



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA PROLACTINA EN EL TEJIDO ADIPOSO Y EN LA RESISTENCIA
A LA INSULINA DURANTE LA OBESIDAD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. en C. XARUBET RUIZ HERRERA

TUTOR

DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

QUERÉTARO, 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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Yazmín Macotela Guzmán. Trabajo financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con los proyectos 261168, 164423 y 174984 y la beca número 245847.

Agradecimientos

A la Dra. Yazmín Macotela, por ser el pilar del proyecto, por la confianza que me brindó para realizarlo y por compartir sus conocimientos conmigo.

A mi Comité tutor por sus aportaciones al proyecto: Dr. Mauricio Díaz y Dr. Emilio Rojas.

A la Dra. Carmen Clapp y al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera por permitir ser parte de su equipo de trabajo.

A la M. en C. Ericka Alejandra de los Ríos Arellano por su ayuda invaluable en los experimentos.

Al apoyo técnico del Nutriólogo. Fernando López y el M. en C. Gabriel Nava.

A los laboratoristas Daniel Mondragón y Antonio Prado.

A todos los miembros de los laboratorios A-14 (Endocrinología Molecular) y A-15 (Neuroendocrinología de la Reproducción) del Instituto de Neurobiología.

La asistencia técnica en el bioterio del MVZ. José Martín García y la Dra. Alejandra Castilla.

A la Lic. Lourdes Ayala por su ayuda en las videoconferencias.

La asesoría de la M. en C. Leonor Casanova Rico, responsable de la Unidad de Enseñanza.

Para

Mi mamá, que no tengo palabras para expresar su importancia, simplemente me dio la vida.

Mis hermanas, por su compañía y ayuda.

Mi esposo, por su paciencia, lealtad y, sobre todo, su amor.

Y para el amor de mi vida... **MI HIJO.**

ÍNDICE

Página

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	x
PRESENTACIÓN	xi
I. ANTECEDENTES	1
I.1 Obesidad	1
I.2 Tejido adiposo	4
<i>I.2.1 Tejido adiposo blanco</i>	6
<i>I.2.2 Adipocinas</i>	7
<i>I.2.3 Disfuncionalidad del tejido adiposo</i>	11
I.3 Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina	14
I.4 Prolactina.....	16
<i>I.4.1 Prolactina como regulador del peso corporal</i>	17
<i>I.4.2 Prolactina como regulador de la ingesta de alimento</i>	18
<i>I.4.3 Efectos metabólicos de la prolactina en el páncreas</i>	19
<i>I.4.4 Efectos metabólicos de la prolactina en el tejido adiposo</i>	20
II. JUSTIFICACIÓN	24
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVOS	26
IV.1 General	26
IV.2 Específicos.....	26
V. METODOLOGÍA	27
V.1 Diseños experimentales.....	27
VI. RESULTADOS	28

VI.1 Artículo 1 – Prolactin promotes adipose tissue fitness and insulin sensitivity in obese males	29
VII. DISCUSIÓN	44
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. PERSPECTIVAS.....	52
X. REFERENCIAS.....	53
XI. ÍNDICE DE FIGURAS	68
XII. ÍNDICE DE TABLAS	69
XIII. ANEXOS	70
XIII.1 Artículo 2 – Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: role of TGF- β and TNF- α	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil CoA carboxilasa
ADIPOQ	Adiponectina
AdipoR1	Receptor de adiponectina 1
AdipoR2	Receptor de adiponectina 2
AKT	Cinasa de serina/treonina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
CCL2	Gen de la proteína quimioatrayente de monocitos
CEBPα	Proteína alfa de unión al potenciador CCAAT
CEBPβ	Proteína beta de unión al potenciador CCAAT
DC	Dieta control
DG	Dieta alta en grasas
FAS	Sintasa de ácidos grasos
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
G6Pasa	Glucosa 6 fosfatasa
GLUT2	Transportador 2 de glucosa
GLUT4	Transportador 4 de glucosa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de masa corporal
IRS	Sustrato del receptor de insulina
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
LPL	Lipoproteína lipasa
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MCP1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PKC	Proteína cinasa c
PPARγ	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas
PRL	Prolactina
RE	Retículo endoplásmico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RPRL	Receptor de prolactina
<i>rPrl</i>-/-	Ratones carentes del receptor de prolactina
SNP	Polimorfismos de nucleótido simple
STAT5	Transductor de señal y regulador de la transcripción 5
TAB	Tejido adiposo blanco
TAC	Tejido adiposo café
TLR	Receptor tipo toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF	Factores asociados a los receptores de TNF α
UCP1	Proteína desacoplante 1
Xbp1s	Isoforma por corte y empalme de la proteína 1 de unión a la caja X

RESUMEN

La obesidad se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa corporal, deriva en la disfunción del tejido adiposo y la resistencia a la insulina, factores determinantes para el desarrollo de diabetes tipo 2, daños cardiovasculares, y otras patologías. Entender como la disfunción del tejido adiposo (hipertrofia y alteración en la producción de adipocinas) altera la homeostasis metabólica es esencial para el desarrollo de terapias efectivas contra la obesidad y sus comorbilidades. Un factor que puede favorecer la función del tejido adiposo y la sensibilidad a la insulina es la hormona prolactina (PRL). Existen evidencias de que bajos niveles de PRL en suero correlacionan con mayor prevalencia de obesidad, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico en humanos y roedores; sin embargo, se desconoce si estos bajos niveles de PRL en suero contribuyen al desarrollo de dichas alteraciones metabólicas. En este trabajo, evaluamos si la PRL promueve la sensibilidad a la insulina y la función del tejido adiposo durante la obesidad, en modelos de ganancia y pérdida de función en roedores obesos, así como en análisis de correlación en humanos. Encontramos que la PRL mejora la sensibilidad a la insulina; ratas con obesidad inducida por una dieta alta en grasas (DG) mostraron niveles bajos de PRL en suero, mientras que el tratamiento con PRL mejoró su sensibilidad a la insulina. Por el contrario, en ratones carentes del receptor de PRL (*rPrl^{-/-}*) se agravó la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa inducidas por una DG, en comparación con los animales silvestres. En concordancia, pacientes con resistencia a la insulina presentaron bajos niveles de PRL en suero comparados con los pacientes sensibles a la insulina. Además, encontramos que la PRL preserva la funcionalidad del tejido adiposo; en ratas obesas, el tratamiento con PRL previno la hipertrofia de los adipocitos e incrementó su hiperplasia, mientras que ratones *rPrl^{-/-}* alimentados con DG mostraron mayor hipertrofia de los adipocitos. Asimismo, en humanos, los niveles de PRL en suero se correlacionaron positivamente con la expresión de marcadores de funcionalidad del tejido adiposo como *PPARG*, adiponectina y *GLUT4*. Los posibles mecanismos que median los efectos de PRL, involucran un incremento en la expresión de los factores de transcripción *Pparg* y *Xbp1s* en el tejido adiposo visceral, disminución de la inflamación del tejido adiposo y elevación de los niveles de adiponectina en suero, factores que favorecen la

sensibilidad a la insulina. En conclusión, nuestro trabajo demuestra que la PRL es un promotor novedoso de la funcionalidad del tejido adiposo y la sensibilidad a la insulina y que el incremento de los niveles de PRL puede tener un potencial terapéutico contra las alteraciones metabólicas derivadas de la obesidad.

ABSTRACT

Obesity is characterized by excessive accumulation of body fat, and leads to adipose tissue dysfunction and insulin resistance, factors that trigger the development of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and other pathologies. Understanding how adipose tissue dysfunction alters metabolic homeostasis is essential to develop effective therapies against obesity and its comorbidities. The hormone prolactin (PRL) is one factor that may regulate adipose tissue function and insulin sensitivity. Recent evidence shows that low serum levels of PRL correlate with prevalence of obesity, type 2 diabetes and metabolic syndrome in humans and rodents; however, whether low serum PRL levels contribute to the development of these metabolic diseases, is unknown. In this work, we evaluated whether PRL promotes insulin sensitivity and adipose tissue fitness during obesity by gain and loss of function experiments in rodents and also by correlation analyses in humans. We found that PRL improves insulin sensitivity; high fat diet (HFD)-induced obese rats showed reduced serum PRL levels, while PRL treatment improved their insulin sensitivity. Conversely, PRL receptor knockout mice (*Prlr*^{-/-}) showed aggravated insulin resistance and glucose intolerance upon HFD feeding, compared to their wild type pairs. In agreement, patients with insulin resistance had low serum PRL levels compared to insulin sensitive subjects. Also, we found that PRL preserves the functionality of the adipose tissue; in obese rats, PRL treatment prevented adipocyte hypertrophy and increased their hyperplasia, while *Prlr*^{-/-} mice fed a HFD showed higher adipocyte hypertrophy. Moreover, in humans, serum PRL levels correlated positively with the expression of markers of adipose tissue functionality such as *PPARG*, adiponectin and *GLUT4*. The possible mechanisms that mediate PRL effects involve increased expression of the transcription factors *Pparg* and *Xbp1s* in visceral adipose tissue, decreased adipose tissue inflammation and elevated serum adiponectin levels, factors known to promote adipose tissue fitness and insulin sensitivity. In conclusion, PRL is a novel promoter of adipose tissue functionality and insulin sensitivity, and increased PRL levels have therapeutic potential against metabolic alterations induced by obesity.

PRESENTACIÓN

En la presente tesis evaluamos el papel de la PRL en la función del tejido adiposo y en la sensibilidad a la insulina en condiciones de obesidad. Dado que los niveles de PRL circulante se reducen en humanos y roedores con distintas alteraciones metabólicas, analizamos el efecto de incrementar los niveles de PRL en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas (DG). Además, evaluamos el comportamiento metabólico de animales carentes de los receptores de PRL alimentados con una DG (modelo que nos ayudó a evaluar la ausencia de la señalización de la PRL). Y finalmente, analizamos posibles correlaciones entre los niveles de PRL circulante y marcadores de funcionalidad en el suero y en el tejido adiposo en humanos. La principal conclusión del trabajo es que la PRL promueve el funcionamiento del tejido adiposo y la sensibilidad a la insulina bajo un insulto de obesidad.

Se presenta información general sobre los temas que nos ayudan a entender el contexto del trabajo en la sección de antecedentes, y posteriormente se esquematizan los modelos experimentales utilizados durante el proyecto en la sección de metodología. Los resultados derivados de la tesis se presentan en el **Artículo 1**: Ruiz-Herrera X, de los Ríos EA, Díaz JM, Lerma-Alvarado RM, Martínez de la Escalera L, López-Barrera F, Lemini M, Arnold E, Martínez de la Escalera G, Clapp C, Macotela Y. (2017). **Prolactin promotes adipose tissue fitness and insulin sensitivity on obese males.** *Endocrinology* 158 (1): 56-68. Hacia el final de la tesis se presenta una discusión y conclusión general del proyecto, finalizando con algunas perspectivas experimentales que se originaron a partir de las conclusiones del trabajo.

Como anexo se presenta el **Artículo 2** en el cual fungí como segundo autor, en el que se demuestra que ratas alimentadas con una DG presentan bajos niveles de PRL en suero: Lemini M, Ruiz-Herrera X, Ledesma-Colunga MG, Díaz-Lezama N, de los Ríos EA, López-Barrera F, Méndez I, Martínez de la Escalera G, Macotela Y*, Clapp C. (2015). **Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels**

are reduced obese and diabetic rats: role of TGF- β and TNF- α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308: R792-R799. * Autor de correspondencia.

I. ANTECEDENTES

I.1 Obesidad

La obesidad se define como el almacenamiento excesivo de grasa corporal, se presenta cuando existe una alimentación alta en calorías y baja actividad física (Balistreri et al., 2010). Esta condición declarada como enfermedad por la Academia Americana de Medicina en 2012 ha alcanzado proporciones epidémicas y es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial (Kaila y Raman, 2008). Actualmente, la obesidad en adultos se diagnostica a partir del Índice de Masa Corporal (IMC) por su bajo costo y simplicidad, definida por el peso en kilogramos dividido por la estatura en metros cuadrados (kg/m^2). Según la Organización Mundial de la Salud se clasifica a una persona con sobrepeso cuando su IMC es mayor a 25 kg/m^2 y como obesa, cuando es superior a 30 kg/m^2 . En los últimos años el uso de la circunferencia de cintura ha cobrado relevancia debido a la evidencia que muestra a la obesidad abdominal, en lugar de la grasa corporal total, como un predictor de alteraciones metabólicas diversas como enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (Nguyen y El-Serag, 2010).

La obesidad es causada por una interacción compleja entre factores ambientales, predisposición genética y de comportamiento. Entre los factores ambientales se considera el alto consumo de calorías, el aumento en el consumo de alimentos poco saludables y con gran contenido de azúcares simples, grasas saturadas, sal, edulcorantes, conservadores y saborizantes artificiales aunado a la falta de actividad física de los pacientes (Kipke et al., 2007). Respecto a la predisposición genética, varios estudios muestran que existe una tasa del 40-70 % de heredabilidad del IMC (Heymsfield y Wadden, 2017). Se conocen alrededor de 11 tipos de obesidad monogénica, originadas por la mutación de genes como leptina y los receptores de melanocortina 4 (Andreasen y Andersen, 2009), que actúan principalmente en el hipotálamo y participan en la regulación de la homeostasis energética (Pigeyre et al., 2016), aunque también se ha investigado que los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) participan en la susceptibilidad genética a la enfermedad (Tiret et al., 2002). Sin embargo, los SNPs asociados al IMC identificados hasta el momento, en

conjunto explican solamente un 1 % en la variación en el IMC (McCarthy, 2010; Nguyen y El-Serag, 2010).

Tabla 1. Medicamentos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos para el control a largo plazo del peso corporal (Heymsfield y Wadden, 2017).

MEDICAMENTO	MECANISMO DE ACCIÓN
Orlistat	Inhibidor de lipasa pancreática y gástrica, resultando en una mala absorción de grasas y reduciendo la ingesta neta de energía.
Lorcaserina	Agonista selectivo del receptor 5HT _{2C} ; promueve la saciedad y reduce la ingesta de alimento.
Liraglutida	Agonista GLP-1, retarda el vaciamiento gástrico para reducir la ingesta de alimento.
Fentermina-topiramato	Agente liberador de norepinefrina (fentermina), modulador del receptor GABA (topiramato); disminuye el apetito para disminuir la ingesta de alimento.
Naltrexona-bupropión	Antagonista opioide (naltrexona), inhibidor de la reabsorción de dopamina y norepinefrina (bupropión); actúa en vías del Sistema Nervioso Central para reducir la ingesta de alimento.

Hasta el momento los tratamientos para la obesidad incluyen cambios en el estilo de vida, tratamiento psicológico, y en casos extremos farmacoterapia y cirugía bariátrica (Kaila y Raman, 2008). El cambio en el estilo de vida está diseñado para modificar el comportamiento alimentario y la actividad física que son las primeras opciones para el control de peso corporal por su bajo costo y su mínimo riesgo de generar complicaciones (Heymsfield y Wadden, 2017). Por su parte, la farmacoterapia está indicada como un complemento para una dieta reducida en calorías y un aumento de actividad física. Sin embargo, los medicamentos son considerados para pacientes que presentan un IMC mayor a 30 kg/m² (Apovian et al., 2015). Existen 5 medicamentos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para el control de peso a largo plazo que incluyen 3 drogas simples y 2 combinadas (Tabla 1) (Heymsfield y Wadden, 2017). La pérdida de peso

con estos medicamentos varia de un 6-10 % del peso corporal original, sin embargo, un alto porcentaje de pacientes recupera el peso perdido tras finalizar el tratamiento y su consumo genera efectos secundarios no deseados (Heymsfield y Wadden, 2017). En los últimos años se ha incrementado la práctica de la cirugía bariátrica para el control de peso corporal, debido a que ha aumentado la proporción de pacientes con IMC mayor a 40 kg/m², sin embargo, estos procedimientos representan un alto riesgo para el paciente (Schauer et al., 2016). Existen varios tipos de cirugías bariátricas, la banda gástrica ajustable por vía laparoscópica es la menos invasiva y la más segura, este procedimiento es reversible y no causa cambios anatómicos en el intestino (Heymsfield y Wadden, 2017). Las cirugías bariátricas disminuyen el peso corporal en un rango del 15-30 % del peso original y remiten las alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad como la diabetes tipo 2 (Heymsfield y Wadden, 2017) aunque en un período de 10 años los pacientes pueden recuperar un 5-10 % de peso corporal (Courcoulas et al., 2015). Las limitaciones de estas cirugías radican en el alto costo inicial, riesgo de complicaciones a corto y largo plazo (Puzziferri et al., 2014) y que aproximadamente del 5-20 % de los pacientes recuperan su peso original (Ikramuddin et al., 2015).

El peligro de acumular un exceso de grasa corporal radica en que este es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar alteraciones metabólicas entre las que se encuentran la diabetes tipo 2, hipertensión, aterosclerosis, hígado graso, enfermedad de Alzheimer, cáncer, dislipidemias, enfermedades cardiovasculares y resistencia a la insulina (Tran y Kahn, 2010). Sin embargo, no todos los individuos obesos desarrollan alteraciones metabólicas, existe un fenotipo que fue descrito en 1982 como “obeso metabólicamente sano” (Samocha-Bonet et al., 2014). Estos pacientes presentan un exceso de grasa corporal, manteniendo su sensibilidad a la insulina, desarrollan una expansión saludable del tejido adiposo sin presentar inflamación ni problemas cardiovasculares (Primeau et al., 2011). Pese a esto, existe información de que cerca del 30 % de los pacientes metabólicamente sanos en un lapso de 5-10 años desarrollan alteraciones metabólicas secundarias (Appleton et al., 2013), debido a una suma de factores como el envejecimiento, la ganancia de peso adicional y una vida sedentaria (Samocha-Bonet et al., 2014).

La acumulación excesiva de grasa que se presenta durante la obesidad se almacena principalmente en el tejido adiposo, el cual se considera como un órgano endócrino capaz de mantener la homeostasis energética en condiciones fisiológicas pero también de contribuir con la patogénesis de la obesidad (Wozniak et al., 2009).

