regulando la acción de leptina e insulina en este subconjunto de neuronas. (Kim *et al.* 2012).

Observamos que la activación constante de STAT5 inducida por prolactina endógena en núcleos hipotalámicos específicos, impacta sobre los niveles de expresión de ciertos genes orexigénicos, lo que finalmente, podría explicar el aumento en los niveles de ingesta y provocar eventualmente, resistencia a leptina. Los cambios en los niveles de expresión génica registrados en nuestro modelo en respuesta a los niveles de prolactina crónicamente elevados, no ocurrieron al mismo tiempo, ni se dieron en todos los núcleos hipotalámicos estudiados, sino más bien, se trataron de cambios espacio y tiempo-dependientes. A los 5 meses de edad, cuando las hembras no son obesas, pero tienen niveles de ingesta significativamente aumentados, se observa un aumento en los niveles de expresión de *Prlr* en el ARC. Sin embargo, contrariamente a lo que habíamos esperado, no se observa aumento en los niveles de expresión de *Npy* o *Agrp*, o una disminución de los niveles de *Pomc*, cambios que podrían haber explicado el incremento en los niveles de ingesta registrado a esta edad. Por esta razón, esto podría estar indicando que en este punto, la prolactina actúa por fuera del ARC para estimular el apetito, como, por ejemplo, sobre el PVN (Sauve & Woodside 2000), o que la acción anorexigénica de la leptina a nivel central, previene el aumento del peso corporal ya que a esta edad demostramos que la leptina sigue siendo capaz de suprimir la ingesta de alimentos en las hembras *lacDrd2KO*. El aumento en los niveles de expresión de *Npy* y *Agrp* en el ARC se hace evidente a los 10 meses de edad en concordancia con la aparición de un fenotipo de obesidad mórbida y podría estar relacionado con el desarrollo de resistencia a leptina a nivel de este núcleo. Por otra parte, el efecto de la hiperprolactinemia sobre el *Agrp* concuerda con el aumento de *Agrp* en el ARC descrito durante la lactancia (Chen *et al.* 1999) aunque es más probable que el efecto sea indirecto ya que las neuronas NPY/AgRP no expresan PRLR (Ladyman *et al.* 2017).

Finalmente encontramos que los niveles de *Npy* están aumentados en el DMN de hembras *lacDrd2KO* de 10 meses de edad lo que concuerda con evidencia previa obtenida en ratas lactantes (Chen & Smith 2004). Se han encontrado PRLR en las neuronas NPY de éste núcleo (Chen & Smith 2004) posicionándolo como posible blanco de la acción de la prolactina (Chen & Smith 2004).

Se ha demostrado que *Npy* tiene un rol pleiotrópico crítico en la regulación del peso corporal afectando, los niveles de ingesta, la adiposidad, y el gasto energético por termogénesis y actividad física. Se propone que el DMN controla los niveles de ingesta dado que cuando es lesionado en ratas, se observa hipofagia y pérdida de peso (Bellinger & Bernardis 2002). Asimismo, el *knockdown* de *Npy* específicamente en el DMN por medio de la técnica de siRNA reduce el tamaño de los depósitos de

tejido adiposo en ratas alimentadas con alimento regular y previene la hiperfagia, obesidad y la alteración de la homeostasis de la glucosa inducidas por una dieta rica en grasa. Además de su participación en la regulación de la ingesta de alimentos, las neuronas NPY del DMN tienen un papel importante en la termorregulación, regulando el gasto energético, ya que participan del desarrollo y del control de la actividad termogénica del tejido adiposo pardo a través de conexiones simpáticas (Bi *et al.* 2012b; Zhang *et al.* 2011). En particular, el aumento de *Npy* a nivel central suprime la actividad simpática en el tejido adiposo marrón interescapular en ratas resultando en termogénesis reducida (Egawa *et al.* 1991). Evidencia previa muestra que el *knockdown* de *Npy* en el DMN potencia la respuesta termogénica frente a la exposición a un ambiente frío, aumenta la actividad locomotora, mejora la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a insulina, y previene la hiperfagia. Por otro lado, se ha demostrado que la eliminación de *Npy* del DMN, induce el desarrollo de adipocitos *beige* en tejido adiposo blanco subcutáneo y una expresión elevada de *Ucp1* en tejido adiposo pardo interescapular e inguinal, siendo ambos eventos responsables de promover la termogénesis (Chao *et al.* 2011) lo que correlaciona con menos adiposidad, y previene la obesidad inducida por la dieta rica en grasa.. Del mismo modo, en las hembras *lacDrd2KO* obesas, la expresión de *Npy* en el DMN aumentó en correlación con la disminución de los niveles de ARNm de *Ucp1* en el tejido adiposo pardo, lo que sugiere una termogénesis defectuosa, que podría contribuir al aumento de peso observado.

Proponemos que el aumento de los niveles de expresión de *Npy* inducido por la hiperprolactinemia en el DMN puede ser un factor causal del aumento de la ingesta de alimentos y la disminución de la expresión de *Ucp1* observada en la grasa parda de hembras *lacDrd2KO* de 10 meses de edad. Por otro lado, a pesar de que se ha establecido que las neuronas que expresan *Npy* en el DMN son capaces de regular la termogénesis a través de la activación simpática (Bi *et al.* 2012b; Zhang *et al.* 2011; Egawa *et al.* 1991) no se puede descartar un efecto directo de la prolactina sobre los adipocitos marrones (Viengchareun *et al.* 2004). Asimismo, es conocido que la prolactina participa del desarrollo del tejido adiposo marrón en roedores (Viengchareun *et al.* 2008), pero también la falta de señalización de prolactina se asocia con focos masivos de adipocitos *beige*, que expresan *Ucp1* y tienen capacidad termogénica, en grasa perirrenal y subcutánea en ratones alimentados con dieta rica en grasa (Auffret *et al.* 2012).

Estos datos sugieren que niveles crónicamente elevados de prolactina modifican gradualmente la expresión de factores orexigénicos en el ARC y el DMN siendo estos cambios probablemente responsables de mantener la elevada ingesta de alimentos y alterar el balance energético conduciendo al desarrollo de obesidad. Observamos que, a los 10 meses de edad, hembras *lacDrD2KO* desarrollan un fenotipo de obesidad mórbida y tienen aumentados los niveles de expresión

de los genes orexigénicos *Npy* y *Agrp* en presencia de hiperleptinemia indicando que el ARC desarrolla resistencia a la leptina, aunque se evidenció que sigue respondiendo a la prolactina. El hecho de que la leptina no haya logrado reducir la ingesta de alimentos a esta edad, en correlación con una respuesta a leptina atenuada evidenciada a través de una menor fosforilación de STAT3 en el MBH, aunque no en el DMN, confirmaron la resistencia central a dicha hormona.

Estos resultados apuntan a una interacción de las respuestas a prolactina y leptina. El deterioro de la acción de la leptina en núcleos hipotalámicos se ha descrito para la mayoría de los modelos hiperprolactinémicos, y se propone que en hembras preñadas permite garantizar una ingesta adecuada de alimentos. En ratones y ratas preñadas, se demostró resistencia a la leptina en el VMN (Ladyman *et al.* 2012; Ladyman & Grattan 2004; Ladyman & Grattan 2005). En ratas con infusión crónica de prolactina, se observó una desensibilización a la leptina en VMN y PVN (Naef & Woodside 2007). Además, la inyección de prolactina también desensibilizó la acción de la leptina en ratas pseudopreñadas en VMN y ARC pero no en PVN (Kim *et al.* 2012; Augustine & Grattan 2008). La resistencia a la leptina es la principal responsable del aumento de adiposidad en humanos, y muchos modelos experimentales de obesidad muestran hiperleptinemia y baja respuesta central a dicha hormona, posiblemente provocada por la activación persistente del LepR. Por ejemplo, se ha observado una respuesta alterada a leptina en modelos de obesidad inducida por una dieta rica en grasas (Lin *et al.* 2000), en ratones obesos *ARC-Pomc* *-/-* (Chhabra *et al.* 2016) y en obesidad relacionada con la edad (Lin *et al.* 2000). Particularmente en los modelos de obesidad inducida por la dieta, se observó una disminución de la respuesta a la leptina en el ARC y no en otros núcleos hipotalámicos como el DMN y el VMN (Munzberg *et al.* 2004; Enriori *et al.* 2007). Esto demuestra que, los mecanismos que subyacen a la resistencia a leptina en el embarazo y obesidad son diferentes. Si bien numerosos trabajos demuestran que durante el embarazo se observa resistencia a leptina a nivel del VMN, los modelos de obesidad desarrollan resistencia a leptina mayormente en el ARC.

Los resultados de este capítulo son relevantes para comprender las alteraciones metabólicas observadas en pacientes con niveles de prolactina séricos crónicamente altos, como los encontrados en pacientes con prolactinomas o tratados con medicamentos psiquiátricos que antagonizan los receptores de dopamina. También destacan que las respuestas a estímulos fisiológicos o farmacológicos a nivel central son núcleo específicas, evidenciando la complejidad que subyace al proceso de regulación del balance energético.



# CAPÍTULO 3

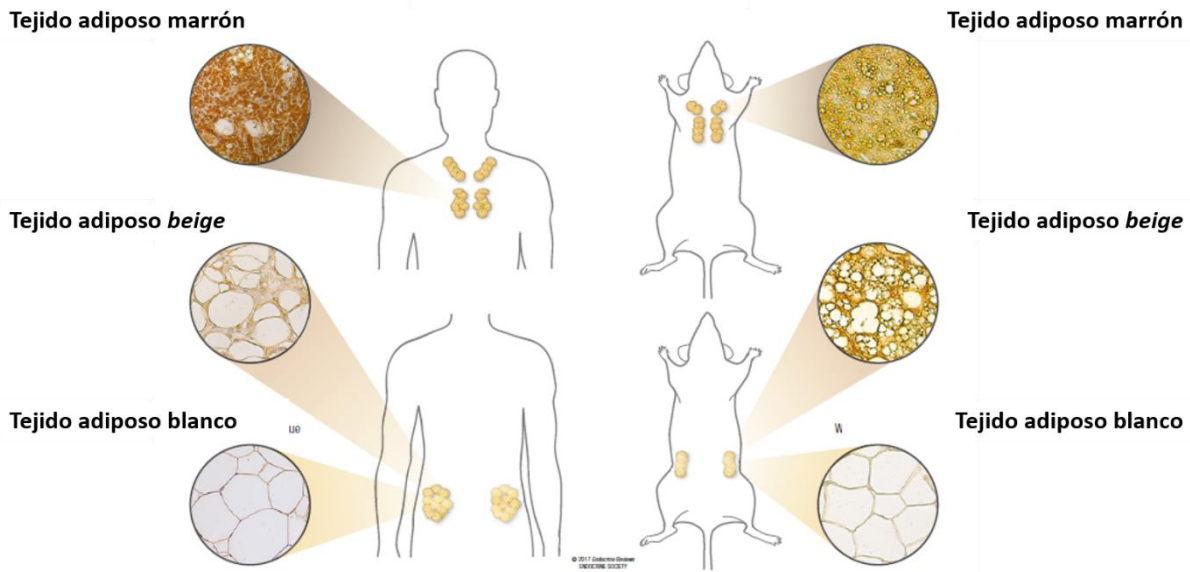
Caracterización del impacto metabólico de la exposición a una dieta rica en grasa en un contexto de hiperprolactinemia

## INTRODUCCIÓN

La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa producto de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto calórico, y supone un riesgo para la salud ya que aumenta la probabilidad de aparición de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2. La obesidad se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más graves del siglo XXI. Su prevalencia ha aumentado a un ritmo alarmante resultando en una epidemia que no solo afecta a los países de altos ingresos, sino que también a los de ingresos medianos y bajos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año mueren cerca de 2,8 millones de personas a causa de obesidad y sobrepeso, lo que exige el desarrollo de estrategias novedosas para enfrentar este problema creciente de manera inminente. En este contexto, surgieron numerosas líneas de investigación en torno al tejido adiposo en busca de posibles dianas terapéuticas

### CARACTERIZACIÓN DE LOS DEPÓSITOS DE TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es un órgano de función central en el control del balance energético por su rol en el metabolismo glucídico y lipídico, así como por su función endócrina. A diferencia de otros órganos, el tejido adiposo se divide en depósitos discretos, anatómicamente distintos, que se distribuyen por todo el organismo (Figura 34). Estudios recientes muestran que los depósitos de tejido adiposo son heterogéneos, están compuestos por adipocitos que derivan de precursores diferentes lo que se traduce en importantes diferencias funcionales en lo referido a la regulación del metabolismo.



**Figura 34.** Ejemplo de ubicaciones anatómicas e inmunomarca para UCP1 de depósitos de tejido adiposo en humanos y ratones de histomorfología y función diferente. Panel izquierdo, arriba: Tejido adiposo pardo humano tomado de biopsia de la región supraclavicular de un paciente con quemaduras. Se caracteriza por tener una morfología multilocular y una mayor marca para la proteína UCP1. En el medio: beiging en tejido adiposo blanco subcutáneo, conduce a la formación de adipocitos beige de aspecto multilocular que expresan Ucp1. Abajo: Tejido adiposo blanco humano tomado de depósito abdominal subcutáneo, formado por adipocitos de morfología unilocular sin marca para UCP1. Panel derecho, arriba: Tejido adiposo pardo de ratón adquirido de la región interescapular con adipocitos de morfología multilocular y aumento de la marca para Ucp1. Medio: beiging en tejido adiposo blanco subcutáneo inguinal. Abajo: Tejido adiposo blanco de ratón obtenido del depósito subcutáneo inguinal con adipocitos de morfología unilocular y sin inmunomarca para la proteína UCP1. Tomado y modificado de (Abdullahi & Jeschke 2017).

En líneas generales, es posible dividir a los depósitos de tejido adiposo en dos grandes grupos con características topográficas, morfológicas y funcionales distintas: tejido adiposo pardo (y tejido adiposo blanco). El tejido adiposo pardo se compone de adipocitos de morfología multilocular, ricos en mitocondrias que le otorgan la capacidad de generar de calor a través de la expresión de *Ucp1* (Schoettl *et al.* 2018). Los adipocitos blancos que componen el tejido adiposo blanco se caracterizan por tener una morfología unilocular y contenido mitocondrial reducido. A diferencia de lo que sucede con el pardo, la baja densidad mitocondrial y la falta de expresión de *Ucp1* facilita el almacenamiento del exceso de energía en forma de triglicéridos.

## Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco es el principal sitio de almacenamiento de energía y juega un papel importante en el aislamiento térmico, así como en la protección contra daños mecánicos (Frayn *et al.* 2003). Es un tejido plástico pues, en períodos de abundancia calórica, acumula el exceso de energía, almacenando ácidos grasos libres en la forma de triglicéridos a través de su esterificación a glicerol, y los libera a la circulación en los tiempos de deficiencia energética (Galic *et al.* 2010). Hoy en día se encuentra ampliamente aceptada la idea del tejido adiposo como un órgano endócrino dinámico, fundamental para la regulación del metabolismo. El adipocito expresa receptores asociados con el control del balance energético y produce numerosas adipoquinas, hormonas y péptidos relacionados a la regulación del apetito. Entre ellos se encuentran adiponectina, resistina, leptina, interleuquina-6, los cuales actúan como reguladores del metabolismo lipídico de manera autocrina/paracrina (Breton 2013; Galic *et al.* 2010).

En general, se diferencian dos depósitos principales de tejido adiposo blanco: el tejido adiposo subcutáneo y el visceral, aunque también existen depósitos de tejido adiposo más pequeños de distinta morfología, que incluyen el tejido adiposo dérmico y el tejido adiposo asociado a la médula ósea. El tejido adiposo blanco subcutáneo se subdivide en anterior y posterior en roedores, que se aproxima anatómicamente a la grasa subcutánea de la parte superior e inferior del cuerpo en humanos. Los principales depósitos adiposos viscerales incluyen los que rodean el corazón (epicárdico/pericárdico) y los órganos intra abdominales, entre los que se encuentran el mesentérico y el gonadal. (mesentérico, omental, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal) tanto en humanos como en roedores.

Se ha descrito que el tejido adiposo visceral y el subcutáneo presentan numerosas diferencias anatómicas, celulares y moleculares y son los depósitos de tejido adiposo de mayor tamaño (Luong *et al.* 2019). Las funciones metabólicas del tejido subcutáneo y el visceral han sido bien estudiadas. La acumulación de grasa visceral, también descrito como obesidad central, se asocia con resistencia a la insulina y un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad metabólica, mientras que la obesidad periférica por exceso de acumulación de tejido adiposo subcutáneo, puede incluso proteger del síndrome metabólico (Ghaben & Scherer 2019) (Fox *et al.* 2007) (Kissebah *et al.* 1982) (Gastaldelli *et al.* 2002) (Zhang *et al.* 2015).

El tejido adiposo visceral es un tejido metabólicamente muy activo. Se han caracterizado dos tipos de tejido adiposo visceral: el mesentérico y el gonadal. El primero se encuentra envolviendo al intestino, el segundo se extiende desde la parte inferior del estómago, recubriendo el abdomen. El

tejido adiposo visceral posee receptores para glucocorticoides, con lo cual, se trata de un tejido sensible a los efectos lipolíticos de las catecolaminas, lo que le otorga una gran capacidad de movilización de ácidos grasos. Desde el punto de vista vascular, está sujeto a drenaje portal, con lo cual los ácidos grasos que se liberan por lipólisis llegan directamente al hígado, constituyendo así un aporte directo de energía para el metabolismo general (Pou *et al.* 2007). Sin embargo, un exceso de liberación de ácidos grasos desde el tejido adiposo visceral al hígado, también predispone al desarrollo de resistencia a insulina, esteatosis hepática, hiperinsulinemia, dislipemia e hiperglucemia, de modo que estudios epidemiológicos destacaron que la acumulación de grasa visceral se asocia con un mayor riesgo de alteraciones endocrinas<sup>18</sup>. El tejido adiposo visceral tiene una alta tasa de producción de citoquinas pro inflamatorias como la interleuquina (IL) 6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), así como del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1).

Por otra parte, el tejido adiposo subcutáneo cumple función de aislante térmico y de amortiguación mecánica. Es el mayor productor de leptina y, siendo los niveles séricos de leptina directamente proporcionales al tamaño del depósito de tejido adiposo subcutáneo.

### **Tejido adiposo marrón**

En los últimos años, el tejido adiposo marrón también conocido como grasa parda, ha sido blanco de múltiples investigaciones. En roedores se localiza en las regiones interescapular, perirrenal y periaórtica. En humanos, durante mucho tiempo se consideró que se encontraba en la región interescapular y que desaparecía por completo en la vida adulta. Sin embargo, evidencia reciente obtenida con tomografía de emisión de positrones (PET) demostró que existe grasa parda distribuida típicamente en capas de tejido conectivo que rodean grupos musculares, órganos, y huesos de la porción superior del tórax (Leitner *et al.* 2017).

Se compone de adipocitos con una gran cantidad de mitocondrias, capaces de oxidar energía química (lípidos y glucosa) para producir calor, otorgándole capacidad termogénica. Este fenómeno que se activa en ambientes fríos y permite proteger contra la hipotermia, depende principalmente de la presencia de UCP1, proteína que desacopla la cadena de transporte de electrones para generar calor en lugar de sintetizar ATP. Se trata de un tejido innervado por el sistema nervioso simpático y muy vascularizado, lo que permite la llegada de oxígeno y el transporte de calor (Subramanian *et al.* 2004).

Dada su función termogénica, el tejido adiposo pardo es responsable de un gran gasto energético que contribuye significativamente al balance energético en modelos de roedores

(Nedergaard *et al.* 2007) (Nicholls 1983) (Hamann *et al.* 1996) (Bartelt *et al.* 2011) (Enerback 2010) (Nedergaard & Cannon 2010). Recientemente, se ha propuesto que los adultos humanos muestran distintos porcentajes de tejido pardo activo (Cypess *et al.* 2009) (Stephens *et al.* 2011) (Seale & Lazar 2009) (Tseng *et al.* 2010), principalmente porque la función de dicho tejido disminuye con la edad (Seale & Lazar 2009) (Tseng *et al.* 2010) (Cypess *et al.* 2009) (Pfannenberger *et al.* 2010). La caída de actividad observada en este depósito de tejido adiposo podría estar vinculada con un desbalance metabólico y con un mayor aumento de peso durante la vejez.

### **Perfil de expresión génica**

Aunque los depósitos de tejido adiposo blanco y pardo ejercen funciones opuestas en términos energéticos, comparten la mayoría de los genes involucrados en la diferenciación de adipocitos y en el metabolismo lipídico. Si bien durante mucho tiempo se creyó que *Ucp1* era el único gen que se expresa específicamente en grasa parda, recientemente se ha demostrado que, en ratones el gen activador de muerte celular (*Cidea*) está altamente expresado en adipocitos marrones y *beige* pero no se expresa en adipocitos blancos.

Los ratones *knockout* para *Cidea* tienen un mayor gasto energético y un metabolismo lipídico muy activo, particularmente tienen lipólisis potenciada. Además, tienen un fenotipo delgado y desarrollan resistencia a obesidad inducida por exposición a dietas ricas en grasa. Se conoce que una de las funciones de *Cidea in vivo* es modular la actividad de *Ucp1*. Dado que *Ucp1* está presente en exceso en las mitocondrias del tejido adiposo pardo, *Cidea* contribuye a enmascarar la actividad de *Ucp1* en condiciones fisiológicas. Alternativamente, la pérdida de inhibición de *Cidea* estimula la lipólisis y la generación de calor, lo que conduce al agotamiento rápido de las reservas de grasa y a un fenotipo delgado impidiendo el desarrollo de obesidad. Basándonos en estos datos, CIDEA es la primera proteína caracterizada en el tejido adiposo pardo capaz de modular la actividad de *Ucp1* y potencialmente ser responsable de contribuir al desarrollo de la obesidad y diabetes (Zhou *et al.* 2003).

El coactivador transcripcional PGC1 $\alpha$  juega un papel crucial en la regulación de la termogénesis inducida por frío en el tejido adiposo pardo (Puigserver *et al.* 1998). Frente a la exposición a bajas temperaturas, se une y coactiva a numerosos factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo de ácidos grasos (Chang *et al.* 2018). El aumento de la expresión de esta proteína en adipocitos blancos no solo

aumentó los niveles de expresión de *Ucp1* y genes que codifican para proteínas de la cadena respiratoria, sino que también indujo el aumento de contenido de ADN mitocondrial de las células sugiriendo mayor mitocondriogénesis. De esta forma, PGC1 $\alpha$  pareciera comportarse como un factor que otorga capacidad termogénica en respuesta a estímulos B-adrenérgicos gatillados por exposición a ambientes fríos. Ratones *knockout* para *Pgc1 $\alpha$*  tienen alterada su capacidad termogénica dada su incapacidad de inducir genes termogénicos en respuesta a estimulación adrenérgica (Lin *et al.* 2004). A pesar de su importancia en la termogénesis adaptativa, PGC1 $\alpha$  no es un regulador maestro de la termogénesis en tejido adiposo pardo *per sé* dado que ratones *knockout* para este gen tienen depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo con *foci* de adipocitos *beige* de morfología normal (Kleiner *et al.* 2012). La diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos marrones maduros tampoco pareciera estar alterada (Uldry *et al.* 2006). Por esta razón si bien PGC1 $\alpha$  es un regulador esencial de la termogénesis adaptativa, no pareciera ser un factor indispensable para el desarrollo de adipocitos marrones o *beige*.

### **Plasticidad del tejido adiposo blanco: *beiging***

Si bien durante mucho tiempo se consideró que el tejido adiposo pardo podía encontrarse únicamente en la región interescapular de algunos mamíferos, como los roedores, o en bebés recién nacidos, evidencia reciente demuestra que ciertos estímulos tales como el estrés, exposición a frío o dieta rica en grasa, conducen también a la aparición de células con capacidad termogénica distribuidas discretamente en los depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo (Wu *et al.* 2012) (Carey *et al.* 2014) (Sidossis & Kajimura 2015).

El proceso de transdiferenciación por el cual adipocitos blancos adoptan fenotipo y funcionalidad del tejido adiposo pardo se conoce como *beiging*. En ratones, este fenómeno es característico del tejido adiposo blanco subcutáneo, mientras que, en humanos, se han observado *foci* de células con capacidades termogénicas en el tejido adiposo visceral (Zuriaga *et al.* 2017).

El *beiging* está muy influenciado por factores ambientales, en mayor medida por la temperatura. La cantidad de células con capacidad termogénica puede ser indetectable en roedores expuestos a temperatura termoneutral hasta mayoritaria cuando son expuestos a ambientes fríos. Esto describe al tejido adiposo, no solo como un tejido heterogéneo, sino también plástico. Si bien estas células, conocidas como adipocitos *beige*, presentan características de adipocitos pardos (abundantes mitocondrias, pequeñas gotas de lípidos en citoplasma y capacidad termogénica dada la

expresión de los genes *Ucp1* y *Pgc1α*), comparten progenitor con los adipocitos blancos (*Myf5* negativos) (Seale *et al.* 2008). No obstante, a pesar de las similitudes entre adipocitos marrones y *beige*, estas poblaciones difieren en los niveles de expresión basal de *Ucp1*. En particular, los adipocitos marrones tienen niveles de expresión basal de *Ucp1* mayores que los adipocitos *beige*. Sin embargo, la estimulación con agonistas  $\beta$ -adrenérgicos puede inducir la expresión de *Ucp1* en adipocitos *beige* hasta niveles comparables con los de adipocitos marrones.

### **Plasticidad del tejido adiposo pardo: whitening**

La exposición al frío agranda el tamaño del depósito de tejido adiposo pardo por combinación de procesos hipertróficos e hiperplásicos (Cairo *et al.* 2019; Rothwell & Stock 1997). En estos casos, la hipertrofia no implica una simple acumulación de grasa, sino que involucra una mayor cantidad de adipocitos termogénicos funcionales. Por el contrario, la exposición de roedores a temperatura termoneutral (situación en la cual la producción de calor por parte de la grasa parda no es necesaria) o dieta hipocalórica, resulta en la atrofia de dicho depósito de tejido (Desautels & Himms-Hagen 1980; Patel *et al.* 1987; Villarroya *et al.* 1986a). La plasticidad del tejido adiposo pardo también se evidencia durante el ciclo reproductivo, hembras lactantes experimentan una marcada atrofia de los depósitos que se recupera después del destete (Trayhurn *et al.* 1982; Villarroya *et al.* 1986b). En especies que hibernan, se producen ciclos de hipertrofia/atrofia de la grasa parda que concuerdan con las etapas de hibernación y actividad (Ballinger & Andrews 2018).

A pesar de que se conoce poco acerca de la plasticidad del tejido adiposo pardo en respuesta a estímulos ambientales en humanos, estudios de PET han demostrado que la cantidad de tejido adiposo pardo disminuye con la edad (Cypess *et al.* 2009) y que la actividad del tejido es muy baja en pacientes obesos o diabéticos (Lee *et al.* 2010; Leitner *et al.* 2017). Asimismo, existe una correlación inversa entre la cantidad de tejido activo y el índice de masa corporal (Cypess *et al.* 2009).

Como describimos previamente, el tejido adiposo pardo es un órgano altamente vascularizado con abundantes mitocondrias que producen calor gracias a la presencia de UCP1, una proteína que desacopla la cadena respiratoria. Si bien evidencia previa demuestra que la obesidad está asociada a una reducción de la función de dicho tejido, los mecanismos por los cuales la obesidad genera un tejido disfuncional eran, hasta hace poco tiempo, desconocidos. Recientemente, se demostró que la obesidad inducida por dieta promueve la remodelación de la vasculatura (rarefacción capilar) que irriga al tejido adiposo pardo lo que conduce a un estado de hipoxia y resulta en una disminución de la capacidad termogénica del tejido. Este nuevo mecanismo propuesto de pérdida de función se



caracteriza por disminución de la señalización B adrenérgica, pérdida y disfunción mitocondrial y recibe el nombre de *whitening* dado que los depósitos de tejido adiposo pardo adoptan un fenotipo similar al del tejido adiposo blanco como consecuencia de la acumulación de gotas lipídicas de gran tamaño en el citoplasma de los adipocitos pardos. Es de destacar que el mayor contenido lipídico aumenta el peso de los depósitos de grasa parda.

La eliminación dirigida de *Vegf* en el tejido adiposo de ratones no obesos dio como resultado *whitening* de la grasa parda, lo que respalda evidencia previa que indica que el papel de la disminución de la vascularización está asociada a la obesidad (Shimizu *et al.* 2014). Por el contrario, la inducción de *Vegf* específicamente en el tejido adiposo pardo de ratones obesos normalizó la vascularización, revirtió la disfunción de los adipocitos pardos y mejoró la sensibilidad a insulina. La rarefacción capilar en este tejido provocada por la obesidad o la ablación de *Vegf* disminuyó la señalización  $\beta$ -adrenérgica, redujo la expresión de genes de expresión mitocondrial tales como *Ucp1*, aumentó la producción de ROS mitocondriales e indujo mitofagia, proceso definido como la remoción de mitocondrias por mecanismos de autofagia (Shimizu *et al.* 2014).

En conclusión, todos estos resultados relacionan al *whitening* con el desbalance energético dado que se asocia a una disminución de la capacidad termogénica del tejido adiposo pardo.

