



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

ANÁLISIS DEL EFECTO PROTECTOR DE LA PROLACTINA EN EL MODELO EXPERIMENTAL

DE DIABETES MELLITUS INDUCIDO POR ESTREPTOZOTOCINA EN EL RATÓN

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta:

L.F. ERIKA GABRIELA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

Tutor:

DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L., INB

Comité tutor:

DRA. TERESA EDITH GARAY ROJAS, INB

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ, INB

Juriquilla, Qro., junio 2017



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 está 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.

## **MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN**

Dra. María Teresa Tusié Luna	Presidente
Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora	Secretario
Dra. Maricela Luna Muñoz	Vocal
Dr. Mauricio Díaz Muñoz	Suplente
Dr. Francisco Gabriela Vázquez Cuevas	Suplente

## RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad de gran prevalencia caracterizada por un estado de hiperglucemia crónica. Una de sus principales causas es la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas responsables de la síntesis de insulina (para la DM tipo 1) así como la disminución de su función (en DM tipo 2). El estudio de factores endógenos que tengan la capacidad de aumentar el número y función de las células  $\beta$  es una buena alternativa terapéutica para el control de dicha enfermedad. Estudios previos han reportado que la hormona prolactina (PRL) estimula la proliferación de las células  $\beta$  y la síntesis de insulina. En el presente trabajo analizamos el efecto protector de la PRL en la DM mediante la comparación de la incidencia y severidad de la diabetes inducida por múltiples dosis bajas de estreptozotocina (STZ) en ratones nulos (RPRL<sup>-/-</sup>) o no (RPRL<sup>+/+</sup>) para el receptor de PRL. La incidencia de diabetes fue máxima a la semana 2 después de la inyección de STZ y similar entre los dos grupos de ratones (63% y 72% para PRLR<sup>+/+</sup> y PRLR<sup>-/-</sup>, respectivamente). A partir de la semana 3 post-STZ, los ratones PRLR<sup>+/+</sup> mostraron una recuperación gradual de la diabetes que llegó a su máximo en la semana 8 post-STZ, donde el 74% de los ratones mostró niveles menores de glucosa sérica (<180 mg/dL). Por el contrario, en los ratones PRLR<sup>-/-</sup> la recuperación de la diabetes comenzó en la semana 6 y fue más evidente en la semana 10 post-STZ, donde solo el 56% de los ratones se recuperaron. Además, tres ratones diabéticos PRLR<sup>-/-</sup> murieron antes de finalizar el experimento y los niveles de glucosa fueron significativamente más altos en ratones nulos para el receptor de PRL, especialmente durante la semana 7 post-STZ (339.8  $\pm$  30.66 mg/dL para PRLR<sup>-/-</sup> y 243.7  $\pm$  26.27 mg/ para PRLR<sup>+/+</sup>; p=0.036). La mayor severidad y menor recuperación de la diabetes observadas en los ratones carentes del receptor de PRL pudiera deberse a una reducción en la población de células  $\beta$  pancreáticas funcionales, pues la densidad y el área de los islotes pancreáticos fue menor en los ratones RPRL<sup>-/-</sup> que en el grupo de ratones silvestres. En conjunto, estos hallazgos apoyan el valor protector de la PRL contra la DM.

## SUMMARY

Diabetes mellitus (DM) is a high prevalence disease characterized by chronic hyperglycemia. One of the main causes of DM is the destruction of insulin-producing pancreatic  $\beta$  cells (type 1 DM) as well the decline in their function (type 2 DM). The use of factors with the capacity to increase the number and function of  $\beta$  cells is a good therapeutic alternative for the control of DM. Previous studies reported that the hormone prolactin (PRL) stimulates the proliferation and insulin production of pancreatic  $\beta$  cells. Here, we analyzed the protective effect of PRL against DM by comparing the incidence and severity of the disease induced by multiple low-doses of streptozotocin (STZ) in mice that were null (PRLR<sup>-/-</sup>) or not (PRLR<sup>+/+</sup>) for the PRL receptor. Incidence of diabetes was maximal and similar between the two groups of mice (63% and 72% for PRLR<sup>-/-</sup> and PRLR<sup>+/+</sup>, respectively) 2 weeks after STZ injection. Starting on week 3-post-STZ, PRLR<sup>+/+</sup> mice showed a gradual recovery from diabetes that was maximal at week 8-post-STZ, with 74% of mice showing lower serum glucose levels (<180 mg/dL). In contrast, the recovery from diabetes of PRLR<sup>-/-</sup> mice started at week 6 and was most evident at week 10-post-STZ, when only 56% of the mice recovered. Also, three diabetic PRLR<sup>-/-</sup> mice died before the end of the experiment and glucose reached higher levels in these mice, especially during week 7 post-STZ (339.8  $\pm$  30.66 mg/dL and 243.7  $\pm$  26.27 mg/dL for PRLR<sup>-/-</sup> and PRLR<sup>+/+</sup>, respectively; p=0.036). The increased severity and reduced recovery of DM observed in the absence of the PRL receptor involve a reduction in the functional pancreatic  $\beta$  cell population because the density and area of pancreatic islets were reduced in PRLR<sup>-/-</sup> mice. Altogether, these findings support the protective effect of PRL against DM.

## **AGRADECIMIENTO**

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Ma. del Carmen Jiménez L., en el Laboratorio de Endocrinología Molecular del Instituto de Neurobiología, UNAM campus Juriquilla, Querétaro, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), número de becario 589293.

Con especial agradecimiento para:

Las Doctoras Carmen Clapp y Yazmín Macotela por su extraordinaria dirección académica que hizo posible la realización de este proyecto y por la oportunidad que me dieron de formarme dentro de su equipo de trabajo.

La Dra. Edith Garay y el Dr. Mauricio Díaz por formar parte de mi Comité Tutoral, por su tiempo y por las valiosas aportaciones que hicieron durante el desarrollo del proyecto.

El Nut. Fernando López Barrera y el M. en C. Gabriel Nava Pinto por su apoyo técnico.

Los compañeros: M. en C. Nundehui Díaz, Biol. Elva Adán, M. en C. Xarubet Ruíz, M. en C. Guadalupe Ledesma y M. en C. Juan Pablo Robles por su apreciable apoyo técnico y académico.

Los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán por su labor asistencial en el laboratorio.

El MVZ José Martín García Servín y la Dra. Gloria Alejandra Eugenia Castilla León, responsables del Bioterio, por su disposición, apoyo y asistencia técnica.

La Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos por su dirección y apoyo en la Unidad de Microscopía confocal.

La M. en C. Leonor Casanova Rico, responsable de la Unidad de Enseñanza, por su invaluable asesoramiento.

El Ing. Ramón Martínez Olvera, responsable de la Unidad de Cómputo y el Dr.

Francisco Javier Valles Valenzuela, responsable de la Biblioteca.

Finalmente agradezco a mi *alma máter* la UNAM, por ser mi segunda casa y el recinto donde mi camino hacia el conocimiento se ha ido formando y consolidando.

## DEDICATORIAS

A una mujer extraordinaria, valiente y sensible, a mi mamá Martha Guadalupe Hernández García, por ser mi pilar, porque siempre me cuidó con brazos fuertes y entregó su amor por educarme libremente, haciéndome saber que está presente, que confía en mí. Por todos los días que me levanta y las noches que me abraza, este proyecto te pertenece. Te amo mami.

A mi querido hermano Erick Gabriel Ramírez Hernández, por siempre volver, por enseñarme la simplicidad de ser feliz, y por todos los momentos de peleas y juegos en los que me envuelve de su cariño.

A mis abuelitos, David Jacobo Hernández y Martha García, por todo su apoyo, porque son mi símbolo de sabiduría, porque me enseñaron a cultivar con paciencia y constancia, por su amor longevo, por su amor eterno.

A los doctores Carmen Clapp, Yazmín Macotela y Gonzalo Martínez de la Escalera por su confianza en mí y aceptar ser mis guías en el camino de la ciencia, por consolidarme con sus enseñanzas y tiempo, por sus consejos y su cariño, gracias.

A mi amiga, Elva Hortencia Adán Castro, por ser mi compañera y cómplice en este proyecto, porque potenció mis alegrías e hizo más fáciles las adversidades, por compartir conmigo tu esencia, el amor por la investigación y los planes de vida.

A mis amigos Nundehui Díaz Lezama, Juan Pablo Moctezuma Hernández y Fernando López Barrera por su tiempo, su cariño y sus grandes enseñanzas.

A mi gran amigo Jorge Luis Domínguez por llegar siempre en el momento adecuado, con las palabras y acciones indicadas que parece que lee mi mente, por su confianza y por motivarme a seguir recorriendo diferentes paisajes en el baile de la vida.

A Abraham Rosas Arellano, por ser el amigo que con sus aventuras me trajo hacia este camino, porque aún en la distancia sé que estás presente.

A todos gracias por estar y permanecer en mi camino.



Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

*Albert Einstein*

# ÍNDICE

	<i>Página</i>
Resumen	iii
Summary	iv
Agradecimientos	v
Dedicatorias	vii
Lista de abreviaturas	x
Introducción	1
Antecedentes	
1. Páncreas y su papel en la homeostasis de la glucosa	4
1.1. Páncreas endócrino	5
1.2. Páncreas exócrino	8
1.3. Homeostasis de la glucosa	8
2. Diabetes Mellitus	10
3. Diabetes experimental	11
3.1. Modelo de diabetes experimental inducida por STZ	11
4. Hormona prolactina y su receptor	14
5. Efecto protector de PRL en la diabetes inducida por STZ	17
Justificación	19
Hipótesis	19
Objetivos	20
Material y métodos	20
Resultados	23
Discusión	31
Conclusión	37
Referencias	37
Índice de figuras	44
Índice de tablas	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>GAD</b>	Ácido glutámico-descarboxilasa
<b>GH</b>	Hormona de crecimiento
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa
<b>GMPc</b>	Guanosín monofosfato cíclico
<b>ip</b>	Intraperitoneal
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>JAK</b>	Janus cinasa
<b>MAP</b>	Proteína cinasas activadas por mitógenos
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PL</b>	Lactógeno placentario
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PP</b>	Polipeptido pancreático
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>ROC</b>	Característica operática del receptor
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RPRL</b>	Receptor de prolactina
<b>RPRL<sup>-/-</sup></b>	Ratón carente del receptor de prolactina
<b>RPRL<sup>+/+</sup></b>	Ratón silvestre
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>STAT</b>	Transductor de señal y regulador de la transcripción
<b>STZ</b>	Estreptozotocina

## 1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que se desencadena cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no puede utilizar con eficacia la insulina que produce (Organización Mundial de la Salud, 2016). Actualmente la DM es catalogada una pandemia global que se encuentra entre las diez principales causas de muerte. Hasta el año 2014 se estimó un total de 422 millones de personas adultas con diabetes en el mundo y se calcula que esta cifra se duplique en los próximos 20 años (Organización Mundial de la Salud, 2016). México ocupa el sexto lugar entre los diez países con más personas diabéticas (International Diabetes Federation, 2015) y en nuestro país la DM ocupa la segunda causa de muerte desde el 2012, estando ubicada sólo por debajo de las enfermedades cardiovasculares (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2015).

Con base en la etiopatogenia de la enfermedad, hay dos tipos principales de DM: la tipo 1 (insulino-dependiente) que representa el 5% de los pacientes con diabetes, y la tipo 2 (no insulino-dependiente) que comprende alrededor del 95% de casos de diabetes en el mundo (Cejkova *et al.*, 2009; Vetere *et al.*, 2014). La DM tipo 1 es una enfermedad autoinmune caracterizada por una reacción inflamatoria local en los islotes del páncreas seguida de la destrucción selectiva de células  $\beta$ . Por su parte, la DM tipo 2 se caracteriza por la resistencia periférica a la insulina (Arora *et al.*, 2009), es decir por una disfunción en la vía de señalización de dicha hormona.

El páncreas es una glándula compuesta de una fracción exócrina que ocupa entre el 96 y 99% de la masa total del páncreas y una parte endócrina que ocupa del 1 a 4% restante (Dolenšek *et al.*, 2015). La función exócrina del páncreas se encarga de producir enzimas digestivas que incluyen la tripsina, la amilasa, la carboxipeptidasa y además la producción de bicarbonato. Las enzimas se sintetizan y secretan en las células acinares exócrinas y son drenadas al duodeno por una red de conductos pancreáticos. Embebidos entre las células acinares exócrinas se encuentran los llamados islotes de Langerhans que son la unidad anatómica funcional del páncreas endócrino (Brennand y Melton, 2009). Los islotes están compuestos de varios tipos celulares endócrinos que incluyen células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y PP (llamadas así porque producen polipéptido pancreático) que sintetizan y secretan al torrente sanguíneo hormonas responsables de la homeostasis de la glucosa; por lo tanto, el

mantenimiento del equilibrio entre estos tipos celulares es importante para el estado metabólico del organismo (Bouwens y Rooman, 2005; Vetere *et al.*, 2014). Dentro de los cinco tipos de células endócrinas, las células  $\beta$  son las más abundantes, corresponden del 60 al 80% del islote de Langerhans y son responsables de la síntesis y secreción de insulina y amilina (Vetere *et al.*, 2014). La insulina está conformada por dos cadenas de polipéptidos que contienen 51 aminoácidos cada una y es una hormona anabólica que se secreta en respuesta al aumento de glucosa y de aminoácidos en la sangre después de la ingesta de alimento. La insulina ayuda a controlar los niveles sanguíneos de glucosa postprandial de tres maneras. Inicialmente, señala a las células de los tejidos periféricos sensibles a insulina (el músculo esquelético principalmente) para aumentar su captación de glucosa. En segundo lugar, actúa en el hígado para promover la glucogénesis. Por último, inhibe simultáneamente la secreción de glucagón a partir de las células  $\alpha$  del páncreas, lo que detiene en el hígado la producción de glucosa a través de la glucogenolisis y la gluconeogénesis. Todas estas acciones reducen los niveles de glucosa en sangre (Aronoff *et al.*, 2004).

En la diabetes, la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas resulta en una disminución en la síntesis de insulina y en un aumento en la producción de glucagón por las células  $\alpha$  del páncreas. Las consecuencias metabólicas de la insuficiencia de insulina y el exceso de glucagón son la hiperglucemia y la cetoacidosis (Van Belle *et al.*, 2009). La hiperglucemia crónica y su correspondiente glucotoxicidad son el principal mecanismo patogénico tanto de la DM tipo 1 como de la DM tipo 2 y sus respectivas complicaciones (Wu y Yan, 2015). Uno de los principales modelos para la comprensión de la glucotoxicidad celular en la diabetes emplea el tratamiento con estreptozocitina (STZ), utilizado por primera vez en 1963 (Rakieten *et al.*, 1963). La STZ es un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces achromogens*. Su estructura está conformada por una molécula de desoxiglucosa unida a una molécula de metilnitrosourea que ejerce efectos citotóxicos alquilando y fragmentando al ADN, mientras que la molécula de glucosa dirige la incorporación del fármaco a través de unirse selectivamente a los transportadores de glucosa GLUT2. Dado que los transportadores GLUT2 son abundantes en las células  $\beta$ , éste tipo celular es muy sensible al efecto de la STZ. Sin embargo, el receptor GLUT2 también se expresa en hígado, riñón y cerebro, por lo que la STZ puede también

afectar las funciones de éstos órganos en una relación dosis-dependiente (Wu y Yan, 2015; Radenković *et al.*, 2016).

Las terapias existentes para tratar la DM con insulina exógena o agentes hipoglucémicos no son del todo satisfactorios (Bouwens y Rooman, 2005), por lo que es necesario identificar nuevas rutas y regímenes terapéuticos que permitan restaurar el ambiente hormonal deficiente y los trastornos del páncreas en la DM (McCall y Farhy, 2013). Dado que la disminución del número y función de las células  $\beta$  del páncreas subyacen a la patología de la DM tipo 1 y eventualmente la de la DM tipo 2 (Vetere *et al.*, 2014), es claro que los agentes que promueven la proliferación y supervivencia de las células  $\beta$ , su regeneración y/o su función tienen potencial terapéutico. Entre estos agentes se incluye a la hormona prolactina (PRL) (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Hyslop *et al.*, 2016).

