



**Universidad Nacional Autónoma de México**

:

**Instituto de Neurobiología**

**“EFECTOS DE LA PROLACTINA EN EL TEJIDO ADIPOSEO  
DURANTE LA OBESIDAD”**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias  
(Neurobiología)**

**Presenta:**

**LBT. Xarubet Ruiz Herrera**

**Directoras de Tesis:**

**Dra. Yazmín Macotela Guzmán**

**Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.**

**Campus Juriquilla, Querétaro, Agosto 2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Xarubet Ruiz Herrera, cuyo título es: “Efectos de la prolactina en el tejido adiposo durante la obesidad” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dra. Maricela Luna Muñoz

▪

Secretario (Tutor)

Dra. Yazmín Macotela Guzmán

▪

Vocal

Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez

▪

Suplente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

▪

Suplente

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

▪

Aprobado por el Comité Académico

▪

Dra. Teresa Morales Guzmán

Coordinador del Programa de Maestría

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Yazmín Macotela Guzmán y la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez-Labora.

## RESUMEN

La obesidad se caracteriza por el almacenamiento excesivo de grasa corporal. El aumento de grasa visceral, incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas, que no se presentan con el aumento de grasa subcutánea. La prolactina (PRL) es uno de los factores que podría regular la función del tejido adiposo. La PRL incrementa la ingesta de alimento en ratas hembra y la reducción farmacológica de los niveles de PRL en suero resulta en una disminución del peso corporal en pacientes obesos con prolactinomas. Además, los animales *knockout* para el receptor de PRL, presentan menor masa de tejido adiposo visceral. En el presente trabajo, analizamos el efecto de la prolactina en la resistencia a la insulina y en la expansión del tejido adiposo en ratas obesas. Para ello, utilizamos ratas macho Wistar alimentadas con dieta control (DC) o dieta obesogénica (DO), 4 semanas después de iniciada la dieta se indujo hiperprolactinemia (HiperPRL) con implantes de bombas osmóticas liberadoras de PRL por 28 días, quedando constituidos los siguientes grupos: DC, DC+HiperPRL, DO y DO+HiperPRL. La hiperprolactinemia disminuyó la resistencia a la insulina inducida por una DO y aumentó la masa del tejido visceral y subcutáneo en animales con DO. La HiperPRL incrementó la hiperplasia del tejido visceral y subcutáneo, y disminuyó la hipertrofia solamente en el tejido visceral. La HiperPRL no alteró la sensibilidad a la insulina ni la expansión del tejido adiposo en los animales en la DC; tampoco alteró la ingesta de alimento o el peso corporal en animales en dieta DC o en DO. En conclusión, la hiperprolactinemia podría ejercer efectos metabólicamente benéficos a través de la modulación del crecimiento y la proliferación de los adipocitos en la obesidad.

## SUMMARY

Obesity is characterized by excessive accumulation of body fat. Increased storage of visceral adipose tissue is associated with bad metabolic outcomes, whereas an excess of subcutaneous adipose tissue can have neutral metabolic effects. Prolactin (PRL) is a factor that may regulate adipose tissue function. Preadipocytes and adipocytes from mice visceral adipose tissue express higher levels of the PRL receptor compared to their subcutaneous counterparts. PRL can increase food intake in female rats, and reductions in serum PRL with bromocriptine can result in weight loss in obese patients with prolactinomas. PRL receptor *knockout* mice have reduced visceral adipose tissue mass compared to wild type animals. We analyzed whether hiperprolactinemia (HyperPRL) influences insulin resistance and adipose tissue expansion in obese rats. Male Wistar rats were maintained with either a control diet (CD) or a high fat diet (HFD) and 4 weeks later, both groups were divided to form the following groups: CD, CD+HyperPRL, HFD and HFD+HyperPRL. HyperPRL was induced by implanting subcutaneous osmotic pumps releasing PRL for 28 days. We found that HyperPRL significantly reduced HFD-induced insulin resistance and resulted in larger visceral and subcutaneous adipose depots in the HFD-fed animals. This was the result of increased hyperplasia in both subcutaneous and visceral fat but reduced hypertrophy in visceral adipose tissue. HyperPRL had no effect on insulin sensitivity and adipose tissue expansion on CD-fed rats, or on food intake or body weight in rats under either CD or HFD. In conclusion, HyperPRL could exert beneficial metabolic effects by modulating adipocyte growth and proliferation in obesity.

## AGRADEZCO

- ◆ *A la Dra. Yazmín Macotela, por la gran oportunidad de participar en su proyecto, por su asesoría, el gran apoyo y la confianza que me brindó.*
- ◆ *A la Dra. Carmen Clapp por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.*
- ◆ *Al Dr. Mauricio Díaz y al Dr. Gerardo Rojas por ser parte del Comité Tutoral de Maestría y por todos sus comentarios que enriquecieron este proyecto.*
- ◆ *A todos los miembros de los laboratorios A-14 (Endocrinología Molecular) y A-15 (Neuroendocrinología de la Reproducción) del Instituto de Neurobiología.*
- ◆ *A mis compañeros: Lupis, Nundi, Norma, Mayda, Zulma, Elva, David, Germán y Hugo.*

## AGRADECIMIENTO INSTITUCIONAL

- ◆ *Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becario No. 371681) por el apoyo económico y del trabajo experimental (IB-200411-22).*
- ◆ *La asistencia técnica y el apoyo del Lic. Nut. Fernando López.*
- ◆ *La asesoría de la M. en C. Leonor Casanova Rico, responsable de la Unidad de Enseñanza.*
- ◆ *La asistencia técnica de Daniel Mondragón, M. en C. Gabriel Nava y Antonio Prado.*
- ◆ *La asistencia técnica en el bioterio del MVZ. José Martín García.*



*Dedicado a:*

*Mi esposo (César Pacheco Romero)*

*Mi mamá (Norma Herrera Sevilla)*

*Mi abue (María Sevilla Hernández)*

*Mis Hermanas (Nashiefy y Pamela)*

*Gracias por su apoyo*

# ÍNDICE

Página

Resumen español.....	iii
Resumen inglés .....	iv
I. Introducción .....	1
II. Antecedentes.....	2
II.1 Obesidad .....	2
II.2 Tejido adiposo .....	2
II.2.1 Tipos de tejido adiposo.....	4
II.2.2 Funciones del tejido adiposo .....	5
II.3 Adipocinas .....	5
II.4 Riesgos metabólicos.....	7
II.5 Obesidad y resistencia a la insulina .....	7
II.6 PRL, tejido adiposo y obesidad .....	10
III. Justificación .....	13
IV. Hipótesis.....	14
V. Objetivos .....	14
V.1 General.....	14
V.2 Específicos .....	14
VI. Metodología.....	15
VI.1 Animales y modelo de obesidad .....	15
VI.2 Inducción de hiperprolactinemia.....	15
VI.3 Peso corporal e ingesta de alimento .....	15
VI.4 Ensayo de tolerancia a la glucosa.....	15

VI.5 Ensayo de tolerancia a la insulina.....	16
VI.6 Bioensayo Nb2 .....	16
VI.7 Histología .....	17
VI.8 Análisis estadístico.....	18
VII. Resultados .....	19
VII.1 Inducción de hiperprolactinemia (niveles de PRL en sangre) .....	19
VII.2 Peso corporal .....	19
VII.3 Ingesta de alimento .....	20
VII.4 Peso del tejido adiposo .....	20
VII.5 Tamaño y número de los adipocitos (hipertrofia e hiperplasia).....	23
VII.6 Tolerancia a la glucosa .....	28
VII.7 Sensibilidad a la insulina .....	30
VIII. Discusión.....	31
IX. Conclusiones.....	36
X. Bibliografía .....	37
XI. Índice de figuras .....	42
XII. Índice de tablas .....	44

## **I. INTRODUCCIÓN**

En los últimos años, la prevalencia de obesidad ha alcanzado magnitudes epidémicas, perjudicando a niños, adolescentes y adultos. Particularmente en México alrededor del 70% de la población es obesa o tiene sobrepeso, lo que ubica a nuestro país como el segundo lugar mundial en obesidad en adultos y el primer lugar en obesidad infantil. Dado que los programas y tratamientos actuales son insuficientes para normalizar el peso corporal y prevenir las complicaciones, resulta de gran relevancia entender los mecanismos y los factores que regulan el crecimiento y la función del tejido adiposo, con la finalidad de encontrar blancos terapéuticos para el tratamiento de la obesidad.

Evidencias experimentales sugieren que la prolactina (PRL) podría ejercer efectos sobre el tejido adiposo, sin embargo, algunos de los resultados son controversiales y poco reproducibles. En nuestro trabajo, evaluamos el efecto de la PRL en el tejido adiposo visceral y subcutáneo en condiciones de obesidad y no obesidad. Para ello implementamos un modelo de obesidad en ratas macho alimentadas con una dieta obesogénica (DO) que consiste en una dieta alta en grasas, y evaluamos el efecto de la hiperprolactinemia (HiperPRL), inducida mediante un implante subcutáneo de bombas liberadoras de PRL, sobre la resistencia a la insulina y la expansión del tejido adiposo visceral y subcutáneo.

A continuación se describen brevemente los antecedentes que conforman el marco teórico de este trabajo y se presentan y discuten los resultados experimentales obtenidos.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Obesidad

La obesidad es una condición que se caracteriza por el almacenamiento excesivo de grasa corporal. Se presenta cuando la ingesta de calorías excede el gasto energético (Balistreri et al., 2010). La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a una persona como obesa cuando ésta presenta un índice de masa corporal (IMC) mayor a  $30 \text{ kg/m}^2$  y con sobrepeso cuando el IMC es mayor a  $25 \text{ kg/m}^2$ . Según la OMS, hay más de un billón de adultos con sobrepeso en todo el mundo y 300 millones de estas personas son clínicamente obesas (Cao, 2010). Particularmente en México alrededor del 70% de la población es obesa o tiene sobrepeso (ENSANUT, 2006).

Durante la obesidad, el metabolismo de un organismo se encuentra alterado, normalmente este proceso está regulado por el estado nutricional, el gasto energético y señales hormonales. En la regulación de la homeostasis metabólica, que consiste en el mantenimiento de un suministro constante de sustratos que pueden ser oxidados para proporcionar energía, participan órganos como el páncreas, el hígado y el tejido adiposo. Los principales combustibles del cuerpo son la glucosa, ácidos grasos y los cuerpos cetónicos, y las reservas de esta energía son el glucógeno del hígado, los triacilglicéridos del tejido adiposo y las proteínas del músculo (Van den Berghe, 1991). Pero además, el metabolismo de la glucosa está controlado por el páncreas, a través de la secreción de insulina y glucagón.

### II.2 Tejido adiposo

El tejido adiposo es un órgano altamente especializado para el almacenamiento de grasa corporal. Es un tejido de origen mesenquimal, que tiene un papel fundamental en la regulación de la homeostasis metabólica, a través del almacenamiento y la liberación de ácidos grasos y la secreción de hormonas y citocinas (Diamond, 2002). El tejido adiposo está formado por varios tipos de células (Figura 1). El principal tipo celular son los adipocitos, que son células maduras que tienen la capacidad de almacenar lípidos, mientras que los preadipocitos, son células unipotenciales que están comprometidos al linaje de adipocitos (Ben-Jonathan et al., 2007). Además, están presentes fibroblastos,

células endoteliales y células inmunes, como los macrófagos, así como células pluripotenciales que pueden dar origen a distintos tipos celulares incluyendo a los adipocitos (Cook y Cowan, 2009). La obesidad resulta de la hipertrofia (aumento del tamaño de las células) y de la hiperplasia (aumento del número de células) de los adipocitos (Otto y Lane, 2005). La hipertrofia de los adipocitos se caracteriza por un estado hiperlipolítico, es decir, aumenta la hidrólisis de triacilglicéridos, que es resistente al efecto antilipolítico de la insulina (Després y Lemieux, 2006). Por otro lado, durante la obesidad incrementa la infiltración de macrófagos al tejido adiposo, los macrófagos aumentan la cantidad de moléculas inflamatorias circulantes, que junto con el exceso de lípidos en la circulación provocan el desarrollo de resistencia a la insulina en diversos tejidos. Además, se ha visto que los macrófagos inhiben la diferenciación de los adipocitos, favoreciendo el desarrollo de hipertrofia de estas células y alterando la secreción de adipocinas (mediadores químicos producidos por el tejido adiposo) (Heilbronn y Campbell, 2008).

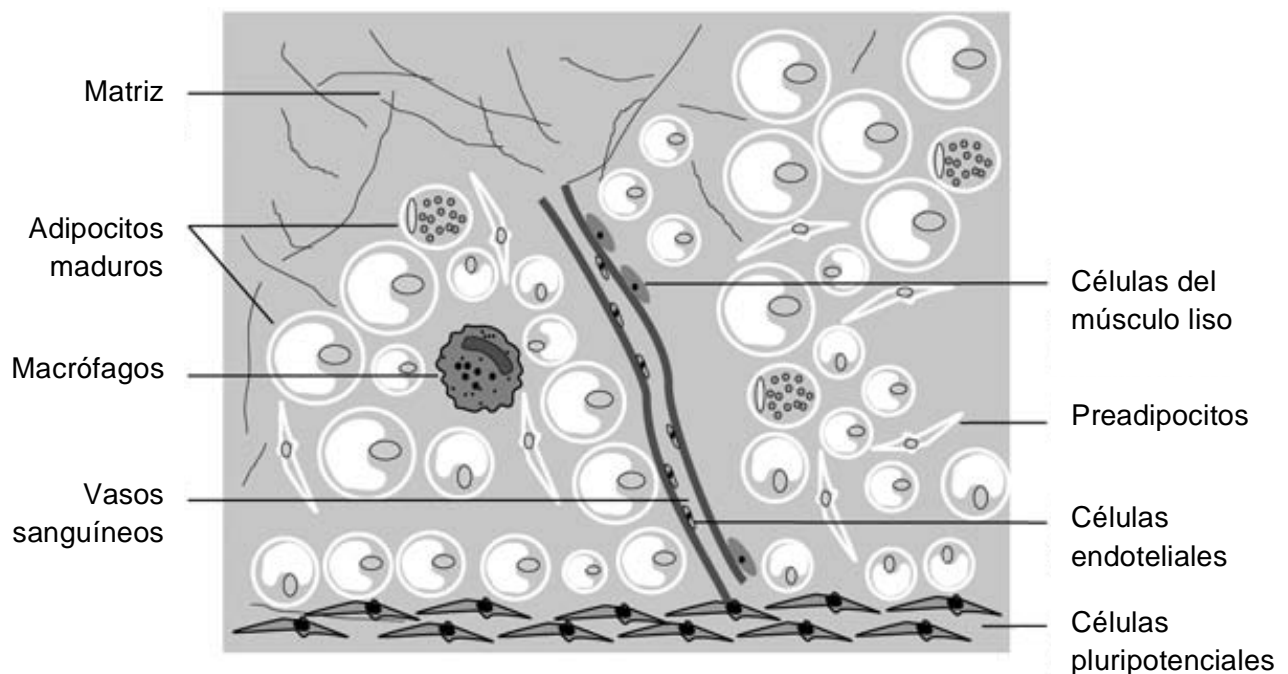


Figura 1. Tipos celulares del tejido adiposo. El tejido adiposo está compuesto por adipocitos maduros, preadipocitos, macrófagos, células endoteliales, células del músculo liso y células pluripotenciales (Schaffler et al., 2005).