I.2 Tejido adiposo

El tejido adiposo es un órgano que realiza funciones esenciales en condiciones fisiológicas (Sun et al., 2011); es de origen mesenquimal, y además de tener una función especializada en el almacenamiento de grasa corporal, se le conoce como el regulador maestro de la homeostasis energética sistémica (Scherer, 2006), ya que almacena y libera ácidos grasos y secreta hormonas y citocinas, conocidas como adipocinas (Brandebourg et al., 2007), por lo que actualmente se le reconoce como un órgano endócrino (Coelho et al., 2013). Aunque el 90% del volumen del tejido adiposo lo constituyen adipocitos maduros que son las células especializadas en el almacenamiento de lípidos, existe una gran variedad de tipos celulares que integran la fracción estromal-vascular: los preadipocitos que son células unipotenciales comprometidos al linaje de adipocitos (Ben-Jonathan et al., 2008), fibroblastos, células endoteliales, pericitos, células inmunes (macrófagos, células T, neutrófilos y linfocitos) y células pluripotenciales que pueden dar origen a distintos tipos celulares incluyendo a los propios adipocitos maduros (Cook y Cowan, 2008). Además de esto, el tejido adiposo es capaz de modular funciones de diversos órganos metabólicos como el cerebro, hígado, páncreas y músculo, y de regular el balance de energía y la sensibilidad a la insulina (Ahima, 2006).

En mamíferos existen dos tipos de tejido adiposo, el café (TAC-tejido adiposo café) y el blanco (TAB-tejido adiposo blanco), los cuales no sólo tienen diferentes funciones, sino que cuentan con una localización y composición celular diferente (Figura 1). El TAC metaboliza los ácidos grasos y libera energía en forma de calor, a través de la actividad de la proteína desacoplante 1 (UCP-1) (Whittle et al., 2011), sus características principales son un alto contenido de mitocondrias y bajo almacenamiento de lípidos (Whittle et al., 2011). Mientras que el TAB regula la homeostasis de la energía a través de almacenar triglicéridos en condiciones de posprandio, liberar ácidos grasos durante episodios de ayuno, secretar múltiples

moléculas que afectan la ingesta de alimento, el balance energético, la sensibilidad a la insulina, y el metabolismo de lípidos y glucosa. Los adipocitos del tejido adiposo blanco se caracterizan por contener una sola gota lipídica que ocupa el 95% de su volumen, y el tamaño de las células oscila entre 20-200 micrómetros (Lee et al., 2013).

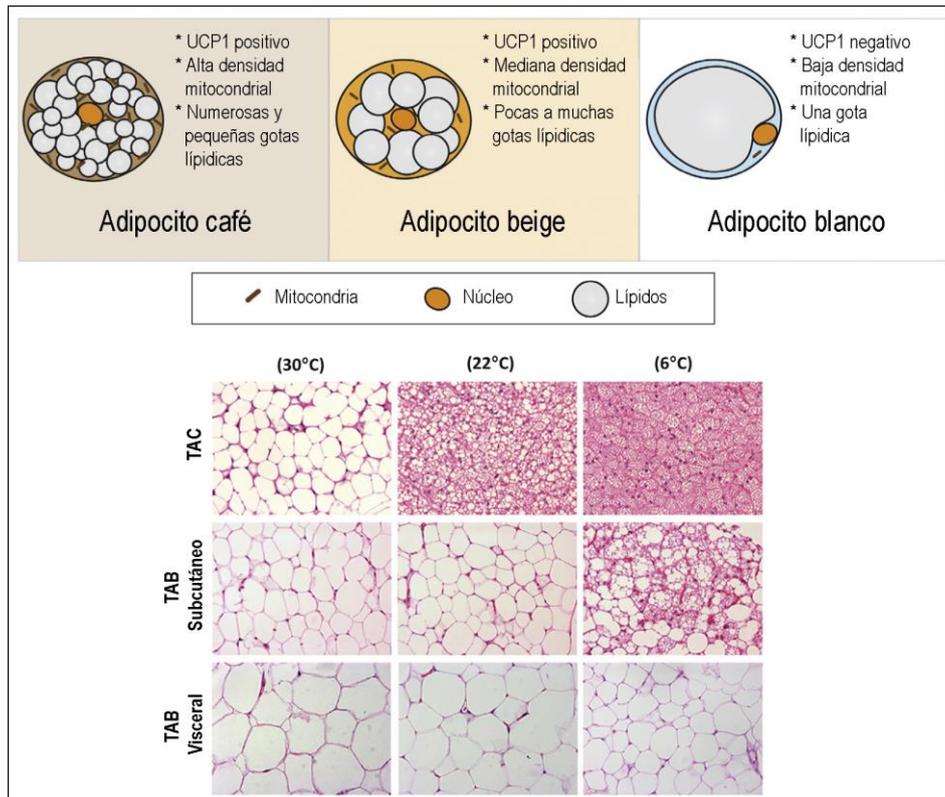


Figura 1. Anatomía del tejido adiposo y su plasticidad en respuesta a temperatura. Se muestran las diferencias morfológicas y funcionales entre los adipocitos cafés, beige y blancos. Así como el remodelamiento del tejido adiposo café (TAC) y tejido adiposo blanco (TAB) subcutáneo sensible a temperatura en ratones macho de 13 semanas de edad, tinción H&E (Sanchez-Gurmaches et al., 2016).

En roedores, existen otros tipo de adipocitos llamados beige, inducidos por una exposición prolongada al frío o con agonistas adrenérgicos (Rosen y Spiegelman, 2014). Estas células expresan un patrón génico similar a los adipocitos cafés, pero están localizados dentro del TAB subcutáneo (Figura 1). Por su parte los adipocitos blancos y los beige derivan de precursores celulares Pax7⁺/Myf5⁻ (Figura 2), mientras

que los adipocitos cafés derivan de los mismos precursores que las células del músculo esquelético Pax7⁺/Myf5⁺ (Rosen y Spiegelman, 2014).

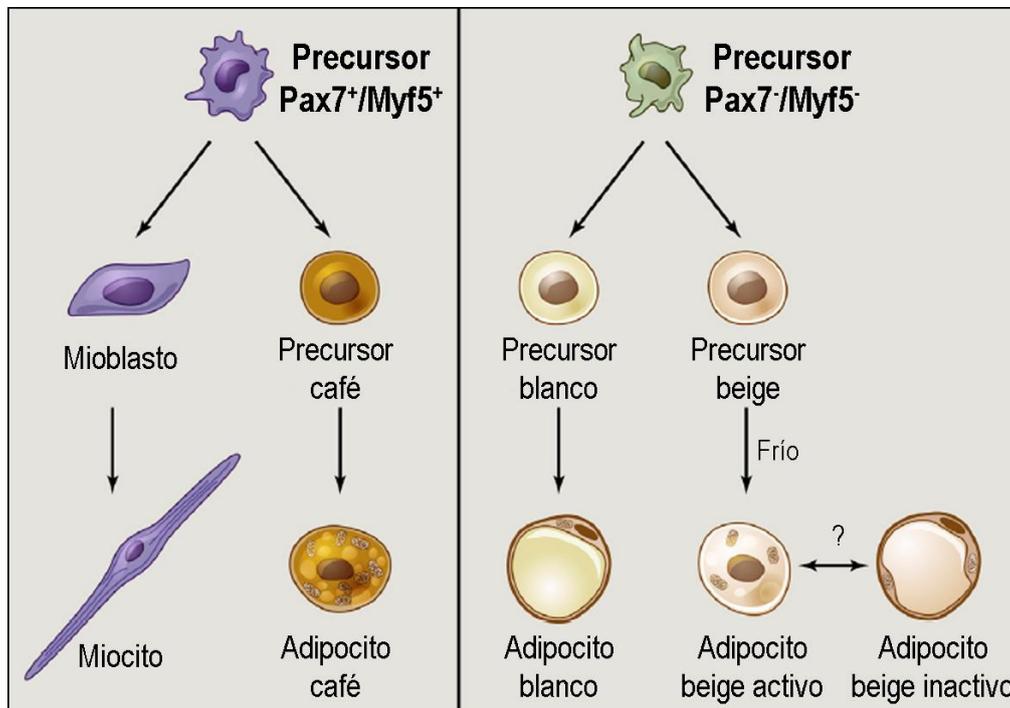


Figura 2. Células precursoras de los adipocitos cafés, beige y blancos. Las células del tejido adiposo café se derivan del mismo precursor que los miocitos, mientras que los adipocitos beige y blancos comparten el mismo progenitor (Rosen y Spiegelman, 2014).

1.2.1 Tejido adiposo blanco

El TAB se clasifica dependiendo de su localización en visceral y subcutáneo. Es importante destacar que el aumento de TAB visceral, incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas, mientras que el aumento del subcutáneo no ejerce tal riesgo (Ahima, 2006). Los depósitos de grasa subcutánea son los que se encuentran debajo de la piel de glúteos, abdomen y muslos. La grasa visceral son los depósitos de grasa mesentérica, omental y perirrenal (Cook y Cowan, 2008); la grasa visceral que se encuentra dentro de la cavidad abdominal que rodea a los órganos internos representa alrededor del 20% de la grasa corporal total en hombres y el 6% en la mujeres (Wajchenberg et al., 2002). Los adipocitos de ambos tejidos tienen distintas características, por ejemplo, presentan patrones diferenciales de

expresión de genes, y son morfológica y funcionalmente diferentes (Gesta et al., 2007).

El tejido adiposo se puede expandir mediante dos mecanismos: hipertrofia (aumento del tamaño de las células) e hiperplasia (aumento del número de células) (Otto y Lane, 2005). A su vez, la hiperplasia involucra el reclutamiento de preadipocitos y su consecutiva proliferación y diferenciación en adipocitos maduros (Tang y Lane, 2012). El proceso de diferenciación de los preadipocitos para generar adipocitos maduros es conocido como adipogénesis (Rosen y Spiegelman, 2000). Diversos estudios han demostrado que el proceso de adipogénesis está definido por un gran número de factores que incluyen la edad, hormonas, especie y depósito de tejido adiposo (Kim et al., 2010). Entre los factores transcripcionales más importantes para estimular la diferenciación de los preadipocitos están PPAR γ (receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas) y CEBP α (proteína alfa de unión al potenciador CCAAT) los cuales estimulan la diferenciación, incluyendo cambios morfológicos, acumulación de lípidos, y expresión de genes característicos de células maduras (Rosen y Spiegelman, 2006). Además, el recambio de adipocitos se mantiene a lo largo de la vida mediante un fino equilibrio entre el proceso de adipogénesis y la apoptosis, que requiere una fuente constante de células progenitoras (Kusminski et al., 2016). La vida media de un adipocito en humanos adultos es de 10 años y al año se renueva el 10% de ellos (Spalding et al., 2008).

Como se mencionó anteriormente, el TAB secreta una gran variedad de hormonas y citocinas (se habla de más de 600) (Bluher, 2014), entre las que destacan adiponectina, leptina, factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), entre otras (Kusminski et al., 2016); aunado a esto, los adipocitos también tienen la capacidad de liberar lípidos como las ceramidas y esfingosinas que también sirven como moléculas de señalización (Holland y Summers, 2008).

1.2.2 Adipocinas

Adiponectina: es secretada exclusivamente por el tejido adiposo y es una proteína muy abundante en el plasma (Galic et al., 2010). La adiponectina circula en forma de trímeros, hexámeros o formando un complejo de alto peso molecular (Ahima, 2006).

Esta adipocina tiene dos receptores (AdipoR1 y AdipoR2), y su unión resulta en un incremento en la activación de AMPK (proteína cinasa activada por AMP), activación de PPAR γ y activación de la vía de señalización de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (Maeda et al., 2001; Yamauchi et al., 2002). Las funciones metabólicas de la adiponectina (Figura 3) engloban el incremento de la acción de la insulina en el hígado, suprime la entrada de ácidos grasos en el hígado (Berg et al., 2001), potencia la absorción de glucosa en el hígado y músculo esquelético (Yamauchi et al., 2002) e incrementa la oxidación de ácidos grasos (Fruebis et al., 2001).

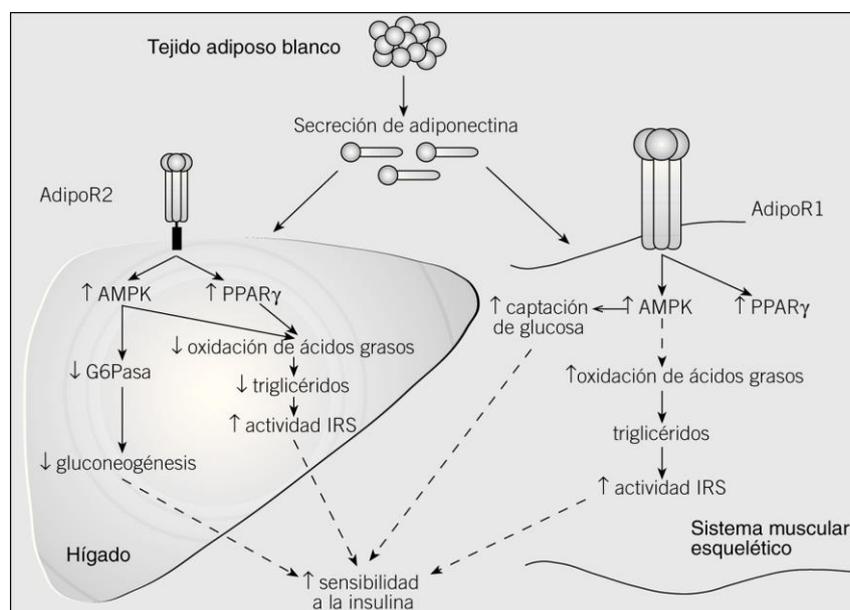


Figura 3. Funciones metabólicas de la adiponectina. Funciones de la adiponectina en el hígado y músculo esquelético. AdipoR1: Receptor a adiponectina 1, AdipoR2: Receptor a adiponectina 2, AMPK: Proteína cinasa activada por AMP, PPAR γ : Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas, G6Pasa: Glucosa 6 fosfatasa, IRS: Sustrato del receptor de insulina (Palomer et al., 2005).

Existe una fuerte correlación inversa entre la concentración de adiponectina en plasma y la masa corporal, ya que durante la obesidad se reducen los niveles de adiponectina mientras que una pérdida de peso incrementa los niveles de la misma (Matsubara et al., 2002). Se ha visto claramente que la adiponectina estimula la sensibilidad a la insulina en modelos de obesidad y esto se debe a su efecto favoreciendo la oxidación de ácidos grasos y la absorción de glucosa en el músculo

esquelético y en el tejido adiposo (Galic et al., 2010). Aunado a esto, la adiponectina también tiene efectos antiinflamatorios, ya que disminuye la activación y proliferación de células T, disminuye la expresión de *TNF α* e *IL6* e incrementa la expresión de interleucina 10 (*IL10*), citocina antiinflamatoria (Yang et al., 2001).

Leptina: es una proteína de 167 aminoácidos secretada principalmente por el TAB y es considerada como una citocina proinflamatoria (Galic et al., 2010), sin embargo, también se ha identificado en la pared gástrica, pared vascular, placenta, ovarios, músculo esquelético e hígado (Koerner et al., 2005). Fue la primera adipocina identificada y es codificada por el gen *ob* (Singla et al., 2010). Su receptor no sólo se expresa en el sistema nervioso central, sino que también se encuentra en tejidos periféricos (células del sistema inmune y hematopoyéticas), sugiriendo que la leptina tiene otras funciones además de regular la ingesta de alimento (Galic et al., 2010; Itoh et al., 2011). Entre sus funciones se encuentra la inhibición del apetito, estimulación de la termogénesis, aumenta la oxidación de ácidos grasos, disminuye el peso corporal y los depósitos de grasa, regulación de la sensibilidad a la insulina y reproducción (Schwartz et al., 2000; Ahima, 2006). La regulación de la leptina está mediada en gran parte por la acción de la insulina, los niveles de leptina disminuyen en respuesta a bajos niveles de insulina y sus niveles se incrementan con la alimentación o en respuesta a la estimulación de insulina (Laclaustra et al., 2007). Además, se sintetiza en mayor cantidad en el TAB subcutáneo comparado con el visceral, siendo mayor en hembras debido a que presentan mayor proporción de tejido subcutáneo (Coelho et al., 2013). Los niveles circulantes de esta adipocina se incrementan con la ganancia de peso y disminuyen con la pérdida de peso (Havel et al., 1996), mientras que la deficiencia de leptina causa obesidad severa (Singla et al., 2010). Además, existe una correlación positiva entre los niveles circulantes de leptina en suero y la masa de tejido adiposo. Durante la obesidad se presentan altos niveles de leptina en suero, desarrollándose un proceso de resistencia a esta adipocina (Singla et al., 2010), es decir, la pérdida de función de la leptina. Se ha sugerido que la resistencia a la leptina se puede desencadenar por el transporte insuficiente de esta adipocina al cerebro, ya que los pacientes con obesidad presentan menores niveles de leptina en el fluido cerebroespinal comparado con sus niveles en plasma (Matarese et al., 2005); además la reducción de la transducción

de la señal del receptor de leptina es otra causa que provoca la resistencia a la leptina (Singla et al., 2010). Aunado a esto, los mecanismos de resistencia a la leptina propuestos recientemente incluyen estrés del retículo endoplásmico (RE) y disfunción mitocondrial en el hipotálamo (Londrville et al., 2014).

Resistina: se llama así debido a su efecto favoreciendo la resistencia a la insulina. Fue descubierta en el 2001, es un péptido pequeño de 12.5 kDa (Galic et al., 2010), formado por 114 aminoácidos. Sus niveles se incrementan en pacientes obesos (Steppan et al., 2001) y son disminuidos por el efecto de drogas como la rosiglitazona (Coelho et al., 2013). Promueve la resistencia a la insulina a través de incrementar la gluconeogénesis hepática. Considerada como una molécula proinflamatoria ya que incrementa la liberación de TNF- α e IL-6 (Kusminski et al., 2005). No es sólo secretada por el tejido adiposo, células del sistema inmune también la producen. Su liberación parece ser estimulada por inflamación, lipopolisacáridos, IL-6, hiperglicemia y hormona de crecimiento (Coelho et al., 2013). Se ha observado que su expresión es mayor en preadipocitos comparada con adipocitos maduros, indicando que es un regulador de la adipogénesis (Steppan et al., 2001).