La PRL es una hormona proteica compuesta por 199 aminoácidos y una masa molecular de 23 kDa que se produce principalmente en células lactotróficas de la glándula pituitaria anterior y que se identificó por su efecto estimulador sobre la producción de leche durante la lactancia. No obstante, ésta hormona y sus receptores se expresan en múltiples tejidos donde además se le han reportado diversos efectos. Entre estos tejidos se incluyen las células inmunes, el epitelio mamario y prostático, el endometrio, el endotelio vascular, los adipocitos, el tejido nervioso y las células  $\beta$  pancreáticas (Ben-Johnathan *et al.*, 1996; Marano y Ben-Johnathan, 2014). Diversos estudios han demostrado que la PRL estimula la replicación de células  $\beta$  y la síntesis de la insulina y potencialmente aumenta la vascularización de los islotes de Langerhans del páncreas (Hyslop *et al.*, 2016). Por lo cual, es nuestro interés estudiar el efecto protector de la PRL en la DM mediante la comparación de la incidencia y severidad de la enfermedad inducida por STZ en ratones nulos (RPRL<sup>-/-</sup>) o no (RPRL<sup>+/+</sup>) del receptor de PRL.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. El páncreas y su papel en la homeostasis de la glucosa

El páncreas es el único órgano en el cuerpo con componentes exócrinos y endócrinos entremezclados dentro del parénquima (Pandiri, 2014). Es definido como una glándula mixta (exócrina/endócrina) que desempeña un papel central en la digestión de los macronutrientes y en la homeostasis del metabolismo mediante la liberación de varias enzimas digestivas y hormonas pancreáticas (Molina, 2013; Röder *et al.*, 2016).

La distribución y organización del tejido pancreático varía entre las especies. El páncreas en el humano se encuentra en la cavidad abdominal superior izquierda detrás del estómago (Pandiri, 2014; Röder *et al.*, 2016) y anatómicamente se divide en cabeza, cuerpo y cola, aunque no existen límites claros entre estas regiones (Dolenšek *et al.*, 2015). En los roedores, el páncreas no está tan bien definido como un órgano compacto, sino que está distribuido difusamente en el mesenterio del intestino delgado proximal de forma dendrítica (Fig. 1). Macroscópicamente se puede dividir en 3 lóbulos principales: duodenal, gástrico y esplénico, que son homólogos a la cabeza, cuerpo y cola del páncreas humano, respectivamente (Dolenšek *et al.*, 2015).

El páncreas funciona como dos órganos independientes: el exócrino y el endócrino (Brennand y Melton, 2009). La mayor parte de la masa pancreática se compone de células exócrinas que se agrupan en lóbulos (acinos) divididos por tejido conectivo y conectados a un conducto que drena al conducto pancreático que desemboca en el duodeno. El producto de las células pancreáticas exócrinas es un fluido alcalino rico en enzimas que se secreta en el intestino delgado para ayudar en el proceso digestivo. Embebidos dentro de los acinos exócrinos se encuentran pequeños grupos de células endócrinas que forman los islotes de Langerhans (Brennand y Melton, 2009; Molina, 2013), este grupo de células secretan varias hormonas responsables de mantener la homeostasis de la glucosa en los estados de ayuno y postprandial (Vetere *et al.*, 2014).

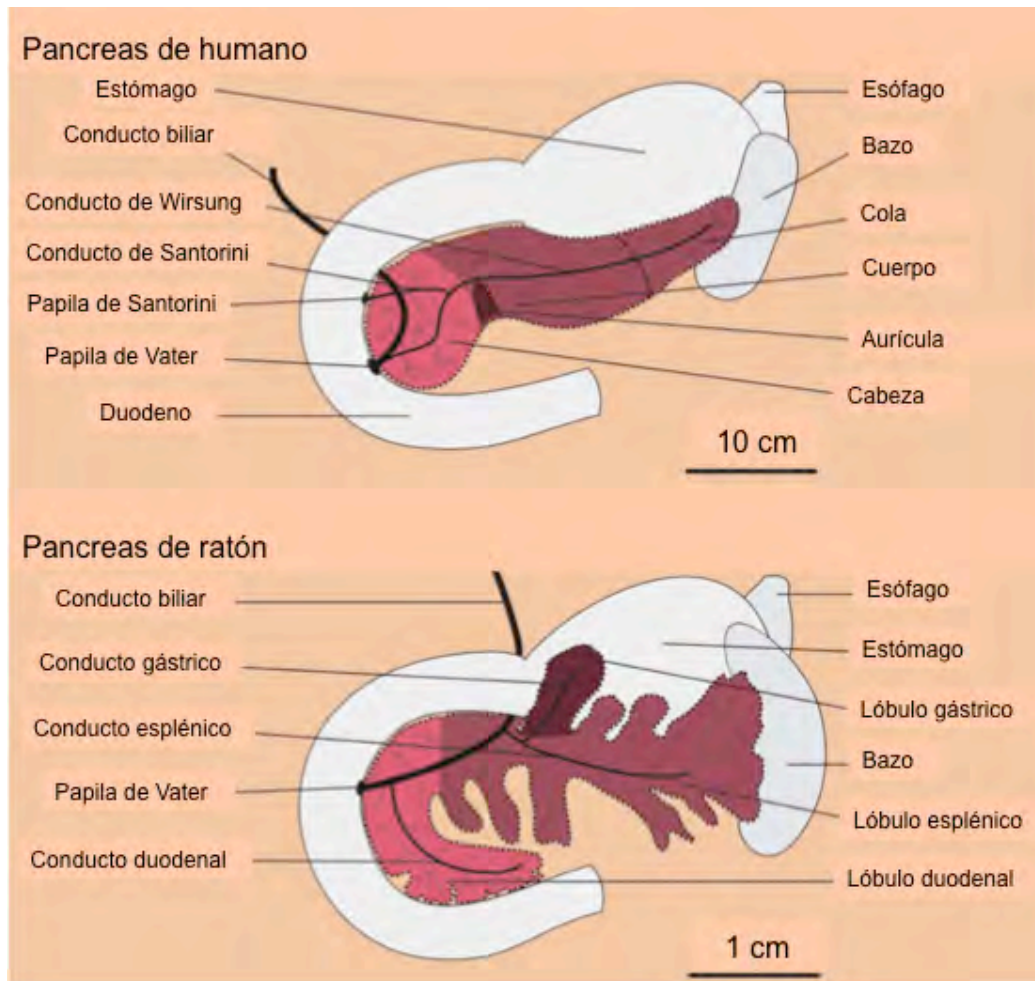


Figura 1. Anatomía macroscópica del páncreas humano y de ratón. El páncreas humano consiste en cabeza, cuerpo y cola mientras que el páncreas de ratón presenta 3 lóbulos no tan bien definidos: duodenal, gástrico y esplénico. El código de colores indica partes homólogas (modificada de Dolenšek *et al.*, 2015).

### 2.1.1. Páncreas endócrino

Las estructuras multicelulares llamadas islotes de Langerhan constituyen la unidad endócrina, anatómica y funcional del páncreas y comprenden del 1 al 4% del volumen total del órgano (Dolenšek *et al.*, 2015). Los islotes de Langerhans se componen de células endócrinas, las cuales además de ubicarse en los islotes, se pueden encontrar diseminadas a lo largo del tejido acinar y ductal como células endócrinas únicas. Hasta el momento, se han encontrado al menos 5 tipos de células endócrinas en los islotes pancreáticos: las células  $\alpha$  que producen glucagón y representan del 20 al 40 % de la masa celular de los islotes en humanos y del 10 al 20% en ratón; las células  $\beta$  productoras de insulina, péptido C y amilina que



representan entre el 50 y 70% del total de células dentro del islote en humanos y entre el 60 y 80% en ratón; las células  $\gamma$  que producen el polipéptido pancreático (PP) y las células  $\delta$  productoras de somatostatina que comprenden del 3 al 5% y del 3 al 10% del total de células de los islotes en el humano y el ratón, respectivamente; y finalmente, las células  $\epsilon$  productoras de grelina y que comprenden alrededor 1% de las células de los islotes (Dolenšek *et al.*, 2015; Röder *et al.*, 2016). Cada una de las hormonas pancreáticas tiene funciones distintas. El glucagón aumenta los niveles de glucosa en sangre, mientras que la insulina los disminuye. La somatostatina tiene un papel predominantemente parácrino para ajustar la regulación de la glucosa en sangre por el islote. Cuando los niveles de insulina son altos y la glucosa baja, la somatostatina inhibe la liberación de insulina, pero cuando la insulina es baja y la glucosa alta, inhibe la liberación de glucagón. Además, la somatostatina actúa en el intestino para inhibir la secreción de hormonas gastrointestinales, la secreción de pepsina, la motilidad y el flujo sanguíneo. Por su parte el PP regula la actividad de secreción exócrina y endócrina del páncreas aunque sus funciones siguen siendo poco claras. Finalmente, se ha sugerido que la grelina inhibe la secreción de insulina estimulada por glucosa por las células  $\beta$  y puede resultar ser un importante regulador del metabolismo y la obesidad. En conjunto, estas hormonas regulan la homeostasis de la glucosa en vertebrados (Brennan y Melton, 2009; Röder *et al.*, 2016).

Los nervios parasimpáticos, simpáticos y sensoriales inervan profusamente los islotes de Langerhans y los respectivos neurotransmisores y neuropéptidos liberados de sus terminales nerviosas ejercen importantes efectos reguladores sobre la liberación de las hormonas endócrinas pancreáticas. La acetilcolina, el polipéptido intestinal vasoactivo, el polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria y el péptido liberador de gastrina son liberados desde las terminales nerviosas parasimpáticas. La noradrenalina, la galanina y el neuropéptido Y se liberan de las terminales nerviosas simpáticas. La activación del nervio vagal estimula la secreción de insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático. La estimulación nerviosa simpática inhibe la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa y la liberación de somatostatina y estimula la secreción de glucagón y polipéptido pancreático (Molina, 2013).

Aunque los islotes tienen una composición celular similar entre diferentes especies, como humano, rata y ratón, parece que difieren en su citoarquitectura. La

arquitectura de los islotes en roedores se caracteriza por la ubicación de células  $\beta$  en el núcleo y las células no- $\beta$  en la periferia alrededor de las células secretoras de insulina (Fig. 2) (Quesada *et al.*, 2008). Esta distribución celular, junto con varios estudios sobre la microcirculación dentro del islote, sugiere que el orden de las interacciones parácrinas va de la célula  $\beta$  a las células  $\alpha$  y  $\delta$ . La rica vascularización del islote asegura además una detección rápida de niveles de glucosa en plasma por estas células endocrinas, permitiendo una respuesta secretora apropiada (Röder *et al.*, 2016). Como se indicó arriba, existen diferencias importantes en la composición y organización espacial celular de los islotes humanos en comparación a la de los roedores. Mientras que la proporción de células  $\delta$  y PP es similar, las células  $\beta$  son menos abundantes y la población de células  $\alpha$  es mayor, lo que sugiere que la secreción de glucagón juega un papel más relevante en el humano. Además, en humanos las células del islote muestran un patrón de distribución dispersa aleatoria, donde la mayoría de las células  $\beta$  están en contacto con células no  $\beta$ , lo que sugiere que se favorecen las interacciones parácrinas entre las diferentes poblaciones celulares (Quesada *et al.*, 2008; Röder *et al.*, 2016). Sin embargo, a pesar de dichas diferencias, se ha demostrado que en ambas especies la arquitectura de los islotes es dependiente de su tamaño, donde los islotes más pequeños ( $<100 \mu\text{m}$  de diámetro) muestran una organización tipo manto (células  $\beta$  rodeadas de células no- $\beta$ ) mientras que los islotes más grandes presentan una organización celular más compleja y heterogénea (Dolenšek *et al.*, 2015).

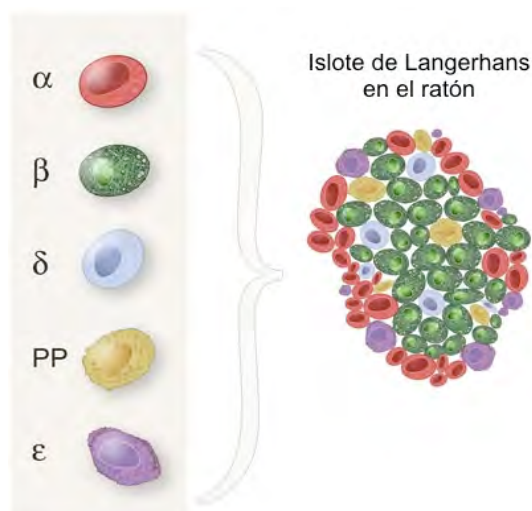


Figura 2. Composición y organización del islote de Langerhans en ratón. Se puede observar el patrón manto- núcleo que siguen las células endócrinas al distribuirse a lo largo del islote (modificada de Symmation LLC, 2005).

### 2.1.2 *Páncreas exócrino*

Junto con el mesénquima, el páncreas exócrino ocupa del 96 al 99% del volumen total del páncreas (Dolenšek *et al.*, 2015) y está compuesto por células acinares, centro-acinares y ductales (Pandiri, 2014). Los acinos se conectan por el conducto pancreático para drenar sus productos de secreción hacia el duodeno (Molina, 2013). En su conjunto, el páncreas exócrino se encarga de producir productos secretores críticos para una digestión adecuada: enzimas digestivas, incluyendo tripsina, lipasa, amilasa y carboxipeptidasa y bicarbonato drenadas por una red de conductos pancreáticos a la primera porción del intestino delgado. El bicarbonato es secretado específicamente por las células epiteliales que recubren estos conductos pancreáticos. Las células acinares pueden ser identificadas por la expresión de la enzima digestiva, mientras que las células del conducto pueden ser identificadas por su expresión de citoqueratinas y lectinas (Brennand y Melton, 2009).

La función del páncreas exócrino está estrechamente regulada por el sistema neuroendocrino. Los islotes y el tejido exócrino son ricamente inervados con vías de señalización aferentes y eferentes del sistema nervioso central y autónomo, siendo el nervio vago y las neuronas entero-pancreáticas las que desempeñan el rol más importante en la vía de regulación. El reflejo entero-pancreático vago-vagal consiste en fibras aferentes y eferentes del nervio vago que coordinan las respuestas a los estímulos intestinales a través del complejo vagal dorsal. Las neuronas postganglionares intrapancreáticas son activadas por los eferentes que surgen de la mucosa del duodeno que está en contacto con el quimo durante la fase intestinal de la digestión. La acetilcolina liberada por estas neuronas actúan sobre los receptores muscarínicos M1 y M3 de las células acinares para provocar su secreción exócrina (Pandiri, 2014).