## II.2.1 Tipos de tejido adiposo

Existen dos tipos de tejido adiposo, el café o pardo (TAC) y el blanco (TAB). El TAC metaboliza los ácidos grasos y proporciona energía para la producción de calor; se caracteriza por una alta densidad de mitocondrias y bajo almacenamiento de lípidos (Whittle et al., 2011). El TAB regula la homeostasis de la energía a través de su capacidad de almacenar y liberar lípidos, así como de la secreción de múltiples sustancias que afectan la ingesta de alimento, el balance energético, la sensibilidad a la insulina, y el metabolismo de lípidos y glucosa. Por su parte, TAB se clasifica en grasa visceral y subcutánea. Los depósitos de grasa subcutánea son los que se encuentran debajo de la piel de glúteos, abdomen y muslos. La grasa visceral son los depósitos de grasa mesentérica, omental y perirrenal (Cook y Cowan, 2009); la grasa visceral que se encuentra dentro de la cavidad abdominal que rodea a los órganos internos representa alrededor del 20% de la grasa corporal total en hombres y el 6% en la mujeres (Wajchenberg et al., 2002) (Figura 2). Los adipocitos de ambos tejidos tienen distintas características, por ejemplo, presentan patrones diferenciales de expresión de genes (Gesta et al., 2007), y son morfológica y funcionalmente diferentes (Tabla 1).

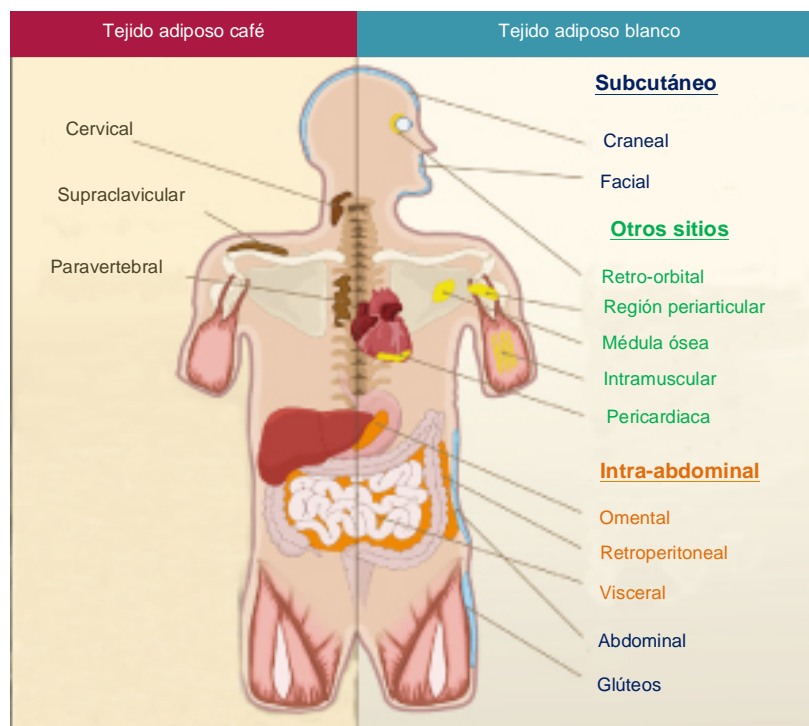


Figura 2. Distribución corporal de los diferentes tipos de tejido adiposo: café y blanco (subcutáneo y visceral) (Gesta et al., 2007).

## II.2.2 Funciones del tejido adiposo

Los adipocitos maduros, llevan a cabo la mayor parte de las funciones del tejido adiposo, ya que tienen la capacidad de metabolizar la glucosa, almacenar y liberar ácidos grasos y secretar hormonas y citocinas particulares, las adipocinas (Brandebourg et al., 2007). Es por esto, que al tejido adiposo se le considera un órgano endócrino que afecta las funciones de diversos órganos como cerebro, hígado, páncreas y músculo, y por lo tanto es un regulador central de la homeostasis metabólica de todo el organismo, a través de regular el balance de energía, la sensibilidad a la insulina y respuestas inflamatorias (Rexford, 2006).

Tabla 1. Principales características de las células adiposas. Se presenta una comparación entre las células adiposas viscerales y subcutáneas (Wajchenberg et al., 2002).

<b>Factor bioquímico</b>	<b>Diferencia regional</b>	<b>Efecto fisiológico</b>
Secreción de adiponectina	Subcutáneo > Visceral	Aumenta la sensibilidad a la insulina
Secreción de leptina	Subcutáneo > Visceral	Aumenta la sensibilidad a la insulina
Respuesta a glucocorticoides	Visceral > Subcutáneo	Mayor almacenamiento de triacilglicéridos
Secreción de angiotensinógeno	Visceral > Subcutáneo	Promueve diferenciación de preadipocitos
Secreción de interleucina 6	Visceral > Subcutáneo	Estimula respuestas inflamatorias
Secreción de TNF $\alpha$	Visceral > Subcutáneo	Estimula respuestas inflamatorias, promueve la resistencia a la insulina

## II.3 Adipocinas

El tejido adiposo blanco secreta una gran variedad de hormonas y citocinas denominadas adipocinas. Entre ellas la adiponectina, es secretada exclusivamente por el tejido adiposo y es una proteína muy abundante en el plasma (Galic et al., 2010). La



adiponectina circula en forma de trímeros, hexámeros o formando un complejo de alto peso molecular (Rexford, 2006). Existe una fuerte correlación entre la concentración de adiponectina en plasma y la masa corporal, ya que durante la obesidad se reducen los niveles de adiponectina mientras que una pérdida de peso incrementa los niveles de adiponectina (Matsubara et al., 2002). Se ha visto claramente que la adiponectina estimula la sensibilidad a la insulina en modelos de obesidad. Además se ha reportado que la adiponectina estimula la oxidación de ácidos grasos y la absorción de glucosa en el músculo esquelético y en el tejido adiposo (Galic et al., 2010).

Por su parte, los niveles circulantes de otra adipocina, la leptina, se incrementan con la ganancia de peso y disminuyen con la pérdida de peso (Havel et al., 1996). Existe una correlación positiva entre los niveles circulantes de leptina en suero y la masa de tejido adiposo. La leptina inhibe el apetito, estimula la termogénesis, aumenta la oxidación de ácidos grasos, disminuye la glucosa, el peso corporal y los depósitos de grasa (Rexford, 2006).

El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) es sintetizado como una proteína de membrana que se somete a una proteólisis por metaloproteasas para ser liberado a la circulación como una molécula soluble de 17 KDa (Galic et al., 2010). Los adipocitos son capaces de producir TNF $\alpha$  y se sugiere que los adipocitos son los principales responsables de que los niveles de esta molécula aumenten durante la obesidad. Pero además, los macrófagos que se encuentran en la fracción estromo-vascular del tejido adiposo son una fuente muy importante de TNF $\alpha$ , que además estimula la infiltración de macrófagos al tejido adiposo (Weisberg et al., 2003).

Los niveles de interleucina-6 (IL-6) se incrementan en la diabetes tipo 2 y correlacionan positivamente con la masa del tejido adiposo y la concentración de ácidos grasos libres (Lazar, 2005). Aproximadamente 1/3 de la IL-6 detectada en plasma es atribuida a la producción por el tejido adiposo (Mohamed-Ali et al., 1997). En adipocitos y hepatocitos se ha demostrado que la IL-6 inhibe la vía de señalización de la insulina (Rotter et al., 2003).

## II.4 Riesgos metabólicos

Es importante destacar que la acumulación excesiva de tejido adiposo tiene un papel metabólico distinto dependiendo del depósito de grasa en el que ocurra (Figura 3). El aumento de grasa visceral, incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas tales como intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, hipertriacilglicerindemia, hipertensión y alteración en los niveles circulantes de lipoproteínas (Rexford, 2006), mientras que el aumento de grasa subcutánea no ejerce tal riesgo (Gesta et al., 2007). Las complicaciones metabólicas relacionadas con la grasa visceral, pueden estar basadas en la anatomía y el hecho de que este tejido drena los ácidos grasos libres y adipocinas a la circulación portal, donde puede actuar preferentemente en el hígado y afectar su metabolismo (Tran y Kahn, 2010). Sin embargo, también puede deberse a que los adipocitos viscerales son intrínsecamente distintos a los subcutáneos (Gesta et al., 2007).

## II.5 Obesidad y resistencia a la insulina

Así pues, la obesidad es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de patologías tales como diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, dislipidemias, hígado graso, Alzheimer y algunos tipos de cáncer (Cao, 2010). Estas enfermedades tienen como factor común a la resistencia a la insulina, es decir, una disminución en la respuesta de los tejidos a las acciones de la hormona.

La insulina desencadena una compleja cascada de señalización en tejidos como el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. Algunos de los efectos de la insulina son mediados por la cinasa de inositol trifosfato (IP-3K), la cual activa a Akt (proteína cinasa B), la PKC (proteína cinasa A) y JNK (cinasa c-Jun N-terminal). Akt en particular media muchos de los efectos metabólicos inducidos por la insulina, como son la inhibición de la gluconeogénesis, la síntesis de glucógeno y la síntesis de proteínas, mientras que la PKC activa la síntesis de lípidos. En contraste, los efectos de la insulina en la proliferación son mediados principalmente por ERK1 y ERK2 (quinasas reguladas por señales extracelulares), independientes de IP-3K. Finalmente la absorción de glucosa regulada por la insulina, es a través de Akt, PKC y el complejo CAP/Cb1 (proteína asociada a la adenilato ciclasa/receptor a canabinoides tipo 1) (Taniguchi et al., 2006).

La resistencia a la insulina es el resultado de la activación de diversos mecanismos incluyendo la inflamación, la lipotoxicidad y el estrés del retículo endoplasmático.

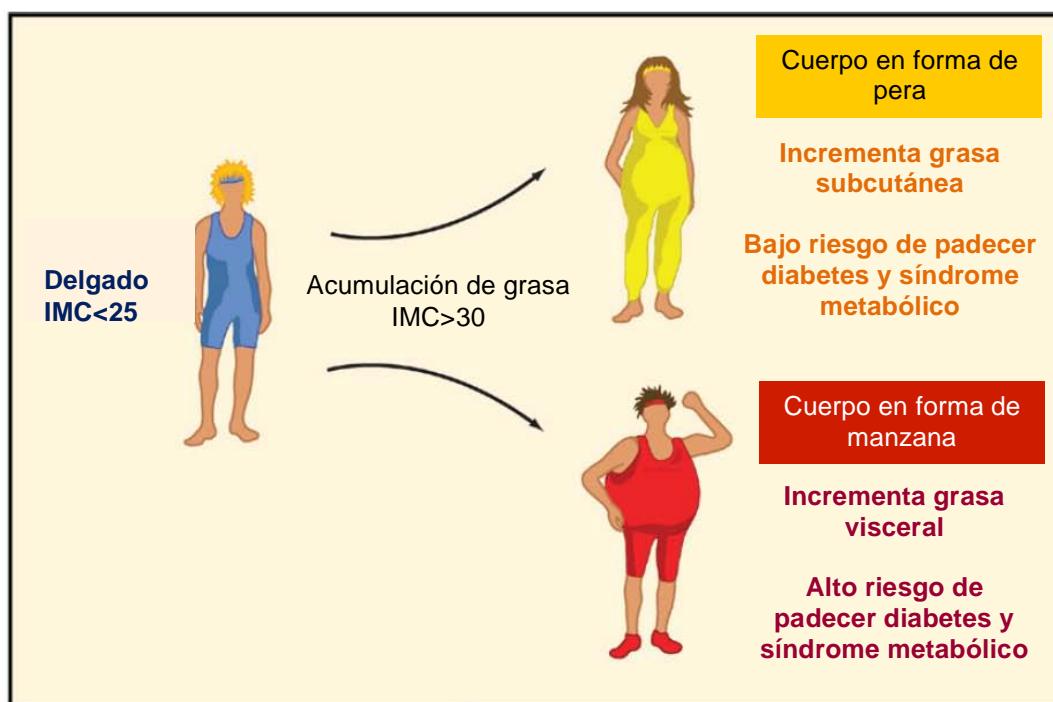


Figura 3. Acumulación de grasa visceral y subcutánea. Un aumento en la acumulación de grasa visceral, presenta riesgos metabólicos que no se presentan con el almacenamiento de grasa subcutánea (Gesta et al., 2007).