Citocinas proinflamatorias: El tejido adiposo también sintetiza TNF- α e IL-6. Se sabe que los adipocitos sintetizan TNF- α , sin embargo, no son las únicas células del tejido adiposo que participan en la producción de esta citocina durante la obesidad, ya que los macrófagos de este tejido y los que se infiltran durante el desarrollo de la enfermedad tienen un papel muy importante en su producción (Coelho et al., 2013). Existen varios estudios que relacionan la expresión de TNF α en el tejido adiposo durante la obesidad con el proceso de resistencia a la insulina; ya que se ha mostrado que esta citocina puede dañar la vía de señalización de la de insulina en el hígado, en el músculo y en el tejido adiposo (Cai et al., 2005). Por otro lado, en humanos el 30 % de la IL-6 circulante proviene del tejido adiposo, su expresión es más alta en el TAB visceral comparado con el tejido subcutáneo (Coelho et al., 2013). Sus niveles también incrementan durante la obesidad, siendo estimulados por TNF- α e interleucina 1 beta (IL-1 β) (Coelho et al., 2013). De manera general la IL-6 inhibe la

lipoproteína lipasa, induce lipólisis e incrementa la absorción de glucosa (Galic et al., 2010).

1.2.3 Disfuncionalidad del tejido adiposo

Aunque el TAB tiene una gran capacidad para cambiar sus dimensiones en respuesta del estado nutricional, durante la obesidad, la función del TAB se altera y se deteriora su capacidad de expansión para contener contra el almacenamiento excesivo de grasa corporal (Kusminski et al., 2016). Desde una perspectiva molecular las alteraciones que sufre el TAB durante la expansión no saludable inducida por la obesidad, incluyen modificaciones en la composición de su matriz extracelular provocando fibrosis, menor vascularización (hipoxia), aumento en el tamaño y número de adipocitos, mayores niveles de estrés oxidativo, daño en la función mitocondrial, perfil de secreción de adipocinas alterado, un estado inflamatorio e infiltración de células inmunes (Sun et al., 2011; Kusminski y Scherer, 2012) (Figura 4).

Entre las principales adipocinas que se alteran durante la expansión no saludable del TAB es un incremento de factores proinflamatorios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, interleucina 8 (IL-8), leptina, resistina y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP1) con una reducción de factores antiinflamatorios como IL-10 y adiponectina (Sun et al., 2011). Durante el desarrollo de la obesidad, el tejido adiposo es blanco de la infiltración de monocitos que responden a señales como MCP1, y estas células inmunes incrementan la cantidad de moléculas inflamatorias que junto con el exceso de lípidos en la circulación provocan el desarrollo de resistencia a la insulina en diversos tejido y alteraciones metabólicas sistémicas (Weisberg et al., 2003). Las células inmunes residentes del TAB y los monocitos recién reclutados se polarizan a macrófagos proinflamatorios M1 (Lumeng et al., 2007). Los macrófagos M1 desregulan la señalización local de los adipocitos, dañando la sensibilidad a la insulina (Sun et al., 2011), principalmente por su secreción de citocinas proinflamatorias y por rodear a los adipocitos apoptóticos creando estructuras tipo corona (Lumeng et al., 2007). Aunado a esto se ha reportado que los macrófagos favorecen el desarrollo de hipertrofia en el tejido adiposo a través de inhibir la diferenciación de los preadipocitos (Heilbronn y Campbell, 2008).

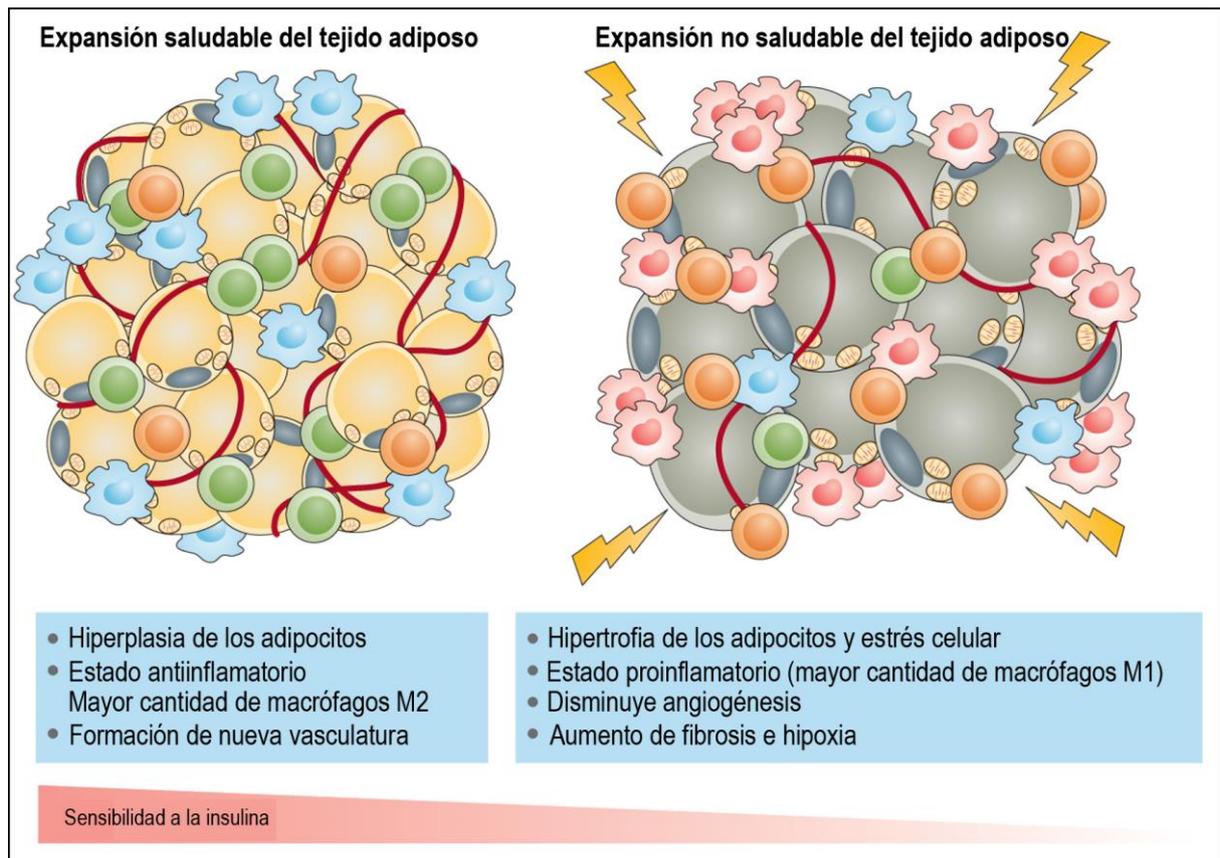


Figura 4. Comparación entre la expansión saludable y no saludable del tejido adiposo.

La expansión saludable del tejido adiposo se caracteriza por un estado antiinflamatorio y suficiente vascularización que mantiene el crecimiento del tejido por hiperplasia, mientras que la expansión no saludable presenta un estado proinflamatorio, fibrosis, hipoxia y una deficiente vascularización que provoca el crecimiento del tejido adiposo por hipertrofia, provocando pérdida de sensibilidad a la insulina (Kusminski et al., 2016).

Por otro lado, el TAB disfuncional desarrolla cierto grado de fibrosis e hipoxia. La fibrosis es una consecuencia patológica de la desregulación de la matriz extracelular, esta matriz funciona como anclaje de los adipocitos y su rigidez, composición y remodelación son factores cruciales para la capacidad de expansión del TAB (Sun et al., 2011). La fibrosis se caracteriza por una abundancia de proteínas de la matriz extracelular, particularmente colágeno (Kusminski et al., 2016). Entre mayor es la flexibilidad de la matriz extracelular existe mayor espacio para que el TAB se pueda expandir de una manera saludable; sin embargo, si la matriz extracelular no es flexible, los adipocitos no pueden almacenar adecuadamente los lípidos, dificultando el crecimiento del TAB y promoviendo

lipotoxicidad (acumulación de ácidos grasos libres en otros tejidos) (Kusminski et al., 2016).

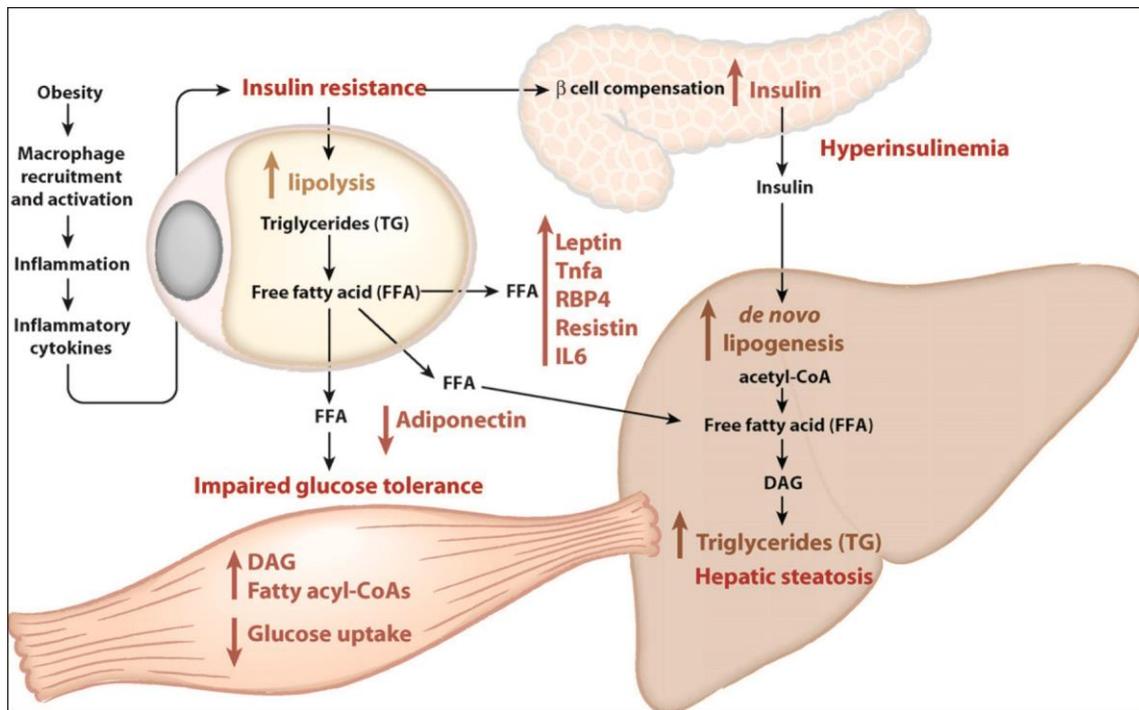


Figura 5. Relación entre la disfuncionalidad del tejido adiposo provocada por la obesidad y el desarrollo de alteraciones metabólicas en otros tejidos. La obesidad conduce al reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo, donde se propicia un estado inflamatorio provocando daño en la señalización a la insulina. En los adipocitos, la resistencia a la insulina conlleva la pérdida de la supresión de la lipólisis por parte de la insulina, conduciendo a la deposición de ácidos grasos libres en otros tejidos. En el músculo se incrementa la entrada de ácidos grasos libres, provocando daño en la absorción de la glucosa que repercute en la tolerancia a la glucosa sistémica. En el hígado el incremento en la entrada de ácidos grasos libres contribuye al desarrollo de esteatosis hepática. Mientras que la resistencia a la insulina en el páncreas provoca el aumento en la síntesis de insulina como mecanismo compensatorio (Attie y Scherer, 2009).

Por otro lado, la hipoxia es un determinante temprano de la disfunción del TAB que incrementa la expresión de factores angiogénicos que además aceleran la fibrosis del tejido adiposo (Choe et al., 2016). La rápida expansión del TAB durante la obesidad supera su propio sistema de neovascularización, generando un estado de hipoxia (Sun et al., 2011). Respecto a esto, se ha reportado que la sobreexpresión

de HIF-1 α (subunidad alfa del factor inducible por hipoxia) en el tejido adiposo provoca disfunción metabólica mientras que su ablación genera el efecto opuesto (Sun et al., 2013).

Esta disfuncionalidad del TAB resulta en una deposición ectópica de grasa en tejidos como el hígado, el músculo esquelético y el páncreas que son importantes reguladores de la homeostasis metabólica, lo que conlleva a una resistencia a la insulina sistémica progresiva y el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (Kusminski et al., 2016) (Figura 5).

I.3 Mecanismos moleculares de resistencia a la insulina

Actualmente existen varias teorías que tratan de explicar la relación entre la acumulación excesiva de grasa y el desarrollo de alteraciones metabólicas, que se centran en el desarrollo de resistencia a la insulina. Existen procesos que se desarrollan durante la obesidad como la lipotoxicidad, inflamación, hiperglucemia y estrés oxidativo que promueven la resistencia a la insulina. Estos procesos convergen en la activación de cinasas de serina/treonina provocando que la señalización del receptor de insulina se vea disminuida en los tejidos blanco de la hormona, a través de inducir la fosforilación de las proteínas IRS (sustrato del receptor de insulina) en residuos de serina, lo que impide su fosforilación en residuos de tirosina (Figura 6), eventos necesarios para la activación de las moléculas río abajo de la vía de señal de la insulina (de Luca y Olefsky, 2008; Boucher et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, la obesidad se caracteriza por un estado de baja inflamación crónica de bajo grado, que se considera un componente que promueve la resistencia a la insulina (de Luca y Olefsky, 2008). Este proceso comienza cuando los adipocitos acumulan un exceso de grasa y desarrollan un proceso inflamatorio, secretando citocinas como el TNF- α , IL-1 β e IL-6, las cuales incrementan la reacción inflamatoria. Las citocinas proinflamatorias liberadas a la circulación por el tejido adiposo, ocasionan la activación de cinasas serina/treonina, disminuyen la expresión de IRS-1, GLUT4 y PPAR γ (Boucher et al., 2014). La inflamación también activa la vía de los receptores tipo Toll 2 y 4 (TLR). Los TLR forman un complejo de proteínas

que contienen el dominio TRAF (factores asociados a los receptores de TNF- α), y activan las vías de JNK e IKK/NF κ B (Akira y Takeda, 2004), que deriva en la producción de más citocinas proinflamatorias y en la fosforilación inhibitoria de proteína involucradas en la vía de señal de la insulina.

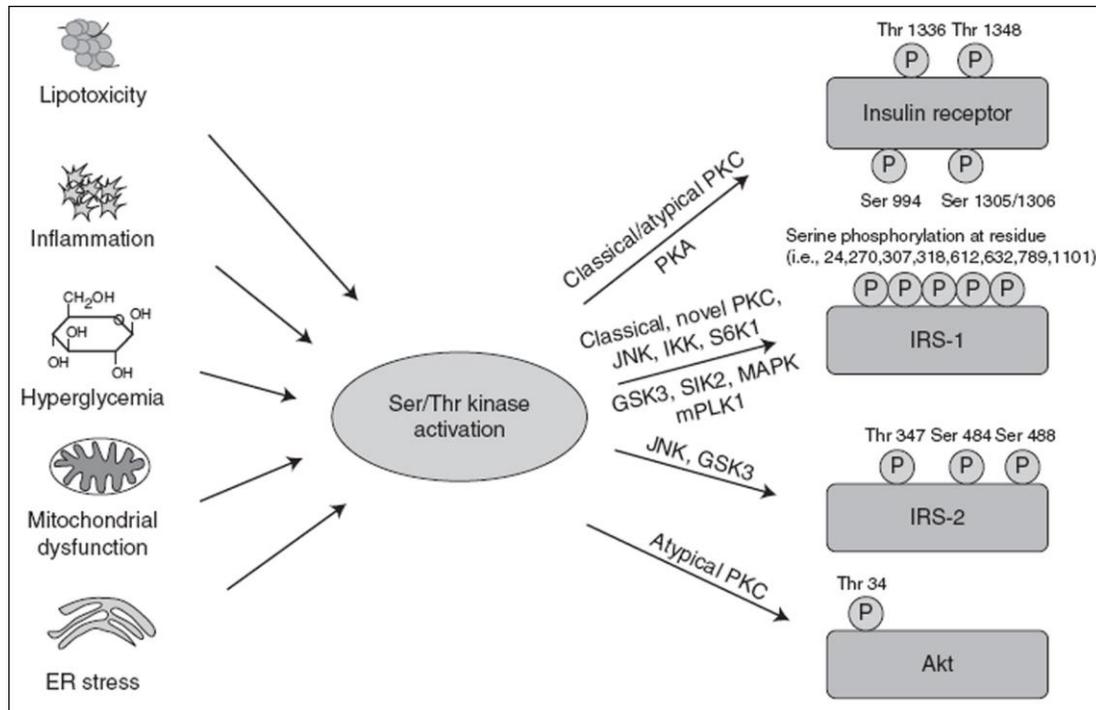


Figura 6. Obesidad y desarrollo de resistencia a la insulina. La lipotoxicidad, inflamación, hiperglucemia y el estrés oxidativo presentes en la obesidad activan cinasas de serina/treonina, induciendo la fosforilación inhibitoria del receptor de insulina, del sustrato del receptor de insulina y de Akt causando la resistencia a la insulina (Boucher et al., 2014).

Por su parte la lipotoxicidad, ocurre cuando los adipocitos han acumulado un exceso de ácidos grasos, e incrementan la liberación de los mismos al torrente sanguíneo. Este exceso de ácidos grasos libres induce la activación de JNK, IKK, PKC y la fosforilación de IRS en residuos de serina (Schenk et al., 2008), además los ácidos grasos también pueden ser depositados en tejidos como el hígado y el músculo, donde se forma diacilglicerol (DAG) y otros metabolitos lipotóxicos, como el gangliosido GM3 o ceramidas (Samuel et al., 2010). DAG activa JNK (cinasa c-Jun N-terminal), y a las proteínas cinasas c (PKC) Φ y ϵ , por su parte PKC Φ está presente en el músculo y estimula la activación de IKK β (cinasa de I κ B) y JNK,

mientras que, PKC ϵ está presente en el hígado e interactúa directamente con el receptor de insulina disminuyendo su actividad. El gangliósido GM3 y las ceramidas, inducen resistencia a la insulina interfiriendo con la activación del receptor de insulina y Akt (cinasa de serina/treonina), respectivamente (Boucher et al., 2014).