### 2.1.3 *Homeostasis de la glucosa*

A través de sus diversas hormonas, particularmente el glucagón y la insulina, el páncreas endócrino mantiene los niveles de glucosa en la sangre dentro de un rango muy estrecho. Esta preservación se lleva a cabo por las acciones opuestas y equilibradas del glucagón y la insulina responsables de la homeostasis de la glucosa (Shrayyef y Gerich, 2010). Durante el sueño o entre comidas, cuando los niveles de

glucosa en la sangre son bajos, el glucagón se libera de las células  $\alpha$  para promover la glucogenólisis hepática. Además, el glucagón impulsa la gluconeogénesis hepática y renal para aumentar los niveles de glucosa endógena en sangre durante el ayuno prolongado. En contraste, la secreción de insulina de las células  $\beta$  es estimulada por niveles elevados de glucosa exógena, como los que ocurren después de una comida (Aronoff *et al.*, 2004; Röder *et al.*, 2016). La insulina se sintetiza como proinsulina, la cual experimenta la escisión de su péptido señal durante la inserción en el retículo endoplásmico, generando proinsulina. En el retículo endoplásmico, la proinsulina es procesada por endopeptidasas específicas que dan lugar a la insulina y el péptido C, los cuales se almacenan en gránulos de secreción en espera de ser liberados bajo demanda (Fu *et al.*, 2013; Molina, 2013). Las células  $\beta$  se caracterizan por la expresión de insulina y del péptido C, por los transportadores de glucosa (GLUT2 principalmente en roedores, mientras que en humanos se expresa además GLUT1 y GLUT3) y por el factor de transcripción Pdx1, determinantes de la función adecuada de las células  $\beta$  (Brennand y Melton, 2009). La unión de insulina a su receptor da como resultado la dimerización y transfosforilación de las subunidades beta del receptor, provocando la activación de la tirosina quinasa intrínseca y con ello la activación de una compleja cascada de señalización que da como resultado: 1) la supresión de la liberación de glucosa del hígado y del riñón, 2) la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) a la membrana citoplasmática para aumentar la captación de glucosa y 3) la inhibición de la liberación de ácidos grasos libres por lipogénesis y la incorporación de aminoácidos en las proteínas. Por último, la insulina inhibe simultáneamente la secreción de glucagón de las células  $\alpha$  pancreáticas, lo que provoca que el hígado deje de producir glucosa a través de la glucogenólisis y la gluconeogénesis.

En resumen, después de acoplarse a su receptor, la insulina permite la entrada de glucosa en los tejidos insulino dependientes (adipocitos, músculo esquelético, cardiomiocitos, entre otros) para ser utilizada como energía; por lo tanto, la insulina actúa como una hormona anabólica, en contraste con la actividad catabólica del glucagón (Aronoff *et al.*, 2004; Mueckler y Thorens, 2013; Röder *et al.*, 2016)

## 2.2. Diabetes Mellitus

La enfermedad más común resultante de la alteración de la liberación de las hormonas pancreática es la diabetes mellitus (Molina, 2013). Los pacientes que presentan dicha enfermedad tienen una incapacidad para mantener la homeostasis de la glucosa (Brennand y Melton, 2009). La patofisiología de la enfermedad implica la entrada deficiente de glucosa en las células y la acumulación de glucosa en la sangre, teniendo como consecuencia metabólica un estado de hiperglucemia crónico. En base a la etiopatogenia de la enfermedad, hay dos tipos principales de diabetes: la diabetes autoinmune de tipo 1 (DM tipo 1 o DM insulino dependiente) causada por una deficiencia absoluta de la secreción de insulina, y diabetes tipo 2 (DM tipo 2 o anteriormente no insulino dependiente) que es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una insuficiente respuesta compensatoria de la insulina secretora (Cejkova *et al.*, 2009; Molina, 2013).

La DM tipo 1 es el resultado de la destrucción de las células  $\beta$ . Representa alrededor del 5 al 10% de los casos, y ocurre más frecuentemente en personas jóvenes, de ahí que también se le conozca como diabetes juvenil. La diabetes tipo 1 se caracteriza por el desarrollo de cetoacidosis en ausencia de terapia con insulina. La diabetes tipo 2, por su parte, representa más del 90% de los casos de diabetes y está asociada con la resistencia a la insulina así como la falta de compensación adecuada por las células  $\beta$  que conduce a una deficiencia relativa de insulina. Por lo general se asocia con la obesidad en adultos y se caracteriza por hiperglucemia leve. Rara vez conduce a la cetoacidosis (King, 2012; Molina, 2013; Radenković *et al.*, 2016).

Pese a sus diferencias, es claro que la pérdida de la masa pancreática funcional causada por la muerte y la disfunción de las células  $\beta$  desempeña un papel importante en la patogénesis de la diabetes tipo 1 y tipo 2 (Fu *et al.*, 2013). De manera interesante, los pacientes con diabetes de larga duración retienen células  $\beta$  residuales a pesar de esta pérdida. Por lo tanto, un foco primario para el tratamiento de la diabetes es normalizar la homeostasis de las células  $\beta$  remanentes, reduciendo su pérdida, recuperando su función y promoviendo su regeneración. Sin embargo, las células  $\beta$  tienen una tasa baja de proliferación basal (Kondegowda *et al.*, 2015). Esto sugiere que factores que puedan aumentar el número y función de las células  $\beta$

podrían mejorar el potencial terapéutico de los tratamientos para la DM. La identificación de mediadores químicos con estos efectos descansa en modelos experimentales de DM donde evaluar sus acciones.

### **2.3. Diabetes experimental**

Los estudios en seres humanos que exploran los mecanismos responsables de los cambios causados por la DM son limitados no sólo por razones éticas, sino también por la variabilidad interindividual (dieta, factores socioeconómicos, nutrición y factores genéticos) que pueden alterar los resultados. Por lo tanto, se vuelve necesario el desarrollo de modelos experimentales donde generar conocimiento sobre su fisiopatología, el desarrollo de nuevas terapias y los mecanismos moleculares que las determinan (Damasceno *et al.*, 2013). A través de los años, varios modelos animales se han desarrollado para el estudio de DM, los cuales incluyen modelos químicos, quirúrgicos (pancreatectomía) y manipulaciones genéticas en varias especies animales para inducir esta enfermedad (Etuk, 2010).

En los modelos químicos de diabetes, un alto porcentaje de las células  $\beta$  se destruyen y la poca producción de insulina endógena conduce a hiperglucemia crónica y pérdida de peso. En este sentido los roedores son excelentes para desarrollar modelos simples y relativamente baratos de diabetes experimental (King, 2012; Radenković *et al.*, 2016) mediante el uso de fármacos diabetogénicos que incluyen el aloxan monohidrato, la estreptozotocina (STZ), el nitrilotriacetato férrico, la ditizona y el suero anti-insulina, de los cuales, los más frecuentemente utilizados son la estreptozotocina y el aloxan (Etuk, 2010). Sin embargo, la estreptozotocina es más usada que el aloxan debido a que presenta algunas ventajas tales como un tiempo de vida media más largo, mayor estabilidad, mejor establecimiento de la diabetes y menor número de complicaciones como cetoacidosis o mortalidad (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009; Radenković *et al.*, 2016).

#### *2.3.1. Modelo de diabetes experimental inducida por STZ*

La STZ fue aislada de *Streptomyces achromogenes* en 1960 y se demostró que era un antibiótico antitumoral de amplio espectro que posee propiedades diabetogénicas caracterizadas por la destrucción selectiva de las células  $\beta$  de los islotes

pancreáticos que resultan en deficiencia de insulina, hiperglucemia, polidipsia y poliuria y mimetizan de esa manera a la DM (Wu y Huan, 2008). La estructura química de la STZ (Fig. 3) está compuesta de una molécula de glucosa unida a una metilnitrosourea altamente reactiva responsable de los efectos citotóxicos de la STZ, mientras que el residuo de glucosa dirige al compuesto químico hacia las células  $\beta$  pancreáticas a través de unirse selectivamente al GLUT2 (Wu y Yan, 2015). Como se mencionó anteriormente, el transportador de glucosa GLUT2 es abundante en la membrana plasmática de la célula  $\beta$ , por lo tanto, este tipo celular es el blanco de la STZ.

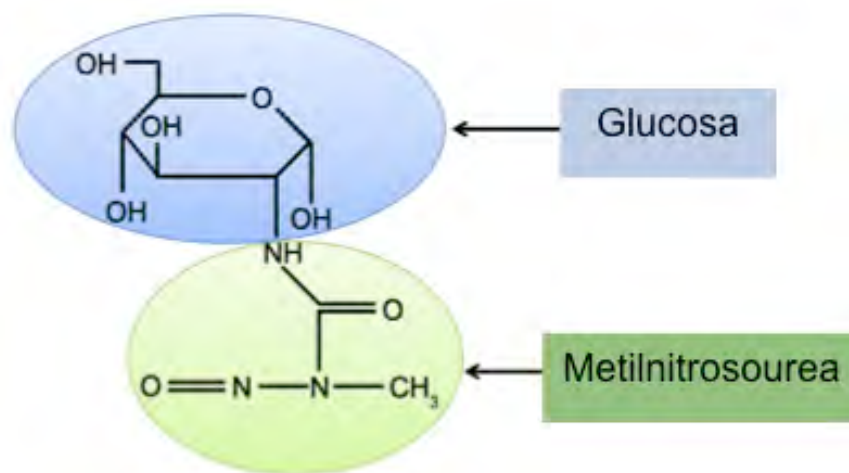


Figura 3. Estructura química de la estreptozotocina (STZ). Mientras que la molécula de metilnitrosourea le confiere el poder citotóxico a la STZ causando metilación del ADN, la molécula de glucosa se mimetiza con la glucosa endógena para dirigir al fármaco selectivamente hacia los transportadores de glucosa 2 (GLUT 2) que son abundantes en la membrana plasmática de las células  $\beta$  (modificada de Wu y Yan, 2015).

Se han propuesto mecanismos para describir cómo es que el residuo de metilnitrosourea provoca su efecto citotóxico y causa tanto necrosis como apoptosis de las células  $\beta$  a través de la fragmentación del ADN. Las tres principales vías asociadas son: 1) la metilación del ADN a través de la formación del catión metilo ( $\text{CH}_3^+$ ) que resulta en la activación de la enzima nuclear poli ADP-ribosa sintetasa como parte del mecanismo de reparación celular y el agotamiento del  $\text{NAD}^+$ ; 2) producción de óxido nítrico (NO) puesto que se ha demostrado que la STZ actúa como donador de NO aumentando en consecuencia la actividad de la guanilato ciclasa y la formación de GMPc; y 3), la producción de especies reactivas de

oxígeno (ROS) y estrés oxidativo. El tratamiento con STZ causa un aumento significativo de radicales oxidantes como el malonaldehído y disminuye las enzimas antioxidantes tales como catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en el páncreas (Eleazu *et al.*, 2013). Es importante mencionar que las células  $\beta$  son particularmente susceptibles al efecto del óxido nítrico y al estrés oxidativo debido a su bajo potencial antioxidante (Yamamoto *et al.*, 2010).

La STZ induce el estado diabético de 2 maneras diferentes que dependen de la dosis empleada. A dosis altas (70-250 mg/kg de peso), provoca de manera rápida e irreversible la destrucción completa de las células  $\beta$  (Arora *et al.*, 2009) a las cuales dirige sus propiedades alquilantes y proapoptóticas correspondientes a las acciones citotóxicas del componente nitroso. En dosis bajas y múltiples exposiciones (30-55 mg/kg de peso por 5 días) (Deeds *et al.*, 2011), la STZ provoca una reacción inmune e inflamatoria, probablemente relacionada con la liberación de autoantígenos como el ácido glutámico-descarboxilasa (GAD) (Graham *et al.*, 2011), que se considera uno de los antígenos candidatos más relevantes que participan en la activación de la autoinmunidad celular  $\beta$ -específica (Jun *et al.*, 2002). Bajo esta condición, normalmente se induce una lesión subóptima que causa una destrucción parcial de las células  $\beta$  y, la inducción del estado hiperglucémico se asocia con deficiencia de insulina e infiltrados inflamatorios en los islotes pancreáticos (Graham *et al.*, 2011) por lo que la progresión de la diabetes depende, en parte, de una insulinitis autoinmune secundaria (Tesch y Allen, 2007). La toxicidad inicial de la STZ que causa la destrucción parcial de células  $\beta$  es de corta duración, dejando una fracción residual que sobrevive del daño y, el deterioro de la función celular de dicha fracción sobreviviente se debe en gran medida a la toxicidad inducida por hiperglucemia (Wu y Yan, 2015).

La sensibilidad a la STZ es muy variable en roedores. Algunos factores que pueden alterar dicha sensibilidad incluyen al estrés, el género (los ratones machos tienden a ser más susceptibles), la edad, la dieta y el peso (Deeds *et al.*, 2011).

El modelo de DM inducido por STZ permite estudiar la acción de factores capaces de promover la proliferación y supervivencia de las células  $\beta$ -pancreáticas y, por ende, su valor potencial en contrarrestar la diabetes. Entre estos factores se encuentra la hormona prolactina.



## 2.4. Hormona prolactina y su receptor

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica de 199 aminoácidos (aa) que se sintetiza y secreta a partir de células especializadas de la glándula pituitaria anterior, conocidas como lactotrofos. De acuerdo con su estructura terciaria, la PRL está organizada en 4  $\alpha$ -hélices dispuestas de manera antiparalela que están unidas por asas flexibles (Fig. 4A) (Freeman *et al.*, 2000).

La PRL secretada por la glándula pituitaria actúa a través de una vía endócrina clásica, es decir, es secretada a la circulación y actúa a distancia sobre células diana (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Además de ser sintetizada y secretada por los lactotrofos de la glándula pituitaria anterior, la PRL también es producida por numerosas células y tejidos en los cuales actúa de una manera local como un factor de crecimiento, un neurotransmisor o una citocina de forma autócrina o parácrina. Dentro de los tejidos en los cuales se ha confirmado la expresión de la PRL se encuentran: el tejido nervioso, la decidua y el miometrio uterinos, el tejido mamario, los folículos ováricos, la glándula lagrimal, las células inmunes, fibroblastos de la piel, el tejido adiposo, y el endotelio vascular (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Marano y Ben-Jonathan, 2014). Hasta el momento no se han encontrado reportes de secreción de PRL *in situ* por parte de las células de los islotes de Langerhans.

El receptor de la PRL (RPRL) corresponde a una proteína de un solo pase transmembranal que pertenece a la superfamilia de receptores tipo citocinas clase 1 (Freeman *et al.*, 2000). Se expresa en numerosos tipos celulares y tejidos de los mamíferos. De hecho, es difícil encontrar un tejido en el cual no se haya identificado la presencia del receptor de PRL (Kelly *et al.*, 2001). Se han descrito esencialmente 3 isoformas del RPRL como resultado del procesamiento alternativo de un solo gen. Estas isoformas tienen el mismo dominio extracelular y varían en la longitud y composición de sus dominios citoplásmicos, por lo que se denominan como corto, intermedio y largo (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 2000). En la rata, las isoformas de RPRL contienen 291 aa (corto), 393 aa (intermedio) y 591 aa (largo). Por su parte, en el ratón, se han identificado una forma larga y tres isoformas cortas, las cuales sólo se diferencian por unos pocos aminoácidos en la parte C-terminal de su cola citoplasmática (Bole-Feysot *et al.*, 1998). En este sentido, se ha reportado que el páncreas, al igual que otros órganos como ovario, glándula adrenal, riñón,

intestino delgado, glándula mamaria e hígado expresan altos niveles del receptor largo de PRL (Binart *et al.* 2010).

El primer paso en la activación del RPRL es su homodimerización inducida por ligando, es decir, una molécula de PRL se une a dos moléculas del receptor a través de dos sitios diferentes en su estructura (fig. 4B). Aunque no está presente ninguna actividad quinasa intrínseca en el dominio intracelular del RPRL, se ha demostrado que una tirosina quinasa asociada de la familia de las janus quinasas, la JAK2 (“janus kinasa 2”) se activa después de la dimerización. Esta etapa de activación implica la fosforilación de la tirosina quinasa JAK, que a su vez fosforila residuos de tirosina presentes en el RPRL. Los transductores de señales y activadores de la transcripción STAT (“signal transduction activator of transcription”), que están presentes en el citoplasma, migran al RPRL y se enlazan a los residuos de tirosina fosforilados a través de dominios SH2. Las STAT son a su vez fosforiladas por JAK2, lo que determina su disociación del RPRL, su dimerización y su migración al núcleo donde se unen a secuencias específicas en el promotor de genes inducidos por PRL, activando la maquinaria de la transcripción. Además de la vía JAK-STAT, otras vías como MAP quinasa (“mitogen-activated protein kinases” o proteína quinasas activadas por mitógenos) y la PLC-IP3 (“phospholipasa C- inositol triphosphate” o fosfolipasa C- inositol trifosfato) se han propuesto como parte de las vías de transducción de señales activadas por PRL (Freeman *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2001).