Existen dos teorías que explican como la resistencia a la insulina es causada por la obesidad. La primera hipótesis plantea a la inflamación como el agente causal. Durante la obesidad la activación e infiltración de macrófagos ocurre comúnmente en el tejido adiposo de ratones y humanos. Esto se asocia con un incremento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  (interleucina 1 $\beta$ ) y la IL-6, resultando en un estado inflamatorio en otros tejidos como músculo e hígado (De Luca y Olefsky, 2008). La inflamación puede producir resistencia a la insulina a través de incrementar la fosforilación del SRI-1 (sustrato del receptor de insulina) en el residuo de serina 307 que impide su activación, por ejemplo, inicia la formación de un complejo de multiproteínas que dispara la activación de JNK, a su vez, JNK fosforila a SRI-1 en Ser-307; la fosforilación de Ser-307 puede interferir con la función de SRI-1 interrumpiendo la interacción con el receptor de insulina. Además, la fosforilación de la serina 307

también altera la localización intracelular de SRI-1 e induce su degradación (Biddinger y Emanuelli, 2010). Por otro lado, la IL-6 induce la transcripción de proteínas SOCS (proteína supresora de la señalización por citocinas), particularmente, SOCS-1 y SOCS-3 que disminuyen la señalización de la insulina. En primer lugar, SOCS-1 y 3 interactúan con el receptor de insulina lo que puede prevenir la unión del SRI o disminuir la actividad cinasa del receptor de insulina. En segundo lugar, las SOCS promueven la degradación del SRI (Taniguchi et al., 2006). Cabe mencionar que la IL-6 también estimula la formación de TRAF (factor asociado al receptor TNF) y TAK (cinasa activada por el factor de crecimiento transformante), las cuales activan a IKK (cinasa del factor inhibitorio kappa B). IKK es un mediador central de la respuesta inflamatoria, ya que activa al factor de transcripción NFκB (factor nuclear kappa B). NFκB estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNFα, IL-1β e IL-6, es así, como promueve la inflamación y la resistencia a la insulina (De Luca y Olefsky, 2008; Samuel et al., 2010).

La otra teoría propone que la lipotoxicidad es la causa de la resistencia a la insulina en la obesidad. Los ácidos grasos libres producidos por el tejido adiposo promueven inflamación activando la vía de los receptores tipo Toll 2 y 4 (TLR). Los TLR forman un complejo de proteínas que contienen TRAF, y activan las vías de JNK e IKK/NFκB (Biddinger y Emanuelli, 2010). Por otro lado, el exceso de ácidos grasos también puede ser depositado en tejidos como el hígado y el músculo, donde se forma diacilglicerol (DAG) y otros metabolitos lipotóxicos, como el gangliosido GM3 o ceramidas (Samuel et al., 2010). DAG activa JNK, PKCφ y PKCε. PKCφ está presente en el músculo y estimula la activación de IKK y JNK, mientras que, PKCε está presente en el hígado e interactúa directamente con el receptor de insulina disminuyendo su actividad. El gangliósido GM3 y las ceramidas, se ha reportado que inducen resistencia a la insulina interfiriendo con la activación del receptor de insulina y Akt, respectivamente (Biddinger y Emanuelli, 2010).

Es evidente que, a través de estos mecanismos, el tejido adiposo juega un papel central en la regulación del metabolismo energético de todo el organismo así como en el desarrollo de la resistencia a la insulina, por ello se han dedicado grandes esfuerzos

para entender como se regula su expansión, crecimiento y función tanto en la salud como en condiciones patológicas.

## II.6 PRL, tejido adiposo y obesidad

Uno de los factores que podría estar involucrado en la regulación del crecimiento y el metabolismo del tejido adiposo en condiciones fisiológicas y patológicas es la hormona prolactina (PRL). La PRL es una proteína de 23 kDa producida principalmente por la hipófisis cuya secreción se encuentra regulada por un tono dopaminérgico inhibitorio hipotalámico constante (Ben-Jonathan et al., 2007). La PRL, es una hormona multifuncional que tiene un papel endócrino, autócrino y parácrino, ya que se produce también en sitios extrahipofisarios. La PRL es esencial para la iniciación y mantenimiento de la lactancia, pero además es una hormona muy versátil con funciones asociadas a la reproducción, crecimiento y desarrollo, osmorregulación, metabolismo, regulación de la respuesta inmune y del comportamiento (Clapp et al., 2009). Esta hormona se expresa y secreta por el tejido adiposo blanco en humanos (Ben-Jonathan et al., 2006). Sus receptores (RPRL), están expresados en casi todos los órganos, incluyendo TAB y TAC, en donde se han encontrado las isoformas larga y corta de dichos receptores. Además, los RPRL se expresan en concentraciones mayores tanto en los preadipocitos como en los adipocitos del tejido visceral comparado con el tejido subcutáneo (Macotella et al., 2012; Gesta et al, 2006).

En modelos *in vitro*, utilizando líneas celulares, se ha observado que los niveles de PRL y su mRNA aumentan durante la diferenciación de los preadipocitos hacia adipocitos maduros (Hugo et al., 2006). Además, en una línea celular de preadipocitos, las células 3T3-L1, la PRL es capaz de estimular la diferenciación hacia adipocitos maduros (Stewart et al., 2004). En explantes de tejido adiposo subcutáneo humano se ha observado que la PRL inhibe la secreción de adiponectina (Nilsson et al., 2005). En ratones, la PRL disminuye la actividad de la lipoproteína lipasa y de la acetil CoA carboxilasa en el tejido adiposo (Barber et al., 1992). La función de la lipoproteína lipasa es hidrolizar el complejo de triacilglicéridos y lipoproteína, mientras que la acetil CoA carboxilasa y la ácido graso sintasa catalizan la formación de cadenas de ácidos grasos (Large et al., 2004). Se ha examinado la relación de la PRL con la leptina, pero no se

han encontrado resultados claros. En cultivos de adipocitos de ratón, la PRL inhibe la secreción de leptina inducida por insulina (Ling y Billig, 2001), y disminuye la liberación de leptina en cultivos de adipocitos provenientes de tejido adiposo visceral de rata (Flint et al., 2006; Brandebourg et al., 2007). En los ratones *knockout* para el receptor de PRL (RPRL-/-), disminuye o no cambia la concentración de leptina (Freemark et al., 2001; Fleenor et al., 2005). Se sugiere que la PRL además, puede regular la ingesta alimenticia. En este sentido, estudios con ratas hembra, muestran que la PRL aumenta la ingesta de alimento, algunas veces de manera dosis dependiente (Gerardo-Gettens et al., 1989; Naef y Woodside, 2007). Además, la inyección de PRL en el núcleo paraventricular aumenta la ingesta de alimento, lo que podría indicar que además de su acción en el tejido adiposo, la PRL regula el sistema hipotalámico orexigénico y anorexigénico que regula el apetito (Sauvé y Woodside, 2000). Sin embargo estos resultados son controversiales y no siempre reproducibles.

Por otro lado, pacientes con hiperprolactinemia debido a la presencia de tumores adenohipofisarios (prolactinomas) presentan una mayor prevalencia de obesidad que la población en general (dos Santos Silva et al., 2010). Sin embargo el tratamiento con drogas que reducen los niveles de PRL, tales como la bromocriptina (un agonista dopaminérgico) ha arrojado resultados variables. En algunos casos, se ha observado disminución del peso corporal de los pacientes y en otros casos no se genera ningún cambio (Doknic et al., 2002). Además, no se sabe si los efectos observados se deben a la disminución de la PRL circulante o al efecto de la bromocriptina sobre los receptores dopaminérgicos fuera de la hipófisis.

Quizá la evidencia más directa de los efectos de la PRL en el tejido adiposo, pero dependiente del sexo, proviene de los animales RPRL-/- . En las hembras RPRL-/-, el tejido adiposo es de menor tamaño que en animales silvestres. El peso corporal de las hembras también es menor en los ratones RPRL-/- que en los silvestres. Mientras que el peso total de los animales macho, la masa del tejido adiposo y la ingesta alimenticia se mantienen normales (Freemark et al., 2001).

Además de los efectos ya descritos, la PRL regula diversas funciones que pueden alterar directamente el desarrollo y la expansión del tejido adiposo, por ejemplo sus efectos sobre la angiogénesis. La angiogénesis es esencial para el crecimiento y expansión de los tejidos, incluyendo el tejido adiposo durante la obesidad (Cao, 2010). La PRL puede estimular e inhibir la angiogénesis directa e indirectamente vía su metabolización a vasoinhibinas (Clapp et al., 2009), de tal manera que la PRL puede afectar el crecimiento y la función del tejido adiposo mediante diversos mecanismos.

### III. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es una condición que ha alcanzado proporciones epidémicas en muchas partes del mundo, no solo en adultos sino recientemente también en niños y adolescentes. Además, es el principal factor de riesgo para una gran gama de patologías. El tratamiento actual sólo incluye cambios en el estilo de vida, como dieta y ejercicio físico, o eliminación de grasa por medio de cirugías; este último, es un procedimiento costoso y presenta un alto riesgo para la salud. Dichos métodos suelen ser insuficientes para normalizar el peso corporal y prevenir las complicaciones. Estas complicaciones están relacionadas con el aumento en el almacenamiento de grasa visceral, ya que no se presentan con el almacenamiento excesivo de grasa subcutánea. Por lo anterior, resulta esencial entender los mecanismos y los factores que regulan la expansión y la función del tejido adiposo, con el fin de encontrar blancos terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad.

La hormona PRL puede tener un papel relevante tanto en el crecimiento como en la función metabólica del tejido adiposo. Se ha visto que la PRL es capaz de estimular la ingesta de alimento en ratas hembra, la presencia de prolactinomas se ha asociado con sobrepeso en humanos y la masa del tejido adiposo visceral es menor en ratones RPRL-/- respecto a los animales silvestres. En este trabajo nos interesó investigar si la PRL puede afectar la función del tejido adiposo tanto en condiciones de homeostasis como en condiciones de expansión patológica como es el caso de la obesidad. Para conocer el efecto de la PRL sobre el tejido adiposo durante la obesidad, implementamos un modelo de obesidad en ratas inducido por una dieta alta en grasas (obesogénica) y evaluamos el efecto de la hiperprolactinemia en estos animales. Los parámetros estudiados fueron la ingesta de alimento, el peso corporal y la sensibilidad a la insulina. Además, en el tejido adiposo se evaluó el peso del tejido y la morfología de los adipocitos.



#### **IV. HIPÓTESIS**

La prolactina estimula el crecimiento del tejido adiposo y disminuye la resistencia a la insulina inducida por una dieta obesogénica.

#### **V. OBJETIVOS**

##### V.1 General

Determinar el efecto de la prolactina en el tejido adiposo visceral y subcutáneo así como en la resistencia a la insulina en animales obesos y no obesos.

##### V.2 Específicos

- Evaluar si niveles elevados de prolactina en sangre modifican el peso corporal y la ingesta de alimento, en animales con dieta control y con dieta obesogénica.
- Analizar el efecto de la prolactina en parámetros metabólicos como tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina, en animales obesos y no obesos.
- Determinar si la prolactina regula el crecimiento del tejido adiposo visceral y subcutáneo evaluando su peso y su morfología, en animales obesos y no obesos.

## VI. METODOLOGÍA

### VI.1 Animales y modelo de obesidad

Se usaron ratas macho Wistar de 4 semanas de edad, se les mantuvo con agua y alimento *ad libitum* bajo ciclos de luz oscuridad de 12 h. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos: 1) dieta control (DC), 2) DC+HiperPRL, 3) dieta obesogénica (DO) y 4) DO+HiperPRL. En la dieta control el 13% de las calorías proviene de lípidos, mientras que en la dieta obesogénica (alta en grasas) el 60% de las calorías proviene de lípidos. Los animales se mantuvieron en las dietas respectivas durante 8 semanas, mientras que el tratamiento de HiperPRL se indujo después de 4 semanas del inicio de la dieta. Los animales se anestesiaron en una cámara saturada de dióxido de carbono para posteriormente ser decapitados (aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM). Se colectaron muestras de sangre y se disecó el tejido adiposo visceral y subcutáneo y el hígado. Los tejidos se pesaron y se almacenaron para el análisis histológico.

### VI.2 Inducción de hiperprolactinemia

Los niveles de PRL se incrementaron supra-fisiológicamente mediante el uso de implantes subcutáneos de bombas ALZET (Adler, 1986), capaces de liberar una dosis constante de PRL ovina (Sigma-Aldrich L6520) al torrente sanguíneo (0.16 mg/Kg/día) durante 28 días, lo que resulta en una dosis de más de 20 ng/mL de PRL en el suero (la concentración fisiológica es menor a 20 ng/mL).

### VI.3 Peso corporal e ingesta de alimento

Se monitoreó el peso corporal y la ingesta de alimento de los animales, una vez a la semana durante las 8 semanas del tratamiento.

### VI.4 Ensayo de tolerancia a la glucosa

El ensayo de tolerancia a la glucosa se realizó una semana antes del sacrificio de los animales para que recuperarán su estado fisiológico. Los animales permanecieron en ayuno durante 12-14 h antes del experimento. Se midieron los niveles de glucosa en sangre, mediante un pequeño piquete con una lanceta en la punta de la cola del animal

y el uso de un glucómetro. La primera medición (tiempo 0) fue antes de la administración de una dosis de 2 g/kg de glucosa vía intraperitoneal. Posteriormente, se midieron los niveles de glucosa a diferentes tiempos (15, 30, 60 y 120 min), después de la administración de la glucosa. Finalmente, se graficó el tiempo contra los niveles de glucosa (mg/dL) en sangre.

#### VI.5 Ensayo de tolerancia a la insulina

A los animales se les retiró el alimento 2 h antes del experimento, el ensayo se realizó una semana antes del sacrificio de los animales para que recuperarán su estado fisiológico. Se midieron los niveles de glucosa en sangre (tiempo 0), antes de la administración de una dosis de 0.75 U/kg de insulina vía intraperitoneal. Posteriormente, se midieron los niveles de glucosa a diferentes tiempos (15, 30, 60 y 120 min), después de la administración de la insulina. Se graficó el tiempo contra los niveles de glucosa en sangre en mg/dL.