## INDUCCIÓN DE LA CAPACIDAD TERMOGÉNICA COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA

Dada la capacidad del tejido adiposo pardo de disipar la energía química como calor, es lógico imaginar que este tejido juega un papel importante en la regulación del metabolismo. Se ha propuesto que la termogénesis adaptativa en este tejido es crucial como mecanismo fisiológico contra la obesidad y la diabetes tipo 2. En 1979, Rothwell y Stock descubrieron que la sobrealimentación de ratas inducía una mayor termogénesis en los depósitos de grasa parda. Este descubrimiento condujo al concepto de termogénesis inducida por la dieta, indicando que la activación de este tejido en respuesta al exceso de calorías podría disminuir o hasta evitar el sobrepeso.

En este contexto, los primeros trabajos realizados en el área fueron confirmatorios. Se demostró que la denervación del tejido o la ablación genética de *Ucp1* específicamente en adipocitos marrones resultaba en un mayor peso corporal y resistencia a la insulina. Por otra parte, estudios recientes en humanos mostraron que la presencia de células termogénicas que expresan *Ucp1* en la grasa subcutánea, correlaciona negativamente con el aumento de peso y la resistencia a insulina (Wu

*et al.* 2012) (Marken Lichtenbelt *et al.* 2009) (Cypess *et al.* 2009) (Saito *et al.* 2009) (Lee *et al.* 2011), lo que confirma el papel del tejido adiposo pardo y *beige* en el control del balance energético.

Luego, múltiples líneas de investigación comenzaron a trabajar la idea de que un aumento en el número o en la actividad de adipocitos pardos o *beige* con capacidad termogénica podría ser utilizado como una herramienta terapéutica contra la obesidad y la resistencia a insulina. Por ejemplo, se demostró que la sobreexpresión del gen *Ucp1* en el tejido de adiposo blanco de ratones genéticamente obesos, normalizaba el fenotipo (Kopecky *et al.* 1995) y que la estimulación adrenérgica del tejido adiposo aumentaba el número de adipocitos *beige* y consecuentemente protegía contra la obesidad, hipertrigliceridemia y resistencia a insulina inducida por dieta (Kim *et al.* 2005) (Cederberg *et al.* 2001). Es importante destacar que el tejido adiposo blanco tiene la capacidad de reclutar adipocitos con capacidad termogénica tras exposición a ambientes fríos o en respuesta a estimulación adrenérgica, fenómeno que ya hemos descrito como *beiging*. Esto promueve el metabolismo de los triglicéridos almacenados como reservorio energético en tejido adiposo blanco ya que los adipocitos *beige* utilizan lípidos como sustratos para la termogénesis, a expensas de una reducción del tamaño de los depósitos de grasa blanca (Cannon & Nedergaard 2004). Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que el *beiging* en el tejido adiposo blanco facilita la pérdida de peso, corrige la resistencia a insulina y la hiperlipidemia observada en fenotipos obesos (Xue *et al.* 2016; Wang *et al.* 2015; Liu *et al.* 2015). Estos resultados resultan prometedores ya que indicarían que la conversión de adipocitos blancos en adipocitos *beige* termogénicamente activos, podría ser una estrategia contra el aumento de peso y sus desórdenes metabólicos asociados.

## **ROL DE LA AUTOFAGIA EN LA PLASTICIDAD DEL TEJIDO ADIPOSO**

La autofagia es el proceso catabólico a través del cual una célula degrada componentes citoplasmáticos enviándolos hacia lisosomas. Los productos de este proceso pueden ser reciclados para ser utilizados como sustratos para la generación de energía o para sintetizar nuevos componentes celulares.

Un evento inicial clave en el proceso de autofagia es la formación del autofagosoma, una organela única de doble membrana que envuelve los componentes citosólicos destinados a la degradación. La iniciación de la formación del autofagosoma está mediada por la proteína quinasa ULK-1. La forma activa de ULK-1 fosforila directamente a Beclin-1, el componente central del primer complejo proteico de autofagia, promoviendo el inicio del proceso (Nazarko & Zhong 2013). Luego, los autofagosomas

formados se fusionan con lisosomas/endosomas que permiten que el contenido del autofagosoma sea degradado por enzimas lisosomales (Eskelinen *et al.* 2002). Las proteínas de membrana asociadas a lisosoma Lamp-1 y Lamp-2, componentes proteicos mayoritarios de la membrana lisosomal, no solo son esenciales para mantener la integridad de la estructura del compartimiento lisosomal, sino que también son requeridas para la fusión del lisosoma y el fagosoma (Huyhn *et al.* 2007). Esto se explica porque modelos *knockout* para estas proteínas acumulan cantidades anormales de autofagosomas en numerosos tejidos (Eskelinen *et al.* 2002).

Existe autofagia basal en prácticamente todos los tipos celulares y su función es la de mantener la homeostasis celular degradando proteínas u organelas dañadas. Sin embargo, la autofagia también puede inducirse como un mecanismo adaptativo para superar diferentes tipos de estrés celular, o como un mecanismo de remodelación que altera la composición intracelular de proteínas y organelas permitiendo la plasticidad celular [13].

La relación entre el metabolismo del tejido adiposo y la autofagia se ha vuelto un área que despierta mucho interés desde la caracterización de dos procesos de autofagia selectiva exclusivos del tejido adiposo: lipofagia y mitofagia. Más aún, alteraciones en el proceso de autofagia son potenciales causas de desórdenes metabólicos tales como obesidad y diabetes (Baerga *et al.* 2009) (Singh *et al.* 2009) (Rocchi & He 2015; Singh & Cuervo 2012; Zhang *et al.* 2009; Bjorndal *et al.* 2011; Bluher 2013; Scheele & Nielsen 2017; Ghosh *et al.* 2018).

Lipofagia es la eliminación selectiva de lípidos por lisosomas. Se trata de un proceso vital en el metabolismo lipídico ya que participa de la regulación del balance entre la lipogénesis y la lipólisis en el tejido adiposo blanco y pardo (Singh & Cuervo 2012; Martinez-Lopez *et al.* 2016; Zechner *et al.* 2017). La lipogénesis es la formación de gotas lipídicas durante la diferenciación de adipocitos blancos; lipólisis es la secreción de glicerol y ácidos grasos que resulta de la degradación de dichas gotas lipídicas por autofagia (Cingolani & Czaja 2016; Ahmed *et al.* 2018).

Mitofagia es el proceso de autofagia selectiva por el cual se remueven activamente mitocondrias. La activación de dicho proceso celular permite eliminar mitocondrias que han sido dañadas por estrés oxidativo (Ashrafi & Schwarz 2013; Li *et al.* 2015; Taylor & Gottlieb 2017) aunque también permite la plasticidad celular observada en adipocitos que incluye la formación de más gotas lipídicas durante la diferenciación de adipocitos blancos (Gospodarska *et al.* 2015; Altshuler-Keylin & Kajimura 2017) y contribuye al *whitening* de adipocitos. En este último caso, los convierte en adipocitos blancos al remover las mitocondrias frente a la desaparición del estímulo frío. De esta forma, cuando se bloquea la mitofagia en adipocitos blancos, las mitocondrias no pueden ser

degradadas lo que mantiene el fenotipo beige (Altshuler-Keylin & Kajimura 2017; Altshuler-Keylin *et al.* 2016). Estudios clínicos han mostrado una gran acumulación de mitocondrias disfuncionales en personas obesas (Kraunsoe *et al.* 2010; Chattopadhyay *et al.* 2015). Estas observaciones posiblemente sugieran que la mitofagia estaría regulada negativamente por la acumulación excesiva de grasa o por un fenotipo de obesidad mórbida. La mitofagia regula el proceso de adipogénesis, positivamente en adipocitos blancos y negativamente en adipocitos *beige* o marrones, y esta actividad depende del estado nutricional del organismo (Altshuler-Keylin & Kajimura 2017).

Evidencia reciente ha demostrado que ULK1 activa la lipólisis al activar el proceso de autofagia en adipocitos (Ro *et al.* 2013) e induce el proceso de mitofagia (Kundu *et al.* 2008) (Egan *et al.* 2011; Kim *et al.* 2011a).

## PROLACTINA Y OBESIDAD

El peso corporal depende de un delicado equilibrio entre la energía ingerida y la energía total empleada, orquestado por señales nutricionales, neuronales y hormonales. Órganos tales como el cerebro, el páncreas, el hígado y el tejido adiposo pueden integrar señales endógenas o ambientales para garantizar la homeostasis metabólica.

Como discutimos a lo largo de esta tesis doctoral, la prolactina, inicialmente identificada por su capacidad de estimular el desarrollo de la glándula mamaria y la lactancia, ejerce múltiples funciones pleiotrópicas que han sido menos estudiadas entre las cuales se encuentra la homeostasis energética (Goffin *et al.* 2002; Ben Jonathan *et al.* 2008) (Lopez-Vicchi & Becu-Villalobos 2017). Se conoce que la prolactina desempeña un papel clave en la diferenciación del tejido adiposo blanco y también del pardo, siendo éste último responsable de un gran gasto de energía que contribuye significativamente a la regulación del balance energético. De hecho, los ratones con delección del *Prlr* tienen depósitos de tejido adiposo pardo hipotróficos y los pre adipocitos derivados de este tejido no logran diferenciarse en adipocitos pardos maduros. Este fenotipo puede revertirse mediante la expresión ectópica de *Prlr*, lo que demuestra la importancia de la prolactina en el proceso de diferenciación de adipocitos pardos (Viengchareun *et al.* 2008).

En relación al tejido adiposo blanco, se ha demostrado que la prolactina es clave en la diferenciación de los adipocitos a partir de células madre (Carre and Binart, 2014), y la sobreexpresión de *Prlr* en adipocitos incrementa su diferenciación (Brandebourg *et al.*, 2007, Fleenor *et al.*, 2006). Por el contrario, ratones con deficiencia del *Prlr* tienen una disminución del tejido adiposo blanco

(Freemark et al., 2001), destacando el rol de la prolactina en el desarrollo y mantenimiento de los depósitos de tejido adiposo blanco. Sin embargo, como para muchas acciones de prolactina, esta hormona puede aumentar o disminuir la adipogénesis dependiendo de la situación fisiológica o patológica y de sus niveles circulantes.

Por otra parte, la capacidad orexigénica reportada de la prolactina (Roy et al. 2007; Lisboa et al. 2006), la asociación genética entre la prolactina y obesidad (Meyre et al. 2009; Nilsson et al. 2011) y la relación entre hiperprolactinemia y sobrepeso (Kok et al. 2004) (dos Santos Silva et al. 2011) son tan solo algunos de los estudios que componen la vasta evidencia que sugiere que, en humanos, la señalización de prolactina podría estar involucrada en el control del balance energético. Desde un punto de vista metabólico, el rol orexigénico de la prolactina es crítico durante la gestación y la lactancia, favoreciendo el almacenamiento de lípidos indispensable para cumplir con las necesidades energéticas durante estos dos períodos fisiológicos principales. Sin embargo, el papel patofisiológico del PRLR o la prolactina continúa siendo un misterio por fuera de esas ventanas de tiempo.

Un trabajo publicado recientemente, demuestra que ratones *knockout* para el *Prlr* son resistentes a la obesidad inducida por una dieta rica en grasa (DG). Estos ratones muestran un aumento en la tasa metabólica que incluye un mayor consumo de O<sub>2</sub> y mayor disipación de calor, sin embargo, el hallazgo más impresionante de este trabajo es que la protección contra la obesidad inducida por DG, podría ser explicada en parte por la aparición de adipocitos *beige* distribuidos discretamente en depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo (Auffret et al. 2012). Se demostró que si bien estos adipocitos comparten progenitor con los adipocitos blancos (*Myf5*negativos) (Seale et al. 2008), tienen aumentados los niveles de expresión de genes asociados al programa de transdiferenciación del tejido adiposo (*Prdm16*, *Pgc1*, *AdRB3* y *Foxc2*) y los niveles de *Ucp1*. Esto último les otorga capacidad termogénica (Auffret et al. 2012), por lo que metabolizan triglicéridos almacenados como reservorio energético (Wu et al. 2012) y disipan calor (Cannon & Nedergaard 2004) a expensas de una reducción de los depósitos de grasa blanca. La inactivación de PRLR aumenta la expresión de genes maestros que controlan el destino del adipocito marrón (*Prdm16*) y la función mitocondrial (*Pgc1 $\alpha$* , *Ucp1*). Sorprendentemente, el programa genético de transdiferenciación se induce con alimentación DG y es más pronunciada en depósitos de grasa específicos tales como el subcutáneo o el perirrenal.

Todos estos resultados proponen un nuevo rol de la prolactina en adipogénesis, dado que además del rol propuesto de promover la diferenciación de adipocitos, demuestran que la ausencia de estimulación con prolactina induce la aparición de focos de células *beige* con capacidad termogénica dentro de las reservas de tejido adiposo blanco, lo que protege contra la obesidad

disipando las calorías consumidas como calor (Nicholls 1983). Por el contrario, la presencia de una señalización activa de prolactina podría participar en el mantenimiento del fenotipo de adipocitos blancos de estos depósitos de grasa.

En conclusión, manipulaciones en la vía de señalización de prolactina podrían traducirse en terapias complementarias para aumentar el gasto energético, o regular la adipogénesis y promover la pérdida de peso.

## OBJETIVOS

Evidencia previa obtenida en nuestro laboratorio muestra que los ratones hembra lacDrd2KO presentan niveles basales de prolactina superiores a las hembras controles *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* desde el primer mes de vida hasta los 11 meses de edad (Perez-Millan *et al.* 2014). A pesar de la hiperprolactinemia crónica, los animales tienen un peso aumentado recién a partir del quinto o sexto mes de vida, y como demostráramos en el Capítulo 2 cambios en la sensibilidad a leptina y en la expresión de genes hipotalámicos orexigénicos de forma tardía.

Habiendo determinado una alteración en el metabolismo energético de lenta aparición en los ratones hembra lacDr2KO decidimos someterlas a un desafío adicional a los niveles altos de prolactina. Nuestro objetivo era evaluar si la exposición a una dieta rica en grasa aceleraba el fenotipo metabólico observado en ratones hiperprolactinémicos recién a los 10 meses de edad y establecer qué tejidos y genes participarían de este proceso. En este contexto, expusimos a nuestro modelo de hembra hiperprolactinémica a una dieta rica en grasa durante dos meses a partir de los 3 meses de edad para poder caracterizar el papel patofisiológico de la activación del PRLR en un contexto de exceso de disponibilidad de energía, y determinar si se podían acelerar los cambios metabólicos con el doble desafío: prolactina crónicamente elevada y dieta rica en grasa. En el presente capítulo caracterizamos el estado del balance energético durante una ventana de tiempo de exposición a una dieta rica en grasa en animales de ambos genotipos.

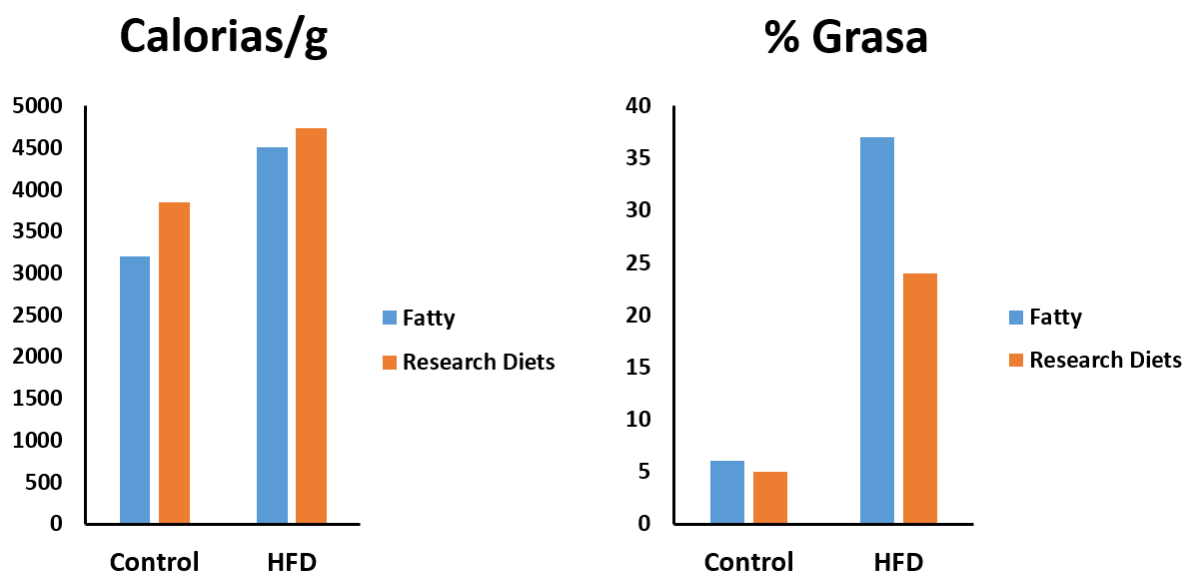
Los objetivos específicos del presente capítulo fueron:

- Estudiar variaciones en el peso corporal y en los niveles de ingesta asociados a la hiperprolactinemia y/o la dieta enriquecida en grasa.
- Caracterizar las variaciones en el metabolismo de la glucemia asociadas a la hiperprolactinemia y/o la exposición a una dieta enriquecida en grasa.
- Determinar los pesos de los distintos depósitos de tejido adiposo, hígado y páncreas, órganos de participación crítica en la regulación del metabolismo energético, al final del tratamiento
- Estudiar el perfil de expresión de genes biomarcadores en tejido adiposo blanco subcutáneo y tejido adiposo pardo que permitan elucidar la acción de la hiperprolactinemia, la dieta, o la combinación de ambas en los procesos de *beiging*, *whitening*, autofagia y adipogénesis.

## RESULTADOS

### COMPOSICIÓN DE LA DIETA

Con el objetivo de evaluar el efecto metabólico y molecular de una dieta rica en grasa sobre nuestro modelo de hiperprolactinemia crónica (hembras *lacDrd2KO*), caracterizamos y comparamos alteraciones inducidas por dos dietas que difieren en composición, la dieta *Fatty* preparada en nuestro laboratorio a partir de jugo bovino, y una dieta rica en grasa comercializada por la compañía *Research Diets*. En líneas generales, la cantidad de calorías/g y el porcentaje de grasa es mayor en los pellets de dieta enriquecida en grasa que en los pellets control para las dos dietas empleadas (Figura 35). Por otro lado, es importante destacar que la diferencia en la cantidad de grasa por gramo observada entre el alimento regular y el alimento enriquecido en grasa es muy importante (entre 4.8 y 6.2 veces superior en la dieta grasa), mientras que la composición calórica es tan solo entre un 1.25 y 1.40 veces mayor.



**Figura 35. Composición de dietas empleadas.** Dieta *Fatty*: pellet control: 3200 g/cal, 6% grasa; pellet dieta grasa: 4500 cal/g, 37% grasa. Dieta *Research Diets*: pellet control 3850 cal/g, 5% grasa; pellet dieta grasa: 4730 cal/g, 24% grasa.

### EFFECTO DE DIETA GRASA SOBRE EL PESO CORPORAL Y LOS NIVELES DE INGESTA

Se realizó un seguimiento del peso corporal y del alimento consumido en los cuatro grupos experimentales (*Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> alimentados con dieta control y dieta grasa, y *LacDrd2KO* alimentados



con dieta control y dieta grasa) durante nueve semanas, siendo ambos parámetros medidos semanalmente. Los experimentos se realizaron con los dos tipos de dietas grasa descritos previamente *Research Diets* y *Fatty*.

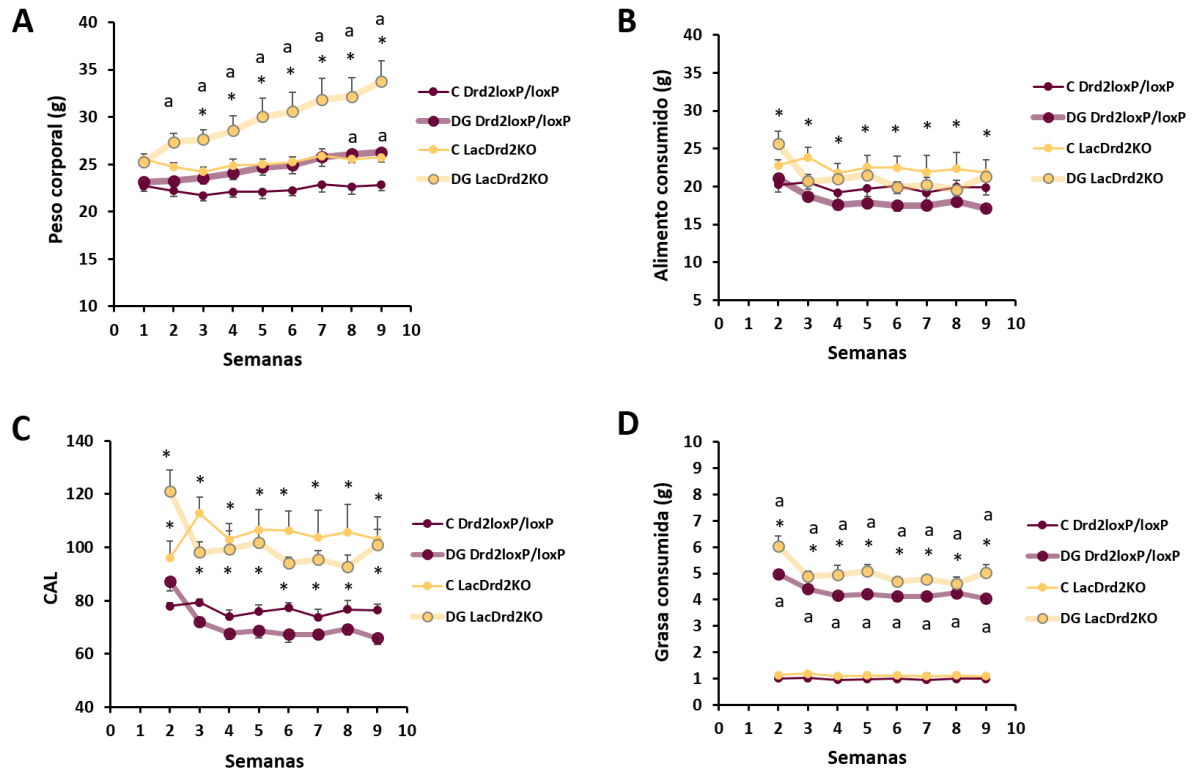
### **Dieta Research Diets**

En este caso, el protocolo se inició con hembras lacDrd2KO y hembras control *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> de 3 meses de edad y se repitió en dos lotes experimentales independientes.

En la figura 36 A se muestra la evolución del peso corporal para todos los grupos experimentales. Las hembras lacDrd2KO alimentadas con dieta rica en grasa (DG lacDrd2KO) presentaron un aumento significativo del peso corporal a partir de la tercera semana respecto de hembras del mismo genotipo alimentadas con dieta regular (C lacDrd2KO) y sorprendentemente, desde la semana 2, tuvieron un peso corporal significativamente mayor que las hembras control *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> que recibieron el mismo tipo de dieta. Esta diferencia de peso entre genotipos aumentó conforme transcurrieron las semanas. Al finalizar el experimento las hembras lacDrd2KO aumentaron un 30% su peso corporal tras dos meses de alimentación rica en grasa, mientras que las hembras control un 14%. En hembras control *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> se observó el efecto de la dieta en forma tardía, ya que el aumento de peso se hizo evidente recién en la semana 8.

Se determinó, además, la ingesta en gramos de alimentos consumido en todos los grupos experimentales a lo largo del protocolo (Figura 36 B). Las hembras lacDrd2KO comieron más que las hembras control *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> independientemente del tipo de dieta recibida, sugiriendo niveles de ingesta aumentados en el fenotipo hiperprolactinéxico ( $p=0.009$ ), como describiéramos en el capítulo 1. Esto se tradujo en un mayor consumo de calorías para el genotipo lacDrd2KO (Figura 36 C).

Por otro lado, si analizamos el efecto dieta, observamos que para mismo genotipo los animales alimentados con dieta enriquecida en grasa muestran una tendencia a consumir menor cantidad de alimento en gramos que los que fueron alimentados con dieta regular, lo que se refleja en una tendencia a consumir menos calorías. No obstante, y de importancia fundamental para nuestro proyecto, ambos genotipos consumen mayor cantidad de grasa, ya que el alimento enriquecido contiene un mayor porcentaje de grasa que la dieta control (Figura 35). Asimismo, las hembras LacDrd2KO consumen una cantidad de grasa significativamente mayor que las hembras *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> a lo largo de todo el experimento (Figura 36 D).



**Figura 36. Peso corporal e ingesta en respuesta a una dieta rica en grasa comercial.** A) Curvas de peso corporal semanal promedio B) ingesta semanal de alimento en gramos (g) (C) ingesta semanal de energía medida en calóricas consumidas (CAL), D) Ingesta semanal de grasa (g). Hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* dieta control (C *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*; 3.9 kcal/g 5% grasa; N=6), hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, dieta grasa (DG *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*; 4.7 kcal/g 24% grasa; N=6), hembras *lacDrd2KO* con dieta control (C *lacDrd2KO*; N=5), hembras *lacDrd2KO* con dieta grasa (DG *lacDrd2KO*; N= 5). Se realizó un análisis de varianza en tres sentidos para medidas repetidas “a” =  $p \leq 0.05$  indica diferencias significativas entre dietas para. respectivo genotipo y tiempo (efecto dieta); \*  $p \leq 0.05$  indica diferencias significativas entre genotipos misma dieta y tiempo respectivo (efecto genotipo). Las barras de error representan el desvío estándar.

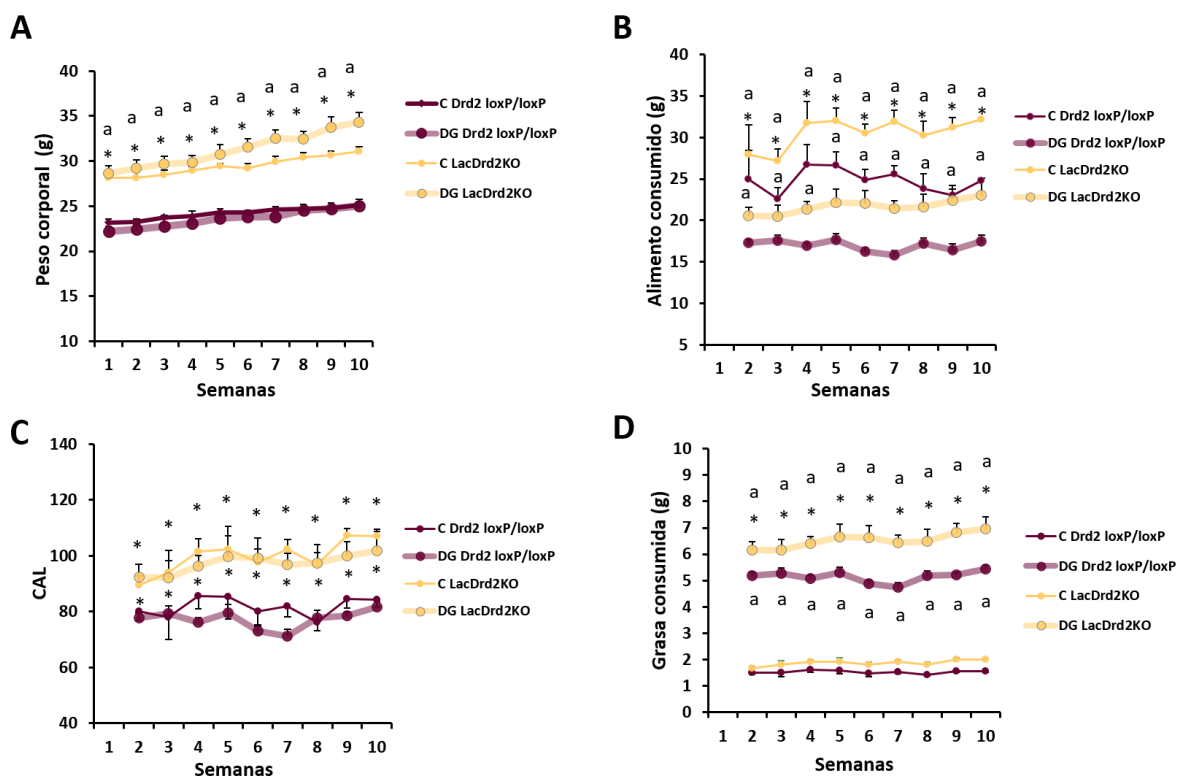
### Dieta Fatty

En este caso la dieta fue preparada en nuestro laboratorio enriqueciendo dieta regular con jugo bovino. El protocolo de alimentación con dieta grasa se repitió para tres lotes de animales independientes y se promediaron las mediciones obtenidas. El primer lote de animales que completó el protocolo, lo inició con seis meses de edad. Sin bien los dos lotes restantes iniciaron el protocolo con 3 meses de edad, las hembras *lacDrd2KO* mostraron, en promedio, un peso corporal significativamente mayor al lote de hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* desde la primera medición (Figura 37 A).

Se realizó un seguimiento del peso corporal y del alimento consumido durante nueve semanas, siendo ambos parámetros medidos semanalmente.