El desarrollo de una línea de ratón deficiente del RPRL es un buen medio para la mejor comprensión de las múltiples funciones de la hormona y su receptor. Los ratones nulos para el RPRL presentan un fenotipo particular. Las hembras homocigóticas son estériles y carecen de un desarrollo mamario normal, mientras que los heterocigóticos son incapaces de lactar después de su primer embarazo; tanto machos como hembras presentan hiperprolactinemia y en algunos casos la hiperplasia hipofisaria está presente. El comportamiento materno se ve afectado tanto en animales homocigotos como heterocigotos. La formación de huesos se reduce en animales jóvenes y adultos (machos y hembras). Finalmente, se ha observado que este tipo de ratones muestran una ligera reducción en el peso corporal que parece ser debido a la reducción de la deposición de grasa abdominal (Kelly *et al.*, 2001). Este fenotipo es consistente con la multiplicidad de los efectos de la hormona que originalmente se identificó por su capacidad de estimular el

desarrollo y función de la glándula mamaria. La multiplicidad de efectos de la PRL se agrupan en seis grandes categorías: reproducción y la lactancia, crecimiento y desarrollo, endocrinología y metabolismo, cerebro y comportamiento, inmunomodulación y equilibrio electrolítico (Kelly *et al.*, 2001).

Dentro de la categoría endocrinología y metabolismo, se conoce que la PRL tiene efectos directos sobre la función del páncreas endócrino aumentando la secreción de insulina, disminuyendo el umbral de la glucosa para estimular la secreción de insulina y promoviendo la expresión de la glucoquinasa y del transportador de glucosa 2 (GLUT2) (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Además, se conoce que de entre los blancos río abajo de las vías de señalización inducidas por PRL, se encuentran la glucocinasa y proteínas del ciclo celular (por ejemplo, ciclina D2), así como factores de transcripción (por ejemplo, FOXD3) que están altamente relacionados con el metabolismo de carbohidratos (Gorvin, 2015). Sin embargo, las funciones de esta hormona en la regulación del metabolismo y sus implicaciones en la diabetes siguen siendo poco claras (Freemark *et al.*, 2002).

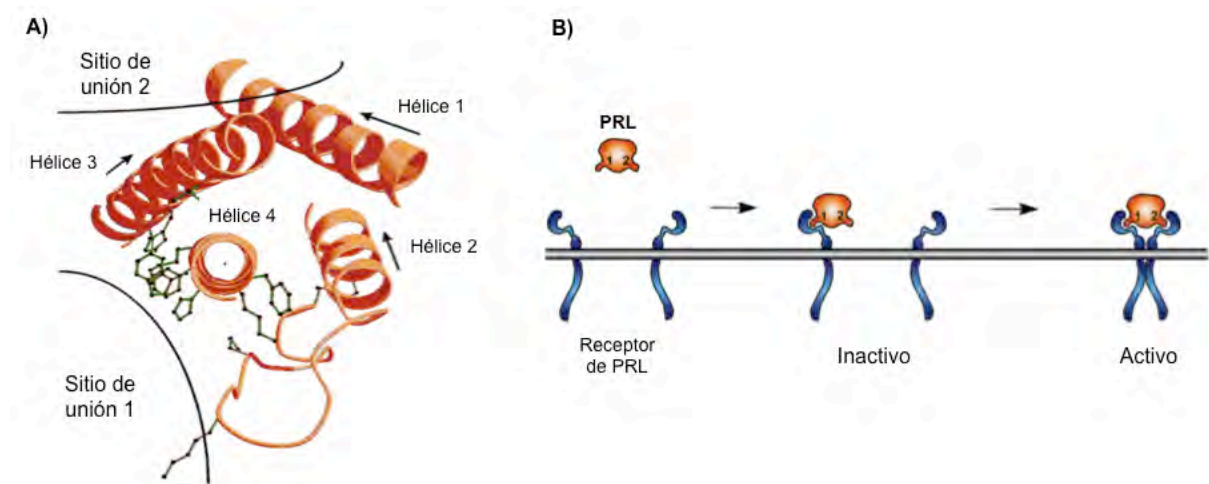


Figura 4. Hormona prolactina y su receptor. A) Estructura terciaria en 3D de la prolactina humana modelada sobre la base de su estructura cristalográfica. Se aprecian las cuatro hélices plegadas de las cuales esta conformada así como sus dos sitios de unión al receptor. B) Activación del RPR por dimerización inducida por PRL. La unión de la hormona a su receptor es secuencial. Primero la PRL interactúa con su receptor a través de su sitio de unión 1 formando un complejo inactivo. A continuación la hormona se une a un segundo receptor a través de su sitio 2, lo que conduce a la homodimerización del receptor y a la formación de un complejo activo (modificada de Bole-Feysot *et al.*, 1998).

## 2.5. Efecto protector de PRL en la diabetes inducida por STZ

El papel de las hormonas pituitarias en la regulación de la homeostasis de la glucosa fue reconocido por primera vez por Bemado Houssay en la década de 1930. A partir de entonces, en varios estudios se ha demostrado que la PRL y la hormona del crecimiento (GH) secretadas por la glándula pituitaria, así como el lactógeno placentario (PL) secretado por la placenta durante el embarazo, están implicados en la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos y causan cambios en la función de los islotes pancreáticos, sin dejar claro hasta qué punto esto era reflejo de un efecto directo de las hormonas sobre los islotes o consecuencia de cambios en otros tejidos debido al aumento en la demanda de insulina. Para la década de 1960, fue posible examinar el efecto directo de estas hormonas tanto en islotes aislados (*in vitro*) como en páncreas de animales (*in vivo*). Desafortunadamente, en aquellos experimentos, la especie de las hormonas disponibles para el tratamiento (hormonas humanas) no era la misma a la de los islotes animales utilizados (ratas y ratones). El alto grado de relación estructura-función de estas hormonas permite que una hormona heteróloga tenga propiedades biológicas en tejidos de otras especies que no se comparten con la hormona homóloga (Sorenson y Brelje, 2001).

Para obtener una mejor comprensión de si estas hormonas tienen efectos únicos o compartidos sobre la función de los islotes, se examinó el efecto de la PRL, GH y PL en islotes aislados de varias especies diferentes. Los primeros estudios que sugirieron efectos de la PRL específicamente sobre las células  $\beta$  del páncreas se llevaron a cabo hace más de 30 años. Nielsen reportó que la GH, la PRL y el PL estimulan la producción de insulina y la síntesis de ADN en islotes de Langerhans aislados de la rata, pero no dejó en claro si el efecto observado se presentaba por una acción directa sobre las células  $\beta$  o bien a través de factores de crecimiento producidos localmente (Nielsen, 1982). Años después, se demostró que las células productoras de insulina expresan al receptor de PRL (Möldrup *et al.*, 1990) y que los receptores de PRL se expresan también en las células  $\alpha$  pero no en las células  $\delta$  de los islotes del páncreas (Sorenson y Stout, 1995). Para 1993, el equipo de Brelje reprodujo el trabajo de Nielsen y concluyó que el PL y la PRL son considerablemente más eficaces que la GH para estimular la proliferación celular y la secreción de insulina en los islotes de Langerhans tanto de la rata, como del ratón

y del humano (Brelje *et al.*, 1993). Éstos resultados fueron apoyados través de experimentos *in vitro* sobre cultivos de células  $\beta$  pancreáticas, donde se demostró que la PRL estimula su proliferación y la síntesis de insulina (Brelje y Sorenson, 1991; Hügl y Merger, 2007) por medio de la activación de la vía de la JAK2 y la consecuente fosforilación/activación del factor de transcripción STAT-5, que, como se mencionó arriba, es la vía canónica de señalización de la PRL (Sorenson y Stout, 1995; Weinhaus *et al.*, 2007).

Más importante aún, la acción fisiológica de la PRL sobre la funcionalidad de las células  $\beta$  del páncreas se fundamentó en estudios *in vivo* utilizando animales desprovistos genéticamente del receptor de la PRL. En estos animales se encontró una disminución en el tamaño y densidad de los islotes, menor densidad de células  $\beta$ , disminución en la expresión de insulina y una menor secreción de insulina a la circulación ante un reto con alta glucosa (Freemark *et al.*, 2002; Gorvin, 2015).

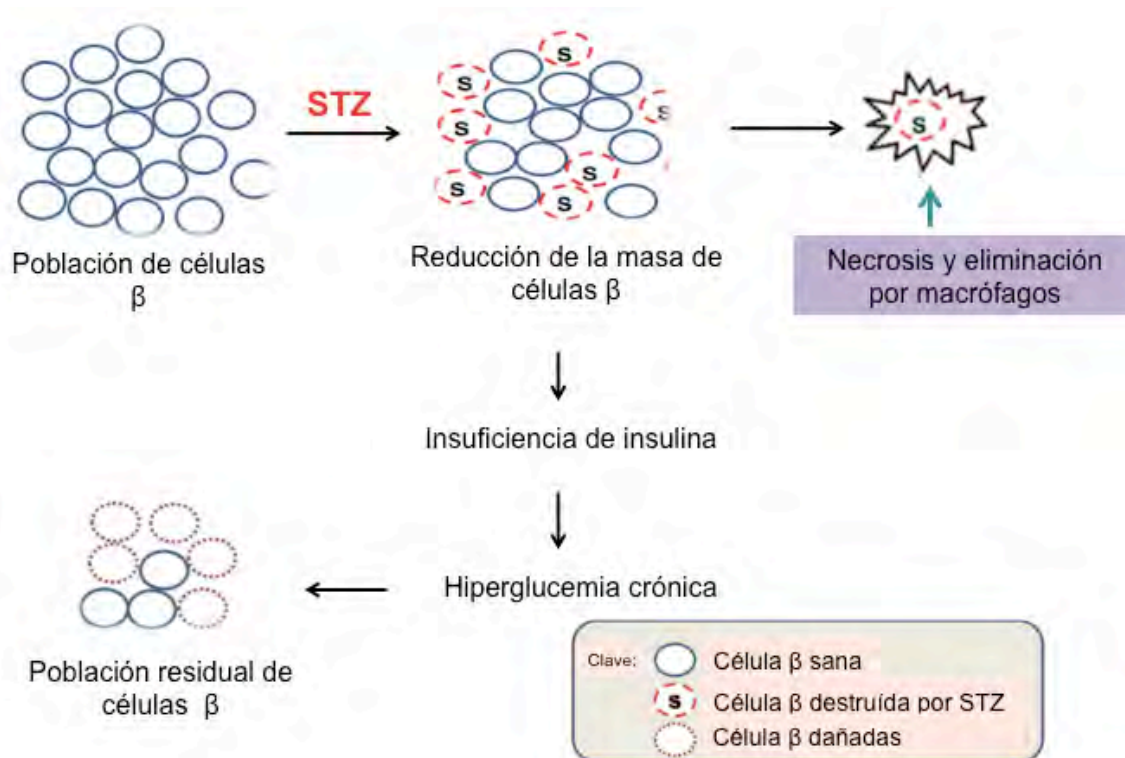


Figura 5. Mecanismo de glucotoxicidad de la célula  $\beta$  por estreptozotocina (STZ). En el esquema se muestra la destrucción parcial de la población de células  $\beta$  causada por STZ así como la reducción de su masa celular que induce insuficiencia de insulina e hiperglucemia crónica. (Modificada de Wu y Yan, 2015).

En su conjunto, estos hallazgos sugieren el valor protector de la PRL en la DM. Hasta el momento, el único estudio reportado *in vivo* sobre el efecto protector la PRL en la diabetes inducida por STZ es el realizado por Holstad y su equipo hace 17 años. En éste estudio se encontró que la administración de PRL exógena reduce los niveles de glucosa después del tratamiento con STZ, sin embargo, no se hizo mención de si la PRL modifica la incidencia de la diabetes ni se analizó si esta hormona estimula la proliferación de células  $\beta$  que sobreviven al daño (Holstad y Sandler, 1999). Al respecto, se reconoce que la STZ tiene efectos variables en parte debido al número residual de células  $\beta$  con potencial proliferativo que sobreviven al efecto de la toxina (Fig. 5) (Wu y Yan, 2015). Queda por determinar si la PRL endógena tiene la potencialidad de proteger o estimular la proliferación de ésta población celular residual.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La DM es una enfermedad con alta prevalencia en nuestro país y el resto del mundo. La STZ es un fármaco citotóxico que se emplea en modelos experimentales de DM debido a su propiedad de destrucción y pérdida de la función de las células  $\beta$ , dejando una fracción residual de células  $\beta$  con potencial proliferativo. El estudio de factores endógenos que tengan la capacidad de aumentar el número y función de las células  $\beta$  es una buena alternativa terapéutica para el control de la DM. La PRL es uno de estos factores, por lo que este proyecto se pretende analizar el efecto protector de la PRL a través de evaluar la incidencia y severidad de la diabetes inducida por STZ en ratones carentes del RPRL.

### **4. HIPÓTESIS**

La prolactina reduce la incidencia y la severidad del efecto diabetogénico provocado por estreptozotocina a través de proteger a las células  $\beta$  pancreáticas.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la incidencia y severidad (a través de los niveles de glucosa circulante y el número y densidad de los islotes pancreáticos) de la diabetes inducida con STZ en el ratón silvestre (RPRL<sup>+/+</sup>) y en el carente del RPRL (RPRL<sup>-/-</sup>).

### Objetivos Particulares

1. Implementar el modelo de DM inducido por STZ en el ratón.
2. Analizar posibles diferencias entre ratones RPRL<sup>+/+</sup> y RPRL<sup>-/-</sup> sometidos a la inducción de diabetes con STZ sobre:
  - La incidencia y severidad de la diabetes (niveles de glucosa en sangre)
  - Densidad y tamaño de islotes pancreáticos

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### *Animales*

Se emplearon un total de 44 ratones hembra (19 RPRL<sup>+/+</sup> y 25 RPRL<sup>-/-</sup>) de la cepa C57BL/6 de 5 a 8 semanas de edad, distribuidos aleatoriamente, con acceso a agua y alimento *ad libitum*, bajo condiciones de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad y a una temperatura ambiental de 22°C aproximadamente. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

### *Diseño experimental*

Todos los ratones tanto silvestres como nulos del receptor de PRL fueron inyectados con STZ (55 mg/kg i.p. al día) durante 5 días consecutivos bajo 4 horas de ayuno previo, y sacrificados al cabo de las 11 semanas posteriores a la primera administración de STZ (Fig. 6).

Durante el transcurso de las 11 semanas, se midieron los niveles de glucosa sérica (también con ayuno de 4 horas) y el peso corporal (sin ayuno) de los ratones, ambas

mediciones se realizaron una vez por semana por las mañanas. Al cabo de las 11 semanas, los animales fueron decapitados, previa anestesia mediante inhalación de CO<sub>2</sub> y los páncreas se recolectaron para evaluar el número y densidad de los islotes pancreáticos por técnicas histológicas.

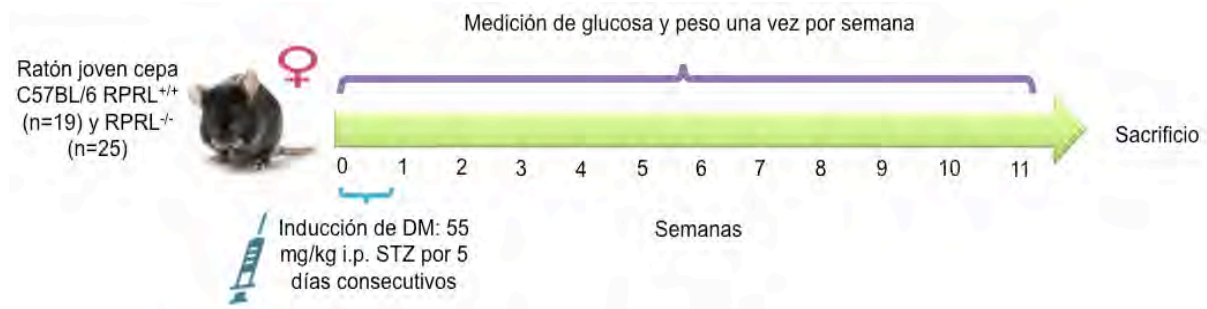


Figura 6. Esquema del diseño experimental.