#### VI.6 Bioensayo Nb2

Los animales fueron sacrificados en una cámara saturada con CO<sub>2</sub>, para posteriormente ser decapitados. Se recolectó la sangre y se centrifugó 10 min a 3 000 rpm para obtener el suero. Se midieron los niveles de PRL en el suero utilizando el bioensayo de células Nb2 de acuerdo al método previamente descrito (Tanaka et al., 1980). Éstas son una línea celular derivada de un linfoma murino cuya proliferación ocurre en función directa de la concentración de PRL. En primer lugar, las células se mantuvieron de 4-7 días en medio de mantenimiento. Este medio se preparó con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 10% de suero de caballo, 10% de suero fetal bovino, penicilina-estreptomina (1:100 v/v) y 1.5 µL/L de 2-mercaptoetanol, se ajustó a pH 7.4 y se filtró. Posteriormente, 24 h antes del ensayo las células se sincronizaron en medio estacionario para detener su proliferación, se sembraron 1x10<sup>6</sup> células/mL. El medio estacionario se preparó con medio DMEM, 10% de suero de caballo, 1% de suero fetal bovino, penicilina-estreptomina (1:100 v/v), 1.5 µL/L de 2-mercaptoetanol, se ajustó a pH 7.4 y se filtró. El día del bioensayo, las células se resuspendieron en medio de bioensayo para tener 625 000 células/mL. El medio de bioensayo se preparó con DMEM, 10% de suero de caballo, penicilina-estreptomina

(1:100 v/v) y 1.5  $\mu\text{L/L}$  de 2-mercaptoetanol se ajustó a pH 7.4 y se filtró. Después, se realizaron dos curvas estándar de PRL ovina y PRL de rata (0, 6.6, 13.3, 26.6, 53.3, 106.6, 213.3, 426.6, 853.5, 1666.6, 16666.6 y 70000 pg/mL), diluyendo en medio de bioensayo. Para montar el ensayo en placas de 96 pozos, se adicionaron 120  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones de la curva. Para las muestras problema, se adicionaron 15  $\mu\text{L}$  de suero, anticuerpo a una dilución 1:1000 ( $\alpha\text{PRL-ovina}$  ó  $\alpha\text{PRL-rata}$ ) y medio de bioensayo (aforando a 360  $\mu\text{L}$ ). A todos los pozos, se les adicionaron 80  $\mu\text{L}$  de medio de bioensayo con células (para tener 50 000 células/pozos) y se incubó por 72 h. Después, se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo] bromuro de 2,5 difeniltetrazolio) obteniendo una concentración de 5mg/mL, se dejó reposar 3 h a 37 °C y se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de SDS-HCl (10%). Se resuspendió completamente y se midió a 595 nm. Con esto, se obtuvo la respuesta proliferativa de las células Nb2 con las muestras problema. Estos datos se interpolaron a la curva estándar y se obtuvo la concentración de PRL.

## VI.7 Histología

Al término de las 8 semanas en la dieta respectiva, los animales se sacrificaron en una cámara saturada con  $\text{CO}_2$ . El tejido adiposo visceral y subcutáneo se disecó, se pesó y posteriormente se fijó en formalina al 10% durante 24 h. Una vez fijadas las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación, utilizando el siguiente protocolo: 1 h en etanol 60%, 1 h en etanol 70%, 1 h en etanol 80%, 1 h en etanol 96%, 1 h en etanol 96%, 1 h en etanol absoluto, 1 h en etanol absoluto, 1 h en etanol 50% - xileno 50%, 1 h en xileno, 1 h en xileno, 1 h en parafina y finalmente otra hora en parafina. Después se incluyeron en parafina, y con estos bloques se hicieron cortes del tejido de 10  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cortes se tiñeron con hematoxilina/eosina con el siguiente tren de tinción: 5 min en xileno, 5 min en xileno, 3 min en etanol 100%, 3 min en etanol 100%, 3 min en etanol 96%, 3 min en etanol 96%, 3 min en etanol 80%, 10 min en agua de la llave, 8 min en hematoxilina, 10 min en agua de la llave, 3 min en solución diferenciadora, 10 min en agua de la llave, 1 min en etanol 80%, 2 min en eosina, 3 min en etanol 96%, 3 min en etanol 96%, 3 min en etanol 100%, 3 min en etanol 100%, 3 min en xileno, 3 min en xileno. Para determinar el tamaño de los adipocitos, se midió el diámetro mayor de 3600 adipocitos por tratamiento, obtenidos de 40 adipocitos de 9 campos por animal,

utilizando 10 animales por tratamiento. Finalmente, de cada uno de los 9 campos, se contó el número de adipocitos que cabían en una determinada área (Lemonnier, 1972).

#### VI.8 Análisis estadístico

Los datos se muestran como los promedios  $\pm$  el error estándar. Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y un ANOVA de medidas repetidas seguido de una prueba de Tukey, para la cual se consideró una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### VII.1 Inducción de hiperprolactinemia (niveles de PRL en sangre)

Se cuantificaron los niveles de PRL total (PRL de rata y ovina) en el suero de los animales de cada uno de los tratamientos para corroborar que la inducción de hiperprolactinemia fue exitosa (Figura 4). En los animales implantados con bombas liberadoras de PRL se observó un nivel de  $93.33 \pm 5.89$  ng/mL en la DC y  $77.7 \pm 10.25$  ng/mL en la DO [ $F(3,19)=15.28$ ;  $p < 0.0001$ ], cabe mencionar que un nivel superior a 20 ng/mL es considerado como HiperPRL (Verhelst y Abs, 2003).

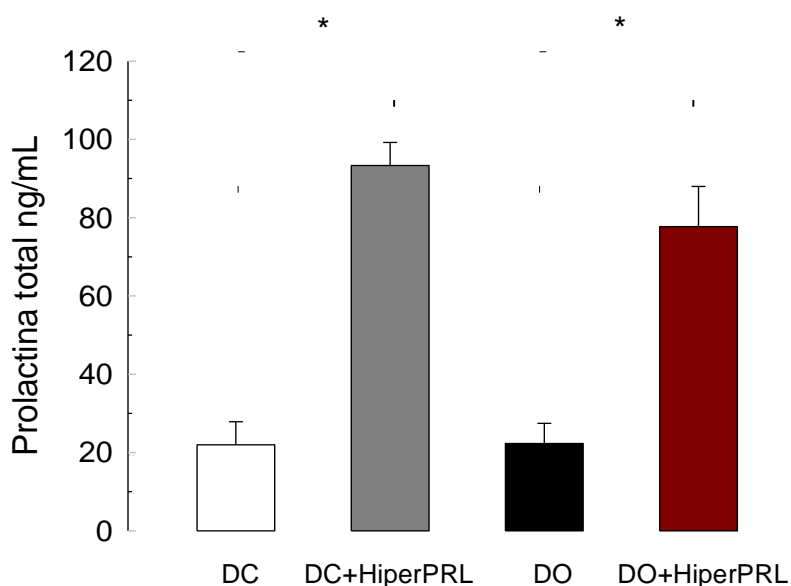


Figura 4. Inducción de hiperprolactinemia. Los niveles circulantes de PRL se determinaron a las 8 semanas de exposición a la dieta control (DC) o dieta obesogénica (DO) en animales implantados (HiperPRL) o no con bombas liberadoras de PRL 4 semanas después de la exposición a las dietas. La concentración de PRL se evaluó por medio del bioensayo Nb2. Las líneas discontinuas horizontales muestran el rango fisiológico de la concentración de PRL. Los resultados son los promedios  $\pm$  E.E. de 7 animales. \*  $p < 0.05$  vs los grupos sin implantes.

### VII.2 Peso corporal

De acuerdo a lo esperado, se observó un mayor peso corporal en los animales con DO, comparado con los animales controles. Por su parte, los animales sometidos a HiperPRL tuvieron una ganancia de peso igual a la de los grupos controles en cada una

de las dietas, por lo que se concluye que la HiperPRL no afecta el peso corporal en condiciones de DC ni en DO (Figura 5).

### VII.3 Ingesta de alimento

En cuanto a la ingesta de alimento, se observó que los animales con DO consumen menor cantidad de alimento al día, respecto a la DC [ $F(3,20)=46.38$ ;  $p<0.0001$ ], mientras que la HiperPRL no mostró ningún efecto en éste parámetro (Figura 6-A). Después, se normalizó la ingesta de alimento contra la ingesta calórica, y se observa que no hay cambios estadísticamente significativos en el consumo calórico entre los 4 tratamientos (Figura 6-B).

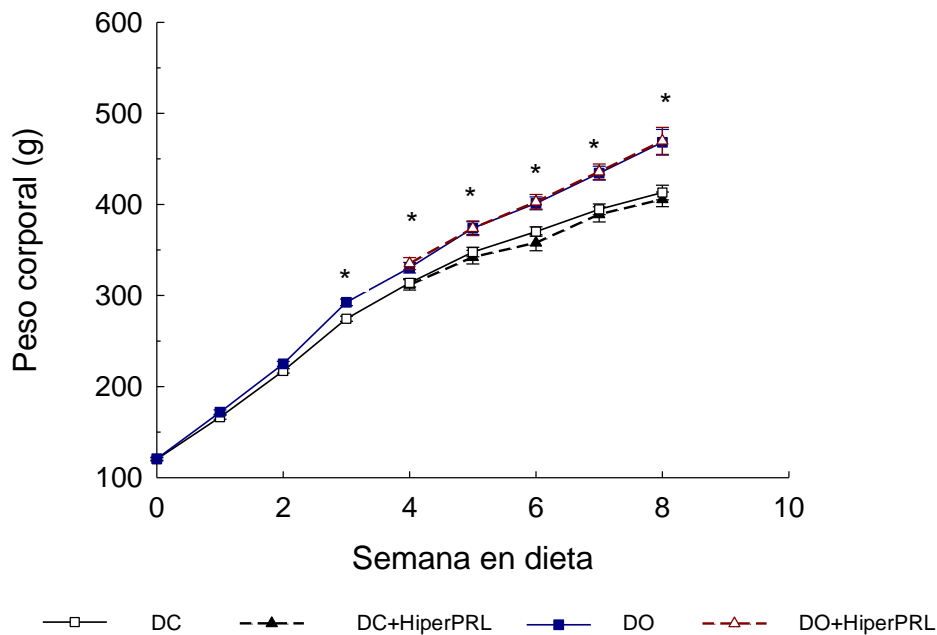


Figura 5. La hiperprolactinemia no modifica el peso corporal. El peso de los animales se monitoreó durante las 8 semanas de exposición a la dieta control (DC) o dieta obesogénica (DO) en animales implantados (HiperPRL) o no con bombas liberadoras de PRL 4 semanas después de la exposición a las dietas. Los resultados son los promedios  $\pm$  E.E. de 7-14 animales. \* $p<0.05$  vs DC y DC+HiperPRL.

### VII.4 Peso del tejido adiposo

Como siguiente paso se analizaron los efectos de la DO y de la HiperPRL sobre el peso del tejido adiposo. Como control se evaluó el peso del hígado (Figura 7-A), donde podemos observar que aumenta el tamaño de este tejido en los animales con una DO

[F(3,39)=8.073; p<0.0003]. Sin embargo, cuando se normalizaron los valores contra el peso corporal del animal (Figura 7-B), no se presentaron cambios estadísticamente significativos entre los tratamientos.

Por el contrario, el peso del tejido adiposo visceral fue de  $6.93 \pm 0.197$  g en los animales sometidos a una DO comparado con los animales en DC que presentaron un peso de  $3.65 \pm 0.27$  g (Figura 8-A). Pero además, la HiperPRL produjo un aumento estadísticamente significativo de la masa de este tejido en animales sometidos a una DO, presentando un peso de  $8.94 \pm 0.46$  g [F(3,35)=60.87; p<0.0001]. Cuando normalizamos el peso del tejido adiposo visceral contra el peso corporal encontramos el mismo resultado [F(3,34)=99.31; p<0.0001], la HiperPRL aumentó la masa del tejido visceral (20%) respecto a los animales no hiperprolactinémicos bajo una DO (Figura 8-B).

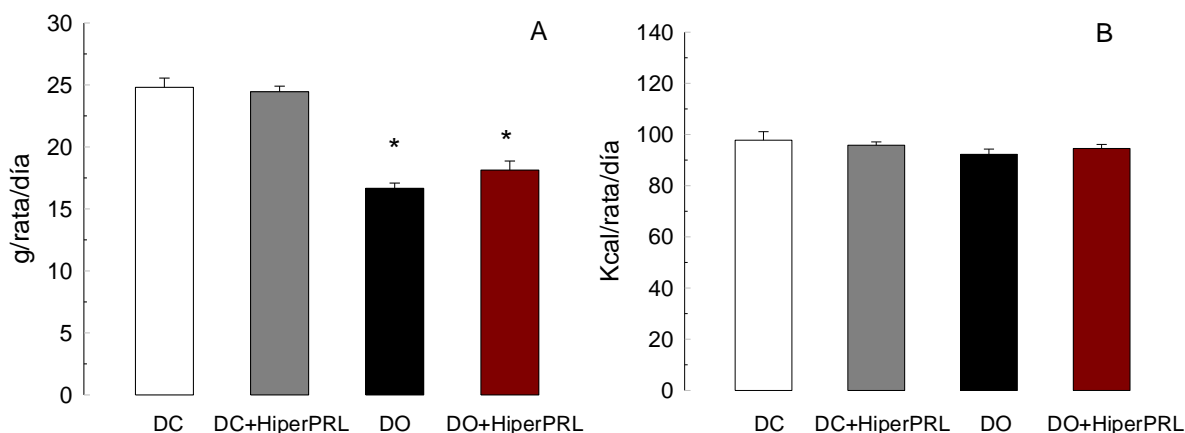


Figura 6. La hiperprolactinemia no modifica la ingesta de alimento. La ingesta de alimento por rata por día se determinó durante las 8 semanas de exposición a la dieta control (DC) o dieta obesogénica (DO) en animales implantados (HiperPRL) o no con bombas liberadoras de PRL 4 semanas después de la exposición a la dieta. Se presenta el consumo de alimento en gramos (A) y normalizado contra los niveles de calorías (B). Los resultados son los promedios  $\pm$  E.E. de 6-7 animales. \* p<0.05 vs DC y DC+HiperPRL.