En primer lugar, observamos que el peso corporal de las hembras lacDrd2KO fue significativamente mayor al peso de las hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* a lo largo de todo el experimento, y se incrementó con la DG observándose un efecto significativo de genotipo en las hembras que recibieron una dieta rica en grasa. Las hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* por otro lado no incrementaron su peso corporal con la DG en ninguno de los puntos. (Figura 37 A) Observamos que las hembras que recibieron la dieta regular consumieron más alimento semanalmente que aquellas que recibieron una dieta enriquecida independientemente del genotipo ( $p \leq 0.005$  vs dieta grasa) (Figura 37 B) y que las hembras lacDrd2KO tenían mayores niveles de ingesta que las *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* independientemente de la dieta recibida ( $p \leq 0.005$  vs hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*) (Figura 37 B).

Las hembras lacDrd2KO consumieron más calorías que las hembras control para las dos dietas, lo que concuerda con los resultados obtenidos para el seguimiento de los niveles de ingesta (Figura 37 C). Por otro lado, observamos que, si bien las hembras que recibieron dieta regular consumieron más alimento que aquellas a las que se alimentaron con dieta grasa, dado que el porcentaje de grasa por gramo de alimento es muy elevado en los pellets grasos (Figura 35), finalmente, la cantidad de grasa ingerida fue mayor en las hembras que recibieron una dieta enriquecida. De forma destacada y similar al protocolo de alimentación con la dieta comercial, la ingesta de grasa fue significativamente más alta en hembras DG lacDrd2KO ( $p \leq 0.005$  vs hembras DG *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*) (Figura 37 D).



**Figura 37. Peso corporal e ingesta en respuesta a una dieta rica en grasa preparada en el laboratorio.** A) Curvas de peso corporal semanal promedio B) ingesta semanal de alimento (g) (C) ingesta semanal de energía medida en calorías consumidas (cal) D) Ingesta semanal de grasa (g). Hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* dieta control (C *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*; 3.2 kcal/g 6% grasa; N=8), hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, dieta grasa (DG *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*; 4.5 kcal/g 37% grasa; N=7), hembras *lacDrd2KO* con dieta control (C *lacDrd2KO*; N=8), hembras *lacDrd2KO* con dieta grasa (DG *lacDrd2KO*; N= 7). Se realizó un análisis de varianza en tres sentidos para medidas repetidas a  $p \leq 0.05$  indica diferencias significativas vs. respectivo genotipo y tiempo (efecto dieta); \*  $p \leq 0.05$  indica diferencias significativas entre genotipos para la misma dieta y tiempo (efecto genotipo). Las barras de error representan el desvío estándar.

En conclusión, validamos para ambos tipos de dietas que aquellas hembras que recibieron una dieta enriquecida consumieron significativamente una mayor cantidad de grasa de manera sostenida ( $p \leq 0.005$ ), y destacamos una mayor ingesta de grasa en el fenotipo hiperprolactinéxico.

## PESO TEJIDOS

Una vez completadas las 9 semanas de protocolo, los animales fueron sacrificados. Se pesaron los órganos, y se tomaron muestras de tejidos que participan de la regulación del balance energético para caracterizar su perfil de expresión génica, con el objetivo de encontrar cambios moleculares que pudieran explicar los contundentes cambios fenotípicos observados en las hembras *lacDrd2KO* alimentadas *ad libitum* con una dieta enriquecida en grasa.

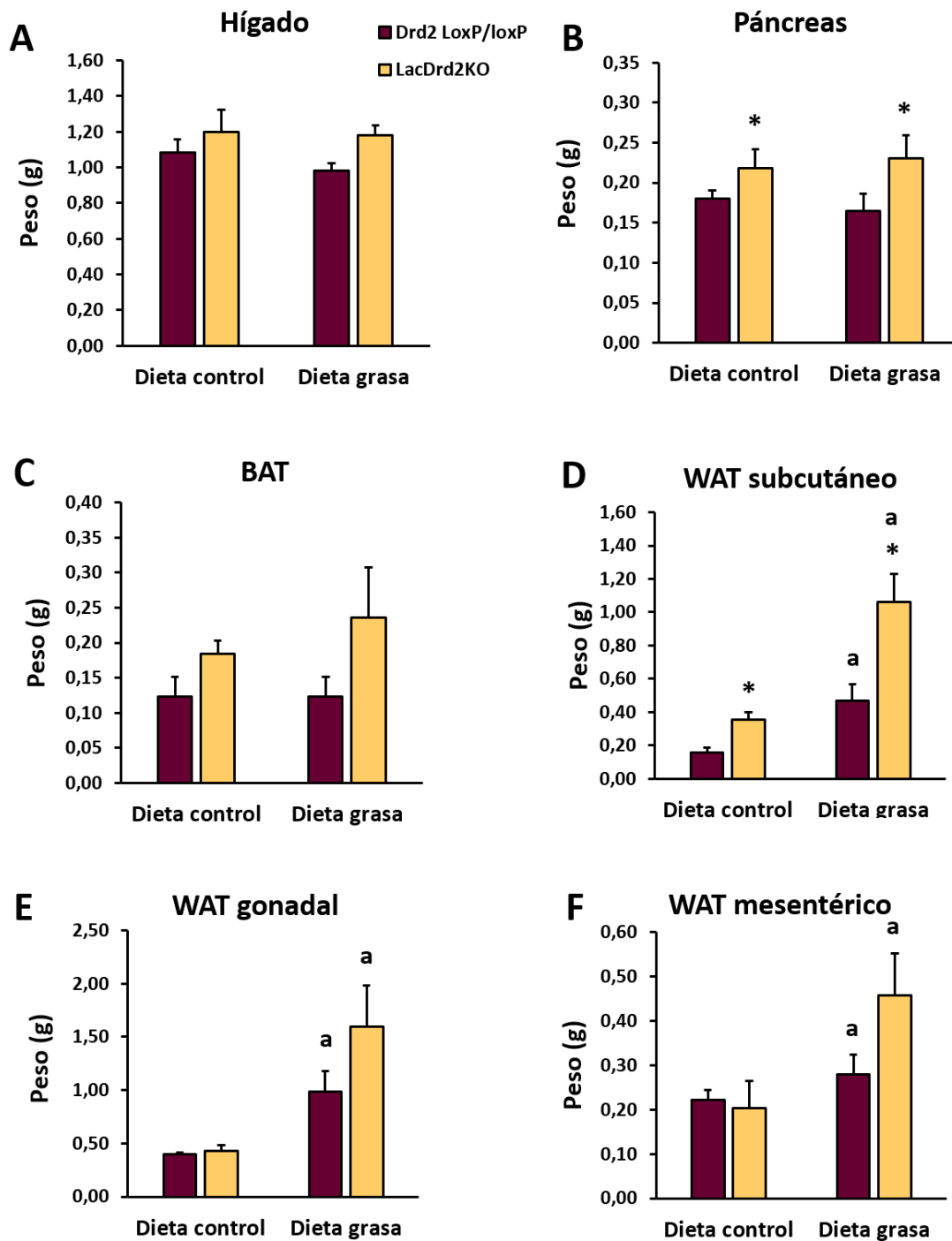
### Dieta Research Diets

Se evaluaron los pesos de hígado, páncreas y de los depósitos grasa blanca y parda.

No se observaron diferencias significativas en el peso del hígado (Figura 38 A) En el páncreas. En el caso del páncreas, se observó un efecto genotipo, dado que, independientemente de la dieta recibida, el páncreas de las hembras *lacDrd2KO* fue significativamente más pesado que el de las hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. (Figura 38 B) Por otro lado, no observamos diferencias significativas en el peso de los depósitos de tejido adiposo marrón, aunque destacamos una tendencia marcada que pareciera indicar que el tejido adiposo pardo es más pesado en nuestro modelo hiperprolactinéxico (Figura 38 C). Por otro lado, se evidenció un claro efecto de la dieta sobre el peso de los depósitos de tejido adiposo blanco (subcutáneo, gonadal, mesentérico). En todos los casos, las hembras *lacDrd2KO* y *Drd2*

*loxP/loxP* que recibieron una dieta rica en grasa tenían depósitos de tejido adiposo significativamente más pesados que las hembras que fueron alimentadas con dieta regular (Figura 38 D-F). Particularmente en el tejido adiposo blanco subcutáneo también observamos un efecto genotipo dado que las hembras *lacDrd2KO* mostraron depósitos de tejido adiposo más pesados que su contraparte control independientemente de la dieta recibida.

En conclusión, la alimentación con una dieta rica en grasa aumentó la adiposidad en hembras de ambos genotipos lo que se traduce en el aumento de peso observado. Este incremento de adiposidad está dado, en parte, por un aumento en el tamaño de los depósitos de tejido adiposo blanco, siendo el tejido adiposo gonadal aquel que aporta mayor peso diferencial, y por la tendencia al aumento del peso del tejido adiposo pardo. En el caso particular de las hembras *lacDrd2KO*, el incremento de peso del tejido adiposo subcutáneo es mayor que en hembras control, aun habiendo recibido la misma dieta grasa, y se da en paralelo a aumento significativo del tamaño del páncreas. De esta forma, el mayor aumento en el peso de los depósitos de tejido adiposo en hembras *lacDrd2KO* que recibieron una dieta rica en grasa explicarían el mayor aumento del peso corporal de las DG *lacDrd2KO* vs DG *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* que se observa en las curvas de peso corporal de la Figura 36. No obstante, el ANOVA solo arroja diferencias significativas en tejido subcutáneo y páncreas.



**Figura 38.** Peso de principales órganos metabólicos de ratones hembra  $Drd2^{loxP/loxP}$  y  $lacDrd2KO$  de 5 meses alimentados ad libitum con dieta control o dieta rica Research Diets durante 9 semanas. A) Peso (g) Hígado (N=6, 6, 5, 5) el ANOVA de dos factores no arrojó diferencias significativas B) Peso (g) páncreas (N= 7, 5, 6, 5) El ANOVA de dos factores arrojó \*  $p < 0,05$  vs ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  con igual dieta C) Peso (g) tejido adiposo marrón (BAT) (N= 6, 6, 5, 5) el ANOVA de dos factores no arrojó diferencias significativas D) Peso (g) tejido adiposo blanco subcutáneo (WAT subcutáneo) (N=6, 4, 6, 5). El ANOVA de dos factores evidenció una interacción no significativa (genotipo x dieta) y efectos de dieta y genotipo, donde \*  $p = 0,01$   $lacDrd2KO$  vs

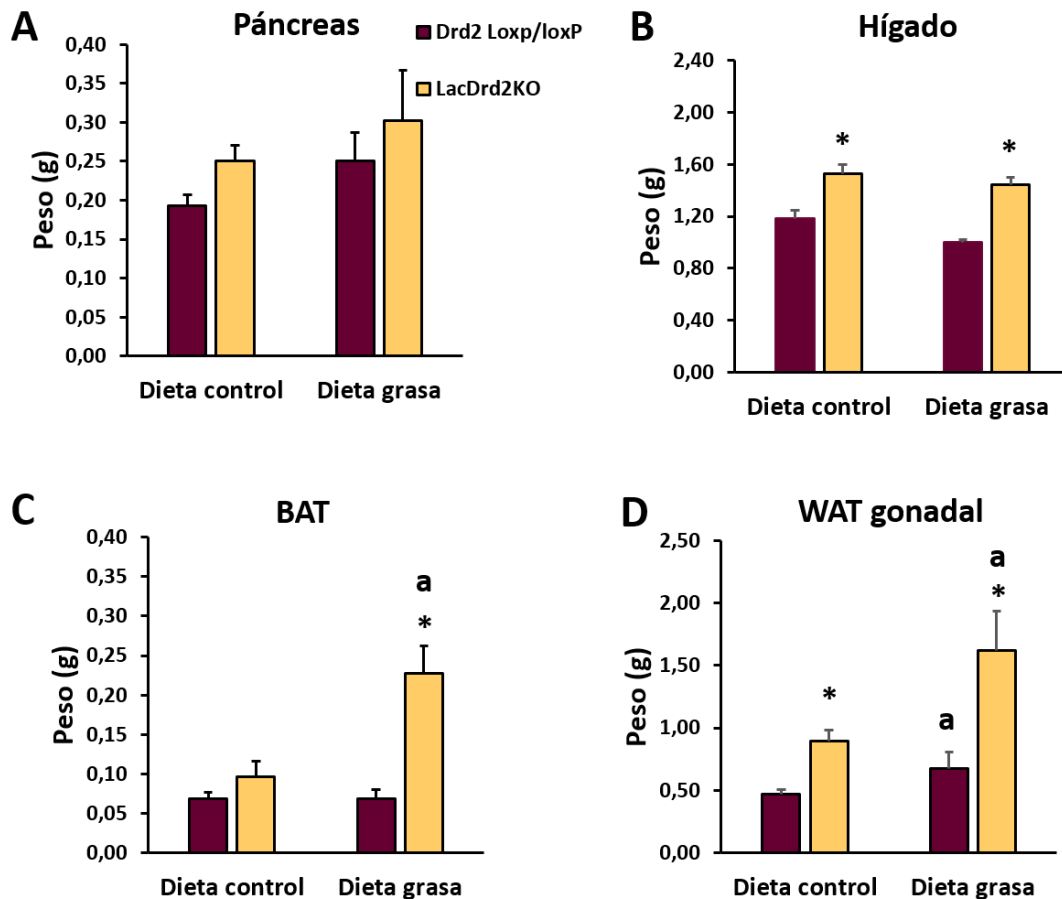
ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, y “a”  $p < 0,05$  dieta grasa vs dieta control, E) Peso (g) tejido adiposo blanco gonadal (WAT gonadal) (N=6, 6, 5, 5). El ANOVA arrojó diferencias significativas donde “a”  $p = 0,009$  dieta grasa vs dieta control F) Peso (g) tejido adiposo blanco mesentérico (WAT mesentérico) (N=6, 6, 5, 5). El ANOVA arrojó diferencias significativas donde  $a < 0,05$  dieta grasa vs dieta control.

## Dieta Fatty

En este caso, se registró el peso del páncreas, hígado, tejido adiposo pardo y tejido adiposo blancogonadal de animales expuestos a una dieta rica en grasa producida en nuestro laboratorio de composición calórica y porcentaje de grasa ligeramente diferente al de la dieta comercial (Figura 35).

En primer lugar, evaluamos el peso del páncreas. Si bien no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, observamos que los páncreas de las hembras lacDrd2KO tienden a ser más pesados (Figura 39 A). Observamos que el hígado de las hembras lacDrd2KO es significativamente más pesado que el de las hembras control, independientemente de la dieta recibida, sugiriendo un claro impacto del contexto hiperprolactinéxico. Sorprendentemente, observamos que la dieta rica en grasa tiende a disminuir el peso de este órgano ( $p=0,07$ ) (Figura 39 B).

Evidenciamos un efecto de la dieta rica en grasa específicamente sobre el peso del BAT de hembras lacDrd2KO ya que su depósito de grasa fue significativamente más pesado que el de hembras de igual genotipo que han recibido una dieta control y, sorprendentemente, que las hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* que han recibido la misma dieta durante 9 semanas (Figura 39 C). Por otra parte, observamos que, bajo alimentación regular o dieta grasa, el peso del tejido adiposo blanco gonadal fue mayor en las hembras hiperprolactinéxicas, los depósitos de ambos genotipos fueron sensibles al efecto de una dieta rica en grasa dado que tanto hembras lacDrd2KO como hembras control que fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta enriquecida, tuvieron depósitos de tejido adiposo blanco más pesados (Figura 39 D).



**Figura 39.** Peso de principales órganos metabólicos de ratones hembra  $Drd2^{loxP/loxP}$  y  $lacDrd2KO$  de 5 meses alimentados ad libitum con dieta control o dieta rica en grasa producida en nuestro laboratorio durante 9 semanas. A) Peso (g) Páncreas (N=6, 5, 6, 5) el ANOVA de dos factores no arrojó diferencias significativas B) Peso (g) hígado (N= 6, 5, 6, 5) El ANOVA de dos factores arrojó \*  $p < 0,00001$  vs ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  C) Peso (g) tejido adiposo marrón (BAT) (N= 5, 5, 5, 5). El ANOVA de dos factores evidenció una interacción significativa (genotipo x dieta),  $p_{interacción} = 0,01$  D); donde \*  $p = 0,001$   $lacDrd2KO$  dieta grasa vs ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  dieta grasa y a  $p = 0,006$   $lacDrd2KO$  dieta grasa vs dieta control C) Peso (g) tejido adiposo blanco gonadal (WAT gonadal) (N=6, 6, 5, 5). El ANOVA arrojó diferencias significativas donde a  $p < 0,05$  dieta grasa vs dieta control D) Peso (g) tejido adiposo blanco gonadal (WAT gonadal) (N=6, 5, 6, 5). El ANOVA evidenció una interacción no significativa (genotipo x dieta), y efectos simples de genotipo y dieta, donde \*  $p = 0,001$  ratones  $lacDrd2KO$  vs ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  y a  $p = 0,02$  dieta grasa vs dieta control

## HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

### Dieta Research Diets

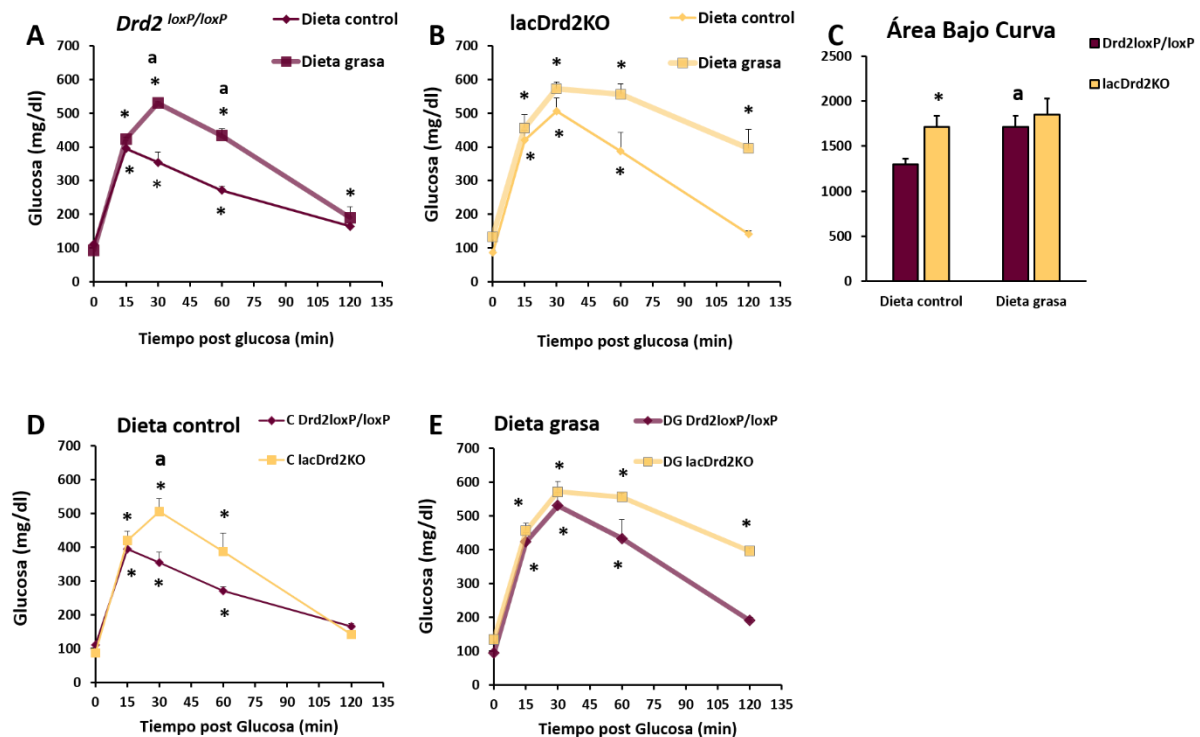
Considerando el aumento de peso observado en hembras alimentadas con dieta rica en grasa decidimos investigar el impacto de la misma sobre la homeostasis de la glucosa *in vivo*.



En primer lugar, realizamos un GTT. En la figura 40 A observamos que la exposición a una dieta rica en grasa durante 9 semanas indujo intolerancia a la glucosa en las hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* dado que los niveles de glucosa en sangre permanecen significativamente más elevados en hembras alimentadas con dieta enriquecida en comparación con sus pares alimentadas con dieta regular, a los 30 y 60 minutos post inyección intraperitoneal de glucosa ( $p=0,04$  y  $p=0,015$  respectivamente). Por otra parte, a los 120 minutos, los niveles de glucosa en sangre vuelven a ser comparables con los basales en hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* que recibieron una dieta control y permanecieron elevados en hembras que recibieron dieta grasa, evidenciando el impacto de la dieta sobre los mecanismos de homeostasis de la glucosa.

Por otro lado, como mencionamos en el capítulo 1, observamos que las hembras lacDrd2KO con alimentación regular tienen un fenotipo de intolerancia a la glucosa a los 5 meses de edad (Figura 40 D). Esto se evidencia a los 30 minutos de la inyección de glucosa, donde se observa que la glucemia es significativamente mayor en hembras lacDrd2KO que en sus pares *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* ( $P= 0,029$ ) sugiriendo que las hembras hiperprolactinémicas desarrollan una mayor dificultad para regularizar la glucemia frente a una sobrecarga de glucosa. Por otro lado, las hembras lacDrd2KO expuestas a dieta enriquecida y a dieta control presentaron curvas de evolución de glucemia similares con una diferencia estadística a los 120 minutos que demuestra que la dieta grasa profundiza levemente la intolerancia ya que a este tiempo la glucemia no vuelve a su nivel basal como ocurre en las alimentadas con dieta regular (Figura 40 B). Sin embargo, el área bajo la curva no es distinta para los ratones lacDrd2KO frente a ambas dietas y sí lo es para ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (Figura 40 C).

En conclusión, el efecto genotipo es similar al efecto de exposición a dieta rica en grasa, es decir que acelera el fenotipo de intolerancia a la glucosa con alimentación regular *ad libitum*.



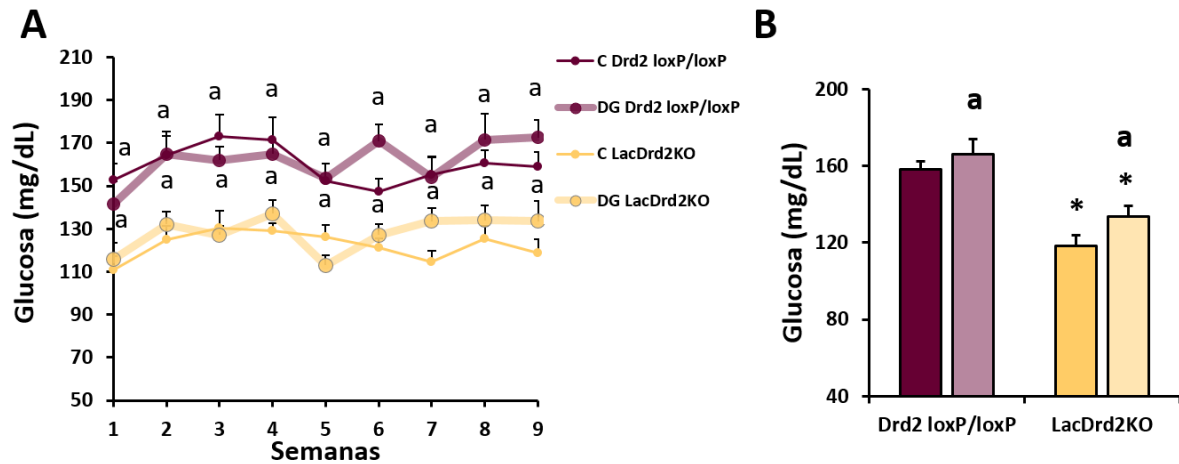
**Figura 40. Efecto de la dieta sobre la homeostasis de la glucosa.** GTT (2 g/kg) en ratones hembra *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 5 meses alimentados con dieta rica en grasa o dieta control y ayunados por 8 horas. A y B) Se realizaron análisis por AMR para los efectos tiempo y dieta dentro de cada genotipo \*  $p < 0,05$  vs tiempo 0 respectivo para ratones alimentados con dieta control o grasa; "a"  $p < 0,05$  vs. ratones alimentados con dieta control en el mismo tiempo) C) Área bajo la curva (sumatoria de los valores de glucemia en todos los tiempos para cada grupo. \*  $P < 0,05$  vs *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* misma dieta y a \*  $P < 0,05$  vs dieta control para mismo genotipo.) D y E) Se realizaron análisis por AMR para los efectos tiempo y genotipo para cada dieta \*  $p < 0,05$  vs tiempo 0 respectivo para ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* o *lacDrd2KO*; y "a"  $p < 0,05$  vs. ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* en el mismo tiempo.  $N=6,6,5,5$  para hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y hembras *lacDrd2KO* bajo dieta control y dieta grasa respectivamente.

## Dieta Fatty

En el caso particular de la dieta *Fatty*, decidimos hacer un seguimiento semanal de la glucemia basal tras 8 horas de ayuno durante los dos meses que duró el experimento. Encontramos que la glucemia basal fue menor en las hembras *LacDrd2KO* a lo largo de todo el protocolo ( $p= 0,00015$ ) (Figura 41 A).

Sorprendentemente, no evidenciamos un efecto significativo de la dieta rica en grasa elaborada en nuestro laboratorio sobre los niveles de glucosa en ayuno, en hembras *lacDrd2KO* o hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, conforme transcurrían las semanas. Sin embargo, si tomamos los valores

de las mediciones desde la semana 7, momento en el que los valores de glucemia comienzan a diferenciarse por efecto de la dieta, encontramos que la dieta rica en grasa induce un aumento de glucemia en ambos genotipos ( $p=0,045$ ) (Figura 41 B).



**Figura 41.: Efecto de la dieta sobre la glucemia basal.** A) Glucemia basal medida semanalmente en ratones hembra  $Drd2^{loxP/loxP}$  y  $lacDrd2KO$  alimentados con dieta rica en grasa o dieta control y ayunados por 8 horas. Hembras  $Drd2^{loxP/loxP}$  dieta control (C  $Drd2^{loxP/loxP}$ ; 3.2 kcal/g 6% grasa; N=8), hembras  $Drd2^{loxP/loxP}$ , dieta grasa (DG  $Drd2^{loxP/loxP}$ ; 4.5 kcal/g 37% grasa; N=7), hembras  $lacDrd2KO$  con dieta control (C  $lacDrd2KO$ ; N=8), hembras  $lacDrd2KO$  con dieta grasa (DG  $lacDrd2KO$ ; N= 7), "a"  $p < 0,05$  vs  $lacDrd2KO$  para el mismo tiempo; B) Promedio de valores de glucemia basal (mg/dL) obtenidos para cada grupo experimental desde la semana 7. El ANOVA en dos sentidos arrojó una interacción no significativa (genotipo x dieta) y efectos de dieta y genotipo, donde \*  $p = 0,000001$   $lacDrd2KO$  vs ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$ , y "a"  $p < 0,05$  dieta grasa vs dieta control.

## EXPRESIÓN GÉNICA

### Tejido adiposo blanco subcutáneo

#### Dieta Research Diets

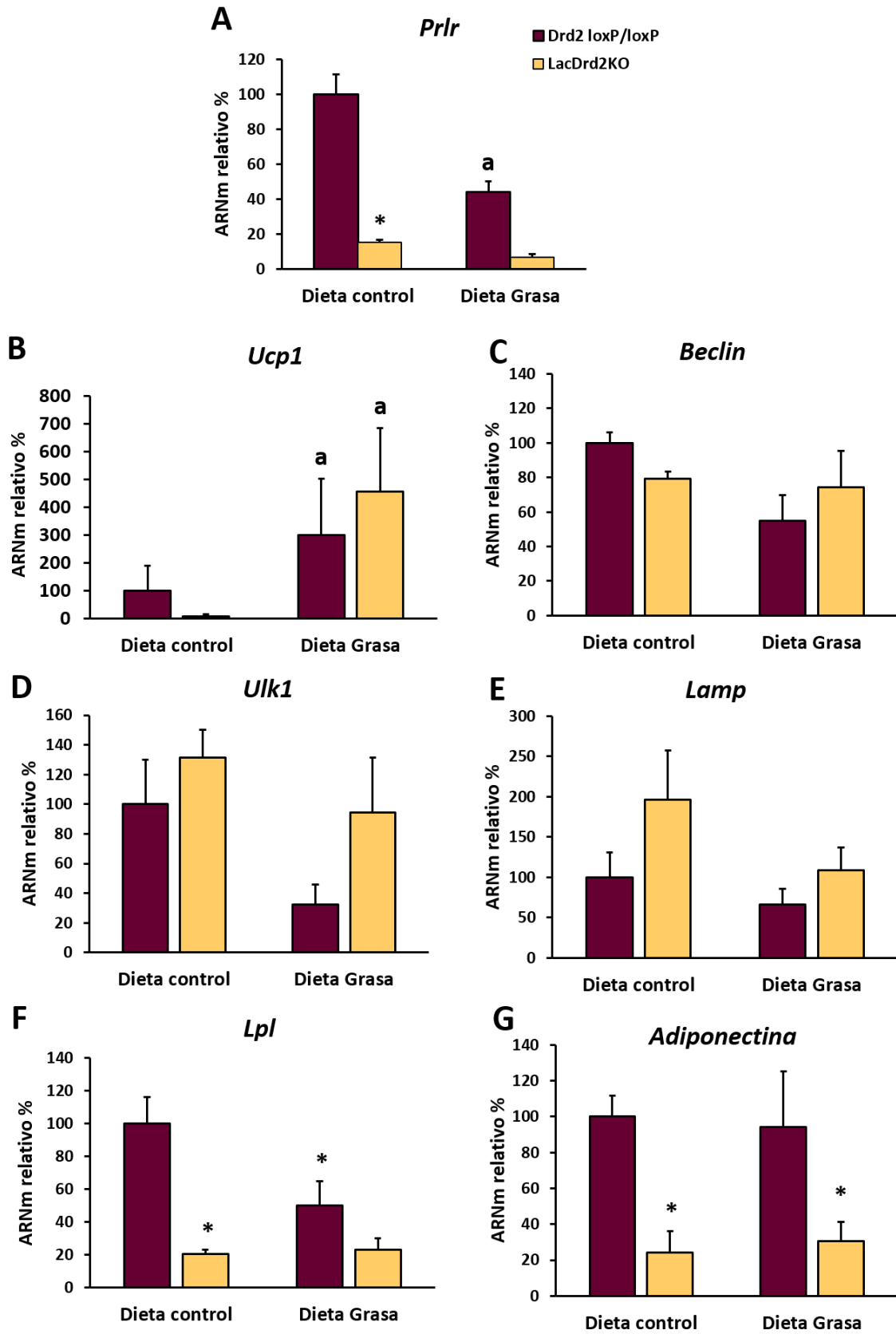
Los receptores de prolactina se expresan en múltiples tejidos implicados en la regulación metabólica, incluidos el tejido adiposo. Esto nos motivó a evaluar en primer lugar, los niveles de expresión del *Prlr* en los depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo. En ratones control  $Drd2^{loxP/loxP}$ , encontramos que la dieta grasa disminuye los niveles de expresión del *Prlr*. Llamativamente, la expresión de dicho gen es menor en hembras  $lacDrd2KO$  que en su contraparte control,

independientemente de la dieta recibida, siendo esta diferencia significativa para la dieta control ( $p=0,0003$  vs. *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup>) (Figura 42 A).