#### Grupos experimentales

- Ratones RPRL<sup>+/+</sup> no diabéticos (glucosa <180 mg/dL)
- Ratones RPRL<sup>+/+</sup> diabéticos (glucosa >180 mg/dL)
- Ratones RPRL<sup>-/-</sup> no diabéticos (glucosa <180 mg/dL)
- Ratones RPRL<sup>-/-</sup> diabéticos (glucosa >180 mg/dL)

#### Modelo de inducción de diabetes mellitus por STZ

Existen múltiples protocolos de dosificación de STZ reportados en función del tipo y la gravedad de la diabetes prevista experimentalmente. De forma general, estos métodos se agrupan en tres categorías: múltiples dosis bajas de STZ por un periodo de varios días, dosis única moderada y dosis única elevada de STZ (Deeds *et al.*, 2011). El modelo de múltiples dosis bajas de STZ induce una lesión subóptima de las células  $\beta$  del páncreas y una progresión de la diabetes basada, en parte, a una insulinitis secundaria autoinmune y destrucción de las células  $\beta$ , por lo que es más utilizado como modelo de DM tipo 1 (Tesch y Allen, 2007). Las dosis de STZ utilizadas para este modelo van de los 40 a los 55 mg/kg de peso corporal administradas diariamente por 5 días consecutivos (Basu y Wiklund, 2011).

En el presente estudio utilizamos el protocolo de múltiples dosis bajas de STZ reportado por Tesch y Allen (2007), que consiste en la administración intraperitoneal de STZ (Sigma®) a dosis de 55 mg/kg de peso por 5 días en ayuno de 4-6 hora, la



cual se disuelve en una solución amortiguadora de citratos pH 4.5 preparada en fresco, por ser el protocolo con el cual se obtuvieron mejores resultados después de probar internamente diferentes protocolos (resultados no mostrados). Usualmente, niveles de glucosa sérica entre 180 y 500 mg/dL indican la inducción de diabetes en un ratón joven (Etuk, 2010; Grant, *et al.*, 2012), por lo que un valor  $\geq 180$  mg/dL de glucosa se utilizó para definir el estado diabético en los ratones durante el experimento.

#### *Medición de glucosa y peso*

La determinación de glucosa se realizó utilizando el kit ACCU CHEK® ACTIVE de ROCHE que consta de un glucómetro de tecnología fotométrica y tiras reactivas en las cuales se coloca una gota de sangre fresca obtenida de la punción de la cola del ratón. El rango de medición del equipo es de 10 a 600 mg/dL, por lo que cuando el glucómetro marcó una lectura de “Hi” como medición, se consideró un valor de glucosa de 600 mg/dL.

El peso de los ratones fue medido en balanza digital Mettler Toledo® modelo MS1602S.

#### *Tinción hematoxilina – Eosina de Harris*

Böhmer y Fischer introdujeron de forma independiente la tinción de hematoxilina y eosina en 1865 y 1875, respectivamente. Para 1876, Wissowzky describió la combinación de colorantes en lo que ahora conocemos como tinción de hematoxilina- eosina (Gill, 2010). La tinción de hematoxilina- eosina se han utilizado durante más de un siglo y siguen siendo una técnica histológica esencial para el reconocimiento de distintos tipos de tejido y sus cambios morfológicos. La Hematoxilina, o más correctamente llamada hemateína (forma oxidada de la hematoxilina) se une con un mordiente (típicamente  $Al^{3+}$ ) para teñir el ADN celular. Se ha sugerido que debido a su carácter catódico, se une a las cargas negativas de los grupos fosfatos que comprenden la columna del ADN, sometiéndose a coordinación o conjugación compleja y dando como resultado la tinción permanente del núcleo. Juntos con su mordiente ( $Al^{3+}$ ), el colorante produce un color azul. A la inversa, el compuesto aniónico eosina Y se une a grupos con carga positiva en las proteínas, tales como grupos amino, tiñéndolas de color rosa de manera no específica (Held, 2014).

Una vez recolectados los páncreas, posterior al sacrificio, fueron fijados en formalina al 10%, y deshidratados en un tren de alcoholes para finalmente ser incluidos en parafina por métodos convencionales. Se realizaron cortes transversales de 5  $\mu$ m de espesor utilizando un micrótopo rotatorio (Leica® RM2125RT); los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y se montaron con Entellan® en laminillas. El tren de tinción de hematoxilina-eosina se realizó de acuerdo al método convencional (*Guidelines for hematoxylin & eosin staining* de la National Society for Histotechnology, 2001). La captura de las imágenes se realizó utilizando un digitalizador de laminillas (ScanScope) bajo un objetivo 20X. Finalmente el número y densidad de los islotes se cuantificó utilizando el software Image-Pro Plus 5.1.

### *Análisis estadístico*

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism Version 6.0c. Los valores se expresaron como media  $\pm$  error estándar (SEM). Los datos se compararon mediante pruebas estadísticas paramétricas (t de Student para comparación de dos grupos y ANOVA de una vía con prueba de Tukey como post hoc para comparación de varios grupos) y no paramétricas (prueba de Fisher y Curva ROC) según fuera el caso. El nivel mínimo de significancia estadística fue de  $p < 0.05$ .

## **7. RESULTADOS**

### ***La incidencia de diabetes de los ratones RPRL<sup>-/-</sup> es similar a la de los ratones RPRL<sup>+/+</sup>***

La presencia de DM (niveles de glucosa sérica  $>180$  mg/dL) fue perceptible desde la primera semana post inyección de STZ, tanto en los ratones RPRL<sup>+/+</sup> como en los RPRL<sup>-/-</sup>. La tasa máxima de diabetes en los ratones RPRL<sup>+/+</sup> se observó en la segunda semana post-STZ (63.15%, 12 ratones diabéticos del total de 19 ratones inyectados con STZ). Para los ratones RPRL<sup>-/-</sup> se presentó una tasa de diabetes similar a la segunda semana post-STZ (64%, 16 ratone diabéticos del total de 25 ratones inyectados con STZ.) que a la cuarta semana mostró un ligero aumento (72%, 18 ratones diabéticos del total de 25 ratones inyectados con STZ) (Fig. 7) que no fue diferente al de la máxima tasa (incidencia) de diabetes alcanzada en el grupo silvestre.

Los animales no diabéticos permanecieron con niveles normales de glucosa ( $119 \pm 6.23$  y  $134.1 \pm 7.71$  para ratones  $RPRL^{+/+}$  y  $RPRL^{-/-}$  respectivamente) a lo largo de las 11 semanas del experimento (resultados no mostrados).

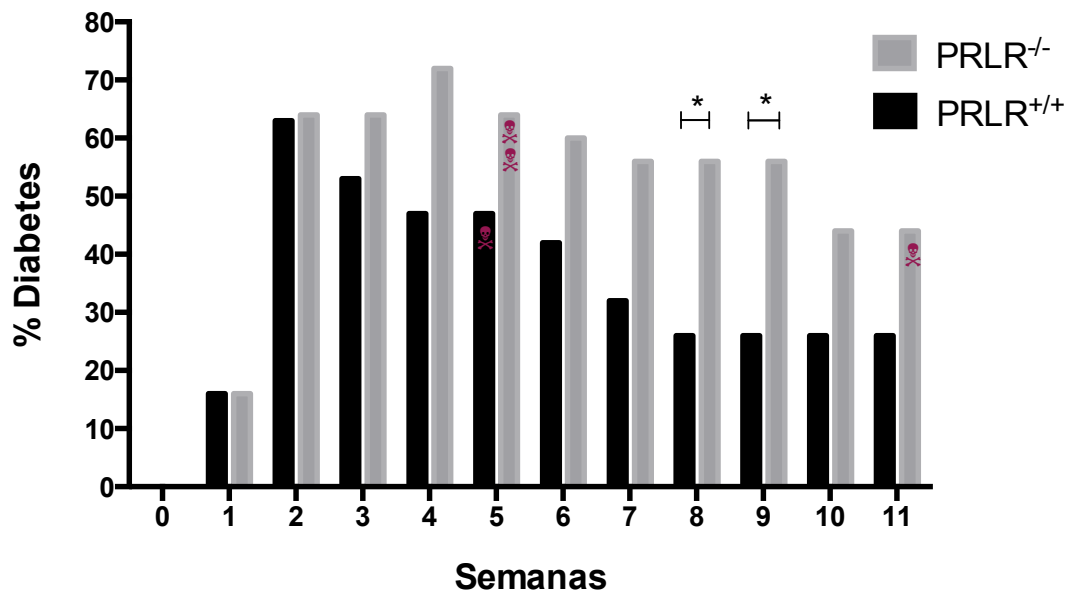


Figura 7. Porcentaje de diabetes presente en los ratones silvestres ( $RPRL^{+/+}$ ) (n=19) y nulos ( $RPRL^{-/-}$ ) (n=25) para el receptor de la PRL a lo largo de las semanas posterior a la inyección de STZ. En los ratones  $RPRL^{+/+}$  la incidencia de diabetes disminuye considerablemente a partir de la semana 3, mientras que en los ratones  $RPRL^{-/-}$  la reversión de la diabetes se retrasa hasta la semana 6, siendo evidente casi al final del experimento en la semana 10. Los símbolos de color rosa representan el número de casos de muerte de los ratones. La comparación entre grupos se realizó con prueba de Fisher, encontrando diferencias significativas en las semanas 8 y 9 post-STZ.

***La ausencia del receptor de prolactina se relaciona con una disminución en la recuperación de la DM inducida por STZ***

A pesar de que la incidencia de diabetes es similar en los ratones  $RPRL^{+/+}$  y  $RPRL^{-/-}$  durante las primera semanas post-STZ, la incidencia de diabetes en los ratones  $RPRL^{+/+}$  disminuyó notablemente a lo largo del tiempo iniciando a partir de la tercera semana posterior a la administración de STZ que muestra una aparente recuperación de la diabetes en este grupo experimental (Fig. 7). En contraste, en los ratones  $RPRL^{-/-}$  la disminución en la incidencia de diabetes se observó hasta la sexta y décima semana post-STZ, lo que indica que la recuperación en este grupo experimental tiene una latencia más prolongada. El porcentaje de diabetes entre

ambos grupos en las semanas 8 y 9 post-STZ mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.035$ ). Estos hallazgos sugieren que el efecto citotóxico de la STZ se mantiene por un periodo más prolongado en ausencia del receptor de prolactina. Queda por determinar si la recuperación de la diabetes en el grupo RPRL<sup>-/-</sup> eventualmente alcanza las mismas cifras observadas en el grupo RPRL<sup>+/+</sup>. La diferencia en el porcentaje de diabetes a través del tiempo entre los ratones RPRL<sup>-/-</sup> y RPRL<sup>+/+</sup> se sustenta al comparar el área bajo la curva del porcentaje de diabetes para cada grupo (Fig. 8), la cual fue significativamente mayor para los ratones nulos del RPRL en relación a los silvestres ( $p=0.013$ ).

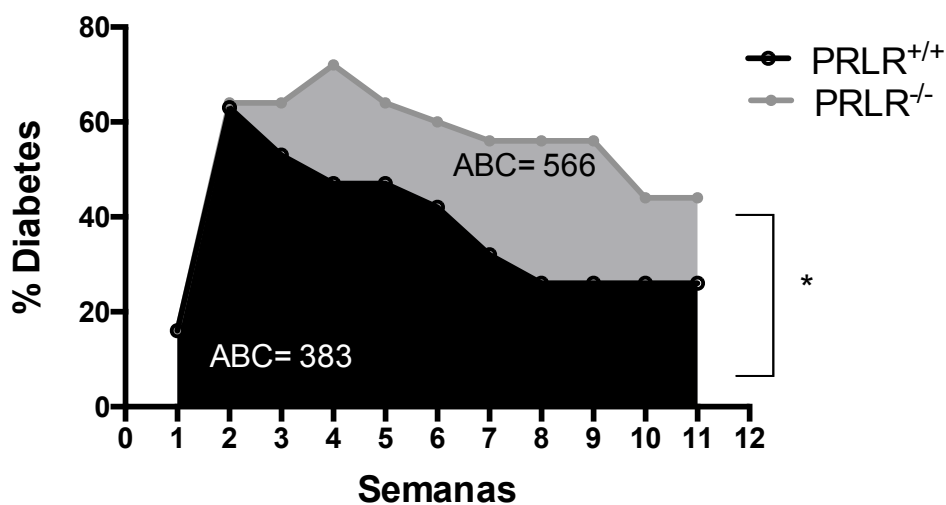


Figura 8. Área bajo la curva del porcentaje de ratones diabéticos silvestres (RPRL<sup>+/+</sup>) y nulos (RPRL<sup>-/-</sup>) para el receptor de la PRL en función del tiempo. ABC= área bajo la curva.

### ***Mortalidad de los animales diabéticos en ausencia del receptor de PRL***

Un mayor número de ratones RPRL<sup>-/-</sup> diabéticos murieron en relación a los ratones silvestres (3 vs. 1, respectivamente). En los ratones nulos del RPRL, dos de las tres muertes ocurrieron en la semana 5 y la otra en la semana 11 posteriores al tratamiento con STZ, mientras que en los ratones diabéticos silvestres la única muerte tuvo lugar a la semana 5 post-tratamiento (Fig. 9). Dado el número tan bajo de ratones que murieron, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad debida a la diabetes entre ambos grupos de ratones RPRL<sup>+/+</sup> y PRL<sup>-/-</sup>. Sin embargo, es posible concluir que la menor latencia de recuperación, probablemente asociada a una mayor severidad de la diabetes, favorece la muerte en ausencia de la señalización de la PRL.

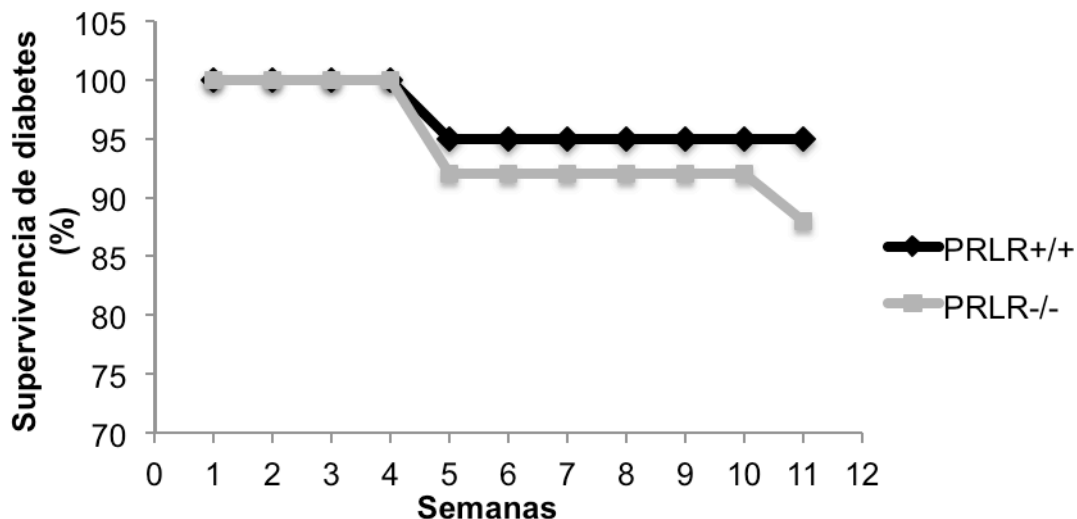


Figura 9. Curva de supervivencia de los ratones diabéticos silvestres (RPRL<sup>+/+</sup>) y nulos (RPRL<sup>-/-</sup>) para el receptor de la PRL. En el grupo RPRL<sup>+/+</sup> se observó un deceso en la quinta semana post-STZ y la supervivencia neta fue del 95 %. En el grupo RPRL<sup>-/-</sup> hubo dos decesos en la semana 5 (92.0% de supervivencia) y uno más en la semana 11 post-STZ (88.8% de supervivencia).