La hiperglucemia está ligada con la inducción de estrés oxidativo, activa PKC induciendo la síntesis de novo de DAG y el incremento en la cantidad de productos finales de glicosilación avanzada, además de inhibir la señalización a la insulina a través de estimular la fosforilación de IRS-1 en residuos de serina (Riboulet-Chavey et al., 2006; Miele et al., 2003). Por otro lado, altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes durante la obesidad provocan estrés oxidativo. El estrés oxidativo conduce a la activación de cinasas que inducen la resistencia a la insulina (Boucher et al., 2014).

I.4 Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica de 23 KDa formada por 199 aminoácidos (Ben-Jonathan et al., 2008). Es principalmente secretada por células especializadas llamadas lactotopos localizadas en la hipófisis anterior, su primera función descrita fue la estimulación del desarrollo de la glándula mamaria y la iniciación y mantenimiento de la lactancia en el conejo (Bole-Feysot et al., 1998). Existen varios factores que regulan la secreción de PRL, entre ellos destacan la succión, el estrés, el embarazo y el incremento de los niveles de estrógenos (Carre y Binart, 2014). Por el contrario, la regulación negativa de la secreción de PRL es principalmente controlada por dopamina, que actúa a través de los receptores D2 presentes en la superficie de los lactotopos (Freeman et al., 2000). Se han reportado variantes de la PRL que surgen de modificaciones postraduccionales como fosforilación, glucosilación, polimerización y rompimiento proteolítico (Brooks et al., 1990; Clapp et al., 1994; Sinha, 1995). Además, en los últimos años se han descubierto varias fuentes extrapituitarias de PRL incluyendo la glándula mamaria, el útero, los linfocitos y el tejido adiposo (Carre y Binart, 2014). Con este hallazgo se incrementó el número de funciones conocidas de la PRL, entre las que destacan su papel en la reproducción, osmoregulación, crecimiento, respiración, funciones cerebrales, comportamiento (Ben-Jonathan et al., 2008), angiogénesis (Clapp et al.,

2008), inmunoregulación (Bole-Feysot et al., 1998) y metabolismo (Ben-Jonathan et al., 2008). La PRL es considerada como una citocina con base en evidencias moleculares y funcionales (Goffin et al., 2002) y en que sus efectos biológicos están mediados por la interacción con su receptor (RPRL) que pertenece a la familia de receptores a citocinas clase I (Bole-Feysot et al., 1998). El RPRL ha sido identificado en un gran número de células y tejidos y es codificado por un único gen que contiene varios promotores que son usados de manera tejido específica (Carre y Binart, 2014). La literatura reporta diferentes isoformas del RPRL, que son generados a través de un empalme alternativo o proteólisis, los cuales se conocen como largo, intermedio, corto y soluble (Ben-Jonathan et al., 2008). La PRL ejerce sus principales efectos fisiológicos activando la forma larga de su receptor, mientras que aún no se ha descubierto la función de la forma soluble del receptor (Brooks, 2012). La PRL no es la única hormona que se une al RPRL, sino que este también tiene afinidad por el lactógeno placentario y la hormona de crecimiento (Carre y Binart, 2014). La activación del RPRL desencadena distintas vías de señalización que incluyen JAK-STAT, MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno) y PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa); la activación de estas cascadas derivan en procesos como supervivencia, diferenciación y proliferación (Ben-Jonathan et al., 2008).

1.4.1 Prolactina como regulador del peso corporal

Las primeras evidencias clínicas, de que la PRL podría tener un efecto en el metabolismo se observaron en pacientes hiperprolactinémicos, que presentaban obesidad, síndrome metabólico y resistencia a la insulina (dos Santos Silva et al., 2011). Por ejemplo, se observó que la hiperprolactinemia se asociaba con resistencia a la insulina en humanos (Gustafson et al., 1980), no obstante, se reportó que los altos niveles de PRL inducían hipogonadismo (Greenman et al., 1998), así que no se sabía si era un efecto directo de la PRL sobre la resistencia a la insulina o un efecto secundario al hipogonadismo. En el 2007 Naliato y cols., publicaron que el tratamiento con un agonista dopaminérgico en mujeres no obesas con prolactinomas (adenomas hipofisarios) normalizaba sus niveles de PRL y su fertilidad, además de disminuir su peso corporal, aunque este último resultado fue asociado a la activación de los receptores dopaminérgicos (Naliato et al., 2007). Además, pacientes con hiperprolactinemia debido a la presencia de prolactinomas presentaron una mayor

prevalencia de obesidad que la población en general y la reducción farmacológica de los niveles circulantes de PRL resultó en una pérdida de peso y mejoró algunos parámetros metabólicos (dos Santos Silva et al., 2011). Cabe destacar que el tratamiento con drogas que reducen los niveles de PRL, tales como la bromocriptina (un agonista dopaminérgico) ha arrojado resultados variables, en algunos casos, se ha observado disminución del peso corporal de los pacientes y en otros casos no se genera ningún cambio (Doknic et al., 2002). A pesar de esto, recientemente se describió que niveles altos de PRL en suero (en rangos fisiológicos) correlacionan con menor prevalencia de obesidad en niños (Chirico et al., 2013), y que además, intervenciones dietarias que resultan en mejores parámetros metabólicos también normalizan los niveles de la hormona en dichos pacientes (Chirico et al., 2013). Aunado a esto, se ha relacionado a los bajos niveles de PRL con mayor prevalencia de alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad como la intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2, síndrome metabólico e inflamación (Balbach et al., 2013; Wang et al., 2013); y en 2014 se reportó que la PRL circulante correlaciona positivamente con la sensibilidad a la insulina en humanos (Wagner et al., 2014).

Por otro lado, se ha tratado de esclarecer el efecto de la PRL en el metabolismo utilizando modelos animales, y en algunos casos se ha demostrado que no hay efecto en el peso y en la distribución de la grasa ante cambios en los niveles de PRL. Al respecto, los ratones carentes de PRL no presentan un fenotipo metabólico (LaPensee et al., 2006). Sin embargo, no se ha reportado cual es el fenotipo de los adipocitos y la sensibilidad a la insulina en ratones carentes de PRL alimentados con una dieta alta en grasas (DG). Por otra parte, los ratones carentes del receptor de PRL (*rPrl*^{-/-}) presentan una disminución pequeña pero progresiva en el peso corporal después de 16 semanas de edad; los animales *rPrl*^{-/-} presentan una reducción de la masa del tejido visceral, efecto que se observa solamente en animales adultos (Freemark et al., 2001).

1.4.2 Prolactina como regulador de la ingesta de alimento

Se ha sugerido que la PRL, además, puede regular la ingesta alimenticia. Un incremento en los niveles de PRL puede estimular la ingesta de alimento a través de promover resistencia a la leptina (Naef y Woodside, 2007), aumentando el peso

corporal y el porcentaje de adiposidad en ratas y ratones (Noel y Woodside, 1993). En este sentido, la mayoría de los estudios han sido realizados en ratas hembra, y muestran que la PRL aumenta la ingesta de alimento, algunas veces de manera dosis dependiente (Gerardo-Gettens et al., 1989; Byatt et al., 1993; Naef y Woodside, 2007). Aunado a esto, la inyección de PRL en el núcleo paraventricular aumenta la ingesta de alimento, lo que podría indicar que además de su acción en el tejido adiposo, la PRL regula el sistema hipotalámico orexigénico y anorexigénico que regula el apetito (Sauve y Woodside, 2000). Estos resultados podrían tener relevancia fisiológica en hembras, durante el embarazo y la lactancia, donde los altos niveles de PRL podrían contribuir con la hiperfagia y la acumulación adiposa necesarias para contender con la alta demanda metabólica inherente a dichos procesos fisiológicos (Noel y Woodside, 1993; Sauve y Woodside, 2000; Nagaishi et al., 2014).

1.4.3 Efectos metabólicos de la prolactina en el páncreas

Uno de los efectos metabólicos más estudiados de la PRL ha sido el que ejerce en uno de los órganos metabólicos más importantes: el páncreas. Se conoce claramente el papel de la PRL estimulando la masa de las células beta pancreáticas y la producción de insulina (Freemark et al., 2002; Vasavada et al., 2006). *In vitro*, la PRL estimula la proliferación de células beta pancreáticas, aumenta la transcripción del gen de insulina, e incrementa la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes pancreáticos (Brelje et al., 1993). La PRL puede actuar en el páncreas gracias a la presencia de su receptor en la vida fetal temprana. El receptor de PRL se expresa principalmente en células acinares y ductos pancreáticos y aparece en células endócrinas (produciendo insulina y glucagón) durante el período perinatal y postnatal (Freemark et al., 1997). A pesar de una ausencia en el fenotipo metabólico en ratones carentes de PRL (LaPensee et al., 2006), en el ratón *rPrl*^{-/-} se observó una deficiencia en el desarrollo del páncreas, concluyendo que la PRL es importante para el desarrollo de los islotes pancreáticos. Estos ratones *rPrl*^{-/-}, presentan una reducción de 26-42% de los islotes y la masa de las células beta pancreáticas. Esta disminución en la densidad se observó desde las 3 semanas hasta los 8 meses de edad, tanto en machos como en hembras. Los islotes pancreáticos de los ratones *rPrl*^{-/-} fueron más pequeños que los silvestres en el período de destete pero no en la

edad adulta. Además, el RNAm de insulina fue más bajo en los ratones *rPrl*^{-/-} adultos que en los silvestres. La concentración de glucosa en ayuno en los *rPrl*^{-/-} fue normal, pero los niveles de glucosa después de una administración intraperitoneal de glucosa fueron más altos en los animales *rPrl*^{-/-} que en los silvestres (Freemark et al., 2002). Molecularmente, los efectos de la PRL inhibiendo la apoptosis y estimulando la proliferación y la secreción de insulina en las células-β pancreáticas es a través de disminuir la expresión de inhibidores del ciclo celular (FoxO1, p27 y p57) y aumentando la expresión de las ciclinas 1, A2, B1, B2 y D2 que estimulan el ciclo celular (Brelje et al., 1993; Fujinaka et al., 2007). Aunado a esto, durante el embarazo se incrementan los niveles de PRL y los islotes se someten a cambios sobrerreguladores que derivan en un incremento en los niveles de insulina característico de este estado fisiológico (Uvnas-Moberg et al., 1990). Uno de los cambios más importantes inducidos por la PRL en las células beta pancreáticas es un incremento en la secreción de insulina estimulada por glucosa con una reducción en el umbral de estimulación. Un estudio mostró una relación directa entre los niveles de PRL en suero y el metabolismo de glucosa en páncreas demostrando que la PRL aumenta la actividad de las enzimas clave de la glucólisis, hexocinasa y glucocinasa, y también incrementa la expresión del transportador 2 de glucosa (GLUT2) en los islotes (Weinhaus et al., 1996).

1.4.4 Efectos metabólicos de la prolactina en el tejido adiposo

Como se mencionó anteriormente, el tejido adiposo es capaz de regular la homeostasis metabólica de todo el organismo y existe evidencia de que la PRL ejerce efectos sobre este tejido. La PRL tiene un papel en el crecimiento y la función del tejido adiposo café, ya que en los animales *rPrl*^{-/-} se observa una menor masa del tejido pardo, debido a esto, los animales son más susceptibles de morir si se les expone a bajas temperaturas, y los preadipocitos derivados de estos tejidos muestran un daño en su proceso de diferenciación hacia adipocitos café maduros (Viengchareun et al., 2008). Cuando los animales adultos *rPrl*^{-/-} son expuestos a una dieta alta en grasas, el tejido blanco se transforma en tejido adiposo beige (aumentando la expresión de UCP1 en tejido perirrenal y subcutáneo, pero no en la grasa visceral) el cual libera energía en forma de calor por lo que los animales mantienen un metabolismo saludable y no se vuelven obesos (Auffret et al., 2012).

Cabe destacar que estos resultados se obtuvieron en ratones de la cepa 129/SvJ que es resistente a la obesidad y al síndrome metabólico, sin embargo, no se ha evaluado cuales son las consecuencias de la falta del receptor de PRL en la cepa de ratones C57BL/6 propensos a la obesidad y a alteraciones metabólicas. Como se mencionó anteriormente, la PRL se produce en sitios extrahipofisarios y el tejido adiposo humano es uno de ellos. Este descubrimiento se realizó en tejido adiposo proveniente de glándula mamaria (Zinger et al., 2003), no obstante, años después se corroboró en tejido adiposo visceral y subcutáneo en un estudio en humanos. Hugo y col., mostraron que la liberación de la PRL en el tejido adiposo humano depende de la localización, estado de diferenciación e IMC; debido a que explantes viscerales de pacientes obesos mostraron mayor liberación de PRL que los explantes de tejido adiposo subcutáneo (Hugo et al., 2008). Por otro lado, se ha tratado de encontrar como se regula la liberación de PRL propiamente en el tejido adiposo; en explantes de tejido adiposo humano se han encontrado receptores funcionales de dopamina y se ha observado que la dopamina afecta la expresión y liberación de PRL (Borcherding et al., 2011). También se ha reportado que la insulina es capaz de inhibir la expresión y liberación de PRL en cultivos primarios de adipocitos, pero es importante resaltar que este efecto es exclusivo del tejido adiposo ya que no se observa en la hipófisis (Hugo et al., 2008). Otro aspecto importante del tejido adiposo, es el proceso de adipogénesis. Bajo condiciones *in vitro*, la adipogénesis es inducida por la exposición a hormonas como la insulina, glucocorticoides y moléculas que incrementan el AMPc (adenosin monofosfato cíclico) (Carre y Binart, 2014). La adipogénesis requiere una activación secuencial de genes implicados en la diferenciación de adipocitos. *CEBPb* (proteína beta de unión al potenciador CCAAT) y *PPARg* son dos factores de transcripción que tienen un papel importante en la diferenciación de adipocitos, el primero en etapas tempranas y el último en etapas tardías de la diferenciación. Por su parte, se ha reportado que la PRL incrementa la expresión de *Cebpb* en células NIH-3T3 (células mesenquimales que se pueden diferenciar a adipocitos maduros), mientras que no lo hace en las células 3T3-L1 (fibroblastos de ratón que se diferencian a adipocitos maduros). También analizaron el efecto de PRL en la expresión de *Pparg* y demostraron que la PRL potencia el efecto de la dexametasona e isobutilmetilxantina para inducir la expresión de *Pparg* en ambos tipos celulares (Nanbu-Wakao et al., 2000). Durante la adipogénesis

incrementa la expresión del RPRL, el efecto podría estar mediado por la PRL ya que se ha visto que esta hormona regula la expresión de su propio receptor (Fleenor et al., 2006; Brandebourg et al., 2007). Por ejemplo, durante la lactancia también aumenta la expresión RPRL en el tejido adiposo de ratón (Ling et al., 2000). Aunado a esto se ha reportado que los RPRL se expresan en concentraciones mayores tanto en los preadipocitos como en los adipocitos del TAB visceral comparado con el subcutáneo (Macotella et al., 2012). La PRL estimula la diferenciación de células 3T3-L1 hacia adipocitos maduros (Stewart et al., 2004). La PRL tiene interacción con hormonas como la insulina, glucocorticoides y catecolaminas que afectan el metabolismo de la glucosa, lipogénesis, lipólisis y liberación de adipocinas (Carre y Binart, 2014). Como se mencionó en el bloque anterior, las adipocinas se liberan por el tejido adiposo y se ha encontrado que la PRL puede regular su liberación. En el 2005 Nilsson y col., mostraron que la PRL inhibe la secreción de adiponectina (adipocina que estimula la sensibilidad a la insulina) en ratón y humano. *In vitro*, observaron que la secreción de adiponectina en tejido adiposo humano disminuye con el tratamiento con PRL, e incrementa la expresión de su receptor tipo 1 (AdipoR1). Por otro lado, en ratones hembra que sobreexpresan PRL disminuyen los niveles de adiponectina en suero, mientras que en el *rPrl*^{-/-} no se observaron cambios (Nilsson et al., 2005). Además, mujeres embarazadas y lactantes (presentan altos niveles de PRL) cursan con hipoadiponectinemia (Asai-Sato et al., 2006). Por otro lado, ratas hiperprolactinemicas presentan un aumento en los niveles de leptina, e *in vitro* en una línea celular de tejido adiposo café (T37i) el tratamiento con PRL induce la expresión de leptina (Gualillo et al., 1999; Viengchareun et al., 2004). Se sabe que la leptina reduce la ingesta de alimento, induce lipólisis e inhibe lipogénesis. También fue demostrado que en el tejido adiposo pardo de ratones *rPrl*^{-/-} se incrementan los niveles de leptina (Viengchareun et al., 2004).

Aunado a esto, se sabe bien que el metabolismo de lípidos es parte fundamental de las funciones del tejido adiposo, y se ha reportado que la PRL puede participar en su regulación. En el tejido visceral de ratas hembra la PRL de manera dosis dependiente suprime el proceso de lipólisis (Brandebourg et al., 2007). Se ha mostrado que la PRL ejerce efectos antilipolíticos en explantes de tejido adiposo perigonadal en roedores y en explantes humanos (LaPensee et al., 2007). Además,

la sobreexpresión de la forma larga del RPRL en el tejido adiposo incrementa el almacenamiento de lípidos, teniendo como resultados, que la obesidad se desarrolle por un mecanismo de hipertrofia del tejido adiposo visceral (Le et al., 2011). Aunado a esto, la PRL incrementa la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) en la diferenciación de células 3T3L1 conduciendo a la acumulación de triglicéridos (Spooner et al., 1979). Sin embargo, durante la lactancia en ratas, la PRL disminuye la lipogénesis reduciendo la expresión de LPL, la acetil coA carboxilasa (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FAS) en el tejido adiposo mamario (Barber et al., 1992). Estos resultados ya han sido confirmados en muchos estudios que demuestran que la PRL inhibe la actividad de la LPL en ratas y humanos en el tejido adiposo blanco durante la lactancia. Además, la PRL disminuye la concentración de malonil CoA, el producto del primer paso de la lipogénesis en cultivos de tejido adiposo humano (Nilsson et al., 2009).