Encontramos que la expresión basal de *Ucp,1* un gen que se expresa específicamente en adipocitos con capacidad termogénica, es baja en ambos genotipos, y que la exposición a dos meses de dieta rica en grasa aumenta significativamente los niveles de expresión de dicho gen, sugiriendo el desarrollo de un fenotipo termogénicamente activo ( $p=0,05$ ) (Figura 42 B).

El aumento observado en *Ucp1* frente a la exposición a una dieta rica en grasa sugería que el tejido adiposo subcutáneo podría estar desarrollando focos de *beiging* con presencia de adipocitos con capacidad termogénica. Esto nos condujo a evaluar los niveles de expresión de indicadores de actividad autofágica, proceso que subyace a la transdiferenciación de adipocitos (Figura 42 C-E). Si bien no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *Beclin*, *Ulk-1* y *Lamp* entre grupos experimentales, observamos un patrón de expresión similar en los genes *Ulk-1* y *Lamp*. Los niveles de expresión de dichos genes en cuestión tienden a disminuir por efecto de la dieta en ambos genotipos, siendo siempre más altos en el tejido adiposo subcutáneo de hembras lacDrd2KO lo que sugiere un efecto genotipo que sería consecuencia del contexto hiperprolactinéxico.

Como esperábamos, observamos que las hembras hiperprolactinéxicas tienen niveles de expresión de *Lpl* y *adiponectina* significativamente más bajos que su contraparte control *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> ( $p=0,001$ ). En el caso particular de los animales *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> que recibieron una dieta enriquecida en grasa durante dos meses, observamos una tendencia a la disminución de *Lpl* (Figura 42 F-G).



**Figura 42. Caracterización del perfil de expresión del tejido adiposo blanco subcutáneo. Niveles de ARNm de**  
 A) *Prlr* B) *Ucp1*, indicador de capacidad termogénica C-E) *Beclin*, *Ulk1*, *Lamp*, proteínas que intervienen en el

proceso autofágico F) *Lpl*, enzima de función lipasa G) adiponectina, citoquina sintetizada por adipocitos que participa del metabolismo lipídico en ratones hembra *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 5 meses de edad con libre acceso a una dieta regular o dieta rica en grasa (*ad libitum*). Hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (dieta control, N=5; dieta grasa, N=6), hembras *lacDrd2KO* (dieta control, N=5; dieta grasa, N= 5). Los resultados se analizaron por ANOVA de dos factores donde \*  $p < 0,05$  vs *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* misma dieta y " a" efecto de genotipo

## Tejido adiposo pardo

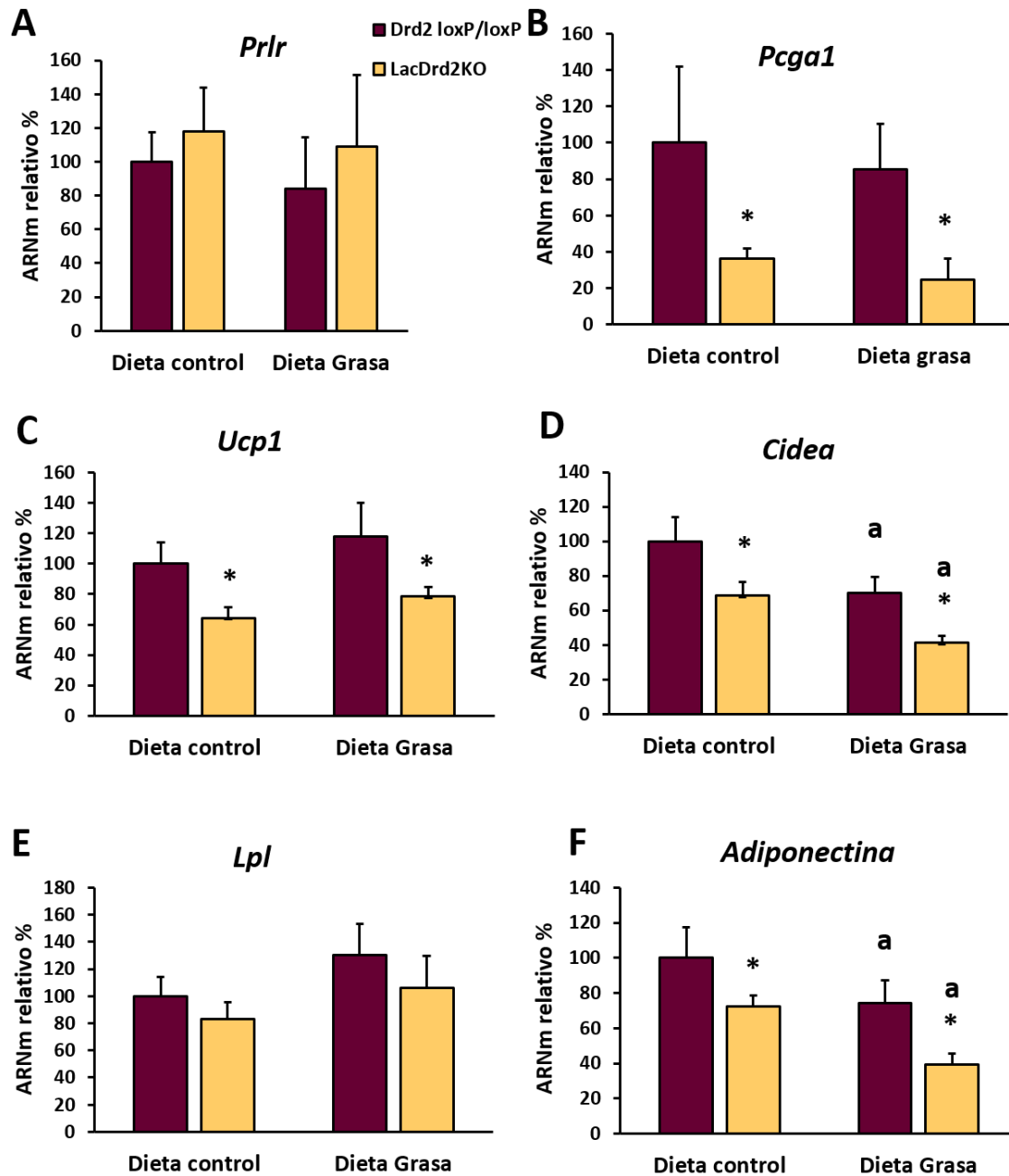
### Dieta research Diets

En primer lugar, decidimos evaluar los niveles de expresión del *Prlr* en el tejido adiposo marrón. Si bien no encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de dicho gen entre los grupos experimentales, observamos una tendencia a niveles aumentados de ARNm de *Prlr* en hembras *lacDrd2KO* (Figura 43 A).

Luego, evaluamos los niveles de expresión de genes característicos de la grasa marrón, *Ucp1*, *Pgc1 $\alpha$*  y *Cidea*. Dichos genes se encuentran en constante diálogo para regular termogénesis observada en el tejido, en particular, *Pgc1 $\alpha$*  induce la expresión de *Ucp1* y *Cidea* la inhibe. Observamos que las hembras *lacDrd2KO* tienen niveles de expresión significativamente menores que las hembras control de *Pgc1 $\alpha$*  ( $p=0,05$ ) (Figura 43 B) y *Ucp1* ( $p=0,04$ ) (Figura 43 C) lo que sugiere una capacidad termogénica reducida. Por otro lado, los niveles de expresión de *Cidea* son significativamente más bajos en hembras *lacDrd2KO* que en su contraparte control para los dos tipos de alimentación lo que evidencia el impacto del contexto hiperprolactinéxico sobre la regulación del balance energético ( $p=0,03$ ), y para este gen también se evidencia un efecto dieta en ambos genotipos ( $p=0,04$ ) (Figura 43 D).

Por último, sabemos que, aunque el tejido adiposo pardo y el tejido adiposo blanco subcutáneo ejercen funciones opuestas en términos energéticos, comparten la mayoría de los genes involucrados en la diferenciación de adipocitos y en el metabolismo lipídico. Esto sumado a evidencia previa que muestra que el tejido adiposo pardo puede experimentar acumulación de abundantes gotas lipídicas como consecuencia de la exposición a dieta rica en grasa (fenómeno que hemos definido previamente como *whitening*) nos condujo a evaluar los niveles de expresión de *Lpl* y *adiponectina*. Por un lado, no encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de *Lpl* en ninguna de las condiciones (Figura 43 E). Encontramos, en cambio, diferencias contundentes en el perfil de expresión de *adiponectina* en los grupos experimentales en estudio. Observamos que la exposición a una dieta rica en grasa disminuye significativamente los niveles de expresión de dicho

gen en ambos genotipos ( $p=0,04$ ) y que los niveles de expresión de *adiponectina* son significativamente bajos en hembras lacDrd2KO que en su contraparte control para los dos tipos de dietas (Figura 43 F).



**Figura 43. Caracterización del impacto de una dieta grasa comercial sobre el perfil de expresión génica del tejido adiposo marrón.** Niveles de ARNm de A) *Prlr*, B C-D) *Pcg1*  $\alpha$ , *Ucp1* y *Cidea* indicadores de capacidad termogénica, E) *Lpl*, enzima de función lipolítica F) *adiponectina*, citoquina sintetizada por adipocitos que participa del metabolismo lipídico, en ratones hembra *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 5 meses de edad con libre

acceso a una dieta regular o dieta rica en grasa (*ad libitum*). Hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (dieta control, N=6; dieta grasa, N=5), hembras *lacDrd2KO* (dieta control, N=6; dieta grasa, N= 5). Los resultados se analizaron por ANOVA de dos factores donde \*  $P < 0,05$  vs ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* para una misma dieta y “a”  $p < 0,05$  vs. dieta control para un mismo genotipo.

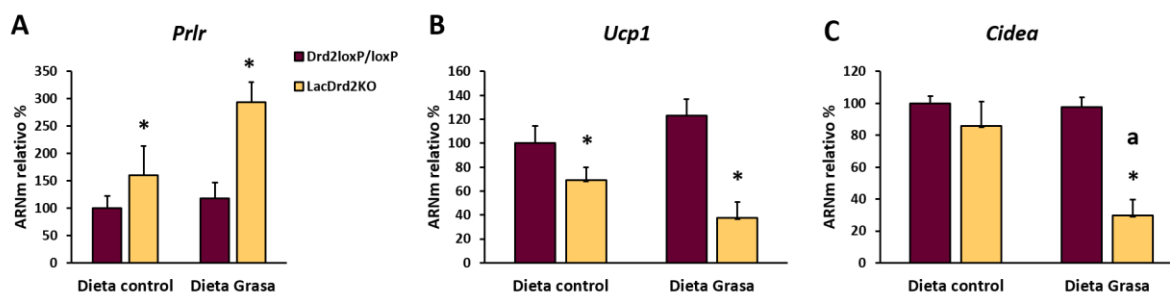
## Dieta Fatty

En primer lugar, encontramos que hembras *lacDrd2KO* tenían niveles de expresión de *Prlr* significativamente elevados respecto de sus pares control, diferencia que se volvió aún más contundente cuando se las ha expuso a una dieta rica en grasa por dos meses (Figura 44 A). Este resultado va en línea con las tendencias que observamos para ratones alimentados con la dieta comercial *Research Diets*.

Luego, evaluamos marcadores de capacidad termogénica del tejido. Observamos que los niveles de expresión basal de *Ucp1* bajo una alimentación con dieta regular, eran menores en las hembras *lacDrd2KO* que en hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, en consonancia con los resultados previos, lo que reafirma la idea desarrollada de que, en condiciones basales, el modelo hiperprolactinémico tiene un tejido adiposo pardo de capacidad termogénica reducida (Figura 44 B). Dado que los depósitos de grasa parda cumplen un papel crítico en la regulación del balance energético, la disminución del gasto de energía termogénica podría explicar el desequilibrio entre el consumo y el gasto de calorías que subyace al sobrepeso observado en nuestro modelo.

*Cidea* es otro de los genes que se expresa específicamente en el tejido adiposo pardo. Evidenciamos una disminución de los niveles de expresión de *Cidea* en hembras *lacDrd2KO* alimentadas con dieta grasa respecto de hembras control que recibieron la misma dieta, y más aún, evidenciamos el impacto de la dieta sobre la expresión de dicho gen en hembras *lacDrd2KO*. Estos resultados son similares a los obtenidos con la dieta *Research Diets*, y sugieren que las alteraciones en los niveles de expresión de *Cidea* posiblemente sean un factor importante en la desregulación de la capacidad termogénica del BAT que subyace al aumento de peso observado en las hembras DG *lacDrd2KO* (Figura 44 C).





**Figura 44. Caracterización del impacto de una dieta grasa producida en el laboratorio sobre el perfil de expresión del tejido adiposo marrón.** Niveles de ARNm de A) *Prrl*, B C) *Ucp1* y *Cidea* indicadores de capacidad termogénica, en ratones hembra *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y *lacDrd2KO* de 5 meses de edad con libre acceso a una dieta regular o dieta rica en grasa (*ad libitum*). Hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (dieta control, N=6; dieta grasa, N=5), hembras *lacDrd2KO* (dieta control, N=6; dieta grasa, N= 5). Los resultados se analizaron por ANOVA de dos factores donde \*  $p < 0,05$  vs ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* para una misma dieta y "a"  $p < 0,05$  vs. dieta control para un mismo genotipo.

## ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL TEJIDO ADIPOSEO PARDO

Dada la alteración observada en los pesos de los depósitos de tejido adiposo pardo y en el perfil de expresión de genes característicos de dicho tejido, y la disminución en la expresión de genes característicos de la grasa parda por hiperprolactinemia, o como consecuencia de la exposición a una dieta rica en grasa, decidimos analizarlo histológicamente. Para ello utilizamos la técnica de hematoxilina-eosina en cortes de tejido adiposo marrón incluido en parafina de hembras *lacDrd2KO* y *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* de 5 meses de edad que completaron el protocolo de ingesta de grasa comercial.

En cortes de tejido adiposo marrón de hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* alimentadas con dieta regular, identificamos la presencia de numerosos adipocitos marrones de citoplasma granuloso, cargado de gotas lipídicas de distinto tamaño que, tras el procesamiento histológico estándar, pierden su contenido y se visualizan como espacios vacíos dándole al adipocito su aspecto multilocular (Figura 45). Sorprendentemente, encontramos que la exposición a una dieta rica en grasa comercial durante dos meses, altera la morfología de los depósitos de grasa parda. Particularmente observamos un mayor contenido de lípidos en el tejido, que se evidencia por la aparición de abundantes gotas lipídicas rodeando a los adipocitos multiloculares, sugiriendo adipogénesis activa en el tejido.

Asimismo, encontramos que los cortes histológicos de hembras control expuestas a alimentación grasa durante dos meses, tenían un aspecto similar al microscopio óptico que aquellos

obtenidos para la grasa parda de hembras lacDrd2KO con alimentación regular evidenciando un efecto del contexto de la alimentación sobre la fisiología del tejido. Más aún, el impacto de la dieta grasa sobre la morfología de la grasa parda de hembras hiperprolactinélicas profundizó aún más las diferencias observadas respecto de las condiciones control.

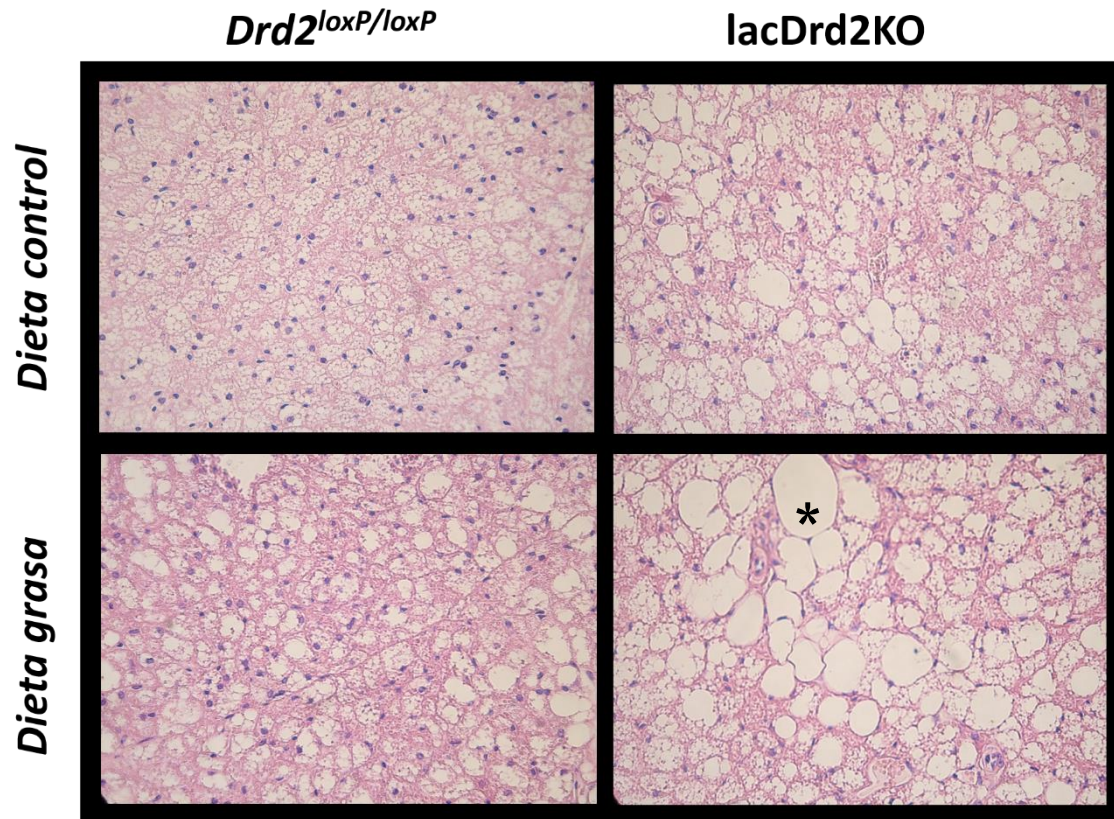


Figura 45. **Tejido adiposo marrón interescapular.** Imágenes representativas tomadas por microscopio óptico de las hematoxilinas eosinas realizadas en cortes de tejido adiposo marrón de la región interescapular de ratones hembras lacDrd2KO y control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* de 5 meses de edad con libre acceso a una dieta regular o dieta rica en grasa comercial (*ad libitum*). En todos los casos, las imágenes fueron obtenidas con un objetivo 40X. \*Indica la presencia de una gota lipídica.

## DISCUSIÓN

Desde un punto de vista metabólico, el rol orexigénico de la prolactina es crítico durante la preñez y la lactancia, favoreciendo la ingesta y el almacenamiento de lípidos indispensable para cumplir con las necesidades energéticas durante estos dos períodos fisiológicos principales (Grattan 2015). Sin embargo, dichos cambios adaptativos podrían resultar perjudiciales en un ambiente obesogénico, definido como aquel que se caracteriza por la presencia de factores externos que pueden conducir al desarrollo de sobrepeso, que exige un mayor gasto de energía para mantener la homeostasis energética en lugar de un aumento de la ingesta de calorías.

Evidencia previa obtenida en nuestro laboratorio muestra que los ratones hembra *lacDrd2KO* presentan niveles basales de prolactina superiores a los de las hembras controles *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* desde el primer mes de vida hasta los 11 meses de edad (Perez-Millan *et al.* 2014). A pesar de la hiperprolactinemia crónica, los animales tienen un peso aumentado recién a partir del quinto o sexto mes de vida, y como demostráramos en el Capítulo 2 cambios en la sensibilidad a leptina, y en la expresión de genes hipotalámicos orexigénicos en forma tardía. En este contexto, nos propusimos evaluar el efecto metabólico de exponer a nuestro modelo de hembra hiperprolactinémica a una dieta rica en grasa durante dos meses a partir de los 3 meses de vida para poder caracterizar el papel patofisiológico de la activación PRLR en un contexto de exceso de disponibilidad de energía, y determinar si se podían acelerar los cambios metabólicos con el doble desafío: prolactina crónicamente elevada y dieta rica en grasa. En particular, en el presente capítulo caracterizamos el estado del balance energético durante una ventana de tiempo de exposición a una dieta rica en grasa.

Las dietas altas en grasas se han utilizado ampliamente como modelo para estudiar respuestas adaptativas a los trastornos metabólicos que son impulsados por la exposición a un ambiente obesogénico. Para asegurar la robustez de nuestros resultados, utilizamos dos dietas, que, aunque tenían una composición calórica y porcentaje de grasa levemente diferentes, seguían la premisa fundamental de tener un porcentaje de grasa significativamente mayor que el alimento regular. Como primera aproximación, utilizamos un alimento rico en grasa preparado en el laboratorio embebiendo el alimento balanceado regular en el primer jugo bovino, dieta que recibió el nombre de “Dieta *Fatty*”. Luego, repetimos el protocolo con otros dos lotes independientes de animales alimentados con una dieta comercial enriquecida en grasa a la que denominamos “Dieta *Research Diets*”. En ambos casos, validamos que aquellas hembras que recibieron una dieta enriquecida consumieron significativamente una mayor cantidad de grasa de manera sostenida a lo largo de todo el experimento.

Antes de comenzar a discutir los resultados, resulta importante mencionar que el primer lote de animales que completó el protocolo de dieta rica en grasa *Fatty*, lo inició con 6 meses de edad. Cuando analizamos los resultados preliminares obtenidos llegamos a la conclusión de que posiblemente las alteraciones preexistentes en los mecanismos de control del balance energético en hembras *lacDrd2KO*, que subyacen a las diferencias de peso encontradas entre genotipos desde la primera medición, impedían hacer un análisis comparativo sobre el impacto de la dieta en el metabolismo energético. Por este motivo, los dos lotes restantes de hembras alimentadas con dieta *Fatty* y los dos lotes independientes de hembras alimentadas con dieta *Research Diets*, iniciaron el protocolo con 3 meses de edad. Si bien a esa edad la hiperprolactinemia ya es evidente, la caracterización previa de los parámetros metabólicos del modelo experimental no arrojó diferencias significativas en el peso corporal

Como primera aproximación, nos propusimos caracterizar la progresión del peso corporal y el comportamiento de ingesta en nuestro modelo de hembra hiperprolactinéica a una edad en la que el peso corporal se encontraba conservado.

El análisis de la progresión del peso corporal mostró un efecto dieta y un efecto genotipo. Las hembras *lacDrd2KO* alimentadas con dieta rica en grasa comercial presentaron un aumento significativo del peso corporal a partir de la tercera semana respecto de hembras del mismo genotipo alimentadas con dieta regular y, desde la semana 2, tuvieron un peso corporal significativamente mayor que las hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* que recibieron el mismo tipo de dieta. Sorprendentemente, esta diferencia de peso entre genotipos aumentó conforme transcurrieron las semanas de manera que, al finalizar el experimento, las hembras *lacDrd2KO* habían aumentado un 30% su peso corporal tras dos meses de alimentación rica en grasa, mientras que las hembras control tan solo un 14%. El aumento de peso corporal encuentra explicación cuando evaluamos los niveles de ingesta en hembras hiperprolactinéicas. Observamos que las hembras *lacDrd2KO* mostraron un comportamiento hiperfágico a lo largo de todo el experimento, esto es, a igual dieta, la cantidad de alimento consumido fue siempre mayor en hembras hiperprolactinéicas en comparación con hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, lo que sugiere un balance energético alterado. Estos resultados encuentran su correlato en estudios en otros modelos animales que muestran que la hiperprolactinemia se asocia a un aumento de peso como resultado de una mayor ingesta. Por ejemplo, en ratas, se describió que la hiperprolactinemia crónica está asociada a un aumento de la ingesta de alimento y del peso corporal, y que este efecto se puede revertir con la administración de un agonista dopaminérgico como la bromocriptina (Baptista *et al.* 2004; Gerardo-Gettens *et al.* 1989). Incluso se ha encontrado que este aumento en los niveles de ingesta es dosis-dependiente, ratas

tratadas con prolactina muestran un comportamiento hiperfágico y ganan más peso que las ratas control tratadas con solución salina (Gerardo-Gettens *et al.* 1989).

El aumento de la adiposidad corporal que subyace al aumento de peso observado, es producto de un desequilibrio entre la ingesta de calorías y el gasto energético. En condiciones fisiológicas, los depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo representan el sitio donde se acumula el exceso de energía como triglicéridos (Freedland 2004). Sin embargo, el tejido tiene una capacidad de almacenamiento de lípidos finita por lo que frente a una sobrecarga de calorías adicional, el exceso de lípidos circulantes se deposita de manera ectópica en depósitos de tejido adiposo blanco visceral (Freedland 2004) (Spalding *et al.* 2017; Serra *et al.* 2017). De esta manera, en un contexto de balance energético positivo, como sucede frente a alimentación con una dieta rica en grasa, no solo aumenta el tamaño de los depósitos de tejido adiposo subcutáneo, sino que también se registra una acumulación de lípidos excesiva en la grasa visceral, y en determinadas ocasiones en el hígado. Se ha demostrado que los depósitos de tejido adiposo responden a una dieta rica en grasa de manera diferente, el crecimiento de la grasa visceral asociado a la obesidad se debe a una combinación de hipertrofia (aumento del tamaño de los adipocitos) e hiperplasia (aumento del número de adipocitos), mientras que el crecimiento de los depósitos de tejido adiposo subcutáneo parece depender casi exclusivamente de la hipertrofia. Por otra parte, la acumulación excesiva de lípidos en los depósitos de tejido adiposo visceral, predispone al desarrollo de síndrome metabólico, definido como un conjunto de alteraciones metabólicas consideradas factores de riesgo para desarrollar una enfermedad cardiovascular y diabetes tipo II (Ibrahim 2010).

En este contexto, decidimos evaluar el peso de los depósitos de tejido adiposo blanco en los cuatro grupos experimentales. Como era de esperar, y en concordancia con los resultados de la bibliografía, encontramos que la dieta rica en grasa aumentó significativamente el peso de los depósitos de tejido adiposo subcutáneo y visceral, éste último incluyó en nuestras mediciones el tejido adiposo gonadal y el mesentérico, en hembras alimentadas con la dieta rica en grasa comercial *Research Diets* y el peso de la grasa gonadal en hembras alimentadas con dieta *Fatty* en ambos genotipos, demostrando que estos tejidos son sensibles al efecto de la dieta grasa.