#### ***La severidad de la DM aumenta en ausencia del receptor de PRL***

Evaluamos la severidad de la DM (definida a través de los niveles de glucosa sanguínea) a lo largo de las 11 semanas posteriores a la inyección de STZ. Observamos que un mayor número de ratones presentan niveles de glucosa superiores a los 340 mg/dL en el grupo RPRL<sup>-/-</sup> diabéticos que en el grupo silvestre (Fig. 10A). La proporción es de 22.8% vs. 6.45% para los ratones nulos y silvestres, respectivamente. Además, a partir de la quinta semana post-STZ, el 100% de los ratones RPRL<sup>+/+</sup> diabéticos mostraron niveles de glucosa por debajo de 340 mg/dL, mientras que en los ratones RPRL<sup>-/-</sup> diabéticos el 40.9% estuvieron por arriba de dicho valor, encontrando incluso un punto extremo por arriba del límite de detección del glucómetro (600 mg/dL). Esta diferencia sugiere que la ausencia del RPRL aumenta la severidad de la diabetes inducida por STZ y, por ende, la susceptibilidad al efecto citotóxico del fármaco. Sin embargo, los promedios de los valores de glucosa a través del tiempo de los ratones RPRL<sup>-/-</sup> diabéticos solo fueron significativamente mayores durante la semana 7 post-STZ (p=0.036) (Fig. 10B).

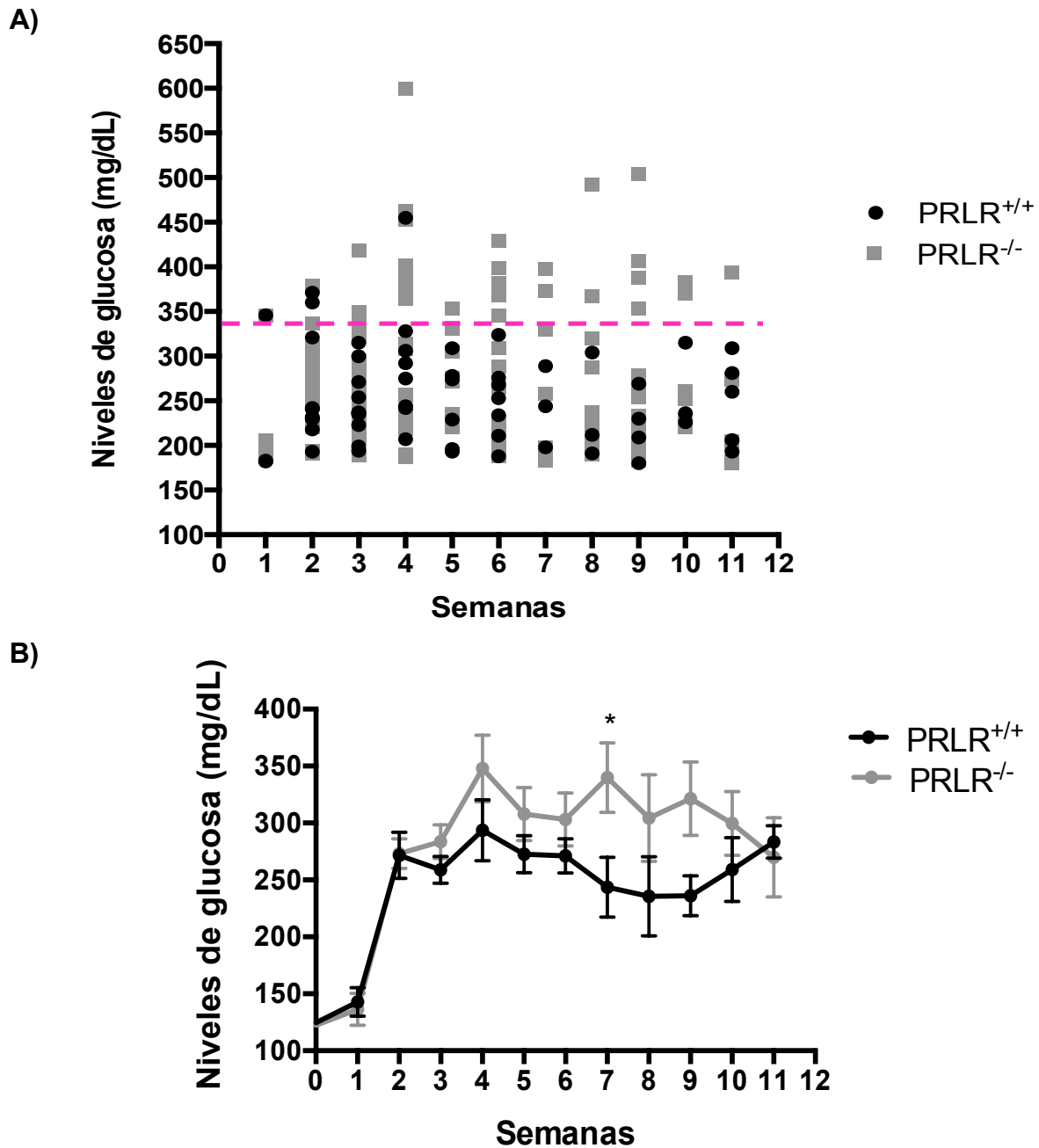


Figura 10. Niveles de glucosa en los ratones diabéticos silvestres (PRLR<sup>+/+</sup>) y nulos (PRLR<sup>-/-</sup>) para el receptor de la PRL. A) Se muestran los valores individuales de glucosa entre los grupos PRLR<sup>+/+</sup> y PRLR<sup>-/-</sup> diabéticos a lo largo de las diferentes semanas del estudio. Se sugiere una mayor severidad de la diabetes en los ratones PRLR<sup>-/-</sup> debido a que en este grupo se observó un mayor número de animales con niveles de glucosa sérica por arriba de los 340 mg/dL (línea rosa punteada) que en el grupo PRLR<sup>+/+</sup>. B) Promedios de los niveles de glucosa en los ratones diabéticos PRLR<sup>+/+</sup> y PRLR<sup>-/-</sup> a través del tiempo (p=0.036).

**La ganancia de peso no fue afectado por la por STZ ni por la ausencia del receptor de la PRL**

Algunos autores han reportado que tras la inducción química de diabetes se presenta pérdida de peso (King, 2012). Al evaluar el promedio de la ganancia de peso al cabo de las 11 semanas del estudio, no encontramos diferencias significativas entre los ratones no diabéticos y diabéticos silvestres, ni tampoco entre los grupos no diabéticos y diabéticos silvestres y nulos para el RPRL (Fig. 11). Estos hallazgos contrastan con estudios previos (Kelly *et al.*, 2001) que muestran que los ratones RPRL<sup>-/-</sup> sanos tienen un peso ligeramente menor a los silvestres.

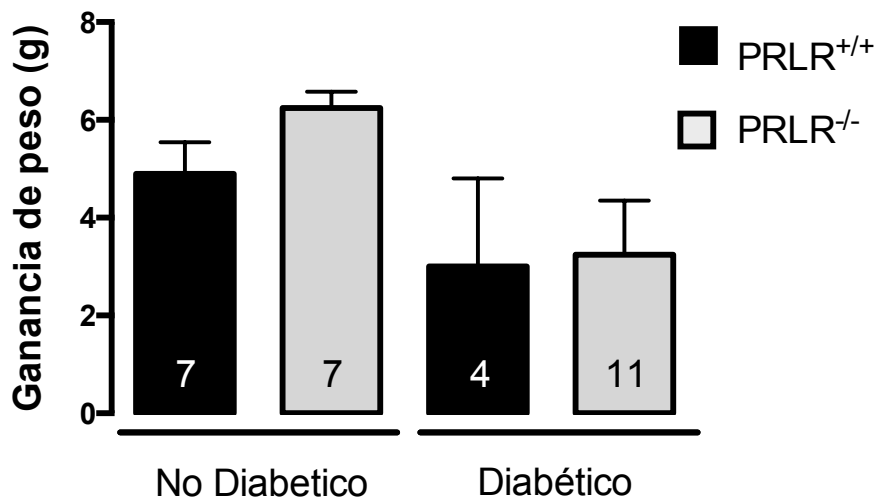


Figura 11. Ganancia de peso en ratones silvestres (RPRL<sup>+/+</sup>) y nulos (RPRL<sup>-/-</sup>) para el receptor de PRL diabéticos y no diabéticos al cabo de las 11 semanas del estudio. El número de ratones por grupo se indica dentro de las barras.

**La densidad de los islotes de Langerhans disminuye en ausencia del receptor de la PRL tanto en animales no diabéticos como diabéticos**

En la figura 12 se muestran micrografías representativas de secciones histológicas del páncreas donde se indican los islotes de Langerhans. Se puede apreciar una menor cantidad de islotes pancreáticos en secciones del páncreas de animales diabéticos con respecto a las secciones de animales no diabéticos. También es claro que el número de islotes es menor en la sección del páncreas de animales no diabéticos nulos para el RPRL con respecto a la de los animales silvestres no diabéticos; y mucho menor en las secciones de ratones diabéticos nulos para el RPRL. Estas diferencias son significativas cuando se evalúa la densidad de los

islotos pancreáticos (número de islotos por área) de diferentes animales (Fig. 13). La densidad de los islotos pancreáticos es menor en animales diabéticos vs. no diabéticos ( $p=0.026$  para los RPRL<sup>+/+</sup> y  $p=0.009$  para los RPRL<sup>-/-</sup>); en los animales no diabéticos que carecen del RPRL con respecto a los no diabéticos silvestres ( $p=0.012$ ); y en los animales diabéticos sin el RPRL con respecto a los diabéticos silvestres ( $p=0.032$ ) (Fig. 13). Estos hallazgos confirman la reducción en los islotos pancreáticos en el modelo de diabetes inducido por STZ (Zhang *et al.*, 2012) y la menor densidad de islotos pancreáticos en animales sanos nulos para el RPRL (Freemark *et al.*, 2002). Este trabajo es el primero que reporta una disminución en la densidad de islotos pancreáticos debida a la diabetes en los animales carentes del RPRL. Estos hallazgos son consistentes con nuestras observaciones que muestran una menor recuperación y una mayor severidad de la diabetes en ausencia del receptor de la PRL.

### ***El área de los islotos disminuye en ausencia del receptor de PRL en animales diabéticos y no diabéticos***

El área de los islotos pancreáticos de los diversos grupos experimentales se muestra en la Tabla 1. De acuerdo a su tamaño, se pueden encontrar islotos pequeños de menos de 100  $\mu\text{m}$ , islotos medianos de entre 100 y 200  $\mu\text{m}$  e islotos grandes de más de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. De manera excepcional, también se han reportado islotos con el límite superior en torno a los 500 y 700  $\mu\text{m}$  de diámetro en el ratón (Dolenšek *et al.*, 2015).

En la diabetes, tanto en los ratones RPRL<sup>+/+</sup> como en los RPRL<sup>-/-</sup>, no se encontraron islotos de Langerhans grandes (Tabla 1), lo que sugiere que los islotos mayores son primordialmente afectados por la STZ.. Al respecto, se ha reportado que los islotos pancreáticos presentan plasticidad y su forma puede cambiar en función al aumento de la demanda de insulina, estados de inflamación, obesidad, diabetes y embarazo (Dolenšek *et al.*, 2015).

Observamos que el área de los islotos de mediano tamaño es significativamente menor ( $p=0.036$ ) en los ratones diabéticos RPRL<sup>-/-</sup> que en los diabéticos silvestres, lo que es consistente con la menor densidad de islotos observada en la diabetes en ausencia del RPRL. Por su parte, entre los ratones no diabéticos, solo hubo diferencias en el área de los islotos de pequeño tamaño donde los ratones RPRL<sup>-/-</sup> presentaron un área significativamente menor ( $p=0.047$ ).



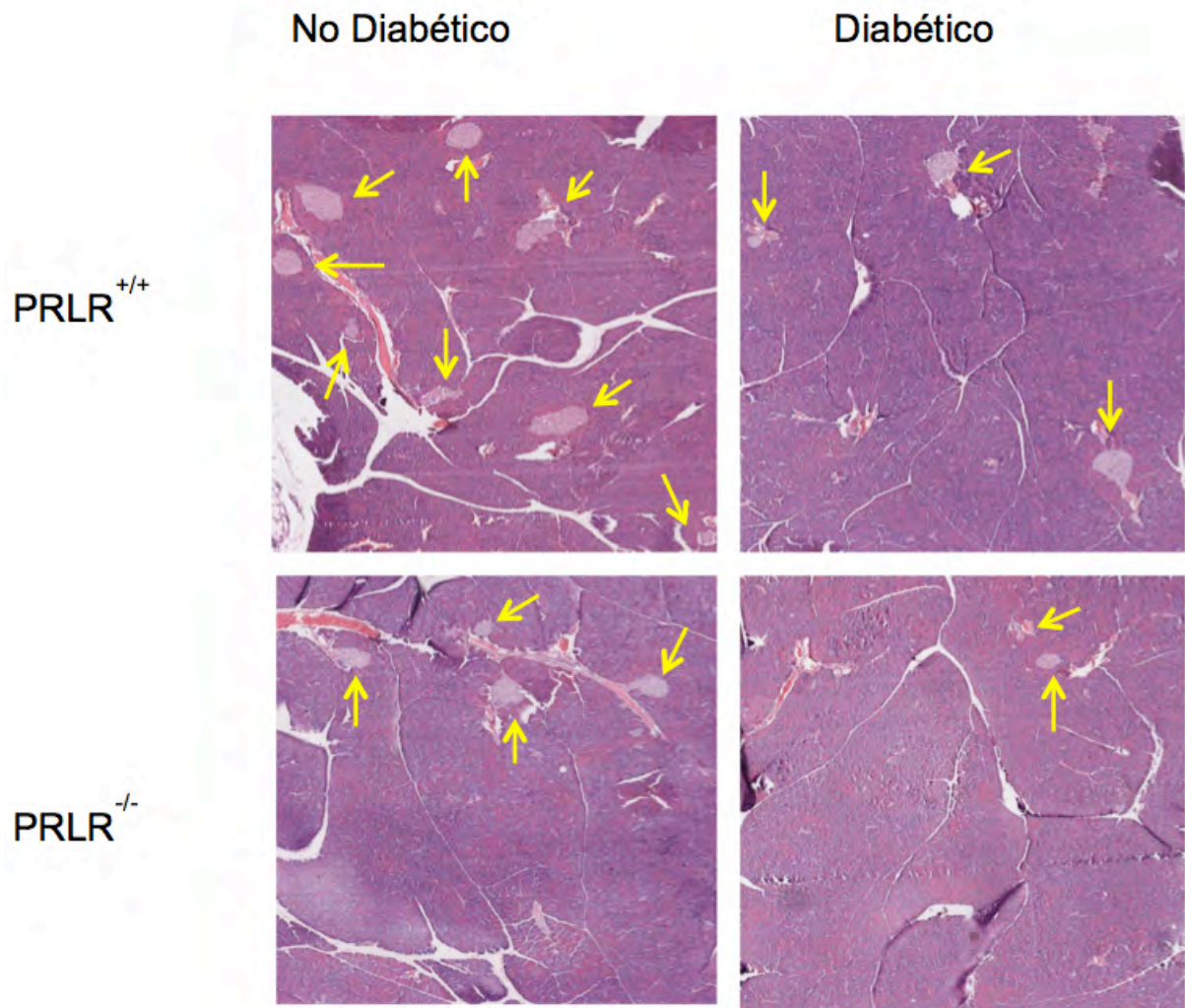


Figura 12. Imágenes representativas de secciones centrales del páncreas teñidas con hematoxilina- eosina correspondientes a animales no diabéticos y diabéticos silvestres y nulos para el receptor de la PRL (RPRL). La porción violeta intenso representa el páncreas exócrino (células acinares), mientras que las regiones rosadas claras señaladas con flechas amarillas representan el páncreas endócrino (islotes de Langerhans). Se pueden observar islotes de diferentes tamaños que se clasifican en islotes pequeños (<100  $\mu\text{m}$ ), islotes medianos (100-200  $\mu\text{m}$ ) e islotes grandes (>200  $\mu\text{m}$ ).