El tejido adiposo subcutáneo pesó  $7.16 \pm 0.42$  g bajo una DO, mientras que en la DC mostró un peso de  $3.97 \pm 0.28$  g (Figura 9-A), pero además la HiperPRL produjo un aumento estadísticamente significativo de la masa de este tejido en animales sometidos a una DO, presentando un peso de  $9.34 \pm 0.46$  g [F(3,37)=45.53; p<0.0001]. Cuando



normalizamos el peso del tejido adiposo subcutáneo contra el peso corporal encontramos el mismo resultado [ $F(3,34)=58.60$ ;  $p<0.0001$ ], la HiperPRL aumentó la masa del tejido subcutáneo (25%) respecto a los animales no hiperprolactinémicos bajo una DO (Figura 9-B).

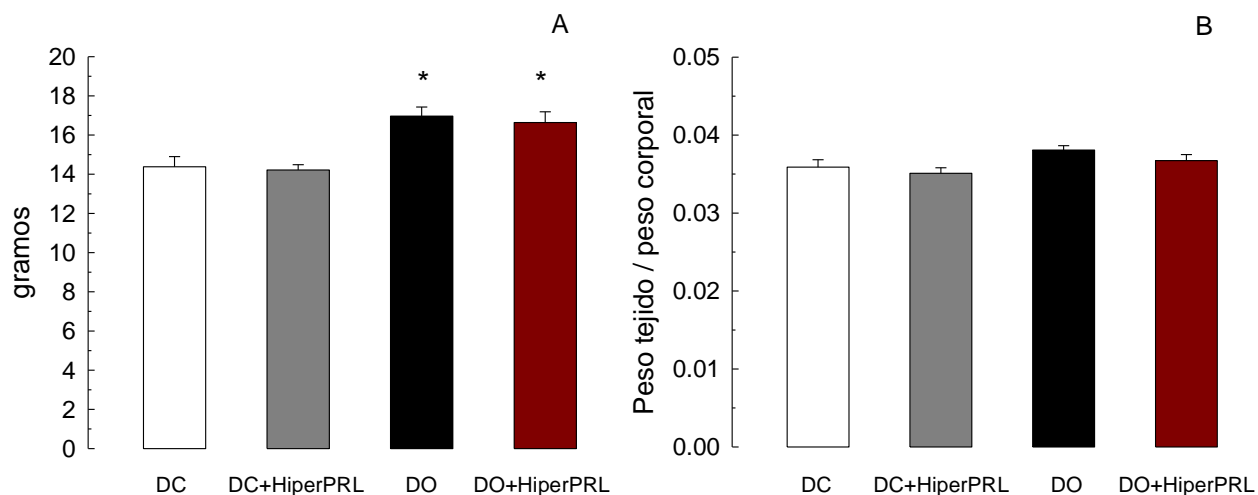


Figura 7. La hiperprolactinemia no altera el peso del hígado. El peso del hígado se evaluó a las 8 semanas de exposición a la dieta control (DC) o dieta obesogénica (DO) en animales implantados (HiperPRL) o no con bombas liberadoras de PRL 4 semanas después del inicio de las dietas. Se presenta el peso en gramos (A) y normalizado contra el peso corporal del animal (B). Los resultados son los promedios  $\pm$  E.E. de 6-7 animales. \* $p<0.05$  vs DC y DC+HiperPRL.

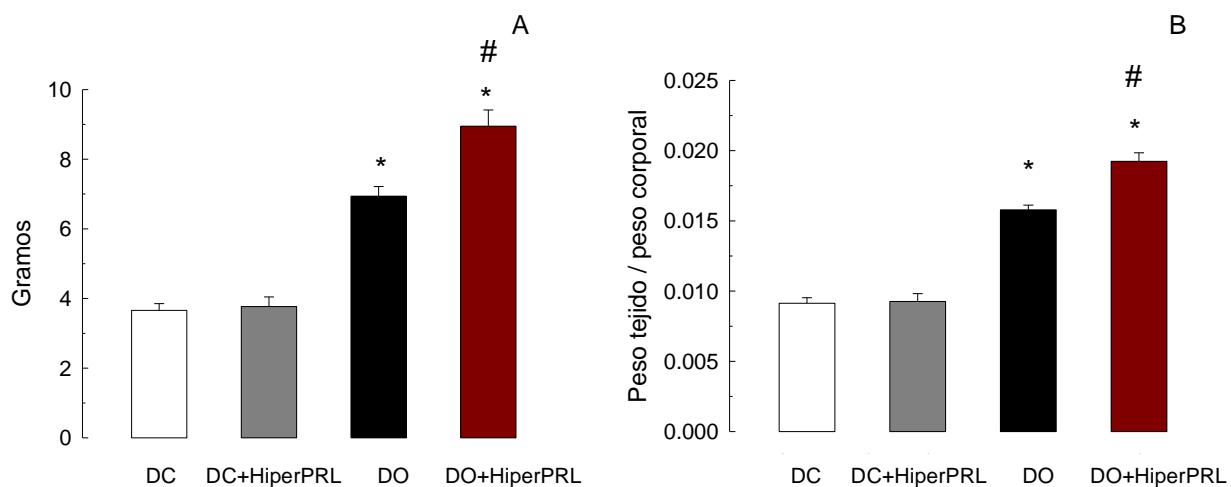


Figura 8. La hiperprolactinemia aumenta el peso del tejido adiposo visceral. Se evaluó el peso del tejido adiposo visceral a las 8 semanas de exposición a la dieta control (DC) o dieta obesogénica (DO) en animales implantados (HiperPRL) o no con bombas liberadoras de PRL 4 semanas después del inicio de las dietas. Se muestra el peso en gramos (A) y normalizado contra el peso corporal (B). Los resultados son los promedios  $\pm$  E.E. de 6-7 animales. \* $p<0.05$  vs DC y DC+HiperPRL; #  $p<0.05$  vs DO.

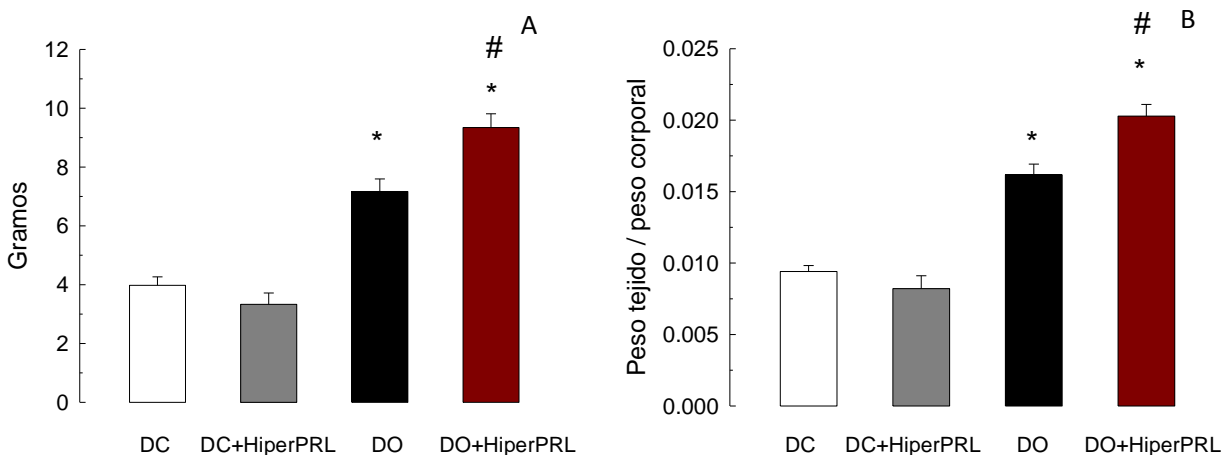


Figura 9. La hiperprolactinemia aumenta el peso del tejido adiposo subcutáneo. Se evaluó el peso del tejido adiposo subcutáneo a las 8 semanas de exposición a la dieta control (DC) o dieta obesogénica (DO) en animales implantados (HiperPRL) o no con bombas liberadoras de PRL 4 semanas después del inicio de las dietas. Se muestra el peso en gramos (A) y normalizado contra el peso corporal (B). Los resultados son los promedios  $\pm$  E.E. de 6-7 animales. \* $p < 0.05$  vs DC y DC+HiperPRL; #  $p < 0.05$  vs DO.

#### VII.5 Tamaño y número de los adipocitos (hipertrofia e hiperplasia)

El aumento en la masa del tejido adiposo puede ocurrir mediante dos mecanismos: hipertrofia, que es el aumento del tamaño de las células, e hiperplasia, en donde aumenta el número de células. Para evaluar si el efecto de la HiperPRL es a través de estimular la hipertrofia y/o la hiperplasia, se cuantificó el tamaño y el número de los adipocitos en el tejido adiposo de los diferentes grupos de animales.

Se observó que los adipocitos en el tejido adiposo visceral de los animales en una DO son de un diámetro mayor, presentando un tamaño de  $164.77 \pm 2.56 \mu\text{m}$  comparado con el tamaño de los adipocitos proveniente de animales con DC  $140.82 \pm 6.57 \mu\text{m}$ , mientras que en animales DO+HiperPRL el tamaño de las células se mantuvo con un diámetro de  $148.62 \pm 4.09 \mu\text{m}$  similar a los animales en DC (Figura 10) [ $F(3,11)=5.088$ ;  $p < 0.0189$ ]. La HiperPRL no produjo ningún efecto en el tamaño de los adipocitos del grupo con DC. Este resultado sugiere que, en condiciones de DO la HiperPRL estimula la hiperplasia del tejido adiposo visceral, ya que hay mayor masa de tejido y los adipocitos se mantienen pequeños. Asimismo, podemos concluir que la HiperPRL previene la

hipertrofia inducida por una DO, aunque por sí misma no produce cambios en el tamaño de los adipocitos.

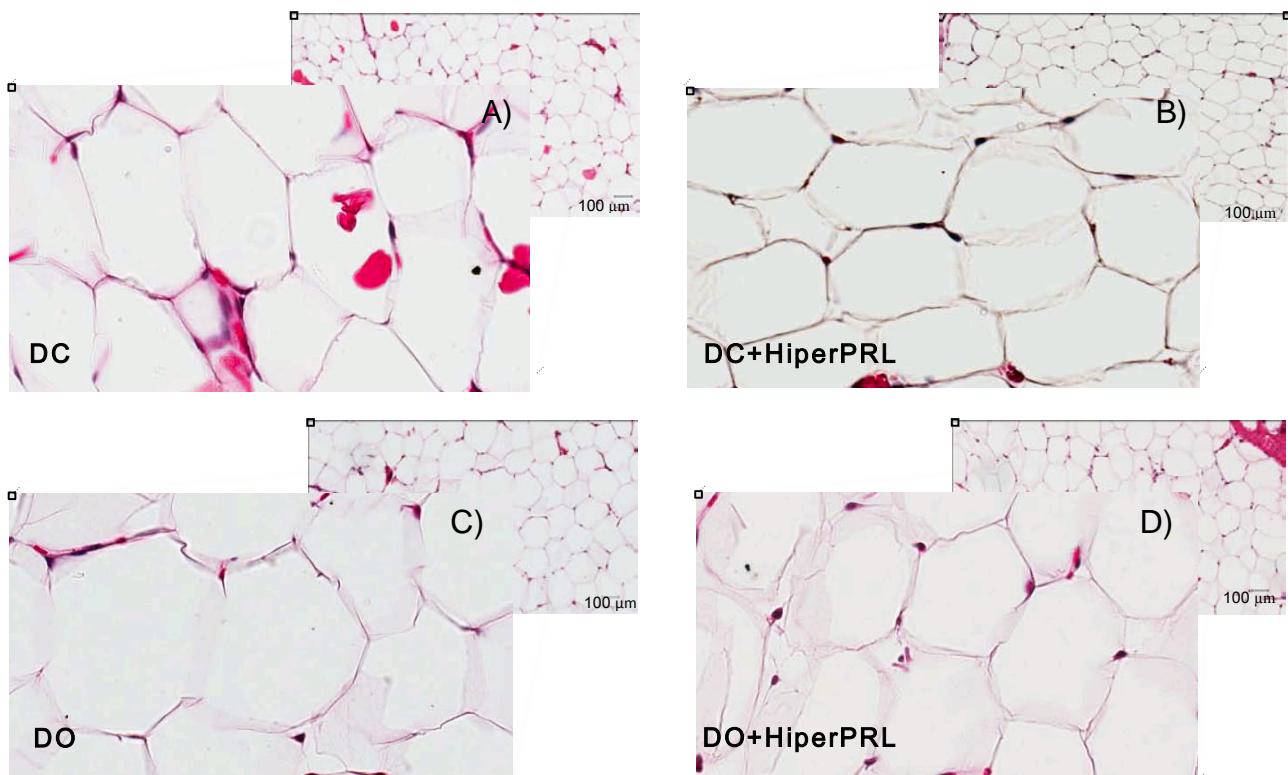
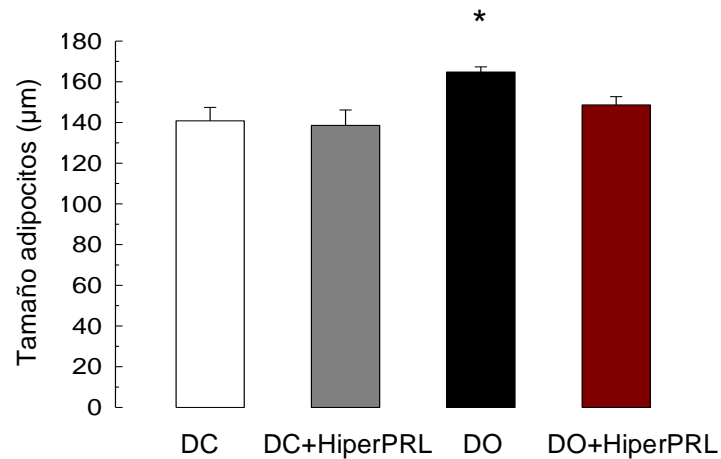


Figura 10. La hiperprolactinemia previene el aumento en el tamaño de los adipocitos viscerales estimulado por una dieta obesogénica. Cortes representativos de los adipocitos viscerales tomados a las 8 semanas de exposición a la dieta control en ausencia (A) o presencia de la bomba liberadora de PRL (B) o bajo una dieta obesogénica (DO) en ausencia (C) o en presencia de la bomba liberadora de PRL (D). El tamaño de los adipocitos se determinó a través de medir su diámetro mayor. Los resultados son los promedios  $\pm$  E.E. de 6-12 animales, \*  $p < 0.05$  vs todos los grupos.