Además del páncreas y el tejido adiposo, se sabe bien que el músculo y el hígado son pieza fundamental en el metabolismo, sin embargo, no existe información acerca de la función de la PRL en el músculo. En cuanto al hígado, se ha reportado una disminución en la expresión hepática del *rPrl* en animales resistentes a la insulina, mientras que el aumento en la expresión del receptor específicamente en el hígado mediante vectores adenovirales aumenta la sensibilidad a la insulina (Yu et al., 2013).

Finalmente, en este trabajo nosotros evaluamos si los bajos niveles de PRL presentes durante la obesidad son un factor causal de la resistencia a la insulina y la pérdida de función del tejido adiposo. Mostramos que la PRL favorece la sensibilidad a la insulina a través de mantener la función del tejido adiposo, estimulando su expansión saludable, evitando su inflamación y estimulando la producción de adipocinas que normalmente se alteran con la obesidad.

II. JUSTIFICACIÓN

La obesidad representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de una gran gama de enfermedades metabólicas como diabetes tipo 2, síndrome metabólico, daños cardiovasculares e incluso cáncer. Esta enfermedad no sólo afecta a adultos, sino que ahora se presenta en niños y adolescentes. Tan sólo en nuestro país más 70% de la población es obesa o tiene sobrepeso, cifra que se piensa ha llegado al límite, es decir, toda la población susceptible a desarrollar sobrepeso u obesidad ya la presenta. Además de que la obesidad representa una gran pérdida económica para el país, debido a los gastos médicos y a la disminución de productividad en los pacientes que la padecen, hay que tener en cuenta que las alteraciones metabólicas derivadas de la obesidad representan un grave problema, por ejemplo, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo 2 son las principales causas de muerte en nuestro país (ENSANUT 2012). Los tratamientos actuales no han sido suficientes para controlar esta enfermedad, ya que un gran porcentaje de los pacientes recupera el peso perdido. Estos tratamientos sólo incluyen cambios en el estilo de vida, como dieta y ejercicio físico, o eliminación de grasa por medio de cirugías; este último, es un procedimiento costoso y presenta un alto riesgo para la salud. Aunado a esto, dichos métodos suelen ser insuficientes para normalizar el peso corporal y sobre todo para prevenir las complicaciones metabólicas, presentándose poco accesibles o difícilmente adoptables en toda la población. Por lo anterior, resulta esencial entender los mecanismos y los factores que regulan la expansión y la función del tejido adiposo en la obesidad, con el fin de encontrar blancos terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad o para evitar el desarrollo de alteraciones metabólicas secundarias. Un factor que podría desempeñar un papel importante en la regulación del funcionamiento del tejido adiposo es la hormona PRL, en primer lugar, porque se sabe que en humanos los bajos niveles de PRL en suero correlacionan con mayor prevalencia de obesidad, diabetes tipo 2, resistencia a la insulina y síndrome metabólico; en segundo lugar, desde hace varios años se ha asociado a la PRL con efectos metabólicos (ingesta de alimento y peso corporal), sin embargo, algunos resultados son contradictorios ya sea por el modelo o las características específicas de cada trabajo. Es por esto, que resulta importante esclarecer el papel de la PRL en el metabolismo y entender si los

bajos niveles de PRL circulante son un factor causal de las alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad o si son simplemente un evento secundario carente de consecuencias. En apoyo a esta idea, en el 2015 publicamos que una dieta alta en grasas disminuye los niveles de PRL en el suero de ratas machos, datos que concuerdan con lo publicado en humanos. Posteriormente, para dilucidar el efecto metabólico de la PRL en condiciones de obesidad, en el presente trabajo administramos PRL a animales obesos y con resistencia a la insulina con el fin de incrementar los niveles de la hormona en suero y evaluamos la funcionalidad de su tejido adiposo y otros parámetros metabólicos. Además, utilizamos ratones carentes de la señalización de PRL para someterlos a una dieta alta en grasas y evaluar el comportamiento metabólico antes dicho reto. Finalmente, evaluamos posibles correlaciones entre los niveles de PRL circulante y parámetros de funcionalidad en el suero y en el tejido adiposo en humanos.

III. HIPÓTESIS

La prolactina aminora la disfuncionalidad del tejido adiposo y la resistencia a la insulina derivadas de la obesidad.

IV. OBJETIVOS

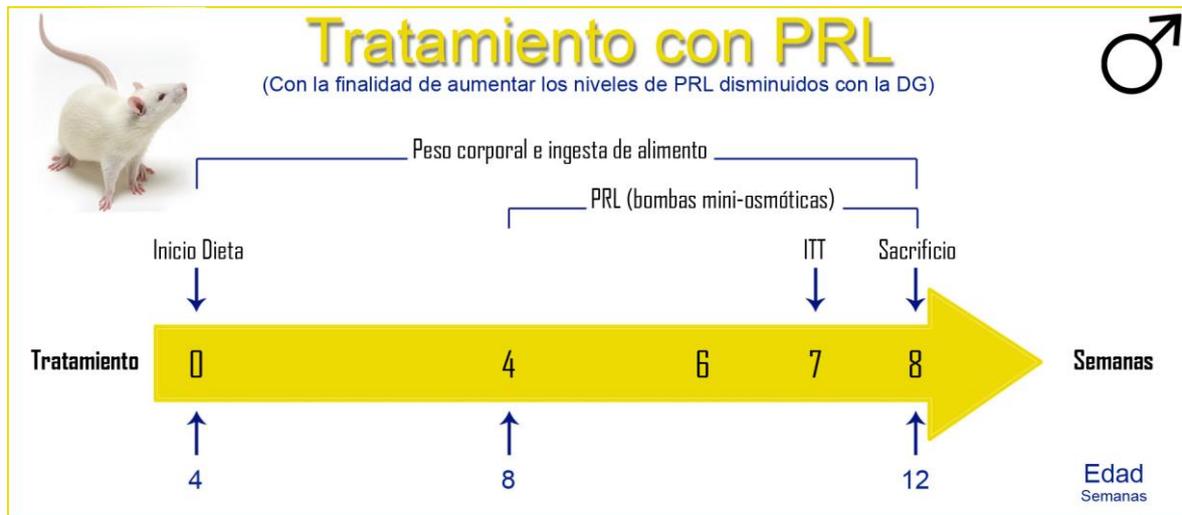
IV.1 General

Evaluar si la prolactina regula la función del tejido adiposo y la resistencia a la insulina en condiciones de obesidad.

IV.2 Específicos

- Determinar si el tratamiento con prolactina en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas (con la finalidad de aumentar los niveles de prolactina disminuidos con dicha alimentación) contiene contra las alteraciones metabólicas asociadas con la dieta.
- Analizar las alteraciones metabólicas asociadas con una dieta alta en grasas en ratones carentes de los receptores de prolactina (modelo para evaluar la ausencia de la señalización de prolactina).
- Evaluar posibles correlaciones entre los niveles de prolactina en suero y marcadores de funcionalidad en el suero y en el tejido adiposo en humanos.

V. METODOLOGÍA



VI. RESULTADOS

VI.1 Artículo 1 – Prolactin promotes adipose tissue fitness and insulin sensitivity in obese males.

Prolactin Promotes Adipose Tissue Fitness and Insulin Sensitivity in Obese Males

Xarubet Ruiz-Herrera, Ericka A. de los Ríos, Juan M. Díaz, Ricardo M. Lerma-Alvarado, Lucía Martínez de la Escalera, Fernando López-Barrera, María Lemini, Edith Arnold, Gonzalo Martínez de la Escalera, Carmen Clapp, and Yazmín Macotela

Instituto de Neurobiología (X.R.-H., E.A.d.I.R., L.M.d.I.E., F.L.-B., M.L., E.A., G.M.d.I.E., C.C., Y.M.), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, 76230 Querétaro, Mexico; and Hospital General de Querétaro (J.M.D., R.M.L.-A.), Servicio de Cirugía General, Servicios de Salud del Estado de Querétaro, 76170 Querétaro, Mexico

Excessive accumulation of body fat triggers insulin resistance and features of the metabolic syndrome. Recently, evidence has accumulated that obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome are associated with reduced levels of serum prolactin (PRL) in humans and rodents, raising the question of whether low PRL levels contribute to metabolic dysfunction. Here, we have addressed this question by investigating the role of PRL in insulin sensitivity and adipose tissue fitness in obese rodents and humans. In diet-induced obese rats, treatment with PRL delivered via osmotic mini-pumps, improved insulin sensitivity, prevented adipocyte hypertrophy, and reduced inflammatory cytokine expression in visceral fat. PRL also induced increased expression of *Pparg* and *Xbp1s* in visceral adipose tissue and elevated circulating adiponectin levels. Conversely, PRL receptor null mice challenged with a high-fat diet developed greater insulin resistance, glucose intolerance, and increased adipocyte hypertrophy compared with wild-type mice. In humans, serum PRL values correlated positively with systemic adiponectin levels and were reduced in insulin-resistant patients. Furthermore, PRL circulating levels and PRL produced by adipose tissue correlated directly with the expression of *PPARG*, *ADIPOQ*, and *GLUT4* in human visceral and sc adipose tissue. Thus, PRL, acting through its cognate receptors, promotes healthy adipose tissue function and systemic insulin sensitivity. Increasing the levels of PRL in the circulation may have therapeutic potential against obesity-induced metabolic diseases. (*Endocrinology* 158: 56–68, 2017)

Adipose tissue dysfunction is a hallmark of obesity-induced metabolic disorders and is also a feature of type 2 diabetes (T2D) and accelerated cardiovascular disease. Adipose tissue functions as an energy reservoir that is central for maintaining whole-body glucose and lipid homeostasis. In obesity, excessive lipid accumulation in adipocytes triggers mechanisms that result in systemic insulin resistance, including impaired adipogenesis (1), altered adipokine secretion, inflammation, fibrosis, reduced angiogenesis, excess free fatty acid release, and ectopic fat deposition (2, 3). Visceral adipose tissue (VAT) expansion is particularly associated with

increased risk of metabolic disorders, whereas sc adipose tissue (SAT) accumulation has little or no negative metabolic impact and may even be protective (4, 5). Identifying factors that promote adipose tissue fitness may be of therapeutic value against insulin resistance and its associated metabolic diseases. Here, we suggest that one such factor is the hormone prolactin (PRL).

PRL is a multifunctional hormone with effects on metabolism. Increased PRL levels can stimulate food intake by promoting leptin resistance (6–10) and enhance body weight and adiposity (6, 7, 11–14) in rats and mice. Some of these actions were evaluated in females and may

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in USA

Copyright © 2017 by the Endocrine Society

Received 22 June 2016. Accepted 31 October 2016.

First Published Online 2 November 2016

Abbreviations: Ccl2, chemokine (C-C motif) ligand 2; CD, control diet; BMI, body mass index; GTT, glucose tolerance test; HFD, high-fat diet; HOMA-IR, homeostasis model of insulin resistance; ITT, insulin tolerance test; Nb2, Noble rat lymphoma; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; PRL, prolactin; qPCR, Real Time-quantitative PCR; RXR, Retinoid X receptor; SAT, subcutaneous adipose tissue; T2D, type 2 diabetes; UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México; VAT, visceral adipose tissue; Xbp1s, spliced form of X-box-binding protein-1.

not occur in males (14, 15), consistent with the concept that they are part of the metabolic adaptations occurring during pregnancy and lactation, when high PRL levels, leptin resistance, hyperphagia, increased body weight, and adiposity coincide to increase nutrient availability to favor offspring development and survival (16). However, PRL can have an adverse impact on metabolism in scenarios of pathological hyperprolactinemia (prolactinomas). Studies, in both men and women, show that the occurrence of prolactinomas associates with higher prevalence of obesity and metabolic alterations such as dyslipidemia, glucose intolerance, and insulin resistance, and these alterations are reduced by lowering PRL levels with dopamine agonists (17–21). However, dopamine agonists may also increase body weight in patients with prolactinomas (21, 22), and there are studies in which body mass index (BMI) and metabolic improvement do not directly correlate with the reduction in PRL levels (23–25). In support of high systemic PRL being deleterious for metabolic homeostasis, PRL levels above 200 ng/mL and up to 4000 ng/mL in female mice for several months correlate with increased food intake, higher body weight and adiposity, glucose intolerance, and insulin resistance (14, 26).

PRL operates at different levels to regulate metabolism. It stimulates β -cell proliferation, survival, and insulin secretion in rodents and humans (27, 28) and promotes liver insulin sensitivity in rodents (29). PRL receptors are expressed on adipocytes from humans, rats, and mice, and PRL is produced by human adipose tissue (30), where it contributes to adipogenesis and inhibits lipolysis (31–33). PRL stimulates also the formation and function of brown fat tissue in newborn rodents (34). Finally, the beneficial effect of adequate PRL levels is highlighted by recent large cohort studies in men and women showing reduced levels of serum PRL in patients having glucose intolerance, T2D, and insulin resistance (35–37) and in children with metabolic syndrome and obesity (38), suggesting thereby that lower PRL levels contribute to disruption of metabolic homeostasis.

Here, we evaluated whether PRL promotes insulin sensitivity and adipose tissue metabolic health in obese rodents and whether in humans circulating and adipose tissue-produced PRL correlate with metabolic fitness markers systemically and in adipose tissue. We demonstrate that PRL administration counteracts obesity-induced insulin resistance and adipose tissue dysfunction in obese rats, whereas obese mice lacking PRL receptors show enhanced insulin resistance and unhealthy adipose tissue expansion. In agreement, PRL levels are reduced in insulin-resistant patients compared with insulin-sensitive ones and correlate directly with the levels of circulating adiponectin and with the expression of makers of fat

fitness in both VAT and SAT. Our findings support the concept that lower concentrations of serum PRL in obesity have deleterious consequences for metabolic homeostasis and that increasing PRL levels may be a therapeutic aid against obesity-induced adipose tissue dysfunction and insulin resistance.

Materials and Methods

Experimental procedures in rats

Male Wistar rats bred for several years at our animal facility (the vivarium of the Institute of Neurobiology of the Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM]) were housed at 22°C on a 12-hour light, 12-hour dark cycle with free access to food and water. Four-week-old rats were fed either a control diet (CD) (Laboratory rodent Diet 5001; LabDiet) or a high-fat diet (HFD) (Open Source Diet D12492; Research Diets) for 8 weeks. In the CD, 28%, 13.5%, and 58% of calories come from proteins, fat, and carbohydrates, respectively, whereas in the HFD, 20%, 60%, and 20% of calories come from proteins, fat, and carbohydrates, respectively. The fat source for both the CD and HFD is largely pig fat or lard. In the HFD, carbohydrates come from maltodextrin and sucrose and proteins from casein, whereas the CD contains oats, wheat, corn, soybean meal, wheat germ, cane molasses, fish meal, dried brewer's yeast, and porcine meat meal as sources of carbohydrate and protein. Thus, the CD is a balanced meal, whereas the HFD is high in fat and in simple sugars. After 4 weeks on the CD or HFD, rats were implanted sc or not with Alzet osmotic minipumps (DURECT Corp) releasing 0.16-mg/kg · d ovine PRL (Sigma-Aldrich) for 28 days. For this purpose, rats were anesthetized with ether inhaled for approximately 2 minutes, using an ether-soaked cotton ball placed at the bottom of a 50-mL conical tube (a new cotton was used for each animal and the cotton was never in direct contact with the animal), and the pumps were implanted sc in less than 2 minutes. To avoid stress-induced alterations in the amount of PRL released, animals were handled daily for 7 days before euthanization by CO₂ inhalation and decapitation. All studies were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the UNAM (protocol numbers 033 and 075), which complies with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the United States National Institutes of Health (8th ed, National Academy Press).

Serum measurements

Rat PRL was evaluated by RIA. However, because the RIA for rat PRL does not detect ovine PRL, we used the Noble rat lymphoma (Nb2) assay to quantify the circulating levels of ovine PRL released by the osmotic minipump in the pump-implanted rats. This is a standardized method based on the proliferative response of Nb2 lymphoma cells to PRL (39). The Nb2 assay detects all PRLs (rat and ovine); therefore, we made this assay specific to ovine PRL by using antiovine PRL antibodies (National Hormone and Peptide Program; catalog number C-3581016789, Research Resource Identifier RRID AB_2629483) (see antibody in Table 1), that do not cross-react with rat PRL. Therefore, the difference in Nb2-bioactivity between the absence and presence of antiovine PRL quantified the levels of ovine PRL in rat serum. Rat adiponectin serum levels were measured using an ELISA kit (Millipore).

Table 1. Antibody Table

Protein Target	Name of Antibody	Manufacturer, Catalog Number	Species Raised in; Monoclonal or Polyclonal	Dilution Used	RRID
Ovine PRL	Anti-ovine PRL-IC-1 antisera	National Hormone and Peptide Program, C-3581016789	Rabbit; polyclonal	1:1000	AB_2629483

Insulin tolerance test (ITT)

The ITT was performed in rats 3 weeks after delivering PRL via osmotic pumps (7 wk after the start of the CD or HFD). Glucose levels were measured with a glucometer in tail vein blood samples obtained with a lancet needle, before or 15, 30, 60, and 120 minutes after an ip injection of 0.75-U/kg insulin (Humulin R; Eli Lilly).

Adipose tissue histology

Subcutaneous inguinal and epididymal (visceral) adipose tissues from rats were fixed in 10% formalin, and sections of 10 μ m were stained with hematoxylin and eosin. Adipocyte size was determined by calculating the mean adipocyte area from 9 fields per animal in 6–10 rats per group using the ImageJ software (<https://www.imagej.nih.gov>). The relative adipocyte number was calculated by dividing the fat pad weight by the mean adipocyte area in that fat depot.

Real Time-quantitative PCR (qPCR)

Adipose tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Total RNA was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen), and cDNA was synthesized using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). PCR products were detected and quantified in a Bio-Rad CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories), using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) in a final reaction volume of 10 μ L containing template and 0.5 μ M each of the primer pairs for rat (*Pparg*, *Il1b*, chemokine [C-C motif] ligand 2 [*Ccl2*], X-box-binding protein-1 [*Xbp1s*], and *Prlr*) genes. *18s rRNA* was used as housekeeping gene. Primer sequences are shown in Supplemental Table 1.