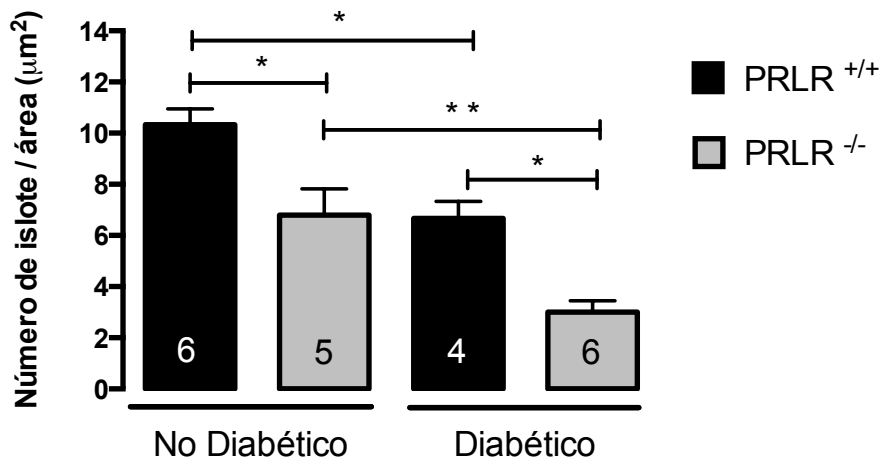


Figura 13. Densidad de los islotes pancreáticos en los ratones diabéticos silvestres (PRLR<sup>+/+</sup>) y nulos (PRLR<sup>-/-</sup>) para el receptor de la PRL analizada a las 11 semanas posteriores a la inducción de diabetes con STZ. El número dentro de las barras indica el número de ratones que se analizaron por grupo. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01

	n	Área de islotes pequeños < 100 (µm <sup>2</sup> )	Área de islotes medianos 100-200 (µm <sup>2</sup> )	Área de islotes grandes >200 (µm <sup>2</sup> )
Diabético				
PRLR <sup>+/+</sup>	4	3562 ± 445.8	18616 ± 1842	No presentes
PRLR <sup>-/-</sup>	6	3752 ± 515.4	13023 ± 1556	No presentes
p		0.782	0.036	
No diabético				
PRLR <sup>+/+</sup>	6	4042 ± 354.2	16113 ± 1566	64860 ± 15372
PRLR <sup>-/-</sup>	5	2795 ± 450.3	14233 ± 1341	40206 ± 4863
p		0.047	0.399	0.135

Tabla 1. Área de los islotes pancreáticos los ratones diabéticos silvestres (PRLR<sup>+/+</sup>) y nulos (PRLR<sup>-/-</sup>) para el receptor de la PRL analizada a las 11 semanas posteriores a la inducción de diabetes con STZ.

## 8. DISCUSIÓN

La PRL es una proteína originalmente identificada por su capacidad para promover la producción de leche en la lactancia. Sin embargo, además de sus bien conocidas propiedades lactogénicas, la PRL es también una hormona altamente versátil cuyas

funciones están relacionadas con la reproducción, el crecimiento, el desarrollo, la regulación inmunológica, la conducta y el metabolismo (Kelly *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2013). Actuando como hormona metabólica, diversos estudios han revelado el papel importante que juega la PRL en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Se sabe que la PRL tiene efectos directos sobre la función pancreática, aumentando la secreción de insulina, disminuyendo el umbral de glucosa para la secreción de insulina y favoreciendo la incorporación y retención celular de la glucosa a través de aumentar la glucocinasa y el transportador de glucosa 2 (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Durante el embarazo, la PRL materna estimula la proliferación de las células  $\beta$  así como la producción y secreción de insulina lo que puede desempeñar un papel fundamental en la expansión de la masa de células  $\beta$  que se requiere para satisfacer las mayores demandas metabólicas y el crecimiento y diferenciación de los tejidos que opera en esta fase del ciclo reproductor (Wang *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que el RPRL está altamente expresado en la célula  $\beta$  pancreática durante el embarazo (Gorvin, 2015). Hoy en día se reconoce que el efecto de la PRL en la regulación metabólica de la glucosa no se limita al período del embarazo y la lactancia. Estudios *in vitro* e *in vivo* reportan que la PRL estimula la proliferación y supervivencia de las células  $\beta$ , mejora la síntesis de insulina y aumenta potencialmente la vascularización de los islotes pancreáticos tanto en hembras como en machos (Lemini *et al.*, 2015; Hyslop *et al.*, 2016). Estudios clínicos han demostrado que bajos niveles de PRL sérica están asociados con una mayor prevalencia de diabetes y alteraciones en la regulación de glucosa. (Wang *et al.*, 2013). En concordancia con los estudios clínicos, se ha observado que los niveles circulantes de PRL se reducen en ratas diabéticas tratadas con STZ y en ratones obesos tratados con dieta alta en grasa (Lemini *et al.*, 2015; Ruiz-Herrera *et al.*, 2017). Más aún, Holstan y Sandler propusieron que la PRL puede prevenir el desarrollo de DM en ratones tratados con STZ debido a sus efectos inmunosupresores (Holstad y Sandler, 1999; Hyslop *et al.*, 2016); observaron que la administración de PRL tenía un efecto benéfico reduciendo los niveles de glucosa en sangre y la insulinitis, pero no fue claro si estas acciones son farmacológicas o si pudieran mimetizar el efecto protector de la PRL endógena.

Bajo esta premisa y sabiendo que la PRL promueve la función y proliferación de las células  $\beta$  del páncreas, propusimos la realización del presente trabajo con la

finalidad de investigar el efecto protector de la PRL endógena en la DM inducida por STZ, utilizando ratones desprovistos del RPRL.

Establecimos en el laboratorio un modelo experimental de DM que utiliza dosis bajas y múltiples de STZ. Bajo este esquema obtuvimos una tasa máxima de diabetes del 63.15% en los ratones RPRL<sup>+/+</sup> y del 72% para los ratones RPRL<sup>-/-</sup> durante la semana 2 y 4 post-STZ. Este resultado concuerda con lo descrito por Kataoka *et al.* (2013), donde reportan una incidencia máxima de diabetes del 67% en la semana 5 posterior al tratamiento, utilizando ratones hembras en el día postnatal 7 (P7) inyectadas con una dosis única de STZ de 50 mg/kg. Algunos autores que aplican protocolos de múltiples dosis bajas de STZ para la inducción de DM (50 a 55 mg/kg de peso por 5 días consecutivos) en ratones de 6 a 8 semanas de edad, han reportado porcentajes de diabetes en un rango amplio de el 50 a el 90% durante la semana 3 posterior al tratamiento con STZ (Tesch y Allen, 2007). De manera general, la incidencia de DM inducida por dosis bajas de STZ dependerá de la actividad de la STZ y la sensibilidad de los roedores al fármaco, la cual puede variar debido a factores como condiciones de estrés, el género, la edad, la dieta y el peso corporal (Tesch y Allen, 2007; Deeds *et al.*, 2011). Aún así, el periodo de tiempo en el que se presenta la diabetes es altamente reproducible.

Pese al hecho de que la diferencia en la tasa máxima de DM entre los grupos RPRL<sup>+/+</sup> y RPRL<sup>-/-</sup> es casi del 10%, no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, de manera interesante, observamos una recuperación del estado de hiperglucemia en ambos grupos, la cual se presentó en menor proporción y con una mayor latencia de aparición en los ratones RPRL<sup>-/-</sup>. Dicha recuperación es posible debido a que el modelo de DM que empleamos induce una lesión subóptima de las células  $\beta$  del páncreas y una progresión de la diabetes basada, en parte, a una insulinitis autoinmune secundaria que destruye parcialmente a una población de células  $\beta$  y deja una fracción residual que sobrevive al efecto citotóxico del fármaco (Tesch y Allen, 2007; Wu y Yan, 2015). Además, ha sido reportado que aunque las células  $\beta$  tienen un potencial mitótico limitado, en un estado hiperglucémico agudo se puede estimular la hiperplasia de las células  $\beta$  al activarse la neogénesis de células precursoras, derivadas de células madre o de células pancreáticas exócrinas que se sabe conservan la plasticidad fenotípica y pueden transdiferenciarse en células pancreáticas endócrinas (Bouwens, 2006), lo

que significa que después de la inducción química de la DM, el estado de hiperglucemia se puede revertir (Radenković *et al.*, 2016). Al respecto, Hartmann *et al.* (1989) y Kataoka *et al.* (2013) reportaron una recuperación espontánea de la diabetes inducida por STZ en ratones neonatos de 5 a 7 días de edad a partir de las semanas 2 a 5 después de haber sido inyectados con STZ. En sus estudios, estos investigadores solo muestran la dinámica de regeneración de la célula  $\beta$  sin dejar claro los mecanismos y factores que promueven este proceso de recuperación. Nuestros datos sugieren que, la ausencia del receptor de PRL, se asocia con una menor recuperación de la DM inducida por STZ por lo que PRL puede estar involucrada en la protección y/o proliferación de fracción residual de la células  $\beta$  que sobreviven tras el tratamiento con STZ.

Consistentemente con los resultados obtenidos, estudios *in vitro* utilizando cultivos de islotes pancreáticos, reportaron un efecto citoprotector de la PRL sobre las células  $\beta$  ante agentes nocivos como citosinas, donadores de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno (Yamamoto *et al.*, 2010). Recordando que las células  $\beta$  son particularmente susceptibles al estrés oxidativo debido a su bajo potencial antioxidante, los autores propusieron que la PRL mejora la supervivencia de éstas células a través de prevenir la apoptosis inducida por diversos insultos citotóxicos que causan estrés oxidativo (Yamamoto *et al.*, 2010), como es el caso de la STZ. Otro estudio *in vitro* demostró que la STZ induce a la caspasa-3 en células INS-1, una línea celular de insulinoma de rata productora de insulina, para producir apoptosis, y que la PRL reduce significativamente la activación de la caspasa-3 en dicha línea celular (Fujinaka *et al.*, 2007). La determinación los mecanismos por los cuales la PRL protege contra los efectos citotóxicos de la STZ sobre las células  $\beta$ -pancreáticas in vivo es objetivo del desarrollo futuro de este proyecto.

Los ratones RPRL<sup>-/-</sup> diabéticos no solo presentaron una menor recuperación del estado hiperglucémico, también mostraron mayor severidad de la DM inducida por STZ, puesto que sus niveles de glucosa en ayuno fueron más elevados en comparación con los ratones RPRL<sup>+/+</sup> diabéticos. Hasta el momento no hay reportes sobre el efecto de la STZ en ratones RPRL<sup>-/-</sup>. No obstante, nuestros resultados muestran una clara diferencia en la incidencia, tasa de recuperación y severidad de la diabetes entre los ratones RPRL<sup>+/+</sup> y RPRL<sup>-/-</sup>, siendo durante las semanas 7, 8 y 9 la ventana de tiempo donde esta diferencia es más evidente entre grupos.

Freemark *et al.* (2002) estudiaron el efecto de la pérdida del RPRL en el desarrollo y la función de los islotes pancreáticos. Entre sus conclusiones destaca que los ratones RPRL<sup>-/-</sup> tuvieron una reducción del 26 al 42% en la densidad de los islotes y en la masa de células  $\beta$ , que los islotes pancreáticos de ratones nulos para el RPRL fueron más pequeños que de los de ratones silvestres al momento del destete pero no en la edad adulta, y finalmente que el peso y los niveles de glucosa en sangre en ayunas fueron iguales entre los ratones RPRL<sup>+/+</sup> y RPRL<sup>-/-</sup>, pero los niveles de glucosa después de una carga de glucosa i.p. fueron 10 - 20% más elevados.

Durante el desarrollo del proyecto, confirmamos que en condiciones fisiológicas normales, no hay diferencias ni en el peso ni en los niveles de glucosa sérica en ayuno entre los ratones RPRL<sup>+/+</sup> y RPRL<sup>-/-</sup> adultos puesto que al inicio del experimento, en la semana 0 previo al tratamiento con STZ, ambos grupos de ratones mostraron niveles de glucosa similares (Fig. 10B), y durante las 11 semanas del experimento los ratones no diabéticos RPRL<sup>-/-</sup> tuvieron la misma ganancia de peso que los ratones RPRL<sup>+/+</sup>. Kelly *et al.* (2001) mostraron que los ratones RPRL<sup>-/-</sup> muestran una ligera reducción en el peso, sin embargo, nosotros no observamos dicha reducción de peso, en concordancia con lo reportado por Freemark *et al.* (2002).

En cuanto a la densidad de los islotes, corroboramos que hay una disminución en el número de islotes por área en los ratones no diabéticos carentes del RPRL. Por su parte también confirmamos que durante el estado diabético, la disminución de la densidad de islotes fue más abrupta. Zhang *et al.* (2012) reportaron una disminución en el número de islotes de ratones adultos tratados con STZ. En apoyo a este resultado, en la literatura se menciona una reducción en el número y volumen de islotes pancreáticos además de una evidente reducción concomitante en la capacidad de secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  en ratones y ratas tratados con STZ bajo un protocolo experimental similar al utilizado por nosotros (King, 2012). Finalmente, el área de los islotes también se vio disminuida en la DM inducida por STZ.

La disminución tanto en la densidad como en el área de los islotes pancreáticos que se presentó en los ratones diabéticos y que fue más severa para los RPRL<sup>-/-</sup> sustenta los resultados descritos anteriormente en donde observamos una mayor severidad de la diabetes y menor recuperación del estado hiperglucémico en este grupo experimental. La disminución en densidad y área de islotes se puede deber a

que si bien la STZ dirige de manera selectiva su efecto citotóxico hacia las células  $\beta$  pancreáticas, la glucotoxicidad local que se induce por la hiperglicemia debida al estado diabetogénico causa deterioro de la función celular tanto de las células  $\beta$  como de las no  $\beta$  (Wu y Yan, 2015). Además, puesto que es bien sabido que la insulina y el glucagón, es decir, las células  $\beta$  y  $\alpha$ , tienen efectos opuestos en la regulación de la glucosa en sangre, las interacciones entre células  $\beta$  y células no  $\beta$  ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) son importantes para estimular la función y regulación de las células pancreáticas endócrinas (Zhang *et al.*, 2012; Dolenšek *et al.*, 2015); por lo que la pérdida de células  $\beta$  y por tanto de dichas interacciones causa alteraciones en la morfología completa del islote. La mayor disminución en la densidad y tamaño de los islotes observadas en animales diabéticos carentes del receptor de la PRL son consistentes con los efectos reportados de esta hormona estimulando la supervivencia y proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Hyslop *et al.*, 2016) y, por ende, con la menor recuperación y la mayor severidad de la diabetes en los animales nulos para el receptor de la PRL observada en el presente estudio. Es posible que en ausencia del receptor de la PRL, la falta de cambios en el área de los islotes pequeños bajo condiciones de diabetes y la de los islotes medianos y grandes en ausencia de diabetes se deba a una compensación en la proliferación de células no-beta, lo que sugeriría que la PRL endógena también ejerce acciones modulando la proliferación y función de los otros tipos celulares. Al respecto, es posible que la ausencia de efecto de la PRL resulte en niveles alterados tanto de la insulina como de las otras hormonas pancreáticas y que esto influya sobre la regulación local de la proliferación de los distintos tipos celulares del páncreas endócrino. Estas posibilidades deberán ser analizadas mediante estudios futuros que evalúen la composición celular de los islotes de Langerhans y los niveles hormonales respectivos en los animales diabéticos carentes del receptor de PRL.