Además de observar un claro efecto del tipo de dieta sobre el tamaño de los depósitos de tejido adiposo blanco caracterizados, que puede ser explicado por el desbalance energético en hembras alimentadas con dieta grasa que es consecuencia de un mayor consumo de grasa a lo largo de todo el protocolo, también se evidenció un efecto del genotipo sobre el peso del tejido adiposo blanco subcutáneo en hembras lacDrd2KO. Esto significa que, independientemente del tipo de dieta recibida, los depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo de hembras hiperprolactinémicas siempre

eran más pesados. La profundización del fenotipo de adiposidad incrementada observada en estas hembras podría ser consecuencia del efecto orexigénico de elevados niveles de prolactina séricos ya descrito en la literatura (Flint *et al.* 2003), que determina que a igual dieta, el fenotipo hiperprolactinéxico consume una mayor cantidad de calorías y grasa que son acumuladas como exceso de lípidos en los depósitos de grasa subcutánea o bien por el efecto directo reportado de la acción de prolactina sobre la fisiología del tejido adiposo subcutáneo. Ratones *knockout* para el *Prlr* tienen un desarrollo alterado del tejido adiposo subcutáneo debido a un menor número de adipocitos (Flint *et al.* 2003). Por otro lado, el tejido adiposo gonadal es uno de los depósitos de tejido adiposo más grandes en roedores y se encuentra alrededor de los testículos de los machos (epidídimo) y alrededor de los ovarios de las hembras (periovárico). Este depósito se incrementa específicamente en roedores alimentados con una dieta de cafetería (Miller *et al.* 2008). Por otro lado, en la obesidad inducida por dieta, se observa un aumento en el tamaño de los depósitos de tejido adiposo subcutáneo y visceral tras dos meses de dieta rica en grasa (Kim *et al.* 2014). Este incremento de adiposidad observado está posiblemente asociado a la cantidad de grasa incorporada semanalmente con el alimento enriquecido en grasa, como lo observamos en nuestros experimentos.

El tejido adiposo marrón es un órgano altamente vascularizado con abundantes mitocondrias cuya función principal es la de oxidar triglicéridos para producir calor (Cannon & Nedergaard 2004; Harms & Seale 2013). Su capacidad termogénica lo convierte en una pieza fundamental en el control del peso corporal. Sin embargo, se ha demostrado que el peso del tejido adiposo pardo correlaciona positivamente con el peso corporal. En particular, el contenido lipídico del tejido correlaciona linealmente con el peso corporal y el peso del tejido (van Beek *et al.* 2015). Numerosa evidencia muestra que la obesidad se asocia con una reducción en la función de dicho tejido. Es decir que en general, un mayor peso no necesariamente indica mayor capacidad termogénica sino que se asocia a un tejido inactivo, ya que indica que los triglicéridos se almacenan en lugar de usarse para la producción de calor (Townsend & Tseng 2014). Esto está respaldado por un mayor contenido de gotas lipídicas en el tejido que correlaciona con un mayor peso corporal. La correlación observada entre el peso del tejido adiposo pardo y el peso corporal puede explicarse por la función de aislamiento térmico del tejido adiposo blanco. El aumento de tejido adiposo blanco en la obesidad es suficiente para mantener la temperatura corporal por lo que la producción de calor por la actividad de la grasa parda se reduce y los triglicéridos se acumulan. En el caso del protocolo de alimentación con dieta comercial, observamos una tendencia en las hembras *lacDrd2KO* a tener depósitos de tejido pardo más pesados que las hembras control. Sorprendentemente, cuando analizamos los resultados obtenidos para el protocolo con dieta *Fatty*, encontramos que la exposición a una dieta rica en grasa durante dos meses, no alteraba el peso del tejido en las hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* pero sí se observó

un claro efecto de la dieta en hembras lacDrd2KO. El aumento en el peso del tejido es tan marcado tras dos meses de dieta grasa que, al comparar el peso promedio de la grasa parda de hembras hiperprolactinémicas con el de hembras control bajo el mismo tipo de dieta, observamos que, en promedio, el primero es tres veces mayor (0,07g vs. 0,23g). En conclusión, demostramos que la exposición a una dieta rica en grasa aumenta el peso de los depósitos de tejido adiposo pardo específicamente en hembras lacDrd2KO, y que, de acuerdo a bibliografía, este aumento de peso estaría asociado a una disminución de la capacidad termogénica del tejido (Shimizu *et al.* 2014). El análisis histológico del tejido de hembras expuestas a la dieta rica en grasa comercial arrojó resultados muy interesantes. Encontramos acumulación de gotas lipídicas en el depósito de grasa parda interescapular de hembras lacDrd2KO alimentadas con dieta regular y el tamaño de las inclusiones lipídicas fue mayor en el caso de las hembras que recibieron la dieta rica en grasa. Sorprendentemente, las alteraciones histomorfológicas observadas en el tejido iban en línea con los pesos registrados para los depósitos de tejido adiposo pardo en cada grupo experimental, siendo la acumulación de lípidos mayor en el caso de las hembras lacDrd2KO y menor para hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* validando el mayor impacto de la dieta rica en grasa sobre las hembras hiperprolactinémicas. En este último grupo no se observaron alteraciones histológicas evidentes igual que no se observaron cambios en el peso de los BAT como consecuencia de la exposición a dieta rica en grasa.

Tomando en consideración los resultados discutidos hasta el momento, podríamos decir que el aumento de peso de hembras lacDrd2KO que recibieron una dieta rica en grasa se debe a la combinación de una mayor ingesta de grasa y una menor eficiencia metabólica para hacerle frente a dicha sobrecarga calórica.

Estudiamos el peso del hígado, órgano de rol central en el control del balance energético, ya que participa de la regulación de múltiples vías metabólicas (lipogénesis, incorporación de ácidos grasos, oxidación de ácidos grasos, liberación de triglicéridos a circulación) pero sobretodo, un órgano susceptible a la acumulación ectópica de lípidos como gotas lipídicas en el citoplasma del hepatocito (Nguyen *et al.* 2008; Yaligar *et al.* 2014). Observamos que, al completar los dos meses de protocolo, las hembras lacDrd2KO tienen un hígado más pesado que su contraparte control que resulta independiente de la dieta recibida. Más específicamente, evidenciamos una tendencia al aumento bajo el protocolo de dieta rica en grasa comercial y un aumento significativo para el protocolo de dieta *Fatty*. Basándonos en evidencia previa que ha reportado casos de pacientes con prolactinomas que registran aumentos en el peso del hígado por acumulación de lípidos (Takaki *et al.* 2018), consideramos que posiblemente el aumento de peso del hígado observado en las hembras

hiperprolactinémicas resulte consecuencia de la obesidad asociada a los elevados niveles de prolactina séricos que se registran en nuestro modelo desde el primer mes de vida. Por otro lado trabajos previos publicados por el laboratorio demostraron un aumento en el contenido de triglicéridos y acumulación de grasa hepática evidenciada por tinción con *oil red* en ratones LacDrd2KO (Luque *et al.* 2016).

Determinamos a su vez, que, en líneas generales, los páncreas de los ratones hembra lacDrd2KO fueron más pesados que los de sus pares control  $Drd2^{loxP/loxP}$ , aunque los datos obtenidos para la dieta *Fatty* y la dieta *Research Diets* fueron ligeramente diferentes. En el caso de los animales que completaron el protocolo con la dieta grasa comercial, observamos que los pesos de los páncreas de las hembras hiperprolactinémicas de 5 meses de edad, fueron significativamente superiores independientemente de la dieta recibida, lo que sugiere un fuerte impacto de la prolactina sérica sobre la fisiología del órgano. Estos resultados son comparables con resultados del capítulo 1 en donde caracterizamos la función del páncreas en ratones hembra lacDrd2KO. Observamos que los páncreas de hembras hiperprolactinémicas de la misma edad con alimentación *ad libitum*, tenían una tendencia a ser más pesados que los de sus pares  $Drd2^{loxP/loxP}$  y explicamos que dicho aumento se debía a una mayor concentración de insulina intrapancreática medida por RIA y una mayor área insulino-positiva medida por inmunohistoquímica. Por otra parte, también publicamos previamente, que, si bien el número de islotes se encontraba conservado entre grupos, los ratones hembra lacDrd2KO tenían un mayor porcentaje de islotes de gran tamaño. El tamaño promedio de cada islote no llegó a ser significativamente mayor en las hembra lacDrd2KO, pero sí el área pancreática ocupada por islotes (Luque *et al.* 2016). Estos resultados van en línea con la acción positiva de la prolactina sobre la expansión de la células  $\beta$ , proceso necesario para la disponibilidad adecuada de insulina durante la preñez (Lopez-Vicchi F. *et al.* 2020). En lo referido a los resultados obtenidos para el protocolo con dieta *Fatty*, si bien no observamos diferencias significativas en el peso del páncreas entre genotipos, el hecho de que los páncreas de las hembras lacDrd2KO tendieran a ser más pesados que los de su contraparte control, indica reproducibilidad de resultados y aporta robustez a las conclusiones.

Muchos son los factores que nos condujeron a evaluar la homeostasis de la glucosa en nuestro modelo de hembra hiperprolactinémica lacDrd2KO. En primer lugar, existe una gran cantidad de trabajos que proponen un rol clave de la prolactina sobre la fisiología de las células del islote pancreático y la homeostasis de la glucosa, consistente con la presencia de PRLR en el páncreas endócrino (Ouhitit *et al.* 1994). En línea con estos resultados, nuestro laboratorio demostró previamente que las hembras lacDrd2KO alimentadas con dieta balanceada, tenían intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia y una secreción alterada de insulina en respuesta a una sobrecarga de



glucosa desde los 5 meses de edad, evidenciando un deterioro de la función de las células  $\beta$  pancreáticas (Luque *et al.* 2016). En este capítulo, mostramos que el sobrepeso observado en las hembras hiperprolactinémicas correlacionaba con aumentos en el peso del páncreas. Demostramos adicionalmente, un aumento del área beta positiva de islotes que se da en respuesta a la acción de prolactina sobre la expansión de los islotes, fundamental en la lactancia. Pero además el fenotipo indicaría la alteración del metabolismo glucídico por pérdida de funcionalidad de células  $\beta$  pancreáticas. En este contexto, hicimos un seguimiento semanal de la glucemia basal en ayunas durante los dos meses que duró el protocolo de alimentación con grasa *Fatty*. En esta primera aproximación a la caracterización del metabolismo de la glucosa, encontramos que la glucemia basal era significativamente menor en las hembras lacDrd2KO a lo largo de todo el experimento para ambas dietas. Si bien no observamos diferencias significativas en respuesta a las dietas considerando todas las semanas, cuando promediamos los valores de glucemia para cada grupo experimental a partir de la semana 7, comprobamos que los niveles basales de glucosa en sangre eran significativamente menores en las hembras hiperprolactinémicas y que hacia el final del tratamiento los valores de glucemia subían con la dieta grasa, manteniéndose las diferencias de genotipo. Evidencia previa muestra que la expresión de lactógeno placentario en las células  $\beta$  de ratón transgénico induce un incremento de la proliferación de células  $\beta$ , hiperplasia de islotes e hiperinsulinemia con hipoglucemia resultante (Vasavada *et al.* 2000). Considerando que el lactógeno placentario actúa vía el PRLR, estos resultados explicarían los bajos niveles de glucosa basal encontrados en las hembras lacDrd2KO de fenotipo hiperprolactinémico e hiperinsulinémico. Tomando estos resultados como punto de partida decidimos evaluar el efecto de la dieta sobre el metabolismo de la glucosa. Para ello, hicimos un GTT en hembras que habían sido sometidas al protocolo de exposición a una dieta grasa comercial. Observamos que la exposición a una dieta rica en grasa induce intolerancia a la glucosa en hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, dado que los niveles de glucosa en sangre permanecen significativamente más elevados en hembras alimentadas con dieta enriquecida en comparación con sus pares alimentadas con dieta regular. Por otro lado, observamos que las hembras lacDrd2KO con alimentación balanceada tienen un fenotipo de intolerancia a la glucosa a los 5 meses de edad (en comparación con las *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* dieta control) y que la dieta grasa profundiza levemente la intolerancia dado que promediando los 120 minutos post sobrecarga de glucosa, la glucemia no vuelve a su nivel basal como ocurre en las alimentadas con dieta regular. Sorprendentemente, podemos concluir que encontramos que el efecto genotipo es similar al efecto de exposición a dieta rica en grasa, es decir que acelera la aparición del fenotipo de intolerancia a la glucosa bajo alimentación regular *ad libitum*. Resultados previos de nuestro laboratorio, y de otros utilizando prolactina en altas dosis, demuestran que se altera el mecanismo de señalización por medio del cual la glucosa entra a la célula beta y estimula la

secreción de insulina (Park et al., 2011) (Luque et al., 2016). En particular se observaron alteraciones en la expresión de GLUT2 y glucocinasa en células  $\beta$  en respuesta a altas dosis de prolactina y lo que desacoplaría el efecto de glucosa sobre la liberación de insulina (Park et al., 2011) (Petryk et al., 2000).

Finalmente nos propusimos evaluar los mecanismos subyacentes al mayor impacto de la dieta rica en grasa sobre el balance energético de las hembras lacDrd2KO haciendo foco en la caracterización del perfil de expresión génica de los depósitos de tejido adiposo dado su rol central en el mantenimiento de la homeostasis energética. La identificación del tejido adiposo como órgano metabólico ha cobrado importancia en los últimos años pues la obesidad se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más graves de este siglo y la disfunción del tejido adiposo es considerada uno de los eventos centrales que inician su desarrollo. En los mamíferos, el tejido adiposo está compuesto esencialmente por el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo que tienen diferente morfología, distribución, perfil de expresión génica y función. El desarrollo de la obesidad depende no solo del equilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético, sino también del equilibrio entre el tejido adiposo blanco, como el principal reservorio de energía, y el tejido adiposo pardo, especializado en el gasto energético gracias a su capacidad termogénica.

Como hemos descrito anteriormente, el tejido adiposo blanco subcutáneo es un tejido metabólicamente plástico, sensible a la acción de prolactina. Como las hembras hiperprolactinémicas muestran un mayor aumento de peso que los animales control bajo el mismo tipo de dieta, y ese aumento se explica en parte por un aumento en el peso de los depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo, nos pareció interesante evaluar el efecto metabólico de elevados niveles de prolactina séricos sobre dicho tejido (Auffret *et al.* 2012).. En primer lugar, encontramos que los niveles de *Prlr* eran significativamente menores en hembras lacDrd2KO independientemente de la dieta recibida, y que la misma solo tuvo efecto sobre la expresión de dicho gen en hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. Estos resultados sugieren una disfuncionalidad del tejido adiposo en presencia de niveles de prolactina crónicamente elevados o de una dieta rica en grasa en los controles, ya que es conocido que la prolactina induce a expresión de su propio receptor en distintos tejidos. Otro resultado sumamente interesante fue que los niveles de *Ucp1* fueron prácticamente indetectables en ausencia de estímulo, y se evidenció un aumento significativo en los niveles de expresión de *Ucp1* por efecto de la dieta rica en grasa en ambos genotipos. Se ha observado que estímulos tales como una dieta hipercalórica promueven la aparición de tejido adiposo pardo termogénicamente activo (Rothwell & Stock 1997). Por el contrario, en ratas la ausencia de alimentación hipercalórica conduce a la atrofia de los depósitos de tejido con capacidad termogénica (Villarroya *et al.* 1986a). Por otro lado, se ha descrito que la ausencia de estimulación con prolactina en el modelo de ratón *Prlr*<sup>-/-</sup> induce la aparición de

focos de células *beige* con capacidad termogénica en los depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo en respuesta a estímulos tales como la exposición a una dieta rica en grasa. Estos adipocitos que expresan *Ucp1* disipan el exceso de calorías consumidas como calor favoreciendo un fenotipo de resistencia a obesidad inducida por dieta (Auffret *et al.* 2012). Es por ello, al conocido efecto de la dieta grasa de elevar *Ucp1* en tejido subcutáneo podríamos proponer que, si bien la sobre estimulación con prolactina debería disminuir el beiging, la disminución del *Prlr* podría impedir este efecto de la prolactina, y por ello solo se observa en efecto dieta. Alternativamente, el efecto dieta puede ser mas importante que el de prolactina, que queda enmascarado. Por el contrario, la presencia de una señalización activa de prolactina podría participar en el mantenimiento del fenotipo de adipocitos blancos de estos depósitos de grasa y favorecer la adipogénesis, aumentando los depósitos de grasa subcutánea. En este contexto evaluamos los marcadores de adipocitos blancos, *Lpl* y *adiponectina*.

Los niveles de expresión del *Prlr* disminuyen en la grasa subcutánea en hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y como era de esperar, aumenta la expresión de *Ucp1* en el tejido indicando inducción de la capacidad termogénica que permite disipar la sobrecarga de calorías ingerida con la dieta. Por otro lado, observamos que las hembras hiperprolactinémicas *lacDrd2KO* tenían menores niveles de *Prlr* en el tejido independientemente de la dieta recibida lo que sugiere un claro efecto de los altos niveles de prolactina endógena sobre la regulación de su propio receptor. Sorprendentemente, observamos que la ausencia de la estimulación con prolactina induce el aumento en los niveles de expresión de *Ucp1* indicando la aparición de adipocitos con fenotipo termogénico. Si bien la acción de prolactina vía su propio receptor también se ve interrumpida en hembras *lacDrd2KO* alimentadas con dieta regular, en este caso no se observa inducción de expresión de *Ucp1* dado que es necesario el estímulo de la dieta grasa para que se dé el fenómeno de transdiferenciación a adipocito *beige* (Auffret *et al.* 2012).

Evidencia bibliográfica muestra que niveles elevados de prolactina sérica disminuyen la expresión de *Lpl* y *adiponectina* *in vivo* e *in vitro*, favoreciendo un fenotipo obeso (Pala *et al.* 2016). Por este motivo, decidimos evaluar los niveles de expresión de ambos genes en nuestros grupos experimentales. Encontramos su expresión es significativamente más baja en el modelo hiperprolactinémico para los dos tipos de dieta. La lipoproteína lipasa (LPL) es la enzima limitante de la velocidad para la absorción y el almacenamiento de ácidos grasos libres en el tejido adiposo. Los ácidos grasos necesarios pueden provenir de fuentes externas, como ácidos grasos libres en circulación o triglicéridos transportados por lipoproteínas (quilomicrones, VLDL o LDL) que, en este caso, deben ser previamente hidrolizados por la enzima LPL presente en el endotelio de los capilares del adipocito para poder ser incorporados (Proenca *et al.* 2014). El hecho de que los niveles de

expresión de *Lpl* sean más bajos en las hembras *lacDrd2KO* indica que el tejido adiposo subcutáneo se encuentra limitado en su capacidad para seguir almacenando lípidos por lo que se depositan ectópicamente sobre otros tejidos, conduciendo a un aumento en el tamaño de los depósitos de tejido adiposo visceral y predisponiendo al desarrollo de síndrome metabólico (Serra *et al.* 2017). Esto se explicaría tanto para el tejido adiposo subcutáneo como gonadal mesentérico.

La adiponectina es una hormona sintetizada por el tejido adiposo y liberada a circulación, que regula la homeostasis energética actuando como mensajero importante en el diálogo entre el tejido adiposo y otros tejidos u órganos metabólicos. Es pleiotrópica, estimula la oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético, inhibe la producción de glucosa en el hígado, y una de sus funciones fisiológicas primarias es la de aumentar la sensibilidad a la insulina (Fang & Judd 2018). Es importante destacar que los niveles de expresión y séricos de adiponectina se encuentran disminuidos en pacientes, cerdos y roedores obesos, y se demostró que esto se asocia a mecanismos de regulación de la homeostasis energética alterados (Fang & Judd 2018). Toda esta evidencia sugiere que la adiponectina puede actuar como un factor endocrino / paracrino / autocrino que previene la progresión hacia un fenotipo obeso (Nigro *et al.* 2014). Encontramos que los niveles de expresión de *adiponectina* en tejido adiposo subcutáneo se encontraban significativamente disminuidos en las hembras *lacDrd2KO* evidenciando un efecto de los elevados niveles de prolactina circulante y en línea con la evidencia obtenida de la bibliografía, esto se enmarca dentro de un fenotipo de intolerancia a la glucosa e incremento de adiposidad. No encontramos efecto de la dieta para este gen en tejido adiposo subcutáneo

Según la bibliografía, la autofagia contribuye a la inactivación de la termogénesis en los depósitos de tejido adiposo. Numerosos estudios experimentales en modelos animales demuestran que existe una relación inversa entre la capacidad termogénica y la autofagia (Cairo & Villarroya 2019). El aumento que observamos en *Ucp1* frente a la exposición a una dieta rica en grasa sugería que el tejido adiposo subcutáneo podría estar desarrollando focos de *beiging* con presencia de adipocitos con capacidad termogénica. Esto nos condujo a evaluar los niveles de expresión de indicadores de actividad autofágica. Si bien no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de los indicadores de actividad autofágica *Beclin*, *Ulk-1* y *Lamp* entre los grupos experimentales, observamos las mismas tendencias en el patrón de expresión de *Ulk-1*, proteína que media la iniciación de la formación del autofagosoma y *Lamp*, componente proteico de la membrana lisosomal requerido para la fusión del lisosoma y el fagosoma. La dieta grasa tendía a disminuir la expresión de *Ulk-1* y *Lamp* en ambos genotipos, lo que sugiere un posible impacto negativo de la dieta sobre la inducción del proceso autofágico. Esto va en línea con lo descrito en bibliografía que indica que la

inactivación de autofagia en el tejido adiposo permite la aparición de adipocitos con capacidad termogénica que producen calor a expensas de una reducción de los depósitos de triglicéridos del tejido adiposo blanco. La disipación de la sobrecarga calórica como calor, permitiría proteger contra la obesidad inducida por dieta. Si bien se observa que los genes autofágicos bajan frente a la exposición a una dieta rica en grasa, vemos que los niveles de expresión basales tienden a ser mayores en las hembras lacDrd2KO lo que sugiere una desregulación en el proceso de autofagia en nuestro modelo de hiperprolactinemia, que como indica evidencia reciente, podría contribuir a la iniciación o progresión de un desorden metabólico en el tejido adiposo subcutáneo.

El aumento de peso observado por exposición a una dieta rica en grasa sugiere un desequilibrio entre la ingesta y el gasto calórico. En este contexto, decidimos caracterizar el perfil de expresión génica del tejido adiposo marrón, dado que su función termogénica es responsable en gran medida de mantener el balance energético (Nicholls 1983) (Hamann *et al.* 1996) (Nedergaard *et al.* 2007) (Bartelt *et al.* 2011) (Nedergaard & Cannon 2010).

La obesidad está asociada a una reducción de la capacidad termogénica del tejido adiposo marrón (Shimizu *et al.* 2014). Por ello, decidimos evaluar los niveles de expresión del PRLR. Nuestra decisión se basó en la evidencia previa que muestra que existe una estrecha asociación entre la prolactina y la regulación del balance energético y en particular en termogénesis, y nuestros resultados del capítulo 2 mostraban un efecto de genotipo sobre la expresión de *Ucp1* en el tejido adiposo pardo. Se han identificado PRLR funcionales en tejido adiposo blanco y marrón, que son esenciales en la adipogénesis y en la termogénesis adaptativa (Viengchareun *et al.* 2008). Ratones *knockout* para el *Prlr* sometidos a una dieta alta en grasas durante 16 semanas mostraron resistencia al aumento de peso y una reducción del tamaño de los depósitos de tejido adiposo blanco en comparación con ratones *wildtype*. Estos ratones también mostraron niveles mayores de marcadores específicos de tejido adiposo pardo (*Ucp1*, *Pgc1  $\alpha$* ) y focos de adipocitos *beige* (Auffret *et al.* 2012). Contrariamente, durante la lactancia, cuando los niveles de prolactina son elevados, disminuyen los niveles de expresión de genes termogénicos en el tejido adiposo pardo (Krol *et al.* 2011) indicando una asociación negativa entre la prolactina y la capacidad termogénica del tejido adiposo pardo. Encontramos una tendencia al aumento de los niveles de expresión del *Prlr* en las hembras lacDrd2KO que formaron parte del protocolo de dieta rica en grasa *Research Diets*, y esta diferencia en los niveles de expresión fue significativa en el caso de la dieta *Fatty*. A priori, la hiperprolactinemia observada en hembras lacDrd2KO y el aumento en los niveles de expresión de su receptor, podría conducir a una disminución de la capacidad termogénica del tejido. Por este motivo, decidimos evaluar la expresión de dos genes característicos de la grasa marrón, *Ucp1* y *Cidea*, que se encuentran en constante diálogo

para regular la capacidad termogénica del tejido. En concordancia con lo que se ha descrito en bibliografía sobre el rol de la prolactina en la grasa parda encontramos que *Ucp1* se encontraba significativamente disminuido en hembras lacDrd2KO independientemente de la dieta recibida en el protocolo de dieta comercial y en el de dieta *Fatty*, indicando capacidad termogénica reducida en el modelo hiperprolactinémico, que, en última instancia, predispone al desarrollo de un fenotipo obeso. En el caso particular de la dieta comercial, las hembras lacDrd2KO también tuvieron niveles de expresión de *Pgc1  $\alpha$*  significativamente más bajos bajo alimentación balanceada y alimentación rica en grasa. Esto se explica porque la activación de vías de señalización de *Pgc1  $\alpha$*  inducen la biogénesis mitocondrial y aumentan los niveles de expresión de genes específicos de la grasa marrón tales como *Ucp1* (Auffret *et al.* 2012). Por lo tanto, niveles bajos de *Pgc1  $\alpha$*  se asocian a niveles bajos de expresión de *Ucp1*. En ratones, al igual que *Ucp1*, *Cidea* no se expresa en adipocitos blancos sino que se encuentra muy representado en adipocitos marrones y *beige* (Abreu-Vieira *et al.* 2015). Encontramos una disminución significativa en los niveles de expresión de *Cidea* en hembras lacDrd2KO de ambos protocolos *Fatty* y *Research Diets*. En ambos casos, la disminución es aún mayor si las hembras fueron expuestas a la dieta rica en grasa. Recapitulando parte de lo que fue discutido hasta el momento, es conocido que la disfunción del tejido adiposo pardo está asociada a un aumento de la acumulación de grandes gotas lipídicas y la pérdida de mitocondrias por mitofagia que le otorgan al tejido un fenotipo similar el de los depósitos de tejido adiposo blanco. Este fenómeno conocido como *blanqueamiento* o *whitening* del tejido se asocia a una reducción en los niveles de expresión de marcadores típicos del tejido adiposo marrón como son *Ucp1*, *Pgc1  $\alpha$*  y *Cidea* (Shimizu *et al.* 2014). La descripción de nuestros cortes histológicos de grasa marrón mostraba claras diferencias entre los grupos experimentales en lo referido al contenido lipídico. Observamos que la acumulación de lípidos era mayor en las hembras hiperprolactinémicas lacDrd2KO que en las hembras control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y que esta diferencia se profundizaba con la exposición a una dieta rica en grasa. En este contexto y de acuerdo con la bibliografía, sugerimos que la acumulación de lípidos en el tejido observada en hembras lacDrd2KO podría conducir a la disminución de los niveles de expresión de *Ucp1*, *Pgc1  $\alpha$*  y *Cidea*, marcadores del tejido adiposo pardo. Y nuevamente podemos sugerir que el efecto genotipo es similar al efecto de exposición a dieta rica en grasa, es decir que acelera los cambios de expresión de marcadores termogénicos como el *Cidea*, mientras que para los genes *Ucp1* y *Pgc1  $\alpha$* , el efecto genotipo fue mas determinante.

Por último, sabemos que, aunque el tejido adiposo pardo y el tejido adiposo blanco subcutáneo ejercen funciones opuestas en términos energéticos, comparten la mayoría de los genes involucrados en la diferenciación de adipocitos y en el metabolismo lipídico por lo que decidimos evaluar los niveles de expresión de *Lpl* y *adiponectina*. Por un lado, no encontramos diferencias

significativas en los niveles de expresión de *Lpl* en ninguna de las condiciones. Encontramos, en cambio, diferencias contundentes en el perfil de expresión de *adiponectina* en los grupos experimentales en estudio. Observamos que la exposición a una dieta rica en grasa disminuye significativamente los niveles de expresión de dicho gen en ambos genotipos y que los niveles de expresión de *adiponectina* son significativamente más bajos en hembras lacDrd2KO que en su contraparte control para los dos tipos de dieta. Dado que se ha evidenciado que la concentración plasmática de adiponectina correlaciona negativamente con la obesidad, la disminución en los niveles de expresión de *adiponectina* en el tejido adiposo marrón observada en hembras lacDrd2KO en comparación con las hembras *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, y en hembras de ambos genotipos expuestas a dieta rica en grasa sugiere una menor contribución de adiponectina a los niveles plasmáticos que podría explicar el mayor aumento de peso. Estos cambios fueron paralelos a lo que se observó en el tejido adiposo subcutáneo.

Nuestros resultados demuestran que la dieta grasa acelera y profundiza los efectos metabólicos de la prolactina crónicamente elevada. A edades tempranas en las que normalmente no se observaba un mayor peso corporal (3 a 5 meses) en hembras lacDrd2KO, se observa que la dieta grasa potencia la ganancia de peso corporal, la intolerancia a la glucosa, y el aumento de peso del tejido blanco subcutáneo. En particular, la combinación de los desafíos metabólicos (prolactina y dieta grasa) tuvo gran impacto en el tejido adiposo pardo donde se observó un marcado *whitening* del tejido, y un descenso pronunciado y, muchas veces superior, para la combinación de los marcadores de termogénesis. Por otro lado, la adiponectina que se asocia en forma inversa a la obesidad mostró un marcado descenso en tejido adiposo pardo y subcutáneo en respuesta a la dieta y genotipo, y en el tejido adiposo pardo la combinación de desafíos tuvo un efecto mayor.