Statistics

Statistical data analysis was performed using SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc). Differences between groups were evaluated by two-way ANOVA followed by the Bonferroni's post hoc comparison test. Body weight and ITT curves were evaluated using repeated measures ANOVA. The threshold for significance was set at $P < .05$.

Experimental procedures in mice

C57BL/6 *Prlr*^{+/-} mice were purchased from The Jackson Laboratory, and the colony was expanded and maintained for several generations before animals were used in our experiments. Animals were housed at 22°C on a 12-hour light, 12-hour dark cycle with free access to food and water. Eight- to 10-week-old male mice were fed a CD (Laboratory rodent Diet 5001; Lab-Diet) or a HFD (Open Source Diet D12492; Research Diets) for 8 weeks. To avoid stress-induced alterations in the amount of PRL released, animals were handled daily for 7 days before euthanization by CO₂ inhalation and decapitation. All studies were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the UNAM (protocol numbers 033 and 075),

which complies with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the United States National Institutes of Health (8th ed, National Academy Press).

Serum measurements

Mouse adiponectin serum levels were measured using an ELISA kit (Millipore).

ITT and glucose tolerance test (GTT)

ITT and GTT were performed in mice after 6 and 7 weeks, respectively, of CD or HFD. Glucose levels were measured with a glucometer in tail vein blood samples obtained with a lancet needle, before or 15, 30, 60, 90, and 120 minutes after an ip injection of 0.75-U/kg insulin (Humulin R; Eli Lilly) for the ITT, or 2 g/kg of 50% dextrose (PiSA Pharmaceuticals) for the GTT.

Adipose tissue histology

Subcutaneous inguinal and epididymal (visceral) adipose tissues from mice were fixed in 10% formalin, and sections of 7 μ m were stained with hematoxylin and eosin. Adipocyte size was determined by calculating the mean adipocyte area from 9 fields per animal in 10–13 mice per group using the ImageJ software (<https://www.imagej.nih.gov>). The relative adipocyte number was calculated by dividing the fat pad weight by the mean adipocyte area in that fat depot.

qPCR

Adipose tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Total RNA was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen), and cDNA was synthesized using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). PCR products were detected and quantified in a Bio-Rad CFX96 RealTime System (Bio-Rad Laboratories), using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) in a final reaction volume of 10 μ L containing template and 0.5 μ M each of the primer pairs for mouse (*Pparg*, *Il1b*, *Ccl2*, *Xbp1s*, and *Prlr*) genes. TATA box-binding protein (*Tbp*) was used as housekeeping gene. Primer sequences are shown in Supplemental Table 1.

Statistics

Statistical data analysis was performed using SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc). Differences between groups were evaluated by two-way ANOVA followed by the Bonferroni's post hoc comparison test. Body weight, ITT, and GTT curves were evaluated using repeated measures ANOVA. The threshold for significance was set at $P < .05$.

Experimental procedures involving human samples

Table 2 shows the clinical and biochemical characteristics of the subjects studied. Lean (BMI < 25), overweight (BMI = 25–29.9), and obese (BMI \geq 30) mestizo male subjects, undergoing

Table 2. Clinical and Biochemical Characteristics of the Subjects Studied

	Lean, BMI < 25 (n = 10)	Overweight, BMI = 25-29.9 (n = 11)	Obese, BMI > 30 (n = 6)	Overweight + Obese, BMI > 25 (n = 17)
Age (y)	35.9 ± 6.0	38.5 ± 2.9	38.8 ± 5.1	38.6 ± 2.5
BMI (kg/m ²)	22.5 ± 0.4	28.7 ± 0.4 ^a	31.8 ± 0.5 ^{a,b}	29.9 ± 0.5 ^a
Insulin (pmol/L)	31.6 ± 6.0	65.2 ± 10 ^a	65.1 ± 18	65.2 ± 9.0 ^a
Glucose (mmol/L)	5.46 ± 0.4	6.50 ± 0.5	6.03 ± 0.7	6.34 ± 0.4
HOMA-IR	1.3 ± 0.3	3.17 ± 0.5 ^a	2.79 ± 0.7	3.0 ± 0.4 ^a
Adiponectin (μg/mL)	9.43 ± 1.4	6.39 ± 1.0	7.12 ± 1.5	6.6 ± 0.8
PRL (mg/L)	13.8 ± 1.2	11.5 ± 1.2	10.3 ± 2.5	11.1 ± 1.1

Values are mean ± SEM.

^a *P* < .05 vs lean.

^b *P* < .05 vs overweight.

surgery involving access to the abdominal cavity (appendectomy, abdominal hernia repair, or cholecystectomy), were recruited at the General Hospital of Queretaro between May 2012 and March 2014. The General Hospital internal review board and the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology, UNAM approved the study, and all procedures were performed in accord with the Declaration of Helsinki. Exclusion criteria were being younger or older than 18 or 65 years, respectively; having a medical history of liver or renal failure, and receiving medication with drugs known to affect PRL secretion (metoclopramide, methyl dopa, opiates, or cimetidine). Fifty-four subjects were identified as candidates and signed the informed consent to participate. Serum samples were collected before surgery, and omental VAT and abdominal SAT samples were then obtained. Later, patients having PRL levels above basal values of 20 μg/L (n = 27) were excluded from the analysis, leaving 27 study subjects. Because PRL is a “stress hormone,” we were concerned that values of PRL in these patients could be influenced by a stress-related confounding factor that could bias our analysis. The excluded patients were from both, insulin resistant (12 subjects), and insulin sensitive (15 subjects) groups.

Serum measurements

Human adiponectin serum levels were measured using ELISA kits (Millipore). Human PRL and insulin were measured by the Immulite 1000 Immunoassay Analyzer (Siemens), and glucose levels were evaluated by a colorimetric assay (Cayman Chemical).

qPCR

Adipose tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. Total RNA was extracted using the TRIzol reagent (Invitrogen), and cDNA was synthesized using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). PCR products were detected and quantified in a Bio-Rad CFX96 RealTime System (Bio-Rad Laboratories), using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) in a final reaction volume of 10 μL containing template and 0.5 μM each of the primer pairs for human (*ADIPOQ*, *PPARG*, *SLC2A4* [*GLUT4*], and *PRLR*) genes. *18S rRNA* was used as house-keeping gene. Primer sequences listed in Supplemental Table 1.

Statistics

Statistical data analysis was performed using SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc) and Microsoft Excel XLSTAT. Differences between 2 groups were evaluated by the Student's *t* test,

and those between 3 or more groups by one-way ANOVA followed by the Bonferroni's post hoc comparison test. Spearman analysis for nonparametric data was used to evaluate correlations between serum levels of PRL and insulin, adiponectin, homeostasis model of insulin resistance (HOMA-IR), and gene expression levels in adipose tissue. The threshold for significance was set at *P* < .05.

Results

PRL treatment improves insulin sensitivity in diet-induced obese rats

Confirming our previous findings that circulating levels of PRL are reduced in obese rodents (40), after 8 weeks on a HFD, male rats showed lower serum PRL levels than animals fed a CD (Figure 1A). To explore whether reduced serum PRL levels contribute to the metabolic alterations seen in obesity, we increased systemic PRL with osmotic minipumps delivering the hormone during the last 4 weeks of the 8-week dietary intervention. PRL levels were increased to 4–6 times those in nontreated rats (Figure 1A). Although body weight and food consumption were unaltered by PRL treatment (Figure 1, B and C), elevating systemic PRL levels in HFD-fed animals improved metabolic responses, as evidenced by an enhanced insulin-induced, glucose-lowering effect during an ITT compared with animals on a HFD without PRL treatment (Figure 1D). In CD-fed animals, PRL treatment had no effect on insulin sensitivity (Figure 1D).

PRL prevents visceral adipocyte hypertrophy in obese rats

In the context of obesity, insulin sensitivity is attributed to a healthy expansion of the adipose tissue (1, 2, 41). This idea prompted us to evaluate whether PRL improves insulin sensitivity by promoting adipose tissue functionality. In HFD-fed animals, PRL treatment increased adipose tissue mass by 20% in the VAT and by 30% in the SAT depots beyond the increases induced by the HFD alone (Figure 2, A and D). This increase in adipose tissue mass

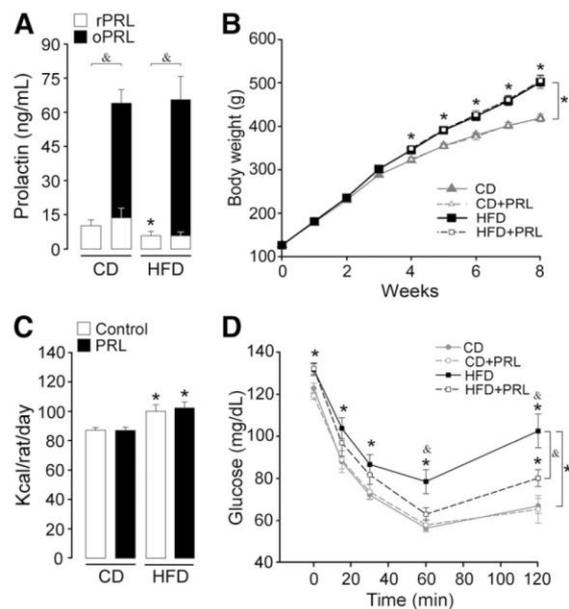


Figure 1. PRL treatment promotes insulin sensitivity in obese rats. Serum PRL levels after 8 weeks of CD or HFD in the absence or presence of osmotic minipumps delivering PRL during the last 4 weeks ($n = 5-7$) (A). White bars represent rat endogenous PRL (rPRL) measured by RIA; black bars represent ovine PRL (oPRL) from pumps quantified by Nb2 assay. Body weight ($n = 7-14$) (B), average food consumption ($n = 6-7$) (C), and ITT ($n = 6-11$) (D) at week 7 of the CD or HFD in rats treated or not with PRL. Data are mean \pm SEM; *, $P < .05$ vs respective CD or CD+PRL; &, $P < .05$ vs respective diet without PRL. Statistically significant differences were determined with two-way ANOVA (A and C) or repeated measures ANOVA (B and D), followed by the Bonferroni's post hoc test.

was not reflected on body weight, because it represents only a 2% increase in total body mass. Compared with CD-fed animals, the number of adipocytes was greater in HFD-fed rats and was further elevated by PRL by 21% and 37% in SAT and VAT, respectively (Figure 2, B and E). Moreover, PRL treatment also reduced adipocyte hypertrophy in HFD-fed rats exclusively in VAT, whereas adipocytes in SAT of HFD-fed rats were the same size with and without PRL treatment (Figure 2, C and F). Under CD conditions, PRL treatment had no effect on adipose tissue mass, adipocyte number, or size (Figure 2, A-F). Because hypertrophic fat cells are believed to be metabolically dysfunctional and adipocyte hyperplasia is a healthier mechanism for increasing fat storage (2), these findings suggest that PRL can promote a healthier form of adipose tissue expansion under obesity conditions.

PRL increases *Pparg* and *Xbp1s* expression in visceral fat, reduces adipose tissue inflammation, and promotes adiponectin secretion

We next investigated the mechanisms that could mediate the beneficial actions of PRL on insulin sensitivity

and adipose tissue expansion. In vivo, under HFD conditions PRL increased the expression of *Pparg* in the VAT but not in the SAT (Figure 2, G and H).

Increased inflammation is characteristic of fat tissue in obesity and has been shown to contribute to insulin resistance (42). PRL has been reported to exhibit both pro- and anti-inflammatory actions in different cell types (43). PRL administration reduced by 50% the expression of *Il1b* in VAT from both CD- and HFD-fed animals (Figure 2G) and also reduced the expression of *Ccl2* in SAT from HFD-fed animals (Figure 2H).

The beneficial metabolic effects observed after elevating PRL levels in animals with HFD-induced obesity resemble those of adiponectin, an adipokine that is insulin sensitizing, proadipogenic, and anti-inflammatory (44). Administration of PRL increased circulating adiponectin levels in rats on both the CD and HFD by 20% and 36%, respectively (Figure 2I). Recently, the transcription factor *Xbp1* has been identified as a PRL target in the mammary gland fat pad (45), and the spliced form of *Xbp1* has been shown to mediate increased adiponectin secretion by fat tissue in vivo (46). PRL treatment resulted in increased *Xbp1s* expression in the VAT of animals under both CD and HFD conditions (Figure 2J), implying that *Xbp1s* may contribute to PRL effects on adiponectin.

The preferential effect of PRL treatment on VAT in the rats (reducing adipocyte hypertrophy and increasing *Pparg* and *Xbp1s* expression) may be explained by the increased expression of PRL receptors in adipose cells from this depot (47). Interestingly, most of the effects of PRL on adipose tissue were observed under HFD feeding conditions. To explore whether the HFD could induce PRL receptor expression in fat thereby increasing PRL sensitivity, we evaluated the mRNA expression of the *Prlr* in the adipose tissue of rats under CD or HFD feeding conditions. We observed that *Prlr* expression is not changed by the HFD or by PRL treatment in either VAT or SAT (Supplemental Figure 1). Similar results were observed in adipose tissue from CD vs HFD-fed mice and from lean vs overweight/obese humans (Supplemental Figure 1).

PRL receptor-null mice under a HFD develop aggravated metabolic alterations

To further explore the role of PRL in metabolic health in obesity, *Prlr*^{-/-} mice (on a C57BL/6 background) were fed a HFD for 8 weeks and studied for metabolic parameters. *Prlr*^{-/-} mice gained more weight when fed a HFD (Figure 3A) and exhibited greater fat mass (Figure 3, B and C). This expansion of fat mass induced by the *Prlr* deletion was the result of enhanced adipocyte hypertrophy (Figure 3, D and E) in both fat depots with no significant change in adipocyte number per fat pad (Figure 3, F and G). *Prlr*^{-/-} mice on a HFD showed exacerbated insulin

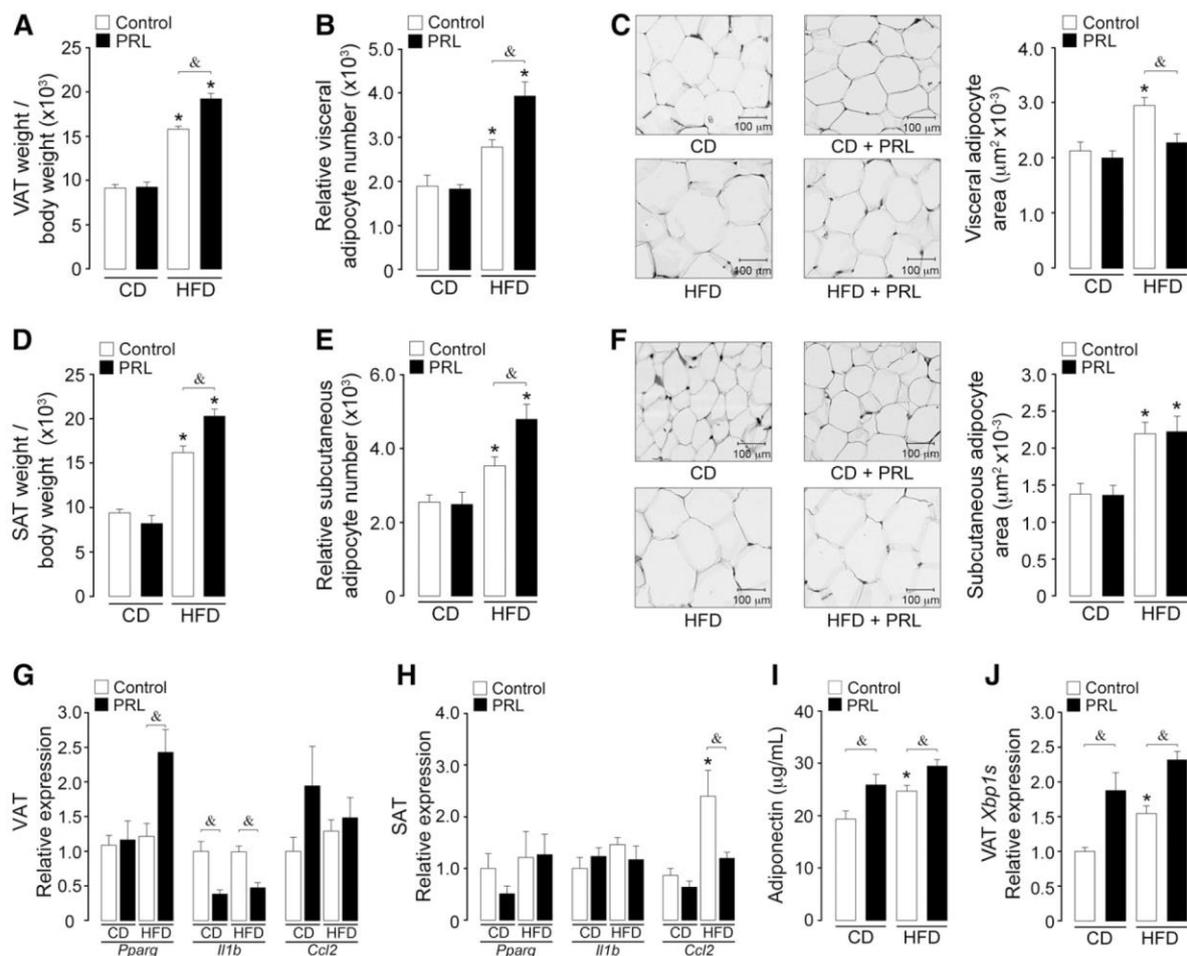


Figure 2. PRL treatment improves adipose tissue fitness in obese rats. VAT and SAT weight normalized to body weight ($n = 7-13$) (A and D), relative adipocyte number per fat depot ($n = 6-10$) (B and E), and representative sections of adipose tissue stained by hematoxylin and eosin to show adipocyte size (C and F). Graphs indicate quantification of adipocyte size in 9 fields per adipose tissue in 6-10 animals per group. Gene expression in VAT and SAT analyzed by qPCR ($n = 7-13$) (G and H). Serum adiponectin levels quantified by ELISA ($n = 7-11$) (I) and qPCR evaluation of *Xbp1s* in VAT ($n = 5-6$) (J). All evaluations were made after 8 weeks of the dietary intervention in the absence or presence of osmotic minipumps delivering PRL during the last 4 weeks. Data are mean \pm SEM; *, $P < .05$ vs respective CD or CD+PRL; &, $P < .05$ vs respective diet without PRL. Statistically significant differences were determined with two-way ANOVA, followed by the Bonferroni's post hoc test.

resistance and glucose intolerance compared with wild-type mice (*Prlr*^{+/+}) on the same diet (Figure 3, H and I). Inflammatory markers (*Il1b* and *Ccl2*) and serum adiponectin levels were not different between genotypes or diets in *Prlr*^{-/-} vs *Prlr*^{+/+} mice (Supplemental Figure 2).