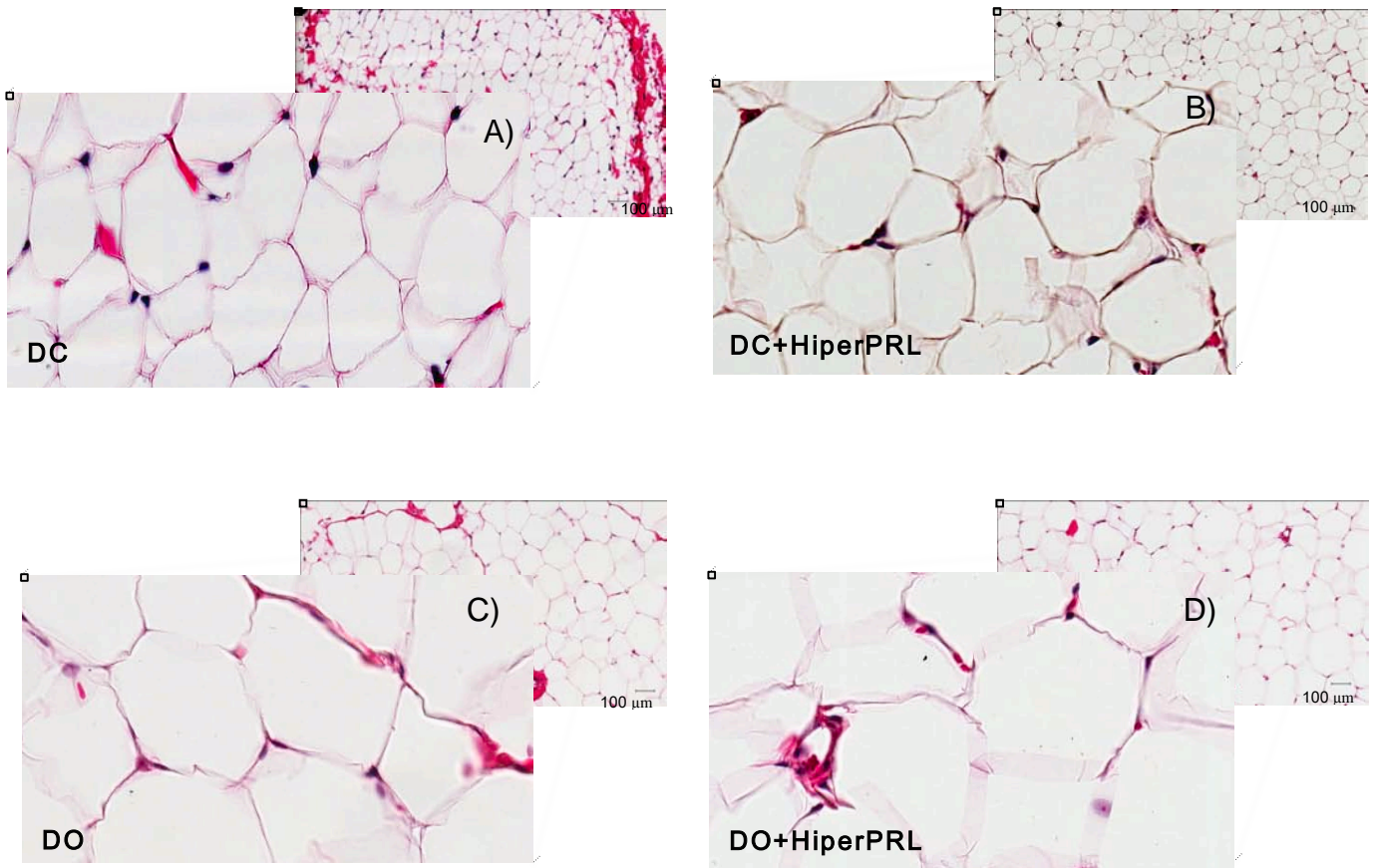
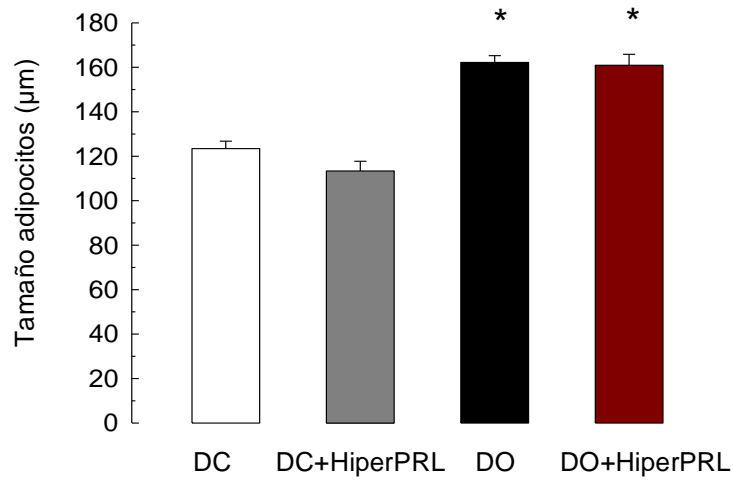


Figura 11. La hiperprolactinemia no afecta el tamaño de los adipocitos subcutáneos. Cortes representativos de los adipocitos subcutáneos tomados a las 8 semanas de exposición a la dieta control en ausencia (A) o presencia de la bomba liberadora de PRL (B) o bajo una dieta obesogénica (DO) en ausencia (C) o en presencia de la bomba liberadora de PRL (D). El tamaño de los adipocitos se determinó a través de medir su diámetro mayor. Los resultados son los promedios  $\pm$  E.E. de 6-12 animales, \*  $p < 0.05$  vs DC y DC+HiperPRL.

En el caso del tejido adiposo subcutáneo, se observó que los adipocitos provenientes de animales con DO poseen un diámetro de  $162.16 \pm 3.08 \mu\text{m}$ , mostrando mayor tamaño (40%) comparado con los adipocitos de los animales que fueron alimentados con la DC que presentaron un diámetro de  $123.4 \pm 3.37 \mu\text{m}$  [ $F(3,22)=27.08$ ;  $p < 0.0001$ ], y que a diferencia de los efectos en el tejido adiposo visceral, en el tejido subcutáneo la HiperPRL no ejerció ningún efecto sobre el tamaño de las células, ni en una DC ni en una DO, siendo su diámetro de  $160.91 \pm 4.95 \mu\text{m}$  similar al tamaño de los adipocitos provenientes de animales sin HiperPRL en sus dietas respectivas (Figura 11). Por lo tanto, este resultado indica que la HiperPRL no previene la hipertrofia de los adipocitos subcutáneos inducida por una DO.

Como siguiente paso, evaluamos el número de adipocitos. Para ello se cuantificó el número de adipocitos en un área determinada. En el caso del tejido visceral, dado que, los adipocitos de los animales en DO son más grandes, existen menos adipocitos por área determinada y como los adipocitos del tratamiento DO+HiperPRL son más pequeños existe un número similar de adipocitos por área comparado con el tejido adiposo de los animales en DC [ $F(3,147)=11.75$ ;  $p < 0.0001$ ] (Figura 12-A). Cuando ajustamos el número de adipocitos en un área determinada por el peso total del tejido adiposo; encontramos que existe un mayor número de adipocitos en los animales DO+HiperPRL [ $F(3,147)=167.3$ ;  $p < 0.0001$ ], ya que hay mayor número de adipocitos y además hay mayor cantidad de masa visceral comparado con los animales alimentados con DO (Figura 12-B).

En el tejido adiposo subcutáneo, se observa que hay un menor número de células por área en los animales en DO con y sin HiperPRL, debido a que los adipocitos de estos animales, son de mayor tamaño que los de animales en DC [ $F(3,169)=51.26$ ;  $p < 0.0001$ ] (Figura 13-A). Al ajustar el número de adipocitos en un área determinada por el peso del tejido adiposo, encontramos que existe mayor número de adipocitos en los animales DO+HiperPRL comparados con los animales en DC y en DO [ $F(3,169)=72.62$ ;  $p < 0.0001$ ], ya que hay mayor cantidad de masa subcutánea. Estos resultados sugieren que la HiperPRL no afecta la hipertrofia pero estimula la hiperplasia del tejido adiposo subcutáneo bajo una DO (Figura 13-B).

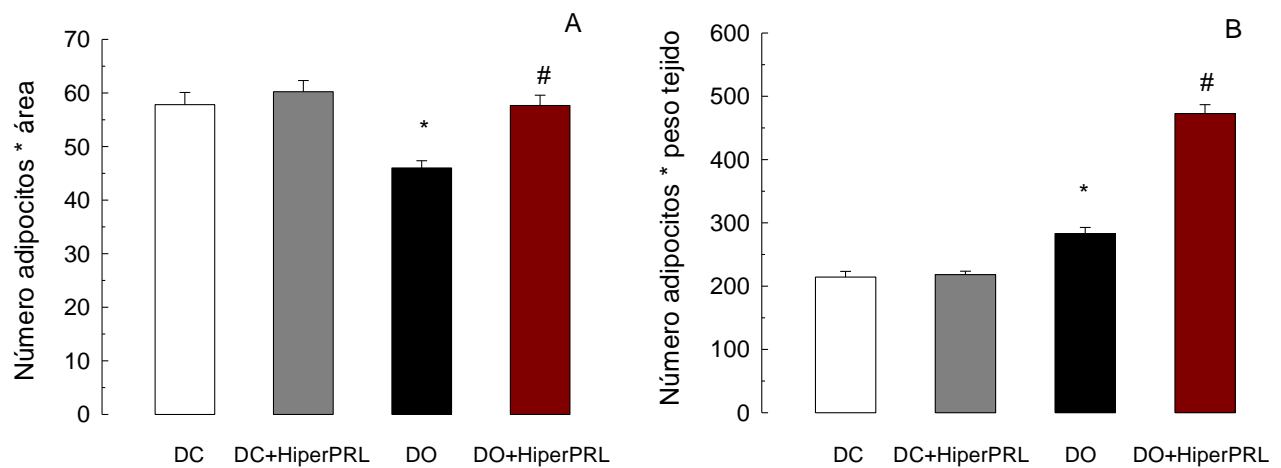


Figura 12. La hiperprolactinemia estimula la hiperplasia del tejido adiposo visceral. Se determinó el número de adipocitos por área (A) y se multiplicó arbitrariamente por el peso del tejido (B) a las 8 semanas de exposición a la dieta control (DC) o dieta obesogénica (DO) en animales implantados (HiperPRL) o no con bombas liberadoras de PRL 4 semanas después del inicio de las dietas. Los resultados son promedios  $\pm$  E.E. de 4 animales, \*  $p < 0.05$  vs DC y DC+HiperPRL; #  $p < 0.05$  vs DO.

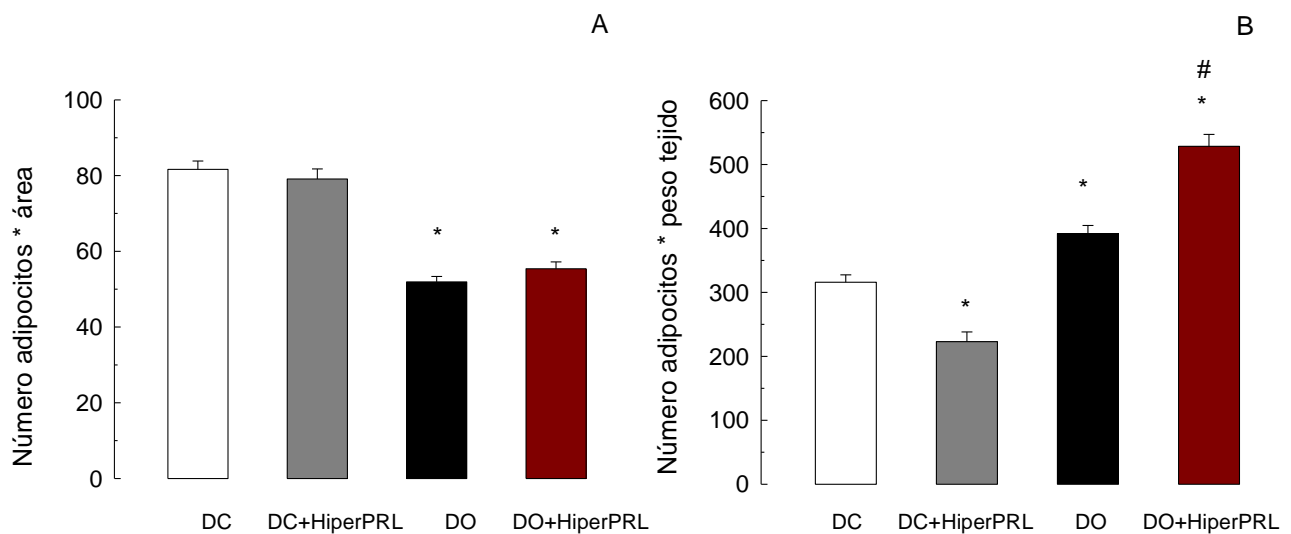


Figura 13. La hiperprolactinemia estimula la hiperplasia del tejido adiposo subcutáneo. Se determinó el número de adipocitos por área (A) y se multiplicó arbitrariamente por el peso del tejido (B) a las 8 semanas de exposición a la dieta control (DC) o dieta obesogénica (DO) en animales implantados (HiperPRL) o no con bombas liberadoras de PRL 4 semanas después de la exposición a las dietas. Los resultados son promedios  $\pm$  E.E. de 4 animales, \*  $p < 0.05$  vs DC; #  $p < 0.05$  vs DO.