Nuestros resultados por lo tanto no solo destacan el rol metabólico de la prolactina, sino la necesidad de combinar insultos metabólicos para desbalancear la homeostasis. Esto es fundamental en el estudio de la obesidad, donde la prolactina o la dieta en forma aislada pueden tener efectos menores, pero su combinación con estrés, ansiedad, desbalance nutricional, o disruptores endocrinos ambientales, puede ser fundamental para el desarrollo del sobrepeso y obesidad.

# DISCUSIÓN GENERAL

La prolactina es una hormona con propiedades únicas. Es inhibida y no estimulada por el hipotálamo, siendo la dopamina, un neurotransmisor y no un péptido, la que ejerce una acción inhibitoria sobre los lactotropos. Otra característica saliente es la expresión de sus receptores en prácticamente todos los tejidos, lo que sugiere una acción pleiotrópica ejerciendo múltiples funciones complementarias que tienden a regular el metabolismo actuando en concierto en distintos órganos. Su función primordial es favorecer la lactancia, de allí su nombre, y ratones y humanos deficientes en prolactina no pueden lactar, siendo éste el fenotipo destacado, y las otras alteraciones menores. Sin embargo, numerosas otras acciones han cobrado relevancia, la mayoría de ellas, favoreciendo la homeostasis metabólica de preñez y lactancia.

Los niveles de prolactina varían durante el ciclo estral/menstrual, y se incrementan durante la preñez y lactancia, aunque el mecanismo exacto es específico de cada especie. Roedores tiene niveles bajos de prolactina en la segunda mitad de la preñez, y la placenta de estas especies produce el lactógeno placentario, un homólogo de prolactina que actúa sobre los PRLR. Son precisamente los niveles elevados de lactógenos placentarios que activan las neuronas dopaminérgicas para apagar la secreción de prolactina en este momento. En humanos, en cambio, las concentraciones de prolactina se incrementan a lo largo de la preñez, y en ambas especies la prolactina está alta en la lactancia, por estímulo de la succión.

El papel de prolactina en estos momentos fisiológicos responde a necesidades homeostáticas y homeostáticas de madre e hijo. Participa en el aumento de ingesta, y deposición grasa de manera de poder sostener la preñez y luego la lactancia. Establece una leve resistencia a la insulina de forma de evitar que la glucosa baje y así impedir un desarrollo inadecuado del cerebro fetal. Del mismo modo, estimula la proliferación de las células beta del páncreas permitiendo niveles séricos de insulina que eviten el desarrollo diabetes gestacional.

Por fuera de estos estadios fisiológicos se le han descripto funciones en la regulación del metabolismo, la reproducción y el sistema inmune, en concordancia con la expresión ubicua de sus receptores. Todas estas funciones que resultan adaptativas cuando los niveles de prolactina son los adecuados, pueden alterarse en estados de hiperprolactinemia farmacológica, como durante los tratamientos psiquiátricos que tienen como blanco el RD2, o patológica, consecuencia de la presencia de un prolactinomas. En esos contextos, funciones que son modulatorias o reguladoras, pueden alterar el metabolismo.



En este sentido, la hiperprolactinemia patológica predispone a la obesidad en humanos y podría generar aumento de peso y alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Estudios en hombres y mujeres, demostraron que la presencia de prolactinomas se asocia a una prevalencia más alta a la obesidad y alteraciones metabólicas tales como dislipidemia, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina. Por el contrario, muchas de estas alteraciones se normalizan al bajar los niveles de prolactina con agonistas dopaminérgicos (Ben-Jonathan et al., 2006, Berinder et al., 2011, Ciresi et al., 2013, Doknic et al., 2002, dos Santos Silva et al., 2011, Greenman et al., 1998, Pala et al., 2015, Peric et al., 2016). Aspectos patológicos en relación al metabolismo se ejemplifican en la asociación del locus de *PRL* (6p22.2–p21.3) y las variaciones en el índice de masa corporal identificados por GWAS (Nilsson et al., 2011). Más aun, SNPs ubicados en cercanía a los genes de *PRL* y *PRLR* se asocian a un mayor riesgo de obesidad y diabetes gestacional (Le et al., 2013). Es decir que el rol protector versus el patológico de la prolactina en la regulación de la adiposidad y obesidad es un tema de gran interés.

En este contexto nuestro interés hace foco en la desregulación del metabolismo cuando la prolactina está crónicamente elevada. Son pocos los modelos experimentales utilizados en la literatura, e incluyen inyección exógena, trasplante de hipófisis bajo la cápsula renal, o tratamientos farmacológicos con estrógenos o antagonistas dopaminérgicos. Otro modelo de hiperprolactinemia crónica es el ratón con delección global del RD2. Sin embargo, trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que estos ratones con niveles crónicamente elevados de prolactina, tenían pocos rasgos metabólicos alterados. Nuestros resultados indicaban claramente que, aunque el *knockout* total era hiperprolactinéxico, en él se solapan diversos fenotipos asociados a la ausencia global del RD2 que enmascaraban un posible efecto de la prolactina sobre el metabolismo energético.

Propusimos entonces un nuevo modelo, no farmacológico y más específico que el *knockout* total para RD2, un *knockout* condicionado con delección del RD2 únicamente en lactatropos: el ratón lacDrd2KO. Nuestros trabajos previos a la realización de esta tesis demostraron elegantemente la estrategia de generación, la hiperprolactinemia sostenida desde el primer mes de vida, y la integridad del RD2 central.

Con esta herramienta nuestros objetivos fueron el estudio de las acciones metabólicas de la prolactina crónicamente elevada, es decir una situación patológica que remeda los prolactinomas no tratados, o tratamientos psiquiátricos que antagonizan el RD2 en forma prolongada.

En primer lugar, describimos el fenotipo metabólico, trabajamos únicamente con hembras lacDrd2KO ya que los niveles de prolactina apenas incrementaron en machos. Elegimos dos edades, 5 meses edad a la cual la ingesta está aumentada pero el ratón no tiene un aumento significativo del

peso corporal y los 10 meses, cuando la hembra *lacDrd2KO* es obesa. Cabe destacar que el fenotipo metabólico fue florido, pero de gradual aparición.

Como mencionáramos, a los 5 meses, a pesar de tener una ingesta aumentada, el peso corporal de las hembras *lacDrd2KO* no se encontraba aumentado, indicando controles homeostáticos funcionales. Sin embargo, los niveles de insulina séricos registrados fueron más altos que los controles, y los de glucosa se encontraban disminuidos, fiel reflejo de la acción descrita para la prolactina sobre la expansión de las células beta. Como se ha propuesto para dosis patológicas de prolactina, la capacidad de liberar insulina en respuesta a la glucosa se encontraba alterada. Los pesos de los tejidos adiposos gonadal, mesentérico y pardo eran normales y se evidenció un aumento estadístico del peso del tejido adiposo blanco subcutáneo, mientras que los niveles de leptina circulantes no se encontraban significativamente aumentados. Podemos concluir entonces que, a los 5 meses de edad, la prolactina muestra un mayor impacto sobre el metabolismo de la glucosa que sobre el peso corporal y la adipogénesis.

A los 10 meses se agravaron las alteraciones patológicas, con un aumento mórbido del peso corporal, que se explica principalmente por un aumento del peso de los depósitos de tejido adiposo gonadal, mesentérico, subcutáneo y pardo, en correlación con niveles de leptina circulantes muy elevados. El peso del hígado también estaba aumentado.

Estos resultados claramente indicaban que entre los 5 y los 10 meses, el organismo, exigido por los niveles altos de prolactina, pierde mecanismos de control metabólicos. Para profundizar sobre esta arista, estudiamos los efectos de prolactina y leptina en el hipotálamo. Es de notar que la vía de señalización de prolactina y leptina más estudiada es la de JAK/STAT, y que la fosforilación de STAT5 y STAT3 son utilizadas como indicadores de la acción central de prolactina y leptina respectivamente.

Utilizando un enfoque inmunohistoquímico, encontramos primeramente que los núcleos hipotalámicos ARC, DMN y VMN, núcleos fundamentales en el control de la ingesta y el balance energético, mostraban un nivel de fosforilación de STAT5 basal más alto en hembras *lacDrd2KO* en comparación con su contraparte control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. Esto era una clara evidencia de un hipotálamo continuamente expuesto a prolactina. Sin embargo, cuando se administraba una sobrecarga de prolactina ip el ARC seguía respondiendo con fosforilación del STAT5, es decir que la capacidad de respuesta a esta hormona no se perdía. En los núcleos DMN y VMN, el nivel de respuesta fue menor en las hembras *lacDrd2KO*.

Por otro lado, un exhaustivo análisis del perfil de expresión génica de cada núcleo hipotalámico, permitió establecer que, a los 5 meses de edad en el ARC, únicamente el *Prlr* se

encontraba aumentado, mientras que a los 10 meses se registró un claro aumento en el nivel de expresión de *Npy* y *Agrp*, dos genes orexigénicos. Por otra parte, el VMN y el DMN también mostraron un fuerte incremento de *Npy* a los 10 meses. La falta de alteración en los niveles de expresión de los genes restantes estudiados (*Cart*, *Bdnf*, *Ira*, *Foxo1*, *Trkb1*, *Lepr*) destaca la especificidad de la respuesta a prolactina de los genes modificados (*Prlr*, *Agrp* y *Npy*), en los núcleos que mostraron los cambios (ARC, VMN y DMN), y en la temporalidad de los cambios, en su mayoría tardíos. Estos resultados indicaron una acción no muy contundente de la prolactina, pero que acumulada en el tiempo, impactó en núcleos hipotalámicos específicos, con blanco en genes orexigénicos.

El análisis de genes hipotalámicos claramente sugería una falta de respuesta a leptina a los 10 meses. A esta edad, como mencionáramos los valores eran muy elevados en las hembras lacDrd2KO, lo que debería resultar en una disminución en los niveles de expresión de *Npy* y *Agrp* para detener el entorno orexigénico, pero observamos exactamente lo contrario. Por ello, con el objetivo de validar nuestra hipótesis estudiamos el comportamiento de ingesta frente a un estímulo de leptina, comprobando que la respuesta inhibitoria de la ingesta se mantuvo a los 5 meses y se perdió a los 10 en las hembras lacDrd2KO. En forma paralela hubo una desensibilización núcleo específica en el MBH y no en los otros núcleos estudiados (PVN, AVPV o DMN) que se evidenció por una disminución en la fosforilación de STAT3.

Estos resultados en su conjunto mostraron que la acción de la prolactina crónicamente elevada es núcleo y gen específica, y basándonos en evidencia de la literatura obtenida para otros modelos experimentales de prolactina elevada (lactancia, preñez o farmacológicos) podemos decir que las acciones son específicas para cada modelo.

La acción de la prolactina sobre el DMN fue de gran interés. A los 10 meses el ARNm de *Npy* estaba incrementado en dicho núcleo. El NPY en este núcleo tiene funciones orexigénicas, y a través el sistema simpático disminuye la capacidad termogénica del tejido adiposo pardo. En concordancia, determinamos que, si bien el peso del dicho depósito de tejido era superior en hembras lacDrd2KO, la concentración de un gen marcador de actividad termogénica (*Ucp1*) era inferior, sugiriendo una capacidad termogénica reducida. Por lo tanto, la acción de la prolactina sobre el DMN incrementando el *Npy*, favorecería la obesidad por aumento de ingesta y disminución del gasto energético.

Por último, los cambios tardíos en la sensibilidad a leptina, y en la expresión de genes hipotalámicos orexigénicos en un entorno de prolactina crónicamente elevada, nos llevaron a evaluar el efecto metabólico de exponer a nuestro modelo de hembra hiperprolactinémica a una dieta rica en grasa durante dos meses a partir de los 3 meses de edad. Nuestro objetivo era caracterizar el papel

patofisiológico de la activación PRLR en un contexto de exceso de disponibilidad de energía, y determinar si se podían acelerar la aparición del fenotipo metabólicos con el doble desafío: prolactina elevada y dieta rica en grasa. Por ello, caracterizamos el estado del balance energético durante la ventana de tiempo de exposición a dos calidades de dieta rica en grasa de animales controles e hiperprolactinémicos.

Nuestros resultados demostraron que la dieta grasa acelera y profundiza los efectos metabólicos de la prolactina crónicamente elevada. A edades tempranas (3 a 5 meses) en las que normalmente no se observaba peso corporal aumentado en hembras *lacDrd2KO* se determinó que la dieta grasa potenciaba la ganancia de peso corporal, la intolerancia a la glucosa, y el aumento de peso del depósito de tejido blanco subcutáneo. Es de destacar que la combinación de los desafíos metabólicos (prolactina y dieta grasa) tuvo gran impacto en el tejido adiposo marrón donde se observó una mayor acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas por histología y una pérdida de capacidad termogénica indicada por un descenso pronunciado de los biomarcadores de capacidad termogénica de la grasa parda *Ucp1* y *Pgc1 $\alpha$* . Por otro lado, la adiponectina, que se asocia en forma inversa a la obesidad, mostró un marcado descenso en tejido adiposo pardo y blanco subcutáneo por efecto dieta y genotipo, y en el tejido adiposo pardo la combinación de desafíos tuvo un efecto mayor. El impacto de la prolactina sobre el tejido adiposo pardo fue muy claro, y apunta a un novedoso y poco estudiado mecanismo relacionado al desbalance energético que puede favorecer la obesidad: la disminución de la capacidad termogénica de la grasa parda.

Nuestros resultados, por lo tanto, no solo destacan el rol metabólico de la prolactina, la participación jerárquica del hipotálamo en el aumento de ingesta inducido por prolactina, sino también la necesidad de combinar insultos metabólicos para desbalancear la homeostasis. Esto es fundamental en el estudio de la obesidad, donde la prolactina o la dieta en forma aislada pueden tener efectos menores, pero su combinación con estrés, ansiedad, falta de ejercicio, desbalance nutricional, o disruptores endocrinos ambientales puede ser fundamental para el desarrollo del sobrepeso y obesidad.

## Reference List

- Abdullahi A & Jeschke MG 2017 Taming the Flames: Targeting White Adipose Tissue Browning in Hypermetabolic Conditions. *Endocrine reviews* **38** 538-549.
- Abreu-Vieira G, Fischer AW, Mattsson C, de Jong JM, Shabalina IG, Ryden M, Laurencikiene J, Arner P, Cannon B, Nedergaard J & Petrovic N 2015 Cidea improves the metabolic profile through expansion of adipose tissue. *Nat. Commun.* **6** 7433.
- Ahima RS & Flier JS 2000b Leptin. *Annual Review of Physiology* **62** 413-437.
- Ahima RS & Flier JS 2000a Leptin. *Annu. Rev. Physiol* **62** 413-437.
- Ahmed M, Nguyen HQ, Hwang JS, Zada S, Lai TH, Kang SS & Kim DR 2018 Systematic characterization of autophagy-related genes during the adipocyte differentiation using public-access data. *Oncotarget.* **9** 15526-15541.
- Altshuler-Keylin S & Kajimura S 2017 Mitochondrial homeostasis in adipose tissue remodeling. *Sci. Signal.* **10**.
- Altshuler-Keylin S, Shinoda K, Hasegawa Y, Ikeda K, Hong H, Kang Q, Yang Y, Perera RM, Debnath J & Kajimura S 2016 Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metab* **24** 402-419.
- ANAND BK, CHHINA GS, SHARMA KN, DUA S & Singh B 1964 ACTIVITY OF SINGLE NEURONS IN THE HYPOTHALAMIC FEEDING CENTERS: EFFECT OF GLUCOSE. *Am.J.Physiol* **207** 1146-1154.
- Anders Bjorklund 1987 Handbook of Chemical Neuroanatomy. *Elsevier*.
- Anderson GM, Beijer P, Bang AS, Fenwick MA, Bunn SJ & Grattan DR 2006 Suppression of prolactin-induced signal transducer and activator of transcription 5b signaling and induction of suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat during late pregnancy and lactation. *Endocrinology* **147** 4996-5005.
- Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschop MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL & Diano S 2008 UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* **454** 846-851.
- Arbogast LA & Voogt JL 1991 Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta. *Endocrinology* **128** 997-1005.
- Ashrafi G & Schwarz TL 2013 The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death. Differ.* **20** 31-42.
- Auffret J, Freemark M, Carre N, Mathieu Y, Turrel-Cuzin C, Lombes M, Movassat J & Binart N 2013 Defective prolactin signaling impairs pancreatic beta-cell development during the perinatal period. *Am.J.Physiol Endocrinol. Metab* **305** E1309-E1318.
- Auffret J, Viengchareun S, Carre N, Denis RG, Magnan C, Marie PY, Muscat A, Feve B, Lombes M & Binart N 2012 Beige differentiation of adipose depots in mice lacking prolactin receptor protects against high-fat-diet-induced obesity. *FASEB J.* **26** 3728-3737.

Augustine RA & Grattan DR 2008 Induction of central leptin resistance in hyperphagic pseudopregnant rats by chronic prolactin infusion. *Endocrinology* **149** 1049-1055.

Augustine RA, Knowles PJ, Khant AZ, Grattan DR & Ladyman SR 2019 Impaired hypothalamic leptin sensitivity in pseudopregnant rats treated with chronic prolactin to mimic pregnancy. *J Neuroendocrinol.* e12702.

Augustine RA, Ladyman SR & Grattan DR 2008 From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *J.Physiol* **586** 387-397.

Auriemma RS, De Alcubierre D, Pirchio R, Pivonello R & Colao A 2019 Glucose Abnormalities Associated to Prolactin Secreting Pituitary Adenomas. *Front Endocrinol.(Lausanne)* **10** 327.

Baerga R, Zhang Y, Chen PH, Goldman S & Jin S 2009 Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy.* **5** 1118-1130.

Bakowska JC & Morrell JI 1997a Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *J.Comp Neurol.* **386** 161-177.

Bakowska JC & Morrell JI 1997b Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *J.Comp Neurol.* **386** 161-177.

Ballinger MA & Andrews MT 2018 Nature's fat-burning machine: brown adipose tissue in a hibernating mammal. *J.Exp.Biol.* **221**.

Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang CY, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK & Lowell BB 2005 Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* **123** 493-505.

Baptista T, de Baptista EA, Lalonde J, Plamondon J, Kin NM, Beaulieu S, Joobar R & Richard D 2004 Comparative effects of the antipsychotics sulpiride and risperidone in female rats on energy balance, body composition, fat morphology and macronutrient selection. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* **28** 1305-1311.

Barber MC, Clegg RA, Finley E, Vernon RG & Flint DJ 1992 The role of growth hormone, prolactin and insulin-like growth factors in the regulation of rat mammary gland and adipose tissue metabolism during lactation. *Journal of Endocrinology* **135** 195-202.

Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, Eychmuller A, Gordts PL, Rinninger F, Bruegelmann K, Freund B, Nielsen P, Merkel M & Heeren J 2011 Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature Medicine* **17** 200-205.

Baskin DG, Figlewicz LD, Seeley RJ, Woods SC, Porte D, Jr. & Schwartz MW 1999 Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Research* **848** 114-123.

Beck B 2006 Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **361** 1159-1185.

Beck B, Jhanwar-Uniyal M, Bulet A, Chapleur-Chateau M, Leibowitz SF & Bulet C 1990 Rapid and localized alterations of neuropeptide Y in discrete hypothalamic nuclei with feeding status. *Brain Research* **528** 245-249.

Bellinger LL & Bernardis LL 2002 The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav.* **76** 431-442.

Ben Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD & LaPensee CR 2006 Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **17** 110-116.

- Ben Jonathan N, LaPensee CR & LaPensee EW 2008 What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine reviews* **29** 1-41.
- Ben Jonathan N, Mershon JL, Allen DL & Steinmetz RW 1996 Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine reviews* **17** 639-669.
- Ben Jonathan N, Oliver C, Weiner HJ, Mical RS & Porter JC 1977 Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology* **100** 452-458.
- Ben-Jonathan N, Neill MA, Arbogast LA, Peters LL & Hoefer MT 1980 Dopamine in hypophyseal portal blood: relationship to circulating prolactin in pregnant and lactating rats. *Endocrinology* **106** 690-696.
- Beranger GE, Karbiener M, Barquissau V, Pisani DF, Scheideler M, Langin D & Amri EZ 2013 In vitro brown and "brite"/"beige" adipogenesis: human cellular models and molecular aspects. *Biochim.Biophys.Acta* **1831** 905-914.
- Berlanga JJ, Garcia-Ruiz JP, Perrot-Applanat M, Kelly PA & Edery M 1997 The short form of the prolactin (PRL) receptor silences PRL induction of the beta-casein gene promoter. *Molecular Endocrinology* **11** 1449-1457.
- Bernard V, Young J & Binart N 2019 Prolactin - a pleiotropic factor in health and disease. *Nat.Rev.Endocrinol.* **15** 356-365.
- Berne RM & Levy MN 1993 *Physiology*. St. Louis, Missouri: Mosby Year Book.
- Berthoud HR 2012 The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. *Proc.Nutr.Soc.* **71** 478-487.
- Bevan JS, Webster J, Burke CW & Scanlon MF 1992 Dopamine agonists and pituitary tumor shrinkage. *Endocrine reviews* **13** 220-240.
- Bi S, Kim YJ & Zheng F 2012b Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides.* **46** 309-314.
- Bi S, Kim YJ & Zheng F 2012a Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides.* **46** 309-314.
- Bi S, Ladenheim EE, Schwartz GJ & Moran TH 2001 A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **281** R254-R260.
- Billes SK, Simonds SE & Cowley MA 2012 Leptin reduces food intake via a dopamine D2 receptor-dependent mechanism. *Mol.Metab* **1** 86-93.
- Bjorndal B, Burri L, Staalesen V, Skorve J & Berge RK 2011 Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J.Obes.* **2011** 490650.
- Bluher M 2013 Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* **27** 163-177.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N & Kelly PA 1998 Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine reviews* **19** 225-268.
- Bone AJ & Taylor KW 1976 Metabolic adaptation to pregnancy shown by increased biosynthesis of insulin in islets of Langerhans isolated from pregnant rat. *Nature* **262** 501-502.

- Brandebourg T, Hugo E & Ben Jonathan N 2007a Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions. *Diabetes Obes. Metab* **9** 464-476.
- Brandebourg TD, Bown JL & Ben Jonathan N 2007b Prolactin upregulates its receptors and inhibits lipolysis and leptin release in male rat adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **357** 408-413.
- Bray GA & Nishizawa Y 1978 Ventromedial hypothalamus modulates fat mobilisation during fasting. *Nature* **274** 900-902.
- Bray GA & York DA 1979 Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev.* **59** 719-809.
- Brelje TC, Parsons JA & Sorenson RL 1994 Regulation of islet beta-cell proliferation by prolactin in rat islets. *Diabetes* **43** 263-273.
- Breton C 2013 The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. *Journal of Endocrinology* **216** R19-R31.
- Bridges RS & Grattan DR 2018 30 years after: CNS actions of prolactin: Sources, mechanisms and physiological significance. *J Neuroendocrinol.* e12669.
- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M & Hokfelt T 1998 The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Science* **95** 15043-15048.
- Brouin I, Jomain JB, Tallet E, van Agthoven J, Raynal B, Hoos S, Kragelund BB, Kelly PA, Ducruix A, England P & Goffin V 2010 Crystal structure of an affinity-matured prolactin complexed to its dimerized receptor reveals the topology of hormone binding site 2. *Journal of Biological Chemistry* **285** 8422-8433.
- Brown RS, Herbison AE & Grattan DR 2011 Differential changes in responses of hypothalamic and brainstem neuronal populations to prolactin during lactation in the mouse. *Biology of Reproduction* **84** 826-836.
- Brown RS, Kokay IC, Herbison AE & Grattan DR 2010b Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J. Comp Neurol.* **518** 92-102.
- Brown RS, Kokay IC, Herbison AE & Grattan DR 2010a Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J. Comp Neurol.* **518** 92-102.
- Brown RS, Kokay IC, Herbison AE & Grattan DR 2010c Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J Comp Neurol.* **518** 92-102.
- Buntin JD, Hnasko RM & Zuzick PH 1999 Role of the ventromedial hypothalamus in prolactin-induced hyperphagia in ring doves. *Physiol Behav.* **66** 255-261.
- Buonfiglio DC, Ramos-Lobo AM, Freitas VM, Zampieri TT, Nagaishi VS, Magalhaes M, Cipolla-Neto J, Cella N & Donato J, Jr. 2016 Obesity impairs lactation performance in mice by inducing prolactin resistance. *Sci. Rep.* **6** 22421.
- Caccavelli L, Feron F, Morange I, Rouer E, Benarous R, Dewailly D, Jaquet P, Kordon C & Enjalbert A 1994 Decreased expression of the two D2 dopamine receptor isoforms in bromocriptine-resistant prolactinomas. *Neuroendocrinology.* **60** 314-322.
- Cairo M, Campderros L, Gavalda-Navarro A, Cereijo R, Delgado-Angles A, Quesada-Lopez T, Giralt M, Villarroya J & Villarroya F 2019 Parkin controls brown adipose tissue plasticity in response to adaptive thermogenesis. *EMBO Rep.* **20**.



- Cairo M & Villarroya J 2019 The role of autophagy in brown and beige adipose tissue plasticity. *J.Physiol Biochem.*
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R & Burn P 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* **269** 546-549.
- Cannon B & Nedergaard J 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* **84** 277-359.
- Carey AL, Vorlander C, Reddy-Luthmoodoo M, Natoli AK, Formosa MF, Bertovic DA, Anderson MJ, Duffy SJ & Kingwell BA 2014 Reduced UCP-1 content in in vitro differentiated beige/brite adipocytes derived from preadipocytes of human subcutaneous white adipose tissues in obesity. *PLoS.ONE.* **9** e91997.
- Carre N & Binart N 2014 Prolactin and adipose tissue. *Biochimie* **97** 16-21.
- Castano JP & Frawley LS 1995 Individual lactotropes release prolactin in a temporally divergent and sexually dimorphic pattern. *Am.J.Physiol* **269** E814-E819.
- Cederberg A, Gronning LM, Ahren B, Tasken K, Carlsson P & Enerback S 2001 FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* **106** 563-573.
- Cerf ME 2007 High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. *Med.Sci.Monit.* **13** RA12-RA17.
- Chang JS, Ghosh S, Newman S & Salbaum JM 2018 A map of the PGC-1alpha- and NT-PGC-1alpha-regulated transcriptional network in brown adipose tissue. *Sci.Rep.* **8** 7876.
- Chao PT, Yang L, Aja S, Moran TH & Bi S 2011 Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity. *Cell Metab* **13** 573-583.
- Chattopadhyay M, Khemka VK, Chatterjee G, Ganguly A, Mukhopadhyay S & Chakrabarti S 2015 Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects. *Mol.Cell Biochem.* **399** 95-103.
- Chen P, Li C, Haskell-Luevano C, Cone RD & Smith MS 1999 Altered expression of agouti-related protein and its colocalization with neuropeptide Y in the arcuate nucleus of the hypothalamus during lactation. *Endocrinology* **140** 2645-2650.
- Chen P & Smith MS 2004 Regulation of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression during lactation: role of prolactin. *Endocrinology* **145** 823-829.
- Cheung CC, Clifton DK & Steiner RA 1997 Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* **138** 4489-4492.
- Chhabra KH, Adams JM, Jones GL, Yamashita M, Schlapschy M, Skerra A, Rubinstein M & Low MJ 2016 Reprogramming the body weight set point by a reciprocal interaction of hypothalamic leptin sensitivity and Pomc gene expression reverts extreme obesity. *Mol.Metab* **5** 869-881.
- Ciccarelli A, Daly AF & Beckers A 2005 The epidemiology of prolactinomas. *Pituitary.* **8** 3-6.
- Cingolani F & Czaja MJ 2016 Regulation and Functions of Autophagic Lipolysis. *Trends Endocrinol.Metab* **27** 696-705.
- Clark JT, Kalra PS, Crowley WR & Kalra SP 1984 Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* **115** 427-429.
- Coleman RA & Lee DP 2004 Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog.Lipid Res.* **43** 134-176.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL & . 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine* **334** 292-295.

Corbacho AM, Valacchi G, Kubala L, Olano-Martin E, Schock BC, Kenny TP & Cross CE 2004 Tissue-specific gene expression of prolactin receptor in the acute-phase response induced by lipopolysaccharides. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **287** E750-E757.

Cordeira J & Rios M 2011 Weighing in the role of BDNF in the central control of eating behavior. *Mol.Neurobiol.* **44** 441-448.

Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF & Cone RD 1999 Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* **24** 155-163.

Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, McNally SR, Swain GP, Montagna C, Hager JH, Hanahan D, Edlund H, Magnuson MA, Garrett-Beal L, Burns AL, Ried T, Chandrasekharappa SC, Marx SJ, Spiegel AM & Collins FS 2003 Of mice and MEN1: Insulinomas in a conditional mouse knockout. *Mol.Cell Biol.* **23** 6075-6085.

Cristina C, García-Tornadú I, Diaz-Torga G, Rubinstein M, Low MJ & Becu-Villalobos D 2006 The dopaminergic D2 receptor knockout mouse: an animal model of prolactinoma. *Frontiers of Hormone Research* **35** 50-63.

Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM & Kahn CR 2009 Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *New England Journal of Medicine* **360** 1509-1517.

de Greef WJ & Neill JD 1979 Dopamine levels in hypophysial stalk plasma of the rat during surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. *Endocrinology* **105** 1093-1099.