PRL serum levels in patients associate positively with adiponectin levels and are reduced in insulin-resistant subjects

Establishing a correlation between PRL actions in rodent models and humans would support our hypothesis that circulating PRL plays a protective role against adipose tissue and metabolic dysfunction. To this end, we evaluated 27 lean, overweight, and obese male patients

(characteristics in Table 2) and analyzed their circulating PRL levels, metabolic parameters, and markers of adipose tissue functionality. Lean, overweight, and obese groups did not differ in age, glucose, adiponectin or PRL levels. However, overweight and overweight plus obese groups had higher insulin levels and HOMA-IR values than the lean group (Table 2). In this population, serum PRL correlated inversely with serum insulin levels (Figure 4A) and HOMA-IR (Figure 4B) and positively with circulating adiponectin levels (Figure 4C). As expected, when the subjects were divided into insulin-sensitive and insulin-resistant groups (HOMA-IR cutoff = 3.0) (48), insulin-resistant subjects had a higher BMI (Table 3). Interestingly, the insulin-resistant subjects showed significantly ($P = .03$)

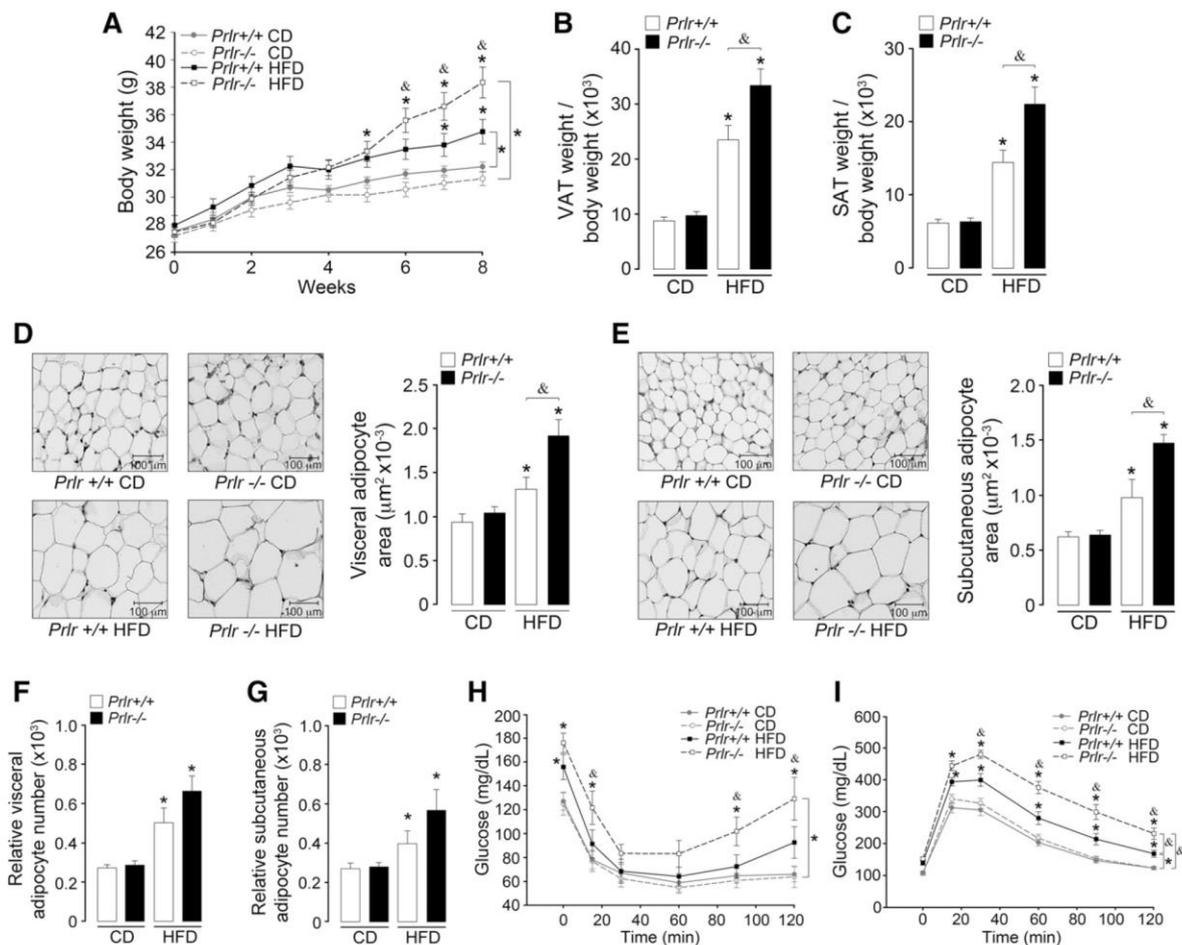


Figure 3. *Prlr*^{-/-} mice fed HFD show aggravated insulin resistance and glucose intolerance and unhealthy adipose tissue expansion. *Prlr*^{-/-} or *Prlr*^{+/+} C57BL/6 mice were evaluated after 8 weeks of dietary intervention. Body weight (n = 26–29) (A), VAT and SAT weight normalized to body weight (n = 19–24) (B and C), representative sections of VAT and SAT stained by hematoxylin and eosin to show adipocyte size (D and E). Graphs indicate quantification of adipocyte size in 9 fields per adipose tissue in 10–13 animals per group. Relative adipocyte number per adipose depot (n = 10–13) (F and G). ITT after 7 weeks on CD or HFD (n = 11–13) (H). GTT after 6 weeks on CD or HFD (n = 24–29) (I). Data are mean \pm SEM; *, $P < .05$ vs respective CD; &, $P < .05$ vs *Prlr*^{+/+} on HFD. Statistically significant differences were determined with two-way ANOVA (B–G) or repeated measures ANOVA (A, H, and I), followed by the Bonferroni's post hoc test.

lower serum PRL levels than those who were insulin sensitive (Table 3). However, as mentioned before, when separated by BMI, overweight or obese groups did not show lower serum levels of PRL compared with the lean group (Table 2), indicating that reduced circulating PRL correlates with insulin resistance but not with obesity itself. Moreover, when subjects were divided by their circulating PRL levels, the higher PRL group showed reduced insulin resistance ($P = .005$) and increased adiponectin levels ($P = .004$) but similar BMI (Table 3).

PRL serum levels and PRL produced in adipose tissue positively associate with expression of adipose tissue fitness markers

The relationship between PRL and adipose tissue fitness was analyzed further by using VAT and SAT biopsies from

lean, overweight, and obese patients (n = 15) undergoing abdominal surgery, and their circulating and adipose tissue PRL levels were evaluated for correlations with the expression of *PPARG*, *ADIPOQ*, and *GLUT4* in the fat tissue samples. Consistent with PRL promoting adipose tissue metabolic fitness, serum PRL levels correlated directly with the expression of *ADIPOQ* in both VAT and SAT, of *PPARG* in VAT, and of *GLUT4* in SAT (Figure 5, A and C). Moreover, PRL is produced by human adipose tissue, where it may act as an autocrine/paracrine factor (30). We found that *PRL* mRNA levels in adipose tissue correlated positively with the expression of *ADIPOQ* and *GLUT4* in SAT but not in VAT (Figure 5, B and D). These results suggest that both systemic PRL and PRL produced locally by the adipose tissue promote insulin sensitivity and adipose tissue metabolic homeostasis in humans.

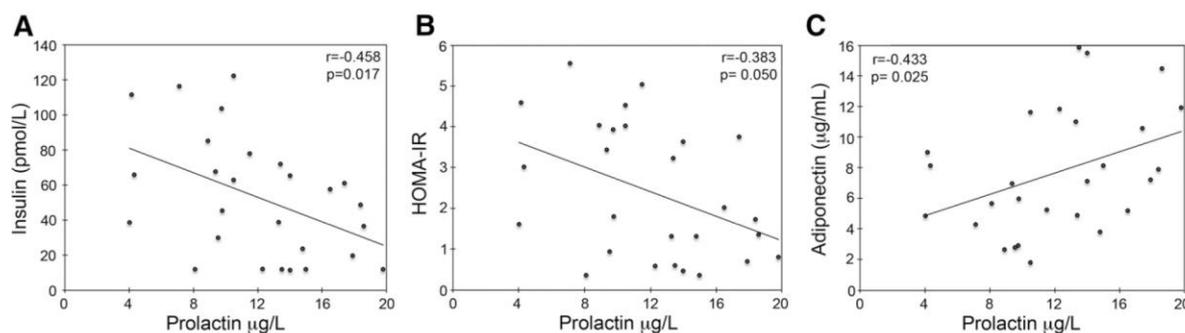


Figure 4. Serum PRL levels associate with insulin sensitivity and adiponectin levels in human subjects. Correlation analysis of serum PRL with circulating insulin (A), HOMA-IR (B), and adiponectin levels (C) from lean, overweight, and obese male subjects.

Discussion

During obesity, the inability of adipose tissue to maintain its functionality while storing nutrient surplus triggers insulin resistance and multiple metabolic diseases. Conversely, a healthy expansion of adipose tissue maintains and can even restore whole-body insulin sensitivity (41). Our study demonstrates that the hormone PRL promotes insulin sensitivity and the healthy expansion of adipose tissue and that these effects become apparent in both rodents and humans during obesity and insulin resistance, conditions that associate with low circulating PRL levels (35–38, 40). Mechanisms for the beneficial effects of PRL may include the ability to increase *Pparg* and *Xbp1s* expression and adiponectin secretion, as well as reducing adipocyte hypertrophy, increasing adipocyte hyperplasia, and reducing inflammation of adipose tissue. Also, other known effects of PRL may contribute to the overall beneficial effect of the hormone on metabolic homeostasis. In particular, PRL promotes β -cell function, not only in rodents but also in humans (27, 28), and stimulates insulin sensitivity in liver of mice, where overexpression of the *Prlr* promotes insulin sensitivity, whereas liver-specific deletion of the *Prlr* increases insulin resistance

(29). Thus, together, these results imply that elevating the levels of PRL may have therapeutic value against obesity-induced metabolic dysfunction.

In obesity, excess fat is stored in existing adipocytes (hypertrophy) or in new fat cells (hyperplasia) generated from precursor cells by the process of adipogenesis (2, 3). Hyperplasia is generally regarded as a relatively benign and perhaps even protective mechanism of adipose tissue expansion (2, 3), whereas deficient adipogenesis and exaggerated adipocyte hypertrophy are linked to adipose tissue dysfunction and metabolic syndrome (1, 49). Here, we showed that PRL treatment stimulates adipocyte hyperplasia in VAT and SAT and reduces adipocyte hypertrophy in VAT of obese, insulin-resistant rats. Consistent with this observation, in the absence of PRL signaling (*Prlr*^{-/-} mice), diet-induced obesity resulted in a greater level of adipocyte hypertrophy in both fat depots that is associated with increased insulin resistance and glucose intolerance. The beneficial effects of PRL likely involve a direct action on adipocytes. PRL receptors are expressed in fat (50, 51), both in adipocyte precursor cells and mature adipocytes (47), and their levels are higher in visceral than in sc fat cells (47). In addition, *Prlr* expression increases in the 3T3-L1 cell line during differentiation to adipocytes, and

Table 3. Insulin-Resistant Subjects Show Reduced PRL Serum Levels

Insulin Sensitivity	Sensitive (HOMA-IR < 3.0), (n = 15)	Resistant (HOMA-IR > 3.0), (n = 12)	P
Age (y)	37.4 ± 4.0	38.1 ± 3.4	.893
BMI (kg/m ²)	25.4 ± 1.0	29.3 ± 0.9	.008
HOMA-IR	1.1 ± 0.1	4.1 ± 0.2	<.000001
Adiponectin (µg/mL)	8.8 ± 1.2	6.3 ± 0.9	.091
PRL (µg/L)	13.7 ± 1.1	10.1 ± 1.1	.031
PRL Levels	Higher (12–20 µg/L) (n = 14)	Lower (4–11.9 µg/L) (n = 13)	P
Age (y)	37.5 ± 4.1	37.9 ± 3.0	.938
BMI (kg/m ²)	26.3 ± 1.0	28.1 ± 1.2	.251
HOMA-IR	1.6 ± 0.3	3.3 ± 0.5	.005
Adiponectin (µg/mL)	9.7 ± 1.1	5.5 ± 0.8	.004
PRL (µg/L)	15.6 ± 0.6	8.3 ± 0.7	<.000001

Values are mean ± SEM.

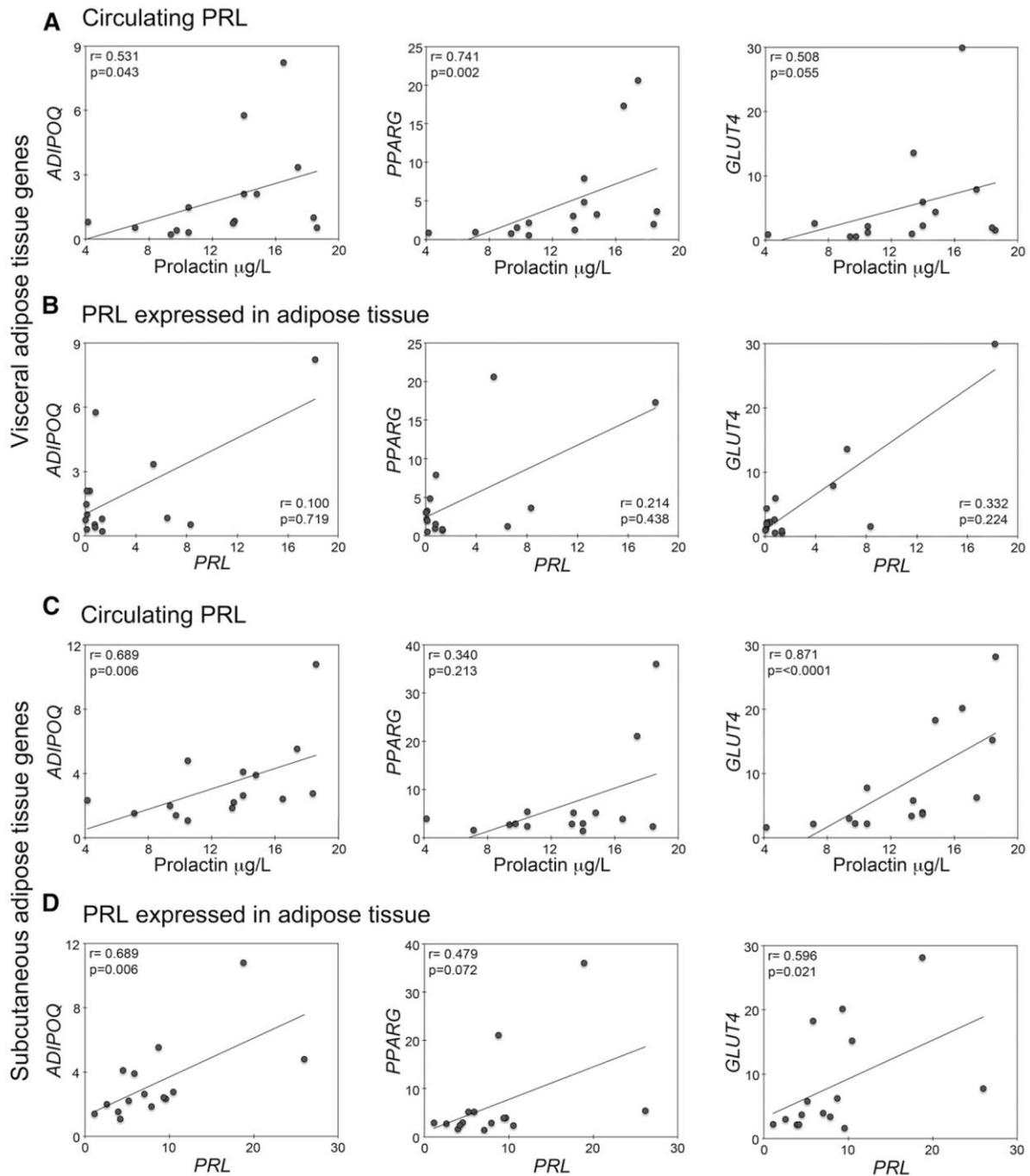


Figure 5. Serum PRL and adipose tissue *PRL* mRNA levels associate with the expression of adipose tissue fitness markers. Correlation analysis of (A and C) serum PRL or (B and D) adipose tissue *PRL* mRNA, and mRNA expression levels of adipose tissue fitness markers in VAT (A and B) and SAT (C and D).

PRL acts on these cells to stimulate such differentiation (52). These effects occur through activation of Signal transducer and activator of transcription 5 (52), as well as increased expression of *Cebpb* and *Pparg* (33), which promotes adipogenesis.

Here, we show that PRL promotes *Pparg* expression only in VAT and exclusively under HFD conditions. In view of the known ability of PPAR γ to improve insulin sensitivity (53), it is likely to mediate the PRL protective effects. PPAR γ induces the expression

of adiponectin (54), an adipokine promoting insulin sensitivity in rodents and humans (55). We found that elevating PRL in serum increases circulating adiponectin levels in rats under both control and HFD conditions. However, PRL stimulated *Pparg* expression only under HFD conditions, so the increase in adiponectin levels induced by PRL under CD likely involves other factors. One such factor may be *Xbp1s*, a transcription factor activated by PRL in mammary adipose tissue during lactation (45). We found that PRL up-regulates *Xbp1s* in the VAT of rats under both CD and HFD feeding, *Xbp1s* induces adipogenesis via the transcriptional activation of *Cebpa* and *Pparg* (56, 57) and improves glucose tolerance and insulin sensitivity in lean and obese mice by increasing adiponectin secretion (46).