## VII.6 Tolerancia a la glucosa

Para evaluar los efectos de la PRL sobre la homeostasis de la glucosa, se realizaron ensayos de tolerancia a la glucosa (TG) y a la insulina (TI). En el ensayo de TG se midió el nivel de glucosa en sangre después de 12 h de ayuno (tiempo 0), dicho nivel aumentó debido a la administración intraperitoneal de glucosa y conforme pasó el tiempo disminuyó. Se observa que en los animales controles, el nivel de glucosa disminuyó rápidamente y llegó a niveles basales, antes que en los animales con DO donde los niveles de glucosa disminuyeron más lentamente y no alcanzaron los niveles basales después de 120 min. En este parámetro la HiperPRL no ejerció ningún efecto (Figura 14). Sin embargo, como era lo esperado los niveles de glucosa en ayuno fueron mayores en animales con una DO comparados con los niveles de animales en DC [F(3,21)=5.34;  $p < 0.0068$ ], mientras que la HiperPRL no generó ningún efecto en los niveles de glucosa en ninguna de las dietas respectivas (Figura 15).

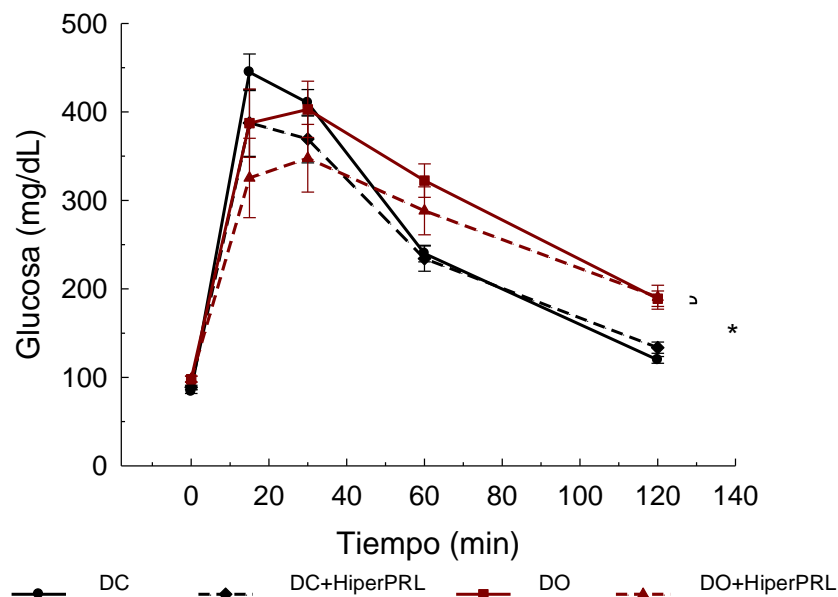


Figura 14. La hiperprolactinemia no altera la tolerancia a la glucosa. La tolerancia a la glucosa se determinó a las 7 semanas de exposición a la dieta control (DC) o dieta obesogénica (DO) en animales implantados (HiperPRL) o no con bombas liberadoras de PRL 4 semanas después del inicio de las dietas. Los resultados son los promedios  $\pm$  E.E. de 5-12 animales. \*  $p < 0.05$  ANOVA de medidas repetidas.

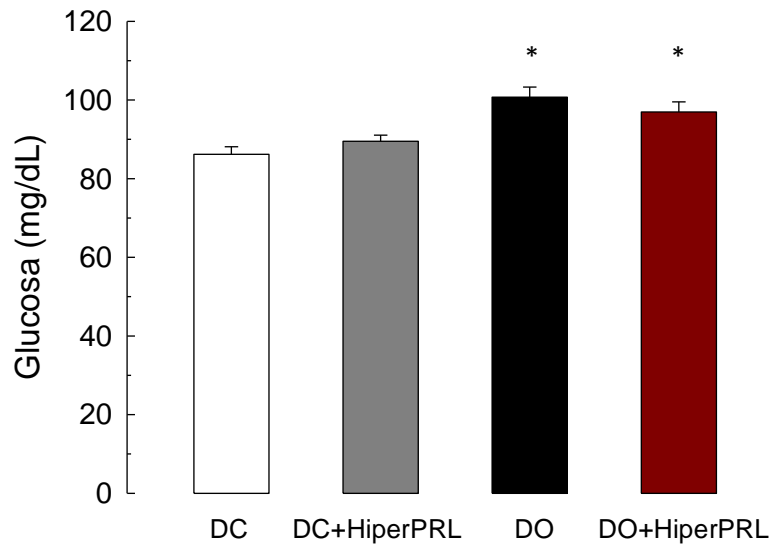


Figura 15. La hiperprolactinemia no modifica los niveles de glucosa en suero. Los niveles de glucosa en suero se determinaron en un ayuno de 12 horas después de 7 semanas expuestas a la dieta control (DC) o obesogénica (DO) en animales implantados (HiperPRL) o no con bombas liberadoras de PRL 4 semanas después de la exposición a las dietas. Los resultados son los promedios  $\pm$  E.E. de 12-18 animales. \*  $p < 0.05$  vs DC.

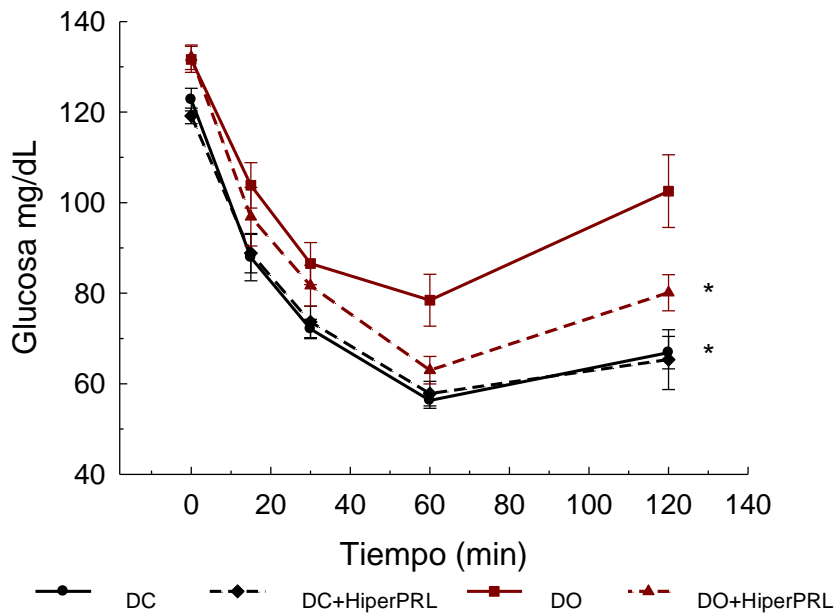


Figura 16. La hiperprolactinemia mejora la sensibilidad a la insulina en animales obesos. La tolerancia a la insulina se determinó después de 7 semanas de exposición a la dieta control (DC) o dieta obesogénica (DO) en animales implantados (HiperPRL) o no con bombas liberadoras de PRL 4 semanas después del inicio de las dietas. Los resultados son los promedios  $\pm$  E.E. de 6-11 animales. \*  $p < 0.05$  vs DO.



## VII.7 Sensibilidad a la insulina

En el ensayo de TI, se midieron los niveles de glucosa después de 2 h sin alimento (tiempo 0), antes de la administración intraperitoneal de insulina y a varios tiempos posteriores a la inyección. Se observa que en los animales con DC, el nivel de glucosa disminuye rápidamente alcanzando niveles de  $56.33 \pm 1.76$  mg/dL después de 60 min, pero en los animales con DO la disminución en los niveles de glucosa es menor llegando a niveles aproximados de  $78.45 \pm 5.74$  mg/dL a los 60 min para después aumentar nuevamente. Interesantemente los animales con DO+HiperPRL tienen una mejor sensibilidad a la insulina que los animales en DO, dicha respuesta se acerca a la observada en animales DC y DC+HiperPRL, ya que después de 60 min su nivel de glucosa es de aproximadamente  $63 \pm 3.04$  mg/dL (Figura 16).

## VIII. DISCUSIÓN

En los últimos años, la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas tanto en adultos como en niños y adolescentes lo que constituye un factor de riesgo muy importante para el desarrollo de alteraciones metabólicas. Los métodos que existen actualmente como tratamiento de la obesidad, son insuficientes para normalizar el peso corporal y prevenir las complicaciones metabólicas. Es por esto, que resulta esencial entender cómo se regula la expansión y la función del tejido adiposo, que es el tejido encargado de almacenar la grasa corporal, con la finalidad de buscar blancos terapéuticos y usarlos como tratamientos. Nosotros propusimos a la PRL como un factor que puede participar en la regulación del crecimiento y la función del tejido adiposo. Hasta el momento, existen una serie de evidencias experimentales que relacionan a la PRL con la función del tejido adiposo, pero es importante destacar que la mayoría de las investigaciones se han realizado en hembras y no en machos, además de que estos resultados suelen ser controversiales y poco reproducibles; asimismo podemos sumar que los estudios no se han realizado en condiciones donde exista expansión del tejido adiposo como en la obesidad inducida por dieta (Byatt et al., 1993; Moore et al., 1986).

En el presente estudio nos propusimos evaluar el efecto de la PRL sobre el tejido adiposo visceral y subcutáneo de animales obesos y no obesos. Los objetivos se centraron en encontrar un efecto de la PRL sobre el peso corporal, ingesta de alimento, parámetros metabólicos como tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina; y en determinar si la PRL regula el crecimiento del tejido adiposo evaluando su peso y morfología. Para cumplir con dichos objetivos, implementamos un modelo de obesidad en ratas macho inducido por una dieta obesogénica y determinamos el efecto de la HiperPRL en estos animales. Utilizamos animales macho, para eliminar los efectos producidos por los cambios cíclicos de la PRL circulante que presentan las hembras.

Con el implante subcutáneo de bombas liberadoras de PRL, logramos aumentar supra-fisiológicamente los niveles de PRL en sangre a 80 ng/mL, mientras que el nivel fisiológico de PRL es menor a 20 ng/mL (Verhelst y Abs, 2003). Con este resultado, se

comprobó que los animales implantados con bombas liberadoras de PRL presentaban un cuadro de hiperprolactinemia (Figura 4).

Analizando el peso corporal de los animales, encontramos que una DO aumenta el peso corporal de las ratas (Buettner et al., 2006), en los animales del presente estudio la HiperPRL no produjo efectos en el peso corporal, es decir, el peso se mantuvo similar a los animales no hiperprolactinémicos. En algunos estudios se ha reportado que la PRL puede regular el peso corporal en humanos, pero no se sabe si este efecto se debe a la disminución del nivel circulante de PRL o al efecto del fármaco utilizado (bromocriptina) sobre los receptores dopaminérgicos (Doknic et al., 2002). Por otro lado, la evidencia que se tiene en el ratón RPRL<sup>-/-</sup> es dependiente del sexo, ya que las hembras muestran una disminución del peso corporal, pero los machos se mantienen normales (Freemark et al., 2001). Por lo tanto, en nuestro estudio, la HiperPRL no produjo cambios en el peso corporal, posiblemente debido a que son ratas macho, o simplemente a que la dieta duró un tiempo muy corto (8 semanas), comparado con otros estudios donde el tratamiento tiene una duración de 32 semanas (Freemark et al., 2001).

Al mismo tiempo que monitoreamos el peso corporal del animal, determinamos la ingesta de alimento. Al medir los gramos de alimento que consumía una rata al día, observamos que los animales con una DO consumieron menor cantidad de alimento comparado con los animales con DC. Por esta razón, realizamos una normalización contra las calorías del alimento, sin embargo, encontramos que no existían cambios estadísticamente significativos entre los grupos. Debido a que los animales con una DO aumentan de peso corporal, pero su consumo de calorías es similar a los animales alimentados con DC, es probable que su aumento de peso sea debido a que disminuye su gasto energético, sin embargo, en este proyecto no analizamos este parámetro. Respecto a la HiperPRL, no se encontró que esta tuviera algún efecto sobre la ingesta de alimento, similar a lo reportado por Freemark et al. (2001) en el ratón RPRL<sup>-/-</sup>. Aunque se ha visto que en ratas hembras la PRL aumenta la ingesta de alimento (Gerardo-Gettens et al., 1989; Naef y Woodside, 2007).

Cuando analizamos la masa del tejido adiposo visceral y subcutáneo, como se esperaba, observamos un aumento en la masa de los dos tejidos en animales alimentados con una DO. De manera relevante, la HiperPRL aumentó la masa de los dos tipos de tejido adiposo (visceral y subcutáneo) en animales alimentados con una DO, mientras que con una DC no se presentaron diferencias. Como control, usamos el peso del hígado, que se mantuvo sin cambio en los cuatro tratamientos. Esto concuerda con lo reportado por Freemark et al. (2001), donde los ratones PRL<sup>-/-</sup> muestran una disminución de la masa del tejido adiposo abdominal. En una investigación reciente con el ratón transgénico para el RPRL, se presentó un aumento de la masa del tejido adiposo epididimal (Le et al., 2011).

Existen dos mecanismos por los cuales el tejido adiposo puede crecer, hipertrofia e hiperplasia (Jo et al., 2009). Para determinar cuál de estos mecanismos media los efectos de la PRL para estimular la expansión del tejido adiposo, medimos el diámetro mayor de los adipocitos. Observamos que la DO estimula la hipertrofia de los adipocitos, pero la HiperPRL disminuye el aumento en el tamaño de las células inducido por una DO, este efecto ocurre solamente en el tejido adiposo visceral. Por otro lado, observamos que la HiperPRL estimula la hiperplasia tanto del tejido adiposo visceral como del subcutáneo en los animales que fueron alimentado con la DO. Estos resultados apoyan la participación de la PRL en el crecimiento y diferenciación del tejido adiposo que parecen ser diferenciales entre el tejido adiposo visceral y el subcutáneo.