En conjunto, la destrucción de las células  $\beta$  por efecto de la STZ causa un daño parcial o total del islote pancreático. No obstante, con base en nuestros resultados, la presencia del receptor de PRL atenúa dicho efecto citotóxico y, en consecuencia, permite a la PRL disminuir la severidad de la diabetes y favorecer la recuperación de la misma. Quedan por determinar los mecanismos por los cuales la PRL ejerce dichos efectos. Específicamente, si la PRL promueve la supervivencia y proliferación de la población residual de células  $\beta$ , y de los otros tipos celulares, que sobreviven a

la citotoxicidad de la STZ y los mecanismos moleculares involucrados en sus acciones.

## 9. CONCLUSIONES

1. La PRL es una hormona que regula la homeostasis de la glucosa al promover la proliferación, supervivencia y función (síntesis y liberación de insulina) de las células  $\beta$  del páncreas.
2. La destrucción y la pérdida de la función de las células  $\beta$  del páncreas contribuyen a la patogenia de la DM. El modelo experimental de DM inducido por dosis bajas y repetidas de STZ causa la destrucción específica de las células  $\beta$  pero deja una fracción residual de células sobrevivientes. Es en dicha fracción residual de células  $\beta$  donde se propone que la PRL ejerce sus efectos protectores.
3. En este estudio utilizamos ratones carentes del receptor de la PRL donde demostramos una menor recuperación del estado hiperglucémico y una mayor severidad de la DM inducida por STZ. Además, encontramos que estas alteraciones se asocian con una mayor disminución del número y del área de los islotes pancreáticos debidas al cuadro diabético.
4. Estos resultados apoyan el efecto protector de la PRL contra el desarrollo y progresión de la DM experimental y sientan las bases para el análisis futuro de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en estas acciones hormonales.

## 10. REFERENCIAS

- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B., y Want, L. (2004). Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagón. *Diabetes Spectrum*, 17(4), 183- 190.
- Arora, S., Ojha, S. K., y Vohora, D. (2009). Characterisation of Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus in Swiss Albino Mice. *Global Journal of Pharmacology*, 3(2), 81–84.
- Basu, S., y Wiklund, L. (2011). *Studies on Experimental Models*. Humana Press: New York.



Ben-Johnathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L., y Steinmetz, R. W. (1996). Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews*, 17(6), 639-669.

Binart, N., Bachelot, A., y Bouilly J. (2010). Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(6), 362-368.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., y Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signals transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 19(3), 225-268.

Bouwens, L. (2006). Beta cell regeneration. *Current Diabetes Reviews*, 2(1), 3-9.

Bouwens, L., y Rooman, I. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiological Reviews*, 85(4), 1255-1270.

Brelje, T. C., Scharp, D. W., Lacy, P. E., Ogren L., Talamantes F., Robertson, M., Friesen, H. G., y Sorenson, R. L. (1993). Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology*, 132(2), 879-887.

Brelje, T. C., y Sorenson, R. L. (1991). Role of prolactin versus growth hormone on islte B-cell proliferation in vitro: implication for pregnacncy. *Endrocrinology*, 128(1), 45-57.

Brennand, K., y Melton, D. (2009). Slow and steady is the key to beta-cell replication. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(3), 472-487.

Cejkova, P., Fojtikova, M., y Cerna, M. (2009). Immunomodulatory role of prolactin in diabetes development. *Autoimmunity Reviews*, 9(1), 23-27.

Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., Kalafatakis, K., y Kamper, E. (2009). The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo*, 23(2), 245-258.

Damasceno, D. C., Sinzato, Y. K., Bueno, A., Netto, A. O., Dallaqua, B., Gallego, F. Q., Lessi, I. L., Corvino, S. B., Serrano, R. G., Marini, G., Piculo, F., Calderon, I. M. P., y Rudge, M. V. C. (2013). Mild Diabetes Models and Their Maternal-Fetal Repercussions. *Journal of Diabetes Research*, 2013, 473575.

Deeds, M., Anderson, J., Armstrong, A., Gastineau, D., Hiddinga, H., Jahangir, A., Eberhardt, NL., y Kudva, Y. (2011). Single Dose Streptozotocin Induced Diabetes: Considerations for Study Design in Islet Transplantation Models. *Laboratory Animals*, 45(3), 131-140.

Dolenšek, J., Rupnik, M.S., y Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, 7(1), e1024405.

Eleazu, C. O., Eleazu, K. C., Chukwuma, S., y Essien, U. N. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12, 60.

Etuk, E. U. (2010). Animal models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(2), 130-134.

Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., y Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, 80(4), 1523-1631.

Freemark, M., Avril, I., Fleenor, D., Driscoll, P., Petro, A., Opara, E., Kendall, W., Oden, J., Bridges, S., Binart, N., Breant, B., y Kelly, P. A. (2002). Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology*, 143(4), 1378-1385.

Fu, Z., Gilbert, E. R., y Liu, D. (2013). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 9(1), 25-53.

Fujinaka, Y., Takane, K., Yamashita, H., y Vasavada, R. C. (2007). Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (42), 30707-30717

Gill, G. W. (2010). H&E Staining: Oversight and Insights. *Dako Connection- Special Stains and H&E*, 14, 104-114.

Gorvin, C. M. (2015). The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 2(3), 85-91.

Graham, M. L., Janecek, J. L., Kittredge, J. A., Hering, B. J., y Schuurman, H.-J. (2011). The Streptozotocin-Induced Diabetic Nude Mouse Model: Differences between Animals from Different Sources. *Comparative Medicine*, 61(4), 356–360.

Grant, C. W., Duclos, S. K., Moran-Paul, C. M., Yahalom, B., Tirabassi, R. S., Arreaza-Rubin, G., Spain, L. M., y Guberski, D. L. (2012). Development of Standardized Insulin Treatment Protocols for Spontaneous Rodent Models of Type 1 Diabetes. *Comparative Medicine*, 62(5), 381-390.

Hartmann, K., Besch, W., y Zühlke, H. (1989). Spontaneous recovery of streptozotocin diabetes in mice. *Experimental and Clinical Endocrinology*, 93(2-3), 225-230.

Held, P. (2014). Hematoxylin and Eosin Stained Tissue. *Laboratory Manager, Applications Department, BioTek Instruments*, 20, 1-5

Holstad, M., y Sandler, S., (1999). Prolactin protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *Journal of Endocrinology*, 163(2), 229-234.

<http://www.symmation.com/portfolio/media/ghrelin-cells-in-the-pancreatic-islet/99>.

Hügl, S. R., y Merger, M. (2007). Prolactin stimulates proliferation of the glucose-dependent  $\beta$ -cell line INS-1 via different IRS-proteins. *Journal of the Pancreas*, 8(6), 739-752.

Hyslop, C. M., Tsai, S., Shrivastava, V., Santamaria, P., y Huang, C. (2016). Prolactin as an adjunct for type 1 diabetes immunotherapy. *Endocrinology*, 157(1), 150-165

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2015). Mujeres y hombres en México 2014. *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. México: INEGI.

International Diabetes Federation. (2015). *IDF Diabetes Atlas, 7 ed.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.

Jun, H. S., Khil, L. Y., y Yoon, J. W. (2002). Role of glutamic acid decarboxylase in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(11), 1892-1901

Kataoka, M., Kawamuro, Y., Shiraki, N., Miki, R., Sakano, D., Yoshida, T., Yasukawa, T., Kume, K., y Kume, S. (2013). Recovery from diabetes in neonatal mice after a low-dose streptozotocin treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(3), 1103- 1108.

Kelly, P. A., Binart, N., Lucas, B., Bouchard, B., y Goffin, V. (2001). Implications of multiple phenotype observed in prolactin receptor knockout mice. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 22(2), 140- 145.

King, A. J. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, 166(3), 877-894.

Kondegowda, N. G., Fenutria, R., Pollack, I., Orthofer, M., Garcia-Ocaña, A., Penninger, J., y Vasavada, R. C. (2015). Osteoprotegerin and Denosumab Stimulate Human Beta Cell Proliferation through Inhibition of the Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) Pathway. *Cell Metabolism*, 22(1), 77-85.

Lemini, M., Ruiz-Herrera, X., Ledesma-Colunga, M. G., Diaz-Lezama, N., De Los Rios, E. A., López-Barrera, F., Méndez, I., Martínez de la Escalera, G., Macotela, Y.,

y Clapp, C. (2015) Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: role of TGF-beta and TNF-alpha. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(9), R792–R799.

Marano, R. J., y Ben-Jonathan, N. (2014). Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Molecular Endocrinology*, 28(5), 622–633.

McCall, A. L., y Farhy, L. S. (2013). Treating type 1 diabetes: from strategies for insulin delivery to dual hormonal control. *Minerva endocrinologica*, 38(2), 145-163.

Möldrup, A., Billestrup, N., y Nielsen, J. H. (1990). Rat insulinoma cells express both a 115 kDa GH receptor and a 95 kDa PRL- receptor structurally related to the cloned hepatic receptors. *Journal of Biochemistry*, 265, 8686-8690.

Molina, P. (2013). Endocrine Pancreas. En: P. Molina (ed.), *Endocrine Physiology*, 4 ed. US: MacGraw Hill.

Mueckler, M., y Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(0), 121-138.

National Society for Histotechnology (2001). Guidelines for Hematoxylin & Eosin staining. Maryland, USA: National Society for Histotechnology.

Nielsen, J. H. (1982). Effects of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on insulin content and release, and deoxyribonucleic acid synthesis in cultured pancreatic islets. *Endocrinology*, 110(2), 600-606.

Organización Mundial de la Salud. (2016). Informe Mundial sobre la diabetes. *Resumen de orientación*. Ginebra: OMS.

Pandiri, A. R. (2014). Overview of Exocrine Pancreatic Pathobiology. *Toxicologic Pathology*, 42(1), 207-216.

Quesada, I., Tudurí, E., Ripoll, C., y Nadal, Á. (2008). Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: Role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal of Endocrinology*, 199(1), 5-19.

Radenković, M., Stojanović, M. y Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 78, 13-31

Rakieten, N., Rakieten, M. L., y Nadkarni, M. V. (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemotherapy Reports*, 29, 91–98.

Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., y Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(3), e219.

Ruiz-Herrera, X., de Los Ríos, E. A., Díaz, J. M., Lerma-Alvarado, R. M., de la Escalera, L. M., López-Barrera, F., Lemini, M., Arnold, E., de la Escalera, G. M., Clapp, C., y Macotela, Y., (2017). Prolactin Promotes Adipose Tissue Fitness and Insulin Sensitivity in Obese Males. *Endocrinology*, 158(1), 56-68.

Shrayyef, M. Z., y Gerich, J. E. (2010). Normal Glucose Homeostasis. En: L. Poretsky (ed.), *Principles of Diabetes Mellitus*, 2 ed. USA: Springer.

Sorenson, R. L., y Brelje, T. C. (2001). Regulation of Pancreatic Islets by Prolactin, Growth Hormone and Placental Lactogen. En: N. Horseman (ed.), *Prolactin*. New York: Springer Science+Business Media.

Sorenson, R. L., y Stout, L. E. (1995). Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an immunohistochemical analysis. *Endocrinology*, 136(9), 4092-4098.

Symmation. (2004-2017). Visualize science and medicine: Ghrelin Cells in the Pancreatic Islet. USA. Recuperado de:

Tesch, G. H., y Allen, T. J. (2007). Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 12(3), 261-266.

Van Belle, T. L., Taylor, P., y Von Herrath, M. G. (2009). Mouse Models for Type 1 Diabetes. *Drug discovery today: Disease models*, 6(2), 41-45.

Vetere, A., Choudhary, A., Burns, S. M., y Wagner, B. K. (2014). Targeting the pancreatic beta-cell to treat diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(4), 278-289.

Wang, T., Lu, J., Xu, Y., Li, M., Sun, J., Zhang, J., Xu, B., Xu, M., Chen, Y., Bi, Y., Wang, W., y Ning, G. (2013). Circulating Prolactin Associates With Diabetes and Impaired Glucose Regulation: A population-based study. *Diabetes Care*, 36(7), 1974-1980.

Weinhaus, A. J., Stout, L. E., Bhagroo, N. V., Brelje, T.C, y Sorenson, R. L. (2007). Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *Endocrinology*, 193(3), 367-381.

Wu, J., y Yan, L.-J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell glucotoxicity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 8, 181-188.

Wu, K. K., y Huan, Y. (2008). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols in Pharmacology*, 5, 1-14.

Yamamoto, T., Mita, A., Ricordi, C., Messinger, S., Miki, A., Sakuma, Y., Timoneri, F., Barker, S., Fornoni, A., Molano, R., Inverardi, L., Pileggi, A., e Ichii, H. (2010). Prolactin Supplementation to Culture Medium Improves Beta-Cell Survival. *Transplantation*, 89(11), 1328-1335.

Zhang, Y., Zhang, Y., Bone, R. N., Cui, W., Peng, J.-B., Siegal, G. P., Wang, H., y Wu, H. (2012). Regeneration of Pancreatic Non- $\beta$  Endocrine Cells in Adult Mice following a Single Diabetes-Inducing Dose of Streptozotocin. *PLoS ONE*, 7(5), e36675.

## 11. ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
<b>Figura 1.</b> Anatomía macroscópica del páncreas humano y de ratón	5
<b>Figura 2.</b> Composición y organización del islote de Langerhans en ratón	7
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la estreptozotocina (STZ)	12
<b>Figura 4.</b> Hormona prolactina y su receptor	16
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de glucotoxicidad de la célula $\beta$ por estreptozotocina (STZ)	18
<b>Figura 6.</b> Esquema del diseño experimental	21
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de diabetes presente en los ratones silvestres (RPRL <sup>+/+</sup> ) y nulos (RPRL <sup>-/-</sup> ) para el receptor de la PRL a lo largo de las semanas posterior a la inyección de STZ	24
<b>Figura 8.</b> Área bajo la curva del porcentaje de ratones diabéticos silvestres (RPRL <sup>+/+</sup> ) y nulos (RPRL <sup>-/-</sup> ) para el receptor de la PRL en función del tiempo	25
<b>Figura 9.</b> Curva de supervivencia de los ratones diabéticos silvestres (RPRL <sup>+/+</sup> ) y nulos (RPRL <sup>-/-</sup> ) para el receptor de la PRL	26
<b>Figura 10.</b> Niveles de glucosa en los ratones diabéticos silvestres (RPRL <sup>+/+</sup> ) y nulos (RPRL <sup>-/-</sup> ) para el receptor de la PRL	27
<b>Figura 11.</b> Ganancia de peso en ratones silvestres (RPRL <sup>+/+</sup> ) y nulos (RPRL <sup>-/-</sup> ) para el receptor de PRL diabéticos y no diabéticos al cabo de las 11 semanas del estudio.	28
<b>Figura 12.</b> Imágenes representativas de secciones centrales del páncreas teñidas con hematoxilina- eosina correspondientes a animales no diabéticos y diabéticos silvestres y nulos para el receptor de la PRL (RPRL)	30
<b>Figura 13.</b> Densidad de los islotes pancreáticos en los ratones diabéticos silvestres (RPRL <sup>+/+</sup> ) y nulos (RPRL <sup>-/-</sup> ) para el receptor de la PRL analizada a las 11 semanas posteriores a la inducción de diabetes con STZ	31

## 12.ÍNDICE DE TABLAS

*Página*

<b>Tabla 1.</b> Área de los islotes pancreáticos los ratones diabéticos diabéticos silvestres (RPRL <sup>+/+</sup> ) y nulos (RPRL <sup>-/-</sup> ) para el receptor de la PRL analizada a las 11 semanas posteriores a la inducción de diabetes con STZ	31
--	----