Dellovade TL, Young M, Ross EP, Henderson R, Caron K, Parker K & Tobet SA 2000 Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes. *J.Comp Neurol.* **423** 579-589.

Demssie YN & Davis JR 2008 Hyperprolactinaemia. *Clin.Med.(Lond)* **8** 216-219.

Dennis Kasper AFSDHDLJLJL 2016 Harrison. Principios de Medicina Interna. *McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES.*

Desautels M & Himms-Hagen J 1980 Parallel regression of cold-induced changes in ultrastructure, composition, and properties of brown adipose tissue mitochondria during recovery of rats from acclimation to cold. *Can.J.Biochem.* **58** 1057-1068.

Devi YS, Shehu A, Halperin J, Stocco C, Le J, Seibold AM & Gibori G 2009 Prolactin signaling through the short isoform of the mouse prolactin receptor regulates DNA binding of specific transcription factors, often with opposite effects in different reproductive issues. *Reprod.Biol.Endocrinol.* **7** 87.

Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V, Kenny CD, Christiansen LM, White RD, Edelstein EA, Coppari R, Balthasar N, Cowley MA, Chua S Jr, Elmquist JK & Lowell BB 2006 Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* **49** 191-203.

Doknic M, Pekic S, Zarkovic M, Medic-Stojanoska M, Dieguez C, Casanueva F & Popovic V 2002a Dopaminergic tone and obesity: an insight from prolactinomas treated with bromocriptine. *European Journal of Endocrinology* **147** 77-84.

Doknic M, Pekic S, Zarkovic M, Medic-Stojanoska M, Dieguez C, Casanueva F & Popovic V 2002b Dopaminergic tone and obesity: an insight from prolactinomas treated with bromocriptine. *Eur.J Endocrinol.* **147** 77-84.

- Donner N, Bredewold R, Maloumy R & Neumann ID 2007 Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur.J Neurosci.* **25** 1804-1814.
- dos Santos Silva CM, Barbosa FR, Lima GA, Warszawski L, Fontes R, Domingues RC & Gadelha MR 2011 BMI and metabolic profile in patients with prolactinoma before and after treatment with dopamine agonists. *Obesity.(Silver.Spring)* **19** 800-805.
- Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M & Shaw RJ 2011 Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331** 456-461.
- Egawa M, Yoshimatsu H & Bray GA 1991 Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am.J Physiol* **260** R328-R334.
- Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB & Elmquist JK 1999 Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* **23** 775-786.
- Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB & Flier JS 1998 Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat.Neurosci.* **1** 445-450.
- Enerback S 2010 Human brown adipose tissue. *Cell Metab* **11** 248-252.
- Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nilni EA, Grove KL & Cowley MA 2007 Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab* **5** 181-194.
- Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, Schwarzmann G, Blanz J, Von Figura K & Saftig P 2002 Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol.Biol.Cell* **13** 3355-3368.
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ & Cone RD 1997 Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* **385** 165-168.
- Fang H & Judd RL 2018 Adiponectin Regulation and Function. *Compr.Physiol* **8** 1031-1063.
- Faouzi M, Leshan R, Bjornholm M, Hennessey T, Jones J & Munzberg H 2007 Differential accessibility of circulating leptin to individual hypothalamic sites. *Endocrinology* **148** 5414-5423.
- Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R & Friedman JM 1997 Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proceedings of the National Academy of Science* **94** 7001-7005.
- Ferguson NB & Keeseey RE 1971 Comparison of ventromedial hypothalamic lesion effects upon feeding and lateral hypothalamic self-stimulation in the female rat. *J.Comp Physiol Psychol.* **74** 263-271.
- Fernandes MF, Sharma S, Hryhorczuk C, Auguste S & Fulton S 2013 Nutritional controls of food reward. *Can.J.Diabetes* **37** 260-268.
- Fink G 2000 Neuroendocrine Regulation of Pituitary Function: General Principles. In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, edn 1, pp 107-133. Eds PM Conn & ME Freeman. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Fleenor D, Arumugam R & Freemark M 2006 Growth hormone and prolactin receptors in adipogenesis: STAT-5 activation, suppressors of cytokine signaling, and regulation of insulin-like growth factor I. *Hormone Research.* **66** 101-110.

- Flint DJ, Binart N, Boumard S, Kopchick JJ & Kelly P 2006 Developmental aspects of adipose tissue in GH receptor and prolactin receptor gene disrupted mice: site-specific effects upon proliferation, differentiation and hormone sensitivity. *Journal of Endocrinology* **191** 101-111.
- Flint DJ, Binart N, Kopchick J & Kelly P 2003 Effects of growth hormone and prolactin on adipose tissue development and function. *Pituitary*. **6** 97-102.
- Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB, Sr. & O'Donnell CJ 2007 Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* **116** 39-48.
- Frasor J, Barkai U, Zhong L, Fazleabas AT & Gibori G 2001 PRL-induced ERalpha gene expression is mediated by Janus kinase 2 (Jak2) while signal transducer and activator of transcription 5b (Stat5b) phosphorylation involves Jak2 and a second tyrosine kinase. *Molecular Endocrinology* **15** 1941-1952.
- Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA & Coppack SW 2003 Integrative physiology of human adipose tissue. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord*. **27** 875-888.
- Freedland ES 2004 Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr.Metab (Lond)* **1** 12.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A & Nagy G 2000 Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews* **80** 1523-1631.
- Freemark M, Avril I, Fleenor D, Driscoll P, Petro A, Opara E, Kendall W, Oden J, Bridges S, Binart N, Breant B & Kelly PA 2002 Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology* **143** 1378-1385.
- Freemark M, Driscoll P, Maaskant R, Petryk A & Kelly PA 1997 Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue differentiation and development. *J.Clin.Invest* **99** 1107-1117.
- Freemark M, Fleenor D, Driscoll P, Binart N & Kelly P 2001 Body weight and fat deposition in prolactin receptor-deficient mice. *Endocrinology* **142** 532-537.
- Friedman JM & Halaas JL 1998 Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395** 763-770.
- Fulton JJ, Marcus DK & Merkey T 2011 Irrational health beliefs and health anxiety. *J.Clin.Psychol*. **67** 527-538.
- Galic S, Oakhill JS & Steinberg GR 2010 Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol.Cell Endocrinol*. **316** 129-139.
- Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson SJ, DeValle J & Yamada T 1993 Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *Journal of Biological Chemistry* **268** 8246-8250.
- Gao Q & Horvath TL 2007 Neurobiology of feeding and energy expenditure. *Annual Review of Neuroscience* **30** 367-398.
- Garcia-Tornadu I, Ornstein AM, Chamson-Reig A, Wheeler MB, Hill DJ, Arany E, Rubinstein M & Becu-Villalobos D 2010 Disruption of the Dopamine D2 Receptor impairs insulin secretion and causes glucose intolerance. *Endocrinology* **151** 1441-1450.
- Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Matsuda M, Mahankali S, Santini E, DeFronzo RA & Ferrannini E 2002 Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **87** 5098-5103.
- Gerardo-Gettens T, Moore BJ, Stern JS & Horwitz BA 1989 Prolactin stimulates food intake in a dose-dependent manner. *Am J Physiol* **256** R276-R280.

- Ghaben AL & Scherer PE 2019 Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20** 242-258.
- Ghosh AK, Mau T, O'Brien M & Yung R 2018 Novel role of autophagy-associated Pik3c3 gene in gonadal white adipose tissue browning in aged C57/Bl6 male mice. *Aging (Albany.NY)* **10** 764-774.
- Gibbs DM & Neill JD 1978 Dopamine levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion in vivo. *Endocrinology* **102** 1895-1900.
- Gilbert 2005 Biología del desarrollo. *Editorial Médica Panamericana*.
- Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G & Colao A 2006 Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocrine reviews* **27** 485-534.
- Goffin V, Binart N, Touraine P & Kelly PA 2002 Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu.Rev.Physiol* **64** 47-67.
- Gospodarska E, Nowialis P & Kozak LP 2015 Mitochondrial turnover: a phenotype distinguishing brown adipocytes from interscapular brown adipose tissue and white adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry* **290** 8243-8255.
- Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I & Stark KL 1997 Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nature Genetics* **17** 273-274.
- Grattan DR 2001 The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. *Prog.Brain Res.* **133** 153-171.
- Grattan DR 2015 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *Journal of Endocrinology* **226** T101-T122.
- Grattan DR, Jasoni CL, Liu X, Anderson GM & Herbison AE 2007a Prolactin regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons to suppress luteinizing hormone secretion in mice. *Endocrinology* **148** 4344-4351.
- Grattan DR, Ladyman SR & Augustine RA 2007b Hormonal induction of leptin resistance during pregnancy. *Physiol Behav.* **91** 366-374.
- Gray J, Yeo GS, Cox JJ, Morton J, Adlam AL, Keogh JM, Yanovski JA, El Gharbawy A, Han JC, Tung YC, Hodges JR, Raymond FL, O'Rahilly S & Farooqi IS 2006 Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes* **55** 3366-3371.
- Greenman Y, Tordjman K & Stern N 1998 Increased body weight associated with prolactin secreting pituitary adenomas: weight loss with normalization of prolactin levels. *Clinical Endocrinology (Oxford)* **48** 547-553.
- Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL & Bruning JC 2005 Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat.Neurosci.* **8** 1289-1291.
- Guan XM, Yu H, Trumbauer M, Frazier E, Van der Ploeg LH & Chen H 1998 Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. *Neuroreport* **9** 3415-3419.
- Gudelsky GA & Porter JC 1979 Release of newly synthesized dopamine into the hypophysial portal vasculature of the rat. *Endocrinology* **104** 583-587.
- Gustafson AB, Banasiak MF, Kalkhoff RK, Hagen TC & Kim HJ 1980 Correlation of hyperprolactinemia with altered plasma insulin and glucagon: similarity to effects of late human pregnancy. *J Clin.Endocrinol.Metab* **51** 242-246.

- Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC & Meister B 1998 Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *Journal of Neurosciences* **18** 559-572.
- Halasz B 2000 The Hypothalamus as an Endocrine Organ: The Science of Neuroendocrinology. In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, edn 1, pp 3-21. Eds M Conn & ME Freeman. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Hamann A, Flier JS & Lowell BB 1996 Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology* **137** 21-29.
- Harms M & Seale P 2013 Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine* **19** 1252-1263.
- Haskell-Luevano C & Monck EK 2001 Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. *Regulatory peptides*. **99** 1-7.
- Herrera E 2000 Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur.J.Clin.Nutr.* **54 Suppl 1** S47-S51.
- Hofker M & Wijmenga C 2009 A supersized list of obesity genes. *Nature Genetics* **41** 139-140.
- Hogan S, Himms-Hagen J & Coscina DV 1985 Lack of diet-induced thermogenesis in brown adipose tissue of obese medial hypothalamic-lesioned rats. *Physiol Behav.* **35** 287-294.
- Hokfelt T & Fuxe K 1972 Effects of prolactin and ergot alkaloids on the tubero-infundibular dopamine (DA) neurons. *Neuroendocrinology.* **9** 100-122.
- Hu Z, Cha SH, Chohnan S & Lane MD 2003 Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Science* **100** 12624-12629.
- Hu ZZ, Meng J & Dufau ML 2001 Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *Journal of Biological Chemistry* **276** 41086-41094.
- Huang C, Snider F & Cross JC 2009 Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology* **150** 1618-1626.
- Hubschle T, Thom E, Watson A, Roth J, Klaus S & Meyerhof W 2001 Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *Journal of Neurosciences* **21** 2413-2424.
- Hugo ER, Borcharding DC, Gersin KS, Loftus J & Ben Jonathan N 2008 Prolactin release by adipose explants, primary adipocytes, and LS14 adipocytes. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **93** 4006-4012.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P & Lee F 1997 Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* **88** 131-141.
- Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P & Grinstein S 2007 LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO journal* **26** 313-324.
- Ibrahim MM 2010 Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes.Rev.* **11** 11-18.
- Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD & Uyeda K 2004 Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Science* **101** 7281-7286.

- Jeon Y, Aja S, Ronnett GV & Kim EK 2016 D-chiro-inositol glycan reduces food intake by regulating hypothalamic neuropeptide expression via AKT-FoxO1 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **470** 818-823.
- Jequier E 2002 Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Annals New York Academy of Sciences* **967** 379-388.
- JM.Quesada Gomez 2006 Leptina y hueso: mecanismos moleculares de la interaccion Leptina-osteoblasto. *Elsevier*.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL & Kalra PS 1999 Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine reviews* **20** 68-100.
- Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP & Kalra PS 1991 Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proceedings of the National Academy of Science* **88** 10931-10935.
- Kamiji MM & Inui A 2007 Neuropeptide y receptor selective ligands in the treatment of obesity. *Endocrine reviews* **28** 664-684.
- Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK & Low MJ 1997 Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron* **19** 103-113.
- Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, Fujitani Y, Kawamori R, Miyatsuka T, Kosaka Y, Yang K, Honig G, van der HM, Kishimoto N, Wang J, Yagihashi S, Tecott LH, Watada H & German MS 2010 Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nature Medicine* **16** 804-808.
- Kim J, Kundu M, Viollet B & Guan KL 2011a AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat.Cell Biol.* **13** 132-141.
- Kim JK, Kim HJ, Park SY, Cederberg A, Westergren R, Nilsson D, Higashimori T, Cho YR, Liu ZX, Dong J, Cline GW, Enerback S & Shulman GI 2005 Adipocyte-specific overexpression of FOXC2 prevents diet-induced increases in intramuscular fatty acyl CoA and insulin resistance. *Diabetes* **54** 1657-1663.
- Kim KW, Donato J, Jr., Berglund ED, Choi YH, Kohno D, Elias CF, Depinho RA & Elmquist JK 2012 FOXO1 in the ventromedial hypothalamus regulates energy balance. *J Clin.Invest* **122** 2578-2589.
- Kim KW, Zhao L, Donato J, Jr., Kohno D, Xu Y, Elias CF, Lee C, Parker KL & Elmquist JK 2011b Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Science* **108** 10673-10678.
- Kim MS, Rossi M, Abusnana S, Sunter D, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Heath MM, Stanley SA, Seal LJ, Bhatti JR, Smith DM, Ghatei MA & Bloom SR 2000 Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes* **49** 177-182.
- Kim SM, Lun M, Wang M, Senyo SE, Guillermier C, Patwari P & Steinhauser ML 2014 Loss of white adipose hyperplastic potential is associated with enhanced susceptibility to insulin resistance. *Cell Metab* **20** 1049-1058.
- King BM 2006 The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav.* **87** 221-244.
- Kishi T, Aschkenasi CJ, Lee CE, Mountjoy KG, Saper CB & Elmquist JK 2003 Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *Journal of Comparative Neurology* **457** 213-235.

- Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, Kalkhoff RK & Adams PW 1982 Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **54** 254-260.
- Kleiner S, Mepani RJ, Laznik D, Ye L, Jurczak MJ, Jornayvaz FR, Estall JL, Chatterjee BD, Shulman GI & Spiegelman BM 2012 Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1alpha in adipose tissues. *Proceedings of the National Academy of Science* **109** 9635-9640.
- Kline JB, Roehrs H & Clevenger CV 1999 Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *Journal of Biological Chemistry* **274** 35461-35468.
- Klop B, Elte JW & Cabezas MC 2013 Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. **5** 1218-1240.
- Kok P, Roelfsema F, Frolich M, Meinders AE & Pijl H 2004 Prolactin release is enhanced in proportion to excess visceral fat in obese women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **89** 4445-4449.
- Kokay IC & Grattan DR 2005 Expression of mRNA for prolactin receptor (long form) in dopamine and pro-opiomelanocortin neurones in the arcuate nucleus of non-pregnant and lactating rats. *J.Neuroendocrinol.* **17** 827-835.
- Kokay IC, Wyatt A, Phillipps HR, Aoki M, Ectors F, Boehm U & Grattan DR 2018 Analysis of prolactin receptor expression in the murine brain using a novel prolactin receptor reporter mouse. *J Neuroendocrinol.* **30** e12634.
- Kopecky J, Clarke G, Enerback S, Spiegelman B & Kozak LP 1995 Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J.Clin.Invest* **96** 2914-2923.
- Krashes MJ, Lowell BB & Garfield AS 2016 Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis. *Nat.Neurosci.* **19** 206-219.
- Kraunsoe R, Boushel R, Hansen CN, Schjerling P, Qvortrup K, Stockel M, Mikines KJ & Dela F 2010 Mitochondrial respiration in subcutaneous and visceral adipose tissue from patients with morbid obesity. *J.Physiol* **588** 2023-2032.
- Krebs DL & Hilton DJ 2001 SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* **19** 378-387.
- Krol E, Martin SA, Huhtaniemi IT, Douglas A & Speakman JR 2011 Negative correlation between milk production and brown adipose tissue gene expression in lactating mice. *J.Exp.Biol.* **214** 4160-4170.
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G & Gruters A 1998 Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics* **19** 155-157.
- Kundu M, Lindsten T, Yang CY, Wu J, Zhao F, Zhang J, Selak MA, Ney PA & Thompson CB 2008 Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* **112** 1493-1502.
- Lacruz A, Baptista T, de Mendoza S, Mendoza-Guillen JM & Hernandez L 2000 Antipsychotic drug-induced obesity in rats: correlation between leptin, insulin and body weight during sulpiride treatment. *Molecular Psychiatry* **5** 70-76.
- Ladyman SR 2008 Leptin resistance during pregnancy in the rat. *J.Neuroendocrinol.* **20** 269-277.
- Ladyman SR, Augustine RA & Grattan DR 2010 Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. *J.Neuroendocrinol.* **22** 805-817.
- Ladyman SR, Fieldwick DM & Grattan DR 2012 Suppression of leptin-induced hypothalamic JAK/STAT signalling and feeding response during pregnancy in the mouse. *Reproduction.* **144** 83-90.



Ladyman SR & Grattan DR 2004 Region-specific reduction in leptin-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in the rat hypothalamus is associated with leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology* **145** 3704-3711.

Ladyman SR & Grattan DR 2005 Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat. *Endocrinology* **146** 3868-3874.

Ladyman SR, MacLeod MA, Khant AZ, Knowles P, Phillipps HR, Brown RSE & Grattan DR 2017 Prolactin receptors in Rip-cre cells, but not in AgRP neurones, are involved in energy homeostasis. *J Neuroendocrinol.* **29** 12474.

Lamberts SWJ & MacLeod RM 1990 Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* **70** 279-318.

LaPensee CR, Horseman ND, Tso P, Brandebourg TD, Hugo ER & Ben Jonathan N 2006 The prolactin-deficient mouse has an unaltered metabolic phenotype. *Endocrinology* **147** 4638-4645.

Lau J & Herzog H 2014 CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. *Front Neurosci.* **8** 313.

Le JA, Wilson HM, Shehu A, Devi YS, Aguilar T & Gibori G 2011 Prolactin activation of the long form of its cognate receptor causes increased visceral fat and obesity in males as shown in transgenic mice expressing only this receptor subtype. *Horm.Metab Res.* **43** 931-937.

Le TN, Elesa SH, Romero R, Chaiworapongsa T & Francis GL 2013 Prolactin receptor gene polymorphisms are associated with gestational diabetes. *Genet.Test.Mol.Biomarkers* **17** 567-571.

LeBaron MJ, Ahonen TJ, Nevalainen MT & Rui H 2007 In vivo response-based identification of direct hormone target cell populations using high-density tissue arrays. *Endocrinology* **148** 989-1008.

Lebrun B, Bariohay B, Moyses E & Jean A 2006 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and food intake regulation: a minireview. *Auton.Neurosci.* **126-127** 30-38.

Lechan RM & Toni R 2000 Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary.

Lee P, Greenfield JR, Ho KK & Fulham MJ 2010 A critical appraisal of the prevalence and metabolic significance of brown adipose tissue in adult humans. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **299** E601-E606.

Lee P, Zhao JT, Swarbrick MM, Gracie G, Bova R, Greenfield JR, Freund J & Ho KK 2011 High prevalence of brown adipose tissue in adult humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **96** 2450-2455.

Lee YS, Challis BG, Thompson DA, Yeo GS, Keogh JM, Madonna ME, Wraight V, Sims M, Vatin V, Meyre D, Shield J, Burren C, Ibrahim Z, Cheetham T, Swift P, Blackwood A, Hung CC, Wareham NJ, Froguel P, Millhauser GL, O'Rahilly S & Farooqi IS 2006 A POMC variant implicates beta-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. *Cell Metab* **3** 135-140.

Leibowitz SF, Hammer NJ & Chang K 1981 Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol Behav.* **27** 1031-1040.

Leitner BP, Huang S, Brychta RJ, Duckworth CJ, Baskin AS, McGehee S, Tal I, Dieckmann W, Gupta G, Kolodny GM, Pacak K, Herscovitch P, Cypess AM & Chen KY 2017 Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proceedings of the National Academy of Science* **114** 8649-8654.

Lerant A & Freeman ME 1998 Ovarian steroids differentially regulate the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: a double label confocal microscopic study. *Brain Research* **802** 141-154.

- Li L, Tan J, Miao Y, Lei P & Zhang Q 2015 ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cell Mol.Neurobiol.* **35** 615-621.
- Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St Pierre J, Zhang CY, Mootha VK, Jager S, Vianna CR, Reznick RM, Cui L, Manieri M, Donovan MX, Wu Z, Cooper MP, Fan MC, Rohas LM, Zavacki AM, Cinti S, Shulman GI, Lowell BB, Krainc D & Spiegelman BM 2004 Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* **119** 121-135.
- Lin S, Thomas TC, Storlien LH & Huang XF 2000 Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **24** 639-646.
- Ling C, Hellgren G, Gebre-Medhin M, Dillner K, Wennbo H, Carlsson B & Billig H 2000 Prolactin (PRL) receptor gene expression in mouse adipose tissue: increases during lactation and in PRL-transgenic mice. *Endocrinology* **141** 3564-3572.
- Ling C, Svensson L, Oden B, Weijdegard B, Eden B, Eden S & Billig H 2003 Identification of functional prolactin (PRL) receptor gene expression: PRL inhibits lipoprotein lipase activity in human white adipose tissue. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **88** 1804-1808.
- Lisboa PC, Passos MC, Dutra SC, Bonomo IT, Denolato AT, Reis AM & Moura EG 2006 Leptin and prolactin, but not corticosterone, modulate body weight and thyroid function in protein-malnourished lactating rats. *Horm.Metab Res.* **38** 295-299.
- Liu H, Kishi T, Roseberry AG, Cai X, Lee CE, Montez JM, Friedman JM & Elmquist JK 2003 Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *Journal of Neurosciences* **23** 7143-7154.
- Liu J, Wang Y & Lin L 2019 Small molecules for fat combustion: targeting obesity. *Acta Pharm.Sin.B* **9** 220-236.
- Liu X, Wang S, You Y, Meng M, Zheng Z, Dong M, Lin J, Zhao Q, Zhang C, Yuan X, Hu T, Liu L, Huang Y, Zhang L, Wang D, Zhan J, Jong LH, Speakman JR & Jin W 2015 Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice. *Endocrinology* **156** 2461-2469.
- Lopez M, Tena-Sempere M & Dieguez C 2010 Cross-talk between orexins (hypocretins) and the neuroendocrine axes (hypothalamic-pituitary axes). *Front Neuroendocrinol.* **31** 113-127.
- Lopez-Vicchi F., De Winne C, Brie B, Sorianello E, Ladyman SR & Becu-Villalobos D 2020 Metabolic Functions of Prolactin. *Journal of Neuroendocrinology.*
- Lopez-Vicchi F & Becu-Villalobos D 2017 Prolactin: The Bright and the Dark Side. *Endocrinology* **158** 1556-1559.
- Lopez-Vicchi F, Luque GM, Brie B, Nogueira JP, Garcia T, I & Becu-Villalobos D 2016 Dopaminergic drugs in type 2 diabetes and glucose homeostasis. *Pharmacol.Res.* **109** 74-80.
- Luong Q, Huang J & Lee KY 2019 Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. *Biology.(Basel)* **8**.
- Luque GM, Lopez-Vicchi F, Ornstein AM, Brie B, De Winne C, Fiore E, Perez-Millan MI, Mazzolini G, Rubinstein M & Becu-Villalobos D 2016 Chronic hyperprolactinemia evoked by disruption of lactotrope dopamine D2 receptors impacts on liver and adipocyte genes related to glucose and insulin balance. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* **311** E974-E988.
- Luquet S, Perez FA, Hnasko TS & Palmiter RD 2005 NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* **310** 683-685.
- Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE & Tessarollo L 1999 Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Science* **96** 15239-15244.

Ma FY, Grattan DR, Goffin V & Bunn SJ 2005 Prolactin-regulated tyrosine hydroxylase activity and messenger ribonucleic acid expression in mediobasal hypothalamic cultures: the differential role of specific protein kinases. *Endocrinology* **146** 93-102.

Macias H & Hinck L 2012 Mammary gland development. *Wiley.Interdiscip.Rev.Dev.Biol.* **1** 533-557.

Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Dietrich MO, Tanaka S, Dezaki K, Oh I, Hashimoto K, Shimizu H, Nakata M, Mori M & Yada T 2009 Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab* **10** 355-365.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S & . 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine* **1** 1155-1161.

Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E, Anderson P, Szczepaniak LS, Dobbins RL, McGarry JD & Parker KL 2002 Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* **143** 607-614.

Margetic S, Gazzola C, Pegg GG & Hill RA 2002 Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **26** 1407-1433.

Marken Lichtenbelt WD, Vanhommel JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P & Teule GJ 2009 Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *New England Journal of Medicine* **360** 1500-1508.

Maroni PD, Koul S, Meacham RB & Koul HK 2004 Mitogen Activated Protein kinase signal transduction pathways in the prostate. *Cell Commun.Signal.* **2** 5.

MARSHALL NB, BARNETT RJ & MAYER J 1955 Hypothalamic lesions in goldthioglucose injected mice. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine.* **90** 240-244.

MARSHALL NB & MAYER J 1956 Specificity of gold thioglucose for ventromedial hypothalamic lesions and hyperphagia. *Nature* **178** 1399-1400.

Martinez-Lopez N, Garcia-Macia M, Sahu S, Athonvarangkul D, Liebling E, Merlo P, Cecconi F, Schwartz GJ & Singh R 2016 Autophagy in the CNS and Periphery Coordinate Lipophagy and Lipolysis in the Brown Adipose Tissue and Liver. *Cell Metab* **23** 113-127.

Matsuda M, Mori T, Sassa S, Sakamoto S, Park MK & Kawashima S 1996 Chronic effect of hyperprolactinemia on blood glucose and lipid levels in mice. *Life Sci.* **58** 1171-1177.

Melmed S 2003 Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *Journal of Clinical Investigation* **112** 1603-1618.

Mercer AJ, Hentges ST, Meshul CK & Low MJ 2013 Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. *Front Neurosci.* **7** 19.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Morgan PJ & Trayhurn P 1996 Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J.Neuroendocrinol.* **8** 733-735.

Messeguer X, Escudero R, Farre D, Nunez O, Martinez J & Alba MM 2002 PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics.* **18** 333-334.

Meyre D, Delplanque J, Chevre JC, Lecoecur C, Lobbens S, Gallina S, Durand E, Vatin V, Degraeve F, Proenca C, Gaget S, Korner A, Kovacs P, Kiess W, Tichet J, Marre M, Hartikainen AL, Horber F, Potoczna N, Hercberg S,

Levy-Marchal C, Pattou F, Heude B, Tauber M, McCarthy MI, Blakemore AI, Montpetit A, Polychronakos C, Weill J, Coin LJ, Asher J, Elliott P, Jarvelin MR, Visvikis-Siest S, Balkau B, Sladek R, Balding D, Walley A, Dina C & Froguel P 2009 Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nature Genetics* **41** 157-159.

Michael H. Ross & Wojciech Pawlina 2006 Histologia: Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. *Editorial Medica Panamericana*.

Miller RS, Becker KG, Prabhu V & Cooke DW 2008 Adipocyte gene expression is altered in formerly obese mice and as a function of diet composition. *Journal of Nutrition* **138** 1033-1038.

Miselis RR & Epstein AN 1975 Feeding induced by intracerebroventricular 2-deoxy-D-glucose in the rat. *Am.J.Physiol* **229** 1438-1447.

Molitch ME 2003 Dopamine resistance of prolactinomas. *Pituitary*. **6** 19-27.

Monda M, Sullo A & De Luca B 1997 Lesions of the ventromedial hypothalamus reduce postingestional thermogenesis. *Physiol Behav.* **61** 687-691.

Moore BJ, Gerardo-Gettens T, Horwitz BA & Stern JS 1986 Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. *Brain Res.Bull.* **17** 563-569.

Moreno-Carranza B, Bravo-Manriquez M, Baez A, Ledesma-Colunga MG, Ruiz-Herrera X, Reyes-Ortega P, Los Rios EA, Macotela Y, Martinez dIE & Clapp C 2018 Prolactin regulates liver growth during postnatal development in mice. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **314** R902-R908.

Moreno-Carranza B, Goya-Arce M, Vega C, Adan N, Triebel J, Lopez-Barrera F, Quintanar-Stephano A, Binart N, Martinez dIE & Clapp C 2013 Prolactin promotes normal liver growth, survival, and regeneration in rodents: effects on hepatic IL-6, suppressor of cytokine signaling-3, and angiogenesis. *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **305** R720-R726.