Para determinar si la PRL producía un efecto en parámetros metabólicos, realizamos un ensayo de tolerancia a la glucosa, para describir la capacidad de los animales para metabolizar la glucosa. De acuerdo a lo esperado (Sörhede-Winzell y Ahrén, 2004), los animales alimentados con una DO presentaron un lento metabolismo de la glucosa, es decir, después de administrar una dosis de glucosa vía intraperitoneal, los niveles de glucosa en sangre, fueron disminuyendo de manera más lenta con respecto a los animales con DC. La HiperPRL no mostró efecto en este parámetro, bajo ninguna de las de las dos dietas (Figura 14). En un estudio previo, donde emplearon animales de 6 meses de edad, se reportó que el ratón transgénico para el RPRL presenta una menor

tolerancia a la glucosa, disminuyendo su eficiencia para metabolizar glucosa (Le et al., 2011).

El otro parámetro metabólico analizado fue la sensibilidad a la insulina, a través de un ensayo de tolerancia a la insulina. Es bien conocido que los animales alimentados con una dieta alta en grasas muestran una baja sensibilidad a la insulina (Oakes et al., 1997), resultado que reproducimos en nuestro paradigma experimental. Después de una administración intraperitoneal de insulina, se observa que los niveles de glucosa en sangre de los animales alimentados con la DO disminuyen menos con respecto a los animales con una DC, es decir, muestran una resistencia a la insulina. Por otro lado, en los animales con una DC, la insulina es capaz de estimular el metabolismo de la glucosa de manera eficiente, ya que los niveles de glucosa disminuyen rápido respecto al tiempo. Sin embargo, la HiperPRL disminuyó la resistencia a la insulina inducida por una DO, resultado que no se presentó bajo una DC. Cabe mencionar, que la PRL inhibe la secreción de adiponectina en explantes de tejido adiposo humano (Nilsson et al., 2005). Además, en el ratón transgénico para el RPRL disminuye la expresión de adiponectina en el tejido adiposo visceral en animales de 6 meses de edad (Le et al., 2011). Por lo tanto, será importante medir los niveles de adiponectina en suero, ya que esta adipocina aumenta la sensibilidad a la insulina, y no se ha cuantificado si su expresión es influenciada por la PRL durante la obesidad. Por otro lado, un punto muy importante que podría ayudar a entender el efecto de la HiperPRL en la sensibilidad de la insulina, es que la PRL promueve la expansión de las células  $\beta$ -pancreáticas disminuyendo los niveles de expresión de inhibidores del ciclo celular (FoxO1, p27 y p57) y aumentando la expresión de las ciclinas 1, A2, B1, B2 y D2 que estimulan el ciclo celular (Arumugam et al., 2011); además la PRL aumenta la secreción de insulina en cultivos de células  $\beta$ -pancreáticas (Brelje et al., 2008; Huang et al., 2009).

Es interesante, que a pesar de encontrar cambios en la sensibilidad a la insulina no encontramos diferencias en la tolerancia a la glucosa efectuados por la HiperPRL. Analizando los niveles de la glucosa en suero después de un ayuno de 12 horas, pudimos observar que los niveles de glucosa aumentan en los animales con una DO,

pero la HiperPRL no generó ningún cambio (Figura 15). La insulina estimula la absorción de glucosa y suprime la producción y liberación de glucosa en el hígado (Jellinger, 2007), por lo tanto, al presentarse una mejora en la sensibilidad a la insulina con un tratamiento de HiperPRL, deberían disminuir los niveles de glucosa en sangre inducidos por una DO, sin embargo, nuestros resultados no muestran eso. Sería importante determinar la síntesis o liberación de glucosa en el hígado de estos animales para entender el por qué no disminuyen los niveles de glucosa en los animales con HiperPRL, probablemente no hay una mejora en la resistencia a la insulina en el hígado.

Finalmente, cabe destacar que la DO provocó un mínimo aumento en el peso corporal de los animales (13%), ya que el peso promedio de los animales con DC fue de 413 g y de los animales con DO de 468 g; sin embargo, es importante aclarar que bastó este pequeño aumento en el peso corporal para desencadenar efectos en otros parámetros como la resistencia a la insulina, la masa, hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo. Por lo tanto, es importante determinar el mecanismo de acción de la PRL en los efectos antes mencionados, así como el de su efecto promotor de la sensibilidad a la insulina. Proponemos que, la PRL podría ayudar a disminuir los efectos metabólicos dañinos provocados por la hipertrofia de los adipocitos viscerales.

## **IX. CONCLUSIONES**

- La hiperprolactinemia disminuye la hipertrofia del tejido adiposo visceral inducida por una dieta alta en grasas.
- La hiperprolactinemia aumenta la hiperplasia del tejido adiposo visceral y subcutáneo durante una dieta obesogénica.
- La hiperprolactinemia disminuye la resistencia a la insulina inducida por una dieta obesogénica.
- La PRL es un regulador del crecimiento y diferenciación del tejido adiposo en ratas macho adultas.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Adler RA. 1986. The anterior pituitary-grafted rat: a valid model of chronic hyperprolactinemia. *Endocr Rev* 7, 302-313.

Arumugam R, Fleenor D, Lu D and Freemark M. 2011. Differential and complementary effects of glucose and prolactin on islet DNA synthesis and gene expression. *Endocrinology* 152, 856-868.

Balistreri CR, Caruso C and Candore G. 2010. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2010, 1-19.

Barber MC, Clegg RA, Finley E, Vernon RG and 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. *J Endocrinol* 135, 195-202.

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

Ben-Jonathan N, LaPensee CR and LaPensee EW. 2007. What can we learn from rodents about prolactin in humans?. *Endocr Rev* 29, 1-41.

Biddinger SB and Emanuelli B. 2010. *Insulin resistance in metabolic syndrome*. Philadelphia: Springer Science, 175-198.

Brandebourg T, Hugo E and Ben-Jonathan N. 2007. Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions. *Diabetes Obes Metab* 9, 464-476.

Brelje TC, Bhagroo NV, Stout LE and Sorenson RL. 2008. Beneficial effects of lipids and prolactin on insulin secretion and  $\beta$ -cell proliferation: a role for lipids in the adaptation of islets to pregnancy. *J Endocrinol* 197, 265-276.

Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J and Bollheimer LC. 2006. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 36, 485-501.

Byatt JC, Staten NR, Salsgiver WJ, Kostelc JG and Collier RJ. 1993. Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. *Am J Physiol* 264, E986-E992.

Cao Y. 2010. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 9, 107-114.

Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC y Martínez de la Escalera G. 2009. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 89, 1177-1215.



Cook A and Cowan C. 2009. Adipose. StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.40.1, <http://www.stembook.org>.

De Luca C and Olefsky JM. 2008. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett* 582, 97-105.

Després JP and Lemieux I. 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881-887.

Diamond F. 2002. The endocrine function of adipose tissue. *Growth Genet Horm* 18, 17-22.

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

Dos Santos Silva CM, Barbosa FRP, Lima GAB, Warszawski L, Fontes R, Domingues RC and Gadelha MR. 2010. BMI and metabolic profile in patients with prolactinoma before and after treatment with dopamine agonists. *Obesity*, 1-5.

ENSANUT. 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, Instituto Nacional de Salud Pública. Disponibles en: <http://www.insp.mx/encuesta-nacional-salud-y-nutricion-2006.html>

Fleenor D, Oden J, Kelly PA, Mohan S, Alliouachene S, Pende M, Wentz S, Kerr J and Freemark M. 2005. Roles of the lactogens and somatogens in perinatal and postnatal metabolism and growth: studies of a novel mouse model combining lactogen resistance and growth hormone deficiency. *Endocrinology* 146, 103-112.

Flint DJ, Binart N, Boumard S, Kopchick JJ and 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. *J Endocrinol* 191, 101-111.

Freemark M, Fleenor D, Driscoll P, Binart N and Kelly PA. 2001. Body weight and fat deposition in prolactin receptor-deficient mice. *Endocrinology* 142, 532-537.

Galic S, Oakhill S and Steinberg GR. 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316, 129-139.

Gerardo-Gettens T, Moore BJ, Stern JS and Horwitz BA. 1989. Prolactin stimulates food intake in a dose-dependent manner. *Am J Physiol* 256, R276-R280.

Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C and Kahn CR. 2006. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:6676-6681.

Gesta S, Tseng YH and Kahn RC. 2007. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242-256.

Havel PJ, Kasim-Karakas S, Mueller W, Johnson PR, Gingerich RL and Stern JS. 1996. Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 4406-4413.

Heilbronn L and Campbell LV. 2008. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des* 14, 1225-1230.

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

Hugo ER, Brandebourg TD, Comstock CE, Gersin KS, Sussman JJ and Ben-Jonathan N. 2006. LS14: a novel human adipocyte cell line that produces prolactin. *Endocrinology* 147, 306-313.

Jellinger PS. 2007. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Clin Cornerstone* 8, S30-S42.

Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, Cushman SM and Periwai V. 2009. Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. *Plos Comput Biol* 5, 1-11.

Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H and Beylot M. 2004. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30, 294-309.

Lazar MA. 2005. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307, 373-375.

Le JA, Wilson HM, Shehu A, Devi YS, Aguilar T and 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. *Horms Metab Res* 43, 931-937.

Lemonnier D. 1972. Effect of age, sex, and site on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *J Clin Invest* 51, 2907-2915.

Ling C and Billig H. 2001. PRL receptor-mediated effects in female mouse adipocytes: PRL induces suppressors of cytokine signaling expression and suppresses insulin-induced leptin. *Endocrinology* 142, 4880-90.

Macotela Y, Emanuelli B, Mori M, Gesta S, Schulz T, Tseng YH and Kahn R. 2012. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* 61, 1691-9.

Matsubara M, Maruoka S and Katayose. 2002. Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentration in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol* 147, 173-180.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S and Coppack SW. 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$  in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4196-200.

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

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

Nilsson L, Binart N, Bohlooly-Y M, Bramnert M, Egecioglu E, Kindblom J, Kelly PA, Kopchick JJ, Ormandy CJ, Ling C and Billig H. 2005. Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 1120-1126.

Oakes NS, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. 1997. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* 46, 1768-1774.

Otto TC and Lane MD. 2005. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40, 229-242.

Rexford SA. 2006. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity* 14, 242S-249S.

Rotter V, Nagaev I and Smith U. 2003. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$ , overexpressed in human fat cells from insulin resistance subjects. *J Biol Chem* 278, 45777-45784.

Samuel VT, Petersen KF and Shulman GI. 2010. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375, 2267-2277.

Sauvé D and Woodside B. 2000. Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. *Brain Res* 868, 306-314.

Schaffler A, Schölmerich J and Büchler C. 2005. Mechanism of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue emerging role in intestinal and mesenteric diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2, 103-11.

Sörhede-Winzell M and Ahrén B. 2004. The high-fat diet-fed mouse, a model for studying mechanisms and treatment impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53, S215-S219.

Stewart WC, Baugh JE, Floyd ZE and Stephens JM. 2004. STAT 5 activators can replace the requirement of FBS in the adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 355-9.

Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL and Friesen HG. 1980. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 51, 1058-1063.

Taniguchi CM, Emanuelli B and Kahn R. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 85-96.

Tran TT and Kahn R. 2010. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol* 6, 195-213.

Van den Berghe G. 1991. The role of the liver in metabolic homeostasis: implications for inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 14, 407-420.

Verhelst J and Abs R. 2003. Hyperprolactinemia: pathophysiology and management. *Treat Endocrinol* 2, 23-32.

Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva MER and Santos RF. 2002. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 34, 616-621.

Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi S, Charo I, Leibel RL and Ferrante AW. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116, 115-124.

Whittle AJ, López M and Vidal-Puig A. 2011. Using brown adipose tissue to treat obesity the central issue. *Trends Mol Med* 17, 405-411.

## XI. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Tipos celulares del tejido adiposo.....	3
<b>Figura 2.</b> Distribución corporal de los diferentes tipos de tejido adiposo: café y blanco (subcutáneo y visceral).....	4
<b>Figura 3.</b> Acumulación de grasa visceral y subcutánea.....	8
<b>Figura 4.</b> Inducción de hiperprolactinemia .....	19
<b>Figura 5.</b> La hiperprolactinemia no modifica el peso corporal .....	20
<b>Figura 6.</b> La hiperprolactinemia no modifica la ingesta de alimento .....	21
<b>Figura 7.</b> La hiperprolactinemia no afecta el peso del hígado .....	22
<b>Figura 8.</b> La hiperprolactinemia aumenta el peso del tejido adiposo visceral.....	22
<b>Figura 9.</b> La hiperprolactinemia aumenta el peso del tejido adiposo subcutáneo .....	23
<b>Figura 10.</b> La hiperprolactinemia previene el aumento en el tamaño de los adipocitos viscerales estimulado por una dieta obesogénica.....	24
<b>Figura 11.</b> La hiperprolactinemia no afecta el tamaño de los adipocitos subcutáneos .....	25
<b>Figura 12.</b> La hiperprolactinemia estimula la hiperplasia del tejido adiposo visceral.....	27

**Figura 13.** La hiperprolactinemia estimula la hiperplasia del tejido adiposo subcutáneo ..... 27

**Figura 14.** La hiperprolactinemia no altera la tolerancia a la glucosa..... 28

**Figura 15.** La hiperprolactinemia no modifica los niveles de glucosa en suero..... 29

**Figura 16.** La hiperprolactinemia mejora la sensibilidad a la insulina en animales obesos..... 29

**XII. ÍNDICE DE TABLAS**

Página

**Tabla 1.** Principales características de las células adiposas ..... 5