Mountjoy KG 2015 Pro-Opiomelanocortin (POMC) Neurons, POMC-Derived Peptides, Melanocortin Receptors and Obesity: How Understanding of this System has Changed Over the Last Decade. *J.Neuroendocrinol.* **27** 406-418.

Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB & Cone RD 1994 Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular Endocrinology* **8** 1298-1308.

Munzberg H, Flier JS & Bjorbaek C 2004 Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* **145** 4880-4889.

Muthuswamy SK 2012 Autocrine prolactin: an emerging market for homegrown (prolactin) despite the imports. *Genes & development* **26** 2253-2258.

Myers MG, Jr. & Olson DP 2012 Central nervous system control of metabolism. *Nature* **491** 357-363.

Naef L & Woodside B 2007 Prolactin/Leptin interactions in the control of food intake in rats. *Endocrinology* **148** 5977-5983.

Nagaishi VS, Cardinali LI, Zampieri TT, Furigo IC, Metzger M & Donato J, Jr. 2014 Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. *Neurosciences* **259** 71-83.

Nagano M & Kelly PA 1994 Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *Journal of Biological Chemistry* **269** 13337-13345.

Naliato EC, Violante AH, Caldas D, Lamounier FA, Loureiro CR, Fontes R, Schrank Y, Souza RG, Costa PL & Colao A 2007 Body fat in nonobese women with prolactinoma treated with dopamine agonists. *Clinical Endocrinology (Oxford)* **67** 845-852.

Nanbu-Wakao R, Fujitani Y, Masuho Y, Muramatsu M & Wakao H 2000 Prolactin enhances CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) messenger RNA expression and stimulates adipogenic conversion of NIH-3T3 cells. *Molecular Endocrinology* **14** 307-316.

Nazarko VY & Zhong Q 2013 ULK1 targets Beclin-1 in autophagy. *Nat. Cell Biol.* **15** 727-728.

Nedergaard J, Bengtsson T & Cannon B 2007 Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **293** E444-E452.

Nedergaard J & Cannon B 2010 The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab* **11** 268-272.

Newbern D & Freemark M 2011 Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* **18** 409-416.

Newey PJ, Gorvin CM, Cleland SJ, Willberg CB, Bridge M, Azharuddin M, Drummond RS, van der Merwe PA, Klenerman P, Bountra C & Thakker RV 2013 Mutant prolactin receptor and familial hyperprolactinemia. *N.Engl.J Med.* **369** 2012-2020.

Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B & Dumon H 2008 Liver lipid metabolism. *J.Anim Physiol Anim Nutr.(Berl)* **92** 272-283.

Nicholls DG 1983 The thermogenic mechanism of brown adipose tissue. Review. *Biosci.Rep.* **3** 431-441.

Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, Bianco A & Daniele A 2014 New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *Biomed.Res.Int.* **2014** 658913.

Nijijima A, Rohner-Jeanrenaud F & Jeanrenaud B 1984 Role of ventromedial hypothalamus on sympathetic efferents of brown adipose tissue. *Am.J.Physiol* **247** R650-R654.

Nilsson L, Olsson AH, Isomaa B, Groop L, Billig H & Ling C 2011 A common variant near the PRL gene is associated with increased adiposity in males. *Mol.Genet.Metab* **102** 78-81.

Nishizawa Y & Bray GA 1978 Ventromedial hypothalamic lesions and the mobilization of fatty acids. *J.Clin.Invest* **61** 714-721.

Noain D, Perez-Millan MI, Bello EP, Luque GM, Casas CR, Gelman DM, Peper M, Tornadu IG, Low MJ, Becu-Villalobos D & Rubinstein M 2013a Central dopamine D2 receptors regulate growth-hormone-dependent body growth and pheromone signaling to conspecific males. *Journal of Neurosciences* **33** 5834-5842.

Noain D, Perez-Millan MI, Bello-Gay E, Luque GM, Casas Cordero R, Gelman D, Peper M, Garcia-Tornadu I, Low MJ, Becu-Villalobos D & Rubinstein M 2013b Central dopamine D2 receptors regulate growth hormone-dependent body growth and pheromone signaling to conspecific males. *Journal of Neurosciences* **In press**.

Noel MB & Woodside B 1993 Effects of systemic and central prolactin injections on food intake, weight gain, and estrous cyclicity in female rats. *Physiol Behav.* **54** 151-154.

Norris DO 2007 *Vertebrate Endocrinology*. Elsevier Academic Press.

O'Rahilly S, Farooqi IS, Yeo GS & Challis BG 2003 Minireview: human obesity-lessons from monogenic disorders. *Endocrinology* **144** 3757-3764.

Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G & Rossetti L 2002 Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* **51** 271-275.

Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I & Barsh GS 1997 Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* **278** 135-138.

Oomura Y 1973 Central mechanism of feeding. *Adv.Biophys.* **5** 65-142.

Oomura Y 1983 Glucose as a regulator of neuronal activity. *Adv.Metab Disord.* **10** 31-65.

Ormandy CJ, Binart N, Helloc C & Kelly PA 1998 Mouse prolactin receptor gene: genomic organization reveals alternative promoter usage and generation of isoforms via alternative 3'-exon splicing. *DNA Cell Biol.* **17** 761-770.

Ouhtit A, Kelly PA & Morel G 1994 Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rat digestive tissues. *Am.J.Physiol* **266** G807-G815.

Pala NA, Laway BA, Misgar RA & Dar RA 2015 Metabolic abnormalities in patients with prolactinoma: response to treatment with cabergoline. *Diabetol.Metab Syndr.* **7** 99.

Pala NA, Laway BA, Misgar RA, Shah ZA, Gojwari TA & Dar TA 2016 Profile of leptin, adiponectin, and body fat in patients with hyperprolactinemia: Response to treatment with cabergoline. *Indian J.Endocrinol.Metab* **20** 177-181.

Palkovits M 1999 Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front Neuroendocrinol.* **20** 270-295.

Panchal H, Wansbury O, Parry S, Ashworth A & Howard B 2007 Neuregulin3 alters cell fate in the epidermis and mammary gland. *BMC.Dev.Biol.* **7** 105.

Park S, Kim DS, Daily JW & Kim SH 2011 Serum prolactin concentrations determine whether they improve or impair beta-cell function and insulin sensitivity in diabetic rats. *Diabetes Metab Res.Rev.* **27** 564-574.

Parker KL & Schimmer BP 1997 Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocrine reviews* **18** 361-377.

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

Patel HV, Freeman KB & Desautels M 1987 Selective loss of uncoupling protein mRNA in brown adipose tissue on deacclimation of cold-acclimated mice. *Biochem.Cell Biol.* **65** 955-959.

Paxinos G & Franklin KBJ 2008 *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier.

Perello M, Valdivia S, Garcia RG & Raingo J 2014 Considerations about rodent models of binge eating episodes. *Front Psychol.* **5** 372.

Perez-Millan MI, Luque GM, Ramirez MC, Noain D, Ornstein AM, Rubinstein M & Becu-Villalobos D 2014 Selective disruption of dopamine d2 receptors in pituitary lactotrope increases body weight and adiposity in female mice. *Endocrinology* **155** 829-839.

Perrot-Applanat M, Gualillo O, Pezet A, Vincent V, Edery M & Kelly PA 1997 Dominant negative and cooperative effects of mutant forms of prolactin receptor. *Molecular Endocrinology* **11** 1020-1032.

- Petryk A, Fleenor D, Driscoll P & Freemark M 2000 Prolactin induction of insulin gene expression: the roles of glucose and glucose transporter-2. *Journal of Endocrinology* **164** 277-286.
- Pfaffly J, Michaelides M, Wang GJ, Pessin JE, Volkow ND & Thanos PK 2010 Leptin increases striatal dopamine D2 receptor binding in leptin-deficient obese (ob/ob) mice. *Synapse* **64** 503-510.
- Pfannenberger C, Werner MK, Ripkens S, Stef I, Deckert A, Schmadl M, Reimold M, Haring HU, Claussen CD & Stefan N 2010 Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans. *Diabetes* **59** 1789-1793.
- Pi XJ & Grattan DR 1998c Differential expression of the two forms of prolactin receptor mRNA within microdissected hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **59** 1-12.
- Pi XJ & Grattan DR 1998b Differential expression of the two forms of prolactin receptor mRNA within microdissected hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **59** 1-12.
- Pi XJ & Grattan DR 1998a Differential expression of the two forms of prolactin receptor mRNA within microdissected hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **59** 1-12.
- Pi XJ & Grattan DR 1998d Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. *J.Comp Neurol.* **394** 462-474.
- Pocock G & Richards CD 2005 *Fisiología Humana: La base de la medicina*. Masson.
- Poggioli R, Vergoni AV & Bertolini A 1986 ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. *Peptides.* **7** 843-848.
- Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, Keane JF, Jr., Meigs JB, Lipinska I, Kathiresan S, Murabito JM, O'Donnell CJ, Benjamin EJ & Fox CS 2007 Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* **116** 1234-1241.
- Proenca AR, Sertie RA, Oliveira AC, Campana AB, Caminhotto RO, Chimin P & Lima FB 2014 New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **47** 192-205.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M & Spiegelman BM 1998 A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92** 829-839.
- Quereda V & Malumbres M 2009 Cell cycle control of pituitary development and disease. *Journal of Molecular Endocrinology* **42** 75-86.
- RAFF 2013 *Fisiología medica. un enfoque por aparatos y sistemas*. MCGRAW-HILL.
- Ramos-Roman MA 2011 Prolactin and lactation as modifiers of diabetes risk in gestational diabetes. *Horm.Metab Res.* **43** 593-600.
- Raposo PD, Pierroz DD, Broqua P, White RB, Pedrazzini T & Aubert ML 2001 Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism. *Mol.Cell Endocrinol.* **185** 195-204.
- Raúl Orlando Calderín Bouza, Carlos Domínguez Álvarez, Pedro Evelio Velbes Marquetti, Luis Alberto Pérez Blanco, Eduardo Cabrera Rode & Neraldo Orlandi González 2009 Insulinorresistencia e hígado graso no alcohólico, ¿existe relación causa-efecto entre ambas condiciones? *Revista Cubana de Endocrinología* **20**.
- Reis FM, Reis AM & Coimbra CC 1997 Effects of hyperprolactinaemia on glucose tolerance and insulin release in male and female rats. *Journal of Endocrinology* **153** 423-428.

Rezai-Zadeh K, Yu S, Jiang Y, Laque A, Schwartzburg C, Morrison CD, Derbenev AV, Zsombok A & Munzberg H 2014 Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. *Mol. Metab* **3** 681-693.

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

Rizwan MZ, Mehlitz S, Grattan DR & Tups A 2017 Temporal and regional onset of leptin resistance in diet-induced obese mice. *J. Neuroendocrinol.* **29**.

Ro SH, Jung CH, Hahn WS, Xu X, Kim YM, Yun YS, Park JM, Kim KH, Seo M, Ha TY, Arriaga EA, Bernlohr DA & Kim DH 2013 Distinct functions of Ulk1 and Ulk2 in the regulation of lipid metabolism in adipocytes. *Autophagy.* **9** 2103-2114.

Rocchi A & He C 2015 Emerging roles of autophagy in metabolism and metabolic disorders. *Front Biol.(Beijing)* **10** 154-164.

Roh E & Kim MS 2016 Brain Regulation of Energy Metabolism. *Endocrinol. Metab (Seoul.)* **31** 519-524.

Roh E, Song DK & Kim MS 2016 Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Exp. Mol. Med.* **48** e216.

Rothwell NJ & Stock MJ 1997 A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Obesity Research* **5** 650-656.

Roy AF, Benomar Y, Bailleux V, Vacher CM, Aubourg A, Gertler A, Djiane J & Taouis M 2007 Lack of cross-desensitization between leptin and prolactin signaling pathways despite the induction of suppressor of cytokine signaling 3 and PTP-1B. *Journal of Endocrinology* **195** 341-350.

Saeger W, Ludecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R, Quabbe HJ & Petersenn S 2007 Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *European Journal of Endocrinology* **156** 203-216.

Sahu A 2003 Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Frontiers in Neuroendocrinology* **24** 225-253.

Saiardi A, Bozzi Y, Baik J-H & Borrelli E 1997 Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. *Neuron* **19** 115-126.

Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y & Tsujisaki M 2009 High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **58** 1526-1531.

Sakaguchi T & Bray GA 1987a Intrahypothalamic injection of insulin decreases firing rate of sympathetic nerves. *Proceedings of the National Academy of Science* **84** 2012-2014.

Sakaguchi T & Bray GA 1987b The effect of intrahypothalamic injections of glucose on sympathetic efferent firing rate. *Brain Res. Bull.* **18** 591-595.

Salais-Lopez H, Agustin-Pavon C, Lanuza E & Martinez-Garcia F 2018 The maternal hormone in the male brain: Sexually dimorphic distribution of prolactin signalling in the mouse brain. *PLoS. ONE.* **13** e0208960.

Salamone JD & Correa M 2012 The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron* **76** 470-485.

Sanchez-Lasheras C, Konner AC & Bruning JC 2010 Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Front Neuroendocrinol.* **31** 4-15.



- Saper CB 2002 The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Annual Review of Neuroscience* **25** 433-469.
- Sapsford TJ, Kokay IC, Ostberg L, Bridges RS & Grattan DR 2012 Differential sensitivity of specific neuronal populations of the rat hypothalamus to prolactin action. *J Comp Neurol.* **520** 1062-1077.
- Sauve D & Woodside B 1996 The effect of central administration of prolactin on food intake in virgin female rats is dose-dependent, occurs in the absence of ovarian hormones and the latency to onset varies with feeding-regimen. *Brain Research* **729** 75-81.
- Sauve D & Woodside B 2000 Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. *Brain Research* **868** 306-314.
- Scheele C & Nielsen S 2017 Metabolic regulation and the anti-obesity perspectives of human brown fat. *Redox.Biol.* **12** 770-775.
- Schenk S, Saberi M & Olefsky JM 2008 Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J.Clin.Invest* **118** 2992-3002.
- Schernthaner G, Prager R, Punzengruber C & Luger A 1985 Severe hyperprolactinaemia is associated with decreased insulin binding in vitro and insulin resistance in vivo. *Diabetologia* **28** 138-142.
- Schneeberger M, Gomis R & Claret M 2014 Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *Journal of Endocrinology* **220** T25-T46.
- Schoettl T, Fischer IP & Ussar S 2018 Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J.Exp.Biol.* **221**.
- Schuff KG, Hentges ST, Kelly MA, Binart N, Kelly PA, Iuvone PM, Asa SL & Low MJ 2002 Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Clinical Investigation* **110** 973-981.
- Schuldiner S 1994 A molecular glimpse of vesicular monoamine transporters. *J Neurochem.* **62** 2067-2078.
- Schwartz GJ, Salorio CF, Skoglund C & Moran TH 1999 Gut vagal afferent lesions increase meal size but do not block gastric preload-induced feeding suppression. *Am.J.Physiol* **276** R1623-R1629.
- Schwartz GJ & Zeltser LM 2013 Functional organization of neuronal and humoral signals regulating feeding behavior. *Annu.Rev.Nutr.* **33** 1-21.
- Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ & Porte D, Jr. 1996 Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature Medicine* **2** 589-593.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P & Baskin DG 1997 Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* **46** 2119-2123.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ & Baskin DG 2000 Central nervous system control of food intake. *Nature* **404** 661-671.
- Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR & Spiegelman BM 2008 PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454** 961-967.
- Seale P & Lazar MA 2009 Brown fat in humans: turning up the heat on obesity. *Diabetes* **58** 1482-1484.

- Segal JP, Stallings NR, Lee CE, Zhao L, Socci N, Viale A, Harris TM, Soares MB, Childs G, Elmquist JK, Parker KL & Friedman JM 2005 Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *Journal of Neurosciences* **25** 4181-4188.
- Serra MC, Ryan AS & Goldberg AP 2017 Reduced LPL and subcutaneous lipid storage capacity are associated with metabolic syndrome in postmenopausal women with obesity. *Obes.Sci.Pract.* **3** 106-114.
- Serri O, Li L, Mamputu JC, Beauchamp MC, Maingrette F & Renier G 2006 The influences of hyperprolactinemia and obesity on cardiovascular risk markers: effects of cabergoline therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* **64** 366-370.
- Setalo G, Flerko B, Arimura A & Schally AV 1978 Brain cells as producers of releasing and inhibiting hormones. *Int.Rev.Cytol.Suppl* 1-52.
- Shao S, Yao Z, Lu J, Song Y, He Z, Yu C, Zhou X, Zhao L, Zhao J & Gao L 2018 Ablation of prolactin receptor increases hepatic triglyceride accumulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **498** 693-699.
- Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, Maruyama S & Walsh K 2014 Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J.Clin.Invest* **124** 2099-2112.
- Shirley B 1984 The food intake of rats during pregnancy and lactation. *Lab Anim Sci.* **34** 169-172.
- Sidossis L & Kajimura S 2015 Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J.Clin.Invest* **125** 478-486.
- Singh R & Cuervo AM 2012 Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Int.J.Cell Biol.* **2012** 282041.
- Singh R, Xiang Y, Wang Y, Baikati K, Cuervo AM, Luu YK, Tang Y, Pessin JE, Schwartz GJ & Czaja MJ 2009 Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J.Clin.Invest* **119** 3329-3339.
- Sinha YN & Sorenson RL 1993 Differential effects of glycosylated and nonglycosylated prolactin on islet cell division and insulin secretion. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine.* **203** 123-126.
- Sjoeholm A, Bridges RS, Grattan DR & Anderson GM 2011 Region-, neuron-, and signaling pathway-specific increases in prolactin responsiveness in reproductively experienced female rats. *Endocrinology* **152** 1979-1988.
- Small CJ, Liu YL, Stanley SA, Connoley IP, Kennedy A, Stock MJ & Bloom SR 2003 Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* **27** 530-533.
- Smart JL, Tolle V & Low MJ 2006 Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *J.Clin.Invest* **116** 495-505.
- Sohn JW, Elmquist JK & Williams KW 2013 Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. *Trends Neurosci.* **36** 504-512.
- Song Z, Levin BE, McArdle JJ, Bakhos N & Routh VH 2001 Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* **50** 2673-2681.
- Sorenson RL & Parsons JA 1985 Insulin secretion in mammosomatotropic tumor-bearing and pregnant rats. A role for lactogens. *Diabetes* **34** 337-341.
- Spalding KL, Bernard S, Naslund E, Salehpour M, Possnert G, Appelsved L, Fu KY, Alkass K, Druid H, Thorell A, Ryden M & Arner P 2017 Impact of fat mass and distribution on lipid turnover in human adipose tissue. *Nat.Commun.* **8** 15253.

- Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, Shin GC & Hinck L 2003 Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev.Cell* **4** 371-382.
- Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S & Leibowitz SF 1986 Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*. **7** 1189-1192.
- Stephens M, Ludgate M & Rees DA 2011 Brown fat and obesity: the next big thing? *Clinical Endocrinology (Oxford)* **74** 661-670.
- Steyn FJ, Anderson GM & Grattan DR 2008 Hormonal regulation of suppressors of cytokine signaling (SOCS) messenger ribonucleic acid in the arcuate nucleus during late pregnancy. *Endocrinology* **149** 3206-3214.
- Subramanian V, Rothenberg A, Gomez C, Cohen AW, Garcia A, Bhattacharyya S, Shapiro L, Dolios G, Wang R, Lisanti MP & Brasaemle DL 2004 Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **279** 42062-42071.
- Takaki Y, Mizuochi T, Nishioka J, Eda K, Yatsuga S & Yamashita Y 2018 Nonalcoholic fatty liver disease with prolactin-secreting pituitary adenoma in an adolescent: A case report. *Medicine (Baltimore)* **97** e12879.
- Tanner JM, Kearns DT, Kim BJ, Sloan C, Jia Z, Yang T, Abel ED & Symons JD 2010 Fasting-induced reductions in cardiovascular and metabolic variables occur sooner in obese versus lean mice. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* **235** 1489-1497.
- Tao YX 2010 The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocrine reviews* **31** 506-543.
- Taylor D & Gottlieb RA 2017 Parkin-mediated mitophagy is downregulated in browning of white adipose tissue. *Obesity.(Silver.Spring)* **25** 704-712.
- Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y & Gibori G 2001 PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology* **142** 4086-4094.
- Tovar S & Dieguez C 2014 Prolactin and energy homeostasis: pathophysiological mechanisms and therapeutic considerations. *Endocrinology* **155** 659-662.
- Townsend KL & Tseng YH 2014 Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends Endocrinol.Metab* **25** 168-177.
- Trayhurn P & Bing C 2006 Appetite and energy balance signals from adipocytes. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **361** 1237-1249.
- Trayhurn P, Douglas JB & McGuckin MM 1982 Brown adipose tissue thermogenesis is 'suppressed' during lactation in mice. *Nature* **298** 59-60.
- Trott JF, Hovey RC, Koduri S & Vonderhaar BK 2004 Multiple new isoforms of the human prolactin receptor gene. *Adv.Exp.Med.Biol.* **554** 495-499.
- Trujillo ML, Spuch C, Carro E & Senaris R 2011 Hyperphagia and central mechanisms for leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology* **152** 1355-1365.
- Tseng YH, Cypess AM & Kahn CR 2010 Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat.Rev.Drug Discov.* **9** 465-482.
- Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J & Bloom SR 1996 A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* **379** 69-72.

- Tuzcu A, Yalaki S, Arıkan S, Gokalp D, Bahcec M & Tuzcu S 2009 Evaluation of insulin sensitivity in hyperprolactinemic subjects by euglycemic hyperinsulinemic clamp technique. *Pituitary*. **12** 330-334.
- Uldry M, Yang W, St Pierre J, Lin J, Seale P & Spiegelman BM 2006 Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab* **3** 333-341.
- Unger TJ, Calderon GA, Bradley LC, Sena-Esteves M & Rios M 2007 Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *Journal of Neurosciences* **27** 14265-14274.
- Valdivia S, Patrone A, Reynaldo M & Perello M 2014 Acute high fat diet consumption activates the mesolimbic circuit and requires orexin signaling in a mouse model. *PLoS.ONE*. **9** e87478.
- van Beek L, van Klinken JB, Pronk AC, van Dam AD, Dirven E, Rensen PC, Koning F, Willems vD & van H, V 2015 The limited storage capacity of gonadal adipose tissue directs the development of metabolic disorders in male C57Bl/6J mice. *Diabetologia* **58** 1601-1609.
- Vander Tuig JG, Kerner J & Romsos DR 1985 Hypothalamic obesity, brown adipose tissue, and sympathoadrenal activity in rats. *Am.J.Physiol* **248** E607-E617.
- Vasavada RC, Garcia-Ocana A, Zawalich WS, Sorenson RL, Dann P, Syed M, Ogren L, Talamantes F & Stewart AF 2000 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.* **275** 15399-15406.
- Vasavada RC, Gonzalez-Pertusa JA, Fujinaka Y, Fiaschi-Taesch N, Cozar-Castellano I & Garcia-Ocana A 2006 Growth factors and beta cell replication. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38** 931-950.
- Vergoni AV, Schioth HB & Bertolini A 2000 Melanocortins and feeding behavior. *Biomed.Pharmacother.* **54** 129-134.
- Vianna CR & Coppari R 2011 A treasure trove of hypothalamic neurocircuitries governing body weight homeostasis. *Endocrinology* **152** 11-18.
- Viengchareun S, Bouzinba-Segard H, Laigneau JP, Zennaro MC, Kelly PA, Bado A, Lombes M & Binart N 2004 Prolactin potentiates insulin-stimulated leptin expression and release from differentiated brown adipocytes. *J Mol.Endocrinol.* **33** 679-691.
- Viengchareun S, Servel N, Feve B, Freemark M, Lombes M & Binart N 2008 Prolactin receptor signaling is essential for perinatal brown adipocyte function: a role for insulin-like growth factor-2. *PLoS.ONE*. **3** e1535.
- Villarroya F, Felipe A & Mampel T 1986a Brown adipose tissue activity in hypocaloric-diet fed lactating rats. *Biosci.Rep.* **6** 669-675.
- Villarroya F, Felipe A & Mampel T 1986b Sequential changes in brown adipose tissue composition, cytochrome oxidase activity and GDP binding throughout pregnancy and lactation in the rat. *Biochim.Biophys.Acta* **882** 187-191.
- Wang S, Liang X, Yang Q, Fu X, Rogers CJ, Zhu M, Rodgers BD, Jiang Q, Dodson MV & Du M 2015 Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) alpha1. *Int.J.Obes.(Lond)* **39** 967-976.
- Weinhaus AJ, Stout LE, Bhagroo NV, Brelje TC & Sorenson RL 2007 Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *Journal of Endocrinology* **193** 367-381.
- Wirth MM, Olszewski PK, Yu C, Levine AS & Giraud SQ 2001 Paraventricular hypothalamic alpha-melanocyte-stimulating hormone and MTHII reduce feeding without causing aversive effects. *Peptides*. **22** 129-134.

Wittmann G, Liposits Z, Lechan RM & Fekete C 2002 Medullary adrenergic neurons contribute to the neuropeptide Y-ergic innervation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat. *Neurosciences Letters* **324** 69-73.

Woodside B 2007 Prolactin and the hyperphagia of lactation. *Physiol Behav.* **91** 375-382.

Woodside B, Budin R, Wellman MK & Abizaid A 2012 Many mouths to feed: the control of food intake during lactation. *Front Neuroendocrinol.* **33** 301-314.

Wu C, Cheng W, Sun Y, Dang Y, Gong F, Zhu H, Li N, Li F & Zhu Z 2014 Activating brown adipose tissue for weight loss and lowering of blood glucose levels: a microPET study using obese and diabetic model mice. *PLoS.ONE.* **9** e113742.

Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerback S, Schrauwen P & Spiegelman BM 2012 Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150** 366-376.

Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW & Barsh GS 2005 PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J.Clin.Invest* **115** 951-958.

Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH & Reichardt LF 2003 Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat.Neurosci.* **6** 736-742.

Xue Y, Xu X, Zhang XQ, Farokhzad OC & Langer R 2016 Preventing diet-induced obesity in mice by adipose tissue transformation and angiogenesis using targeted nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Science* **113** 5552-5557.

Yaligar J, Gopalan V, Kiat OW, Sugii S, Shui G, Lam BD, Henry CJ, Wenk MR, Tai ES & Velan SS 2014 Evaluation of dietary effects on hepatic lipids in high fat and placebo diet fed rats by in vivo MRS and LC-MS techniques. *PLoS.ONE.* **9** e91436.

Yang L, Scott KA, Hyun J, Tamashiro KL, Tray N, Moran TH & Bi S 2009 Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. *Journal of Neurosciences* **29** 179-190.

Yaswen L, Diehl N, Brennan MB & Hochgeschwender U 1999 Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature Medicine* **5** 1066-1070.

Yavuz D, Deyneli O, Akpınar I, Yildiz E, Gozu H, Sezgin O, Haklar G & Akalin S 2003 Endothelial function, insulin sensitivity and inflammatory markers in hyperprolactinemic pre-menopausal women. *European Journal of Endocrinology* **149** 187-193.

Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S, O'Rahilly S & Farooqi IS 2004 A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat.Neurosci.* **7** 1187-1189.

Yip SH, Romano N, Gustafson P, Hodson DJ, Williams EJ, Kokay IC, Martin AO, Mollard P, Grattan DR & Bunn SJ 2019 Elevated Prolactin during Pregnancy Drives a Phenotypic Switch in Mouse Hypothalamic Dopaminergic Neurons. *Cell Rep.* **26** 1787-1799.

Yoshimatsu H, Niiijima A, Oomura Y, Yamabe K & Katafuchi T 1984 Effects of hypothalamic lesion on pancreatic autonomic nerve activity in the rat. *Brain Research* **303** 147-152.

Zampieri TT, Ramos-Lobo AM, Furigo IC, Pedrosa JA, Buonfiglio DC & Donato J, Jr. 2015 SOCS3 deficiency in leptin receptor-expressing cells mitigates the development of pregnancy-induced metabolic changes. *Mol.Metab* **4** 237-245.

- Zechner R, Madeo F & Kratky D 2017 Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18** 671-684.
- Zhang M, Hu T, Zhang S & Zhou L 2015 Associations of Different Adipose Tissue Depots with Insulin Resistance: A Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies. *Sci.Rep.* **5** 18495.
- Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M & Jin S 2009 Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science* **106** 19860-19865.
- Zhang Y, Kerman IA, Laque A, Nguyen P, Faouzi M, Louis GW, Jones JC, Rhodes C & Munzberg H 2011 Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. *J Neurosci.* **31** 1873-1884.
- Zheng H & Berthoud HR 2008 Neural systems controlling the drive to eat: mind versus metabolism. *Physiology.(Bethesda.)* **23** 75-83.
- Zhou Z, Yon TS, Chen Z, Guo K, Ng CP, Ponniah S, Lin SC, Hong W & Li P 2003 Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nature Genetics* **35** 49-56.
- Zhu X, Gleiberman AS & Rosenfeld MG 2007 Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev.* **87** 933-963.
- Zigman JM & Elmquist JK 2003 Minireview: From anorexia to obesity--the yin and yang of body weight control. *Endocrinology* **144** 3749-3756.
- Zuriaga MA, Fuster JJ, Gokce N & Walsh K 2017 Humans and Mice Display Opposing Patterns of "Browning" Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. *Front Cardiovasc.Med.* **4** 27.