It is puzzling that PRL treatment increases *Xbpl* levels in adipose tissue under both CD and HFD but increases *Pparg* only under HFD. Several studies have shown that many PPAR γ effects occur in association with obesity or HFD conditions (58–61). One mechanistic explanation for this is that visceral fat (but not SAT) from obese mice is more sensitive to PPAR γ agonists (rosiglitazone) (59). Enhanced sensitivity results from increased expression of ubiquitin hydrolase/ligase ubiquitin C-terminal esterase L1 in visceral fat of obese mice and humans. Ubiquitin hydrolase/ligase ubiquitin C-terminal esterase L1 facilitates the proteasomal degradation of the PPAR γ heterodimerization partner retinoid X receptor α (RXR α), promoting increased PPAR γ -RXR β heterodimerization, which is less sensitive to transcriptional repression by silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors than PPAR γ -RXR α . Thus, the reduced RXR α to RXR β ratio increases PPAR γ transcriptional activity (59), thereby promoting *Cebpa* expression and initiating the positive feedback loop between these 2 factors to mutually increase each other's expression. Accordingly, by favoring the action of PPAR γ agonists or activators, the obese condition provides a plausible explanation for the preferential effects of PRL treatment under HFD.

In our study, increasing serum PRL to levels (60–80 ng/mL) equivalent to those reported in male rats at circadian peaks (62) or in response to stress (63, 64) elevated systemic adiponectin. This implies that PRL at a relatively high concentration but within a physiological range found in female reproductive states may protect against metabolic dysfunction by increasing circulating adiponectin. However, contrary to this proposal, PRL reduces adiponectin secretion by adipose tissue in culture (65) and transgenic female (but not male) mice overexpressing PRL and having PRL serum levels (>250 ng/mL, at the high end of the normal range found during pregnancy

and lactation), show lower systemic adiponectin values (65). Although the differences in in vitro vs in vivo conditions, gender, physiological state, and PRL concentration may contribute to these discrepancies, clinical work supports our proposal. Clinical studies demonstrate that circulating PRL positively correlates with insulin sensitivity (36, 38) and with serum adiponectin in males (current findings) and in females with polycystic ovary syndrome (66).

The inhibition of proinflammatory mediators is another way by which PRL may improve insulin sensitivity and fat fitness. In agreement with the antiinflammatory effects of PRL in other rodent models of disease (67), we found that PRL treatment reduces the expression of *Il1b* and *Ccl2* in VAT and SAT, respectively, and both IL-1 β and CCL2 contribute to inflammation-mediated insulin resistance and adipose tissue dysfunction in obesity (68, 69).

Consistent with our observations in *Prlr*^{-/-} mice, mice deficient in PRL (on a C57BL/6 strain) fed a CD have normal adipose tissue mass and unaltered metabolic phenotype (70). Although insulin sensitivity and adipose tissue fitness have not been evaluated in PRL null mice under a HFD, we show here that *Prlr*^{-/-} mice on a HFD develop increased obesity, exacerbated glucose intolerance, insulin resistance, and enlarged adipocytes. These findings confirm the beneficial actions of PRL on metabolic and adipose tissue function and show that its effects become evident during obesity. However, in apparent contradiction to our findings, *Prlr*^{-/-} mice on a 129/SvJ genetic background display milder obesity and no insulin resistance in response to a HFD (71), which prompts to the emergence of beige/brite adipocytes in white fat. The 129/SvJ strain is intrinsically less prone to diabetes and HFD-induced obesity than the C57BL/6 strain (72). Its reduced susceptibility involves increased intermuscular deposits of brown adipocytes (72), higher thermogenic capacity, augmented beige potential, and distinct inflammatory pathways in the adipose tissue and gut microbiota environments (73, 74). The aggravated metabolic alterations found in the present study in *Prlr*^{-/-} mice of the C57BL/6 strain were consistent with the fact that no beige adipocytes could be detected in SAT or VAT under HFD conditions (Figure 3, D and E).

The above information makes clear that in rodents, as in humans, metabolic alterations depend on genetically associated risk and protective factors and that these factors are able to influence the outcome of PRL metabolic effects. However, our conclusion that the absence of PRL action in obesity has negative metabolic consequences that can be counteracted by increasing PRL levels, is supported by clinical data. Low PRL

levels associate with glucose intolerance, insulin resistance, obesity, and T2D in adults (35–37) and with metabolic syndrome in children (38). Here, we extend these findings by showing that insulin-sensitive male subjects have PRL values higher than those in insulin-resistant patients, regardless of their BMI (within the 19–36 range), and that patients' serum PRL levels associate positively with circulating adiponectin levels and with the expression of adipose tissue fitness markers, including *ADIPOQ*, *PPARG*, and *GLUT4*. Furthermore, our work supports the role of PRL as a local regulator of human adipose tissue (30) by showing that PRL synthesis in SAT correlates with the expression of *ADIPOQ* and *GLUT4* in this adipose depot.

In summary, the present study shows that PRL protects against obesity-induced insulin resistance by promoting the healthy expansion and metabolic fitness of adipose tissue via mechanisms that include increased levels of *Xbp1s*, *Pparg*, and adiponectin in fat. Given that low circulating PRL correlates with disrupted metabolic homeostasis in patients, restoring or elevating PRL levels may help reduce metabolic dysfunction in normal or obese individuals with insulin resistance. Our work expands the knowledge of PRL effects in physiological states beyond pregnancy and lactation, and highlights the need for a better understanding of its role in regulating metabolic homeostasis in both females and males.

Acknowledgments

We thank Daniel Mondragón, Juan Pablo Robles, Gabriel Nava, Martín García-Servín, Alejandra Castilla, and Antonio Prado (all of Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM]) for excellent technical assistance; Dorothy D. Pless (Instituto de Neurobiología, UNAM) for critically editing the manuscript; and Teresita Ortiz-Ortiz (Hospital General de Querétaro, Servicios de Salud del Estado de Querétaro) for supporting patient recruitment logistics. We also thank C. R. Kahn (Joslin Diabetes Center, Boston, MA) for critical reading of the manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Yazmín Macotela, PhD, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, 76230 Querétaro, Mexico. E-mail: macotelag@unam.mx.

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) Grants 164423 and 174984 (to Y.M.). Xarubet Ruiz-Herrera is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and received the CONACYT Fellowship 245847.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

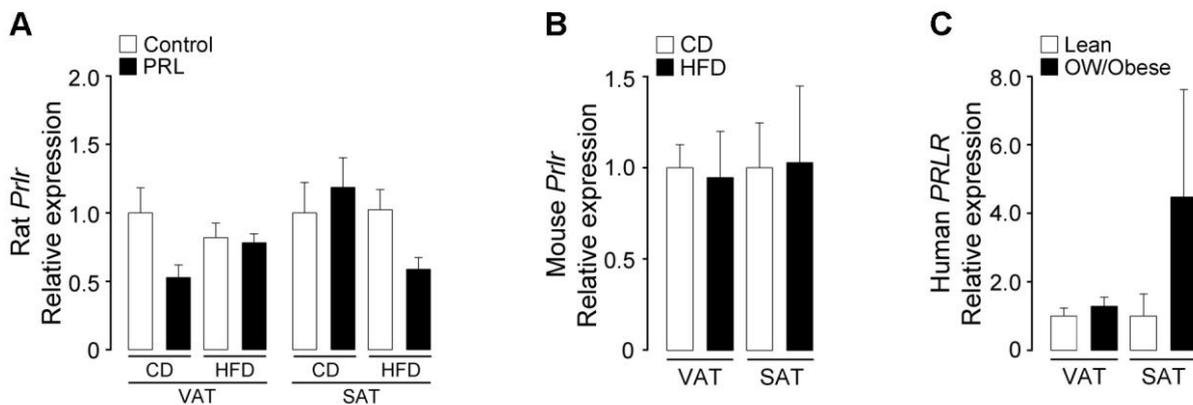
- Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A, Smith U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(4):193–200.
- Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*. 2015;208(5):501–512.
- Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1–2):20–44.
- Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med*. 2013;34(1):1–11.
- Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab*. 2008;7(5):410–420.
- Noel MB, Woodside B. Effects of systemic and central prolactin injections on food intake, weight gain, and estrous cyclicity in female rats. *Physiol Behav*. 1993;54(1):151–154.
- Gerardo-Gettens T, Moore BJ, Stern JS, Horwitz BA. Prolactin stimulates food intake in a dose-dependent manner. *Am J Physiol*. 1989;256(1 Pt 2):R276–R280.
- Sauvé D, Woodside B. The effect of central administration of prolactin on food intake in virgin female rats is dose-dependent, occurs in the absence of ovarian hormones and the latency to onset varies with feeding regimen. *Brain Res*. 1996;729(1):75–81.
- Sauvé D, Woodside B. Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. *Brain Res*. 2000;868(2):306–314.
- Nagaishi VS, Cardinali LL, Zampieri TT, Furigo IC, Metzger M, Donato J Jr. Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. *Neuroscience*. 2014;259:71–83.
- Moore BJ, Gerardo-Gettens T, Horwitz BA, Stern JS. Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. *Brain Res Bull*. 1986;17(4):563–569.
- Naef L, Woodside B. Prolactin/leptin interactions in the control of food intake in rats. *Endocrinology*. 2007;148(12):5977–5983.
- Byatt JC, Staten NR, Salsgiver WJ, Kostelc JG, Collier RJ. Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. *Am J Physiol*. 1993;264(6 Pt 1):E986–E992.
- Perez Millan MI, Luque GM, Ramirez MC, et al. Selective disruption of dopamine D2 receptors in pituitary lactotrophs increases body weight and adiposity in female mice. *Endocrinology*. 2014;155(3):829–839.
- Heil SH. Activational and organizational actions of gonadal hormones and the sex-specific effects of prolactin on food intake by rats. *Dev Psychobiol*. 1999;35(1):61–67.
- Grattan DR. 60 years of neuroendocrinology: the hypothalamoprolactin axis. *J Endocrinol*. 2015;226(2):T101–T122.
- Serri O, Beauregard H, Rasio E, Hardy J. Decreased sensitivity to insulin in women with microprolactinomas. *Fertil Steril*. 1986;45(4):572–574.
- Greenman Y, Tordjman K, Stern N. Increased body weight associated with prolactin secreting pituitary adenomas: weight loss with normalization of prolactin levels. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;48:547–553.
- Pala NA, Laway BA, Misgar RA, Dar RA. Metabolic abnormalities in patients with prolactinoma: response to treatment with cabergoline. *Diabetol Metab Syndr*. 2015;7:99.
- Perić B, Kruljac I, Šundalić S, et al. Obesity and hypercholesterolemia in patients with prolactinomas: could DHEA-S and growth hormone be the missing link? *Endocr Res*. 2016;41(3):200–206.
- Auriemma RS, Granieri L, Galdiero M, et al. Effect of cabergoline on metabolism in prolactinomas. *Neuroendocrinology*. 2013;98(4):299–310.
- Steele CA, MacFarlane IA, Blair J, et al. Pituitary adenomas in childhood, adolescence and young adulthood: presentation, management, endocrine and metabolic outcomes. *Eur J Endocrinol*. 2010;163(4):515–522.

23. Creemers LB, Zelissen PM, van't Verlaat JW, Koppeschaar HP. Prolactinoma and body weight: a retrospective study. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1991;125(4):392–396.
24. Doknic M, Pekic S, Zarkovic M, et al. Dopaminergic tone and obesity: an insight from prolactinomas treated with bromocriptine. *Eur J Endocrinol*. 2002;147(1):77–84.
25. dos Santos Silva CM, Barbosa FR, Lima GA, et al. BMI and metabolic profile in patients with prolactinoma before and after treatment with dopamine agonists. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(4):800–805.
26. Ratner LD, Stevens G, Bonaventura MM, et al. Hyperprolactinemia induced by hCG leads to metabolic disturbances in female mice. *J Endocrinol*. 2016;230(1):157–169.
27. Freemerk M, Avril I, Fleenor D, et al. Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology*. 2002;143(4):1378–1385.
28. Huang C, Snider F, Cross JC. Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of β -cell mass during pregnancy. *Endocrinology*. 2009;150(4):1618–1626.
29. Yu J, Xiao F, Zhang Q, et al. PRLR regulates hepatic insulin sensitivity in mice via STAT5. *Diabetes*. 2013;62(9):3103–3113.
30. Hugo ER, Borcherding DC, Gersin KS, Loftus J, Ben-Jonathan N. Prolactin release by adipose explants, primary adipocytes, and LS14 adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):4006–4012.
31. Carré N, Binart N. Prolactin and adipose tissue. *Biochimie*. 2014;97:16–21.
32. Ben-Jonathan N, Hugo E. Prolactin (PRL) in adipose tissue: regulation and functions. *Adv Exp Med Biol*. 2015;846:1–35.
33. Nambu-Wakao R, Fujitani Y, Masuho Y, Muramatu M, Wakao H. Prolactin enhances CCAAT enhancer-binding protein- β (C/EBP β) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) messenger RNA expression and stimulates adipogenic conversion of NIH-3T3 cells. *Mol Endocrinol*. (2)2000;14:307–316.
34. Viengchareun S, Servel N, Fève B, Freemerk M, Lombès M, Binart N. Prolactin receptor signaling is essential for perinatal brown adipocyte function: a role for insulin-like growth factor-2. *PLoS One*. 2008;3(2):e1535.
35. Balbach L, Wallaschofski H, Völzke H, Nauck M, Dörr M, Haring R. Serum prolactin concentrations as risk factor of metabolic syndrome or type 2 diabetes? *BMC Endocr Disord*. 2013;13:12.
36. Wagner R, Heni M, Linder K, et al. Age-dependent association of serum prolactin with glycaemia and insulin sensitivity in humans. *Acta Diabetol*. 2014;51(1):71–78.
37. Wang T, Lu J, Xu Y, et al. Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation: a population-based study. *Diabetes Care*. 2013;36(7):1974–1980.
38. Chirico V, Cannavo S, Lacquaniti A, et al. Prolactin in obese children: a bridge between inflammation and metabolic-endocrine dysfunction. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79:537–544.
39. Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980;51(5):1058–1063.
40. Lemini M, Ruiz-Herrera X, Ledesma-Colunga MG, et al. Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: role of TGF- β and TNF- α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;308(9):R792–R799.
41. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2621–2637.
42. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821–1830.
43. Clapp C, Adán N, Ledesma-Colunga MG, Solís-Gutiérrez M, Triebel J, Martínez de la Escalera G. The role of the prolactin/vasoinhibin axis in rheumatoid arthritis: an integrative overview. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(15):2929–2948.
44. Ye R, Scherer PE. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? *Mol Metab*. 2(3)013;2:133–141.
45. Gregor MF, Misch ES, Yang L, et al. The role of adipocyte XBP1 in metabolic regulation during lactation. *Cell Rep*. 2013(5);3:1430–1439.
46. Sha H, Yang L, Liu M, et al. Adipocyte spliced form of X-box binding protein 1 promotes adiponectin multimerization and systemic glucose homeostasis. *Diabetes*. 2014;63(3):867–879.
47. Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, et al. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes*. 2012;61(7):1691–1699.
48. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412–419.
49. Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U. Restricted adipogenesis in hypertrophic obesity: the role of WISP2, WNT, and BMP4. *Diabetes*. 2013;62(9):2997–3004.
50. Ling C, Hellgren G, Gebre-Medhin M, et al. Prolactin (PRL) receptor gene expression in mouse adipose tissue: increases during lactation and in PRL-transgenic mice. *Endocrinology*. 2000;141(10):3564–3572.
51. Ling C, Svensson L, Odén B, et al. Identification of functional prolactin (PRL) receptor gene expression: PRL inhibits lipoprotein lipase activity in human white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(4):1804–1808.
52. Stewart WC, Baugh JE Jr, Floyd ZE, Stephens JM. STAT5 activators can replace the requirement of FBS in the adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2(1)004;324:355–359.
53. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*. 2013;19(5):557–566.
54. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, et al. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*. 2003;52(7):1655–1663.
55. Gao H, Fall T, van Dam RM, et al. Evidence of a causal relationship between adiponectin levels and insulin sensitivity: a Mendelian randomization study. *Diabetes*. 2013;62(4):1338–1344.
56. Sha H, He Y, Chen H, et al. The IRE1 α -XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis. *Cell Metab*. 2009(6);9:556–564.
57. Cho YM, Kwak SN, Joo NS, et al. X-box binding protein 1 is a novel key regulator of peroxisome proliferator-activated receptor γ 2. *FEBS J*. 2014;281(22):5132–5146.
58. Jonker JW, Suh JM, Atkins AR, et al. A PPAR γ -FGF1 axis is required for adaptive adipose remodelling and metabolic homeostasis. *Nature*. 2012;485(7398):391–394.
59. Lefebvre B, Benomar Y, Guédin A, et al. Proteasomal degradation of retinoid X receptor α reprograms transcriptional activity of PPAR γ in obese mice and humans. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1454–1468.
60. Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, et al. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes*. 2002;51(10):2968–2974.
61. Edvardsson U, Bergström M, Alexandersson M, Bamberg K, Ljung B, Dahllöf B. Rosiglitazone(BRL49653), a PPAR γ -selective agonist, causes peroxisome proliferator-like liver effects in obese mice. *J Lipid Res*. 1999;40(7):1177–1184.
62. Esquifino AI, Chacón F, Jimenez V, Reyes Toso CF, Cardinali DP. d24-hour changes in circulating prolactin, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in male rats subjected to social isolation. *J Circadian Rhythms*. 2(1)004;2:1.
63. Krulich L, Hefco E, Aschenbrenner JE. Mechanism of the effects of hypothalamic deafferentation on prolactin secretion in the rat. *Endocrinology*. 1975;96(1):107–118.
64. Sylvester PW, Forczek S, Ip MM, Ip C. Exercise training and the differential prolactin response in male and female rats. *J Appl Physiol (1985)*. 1989;67(2):804–810.
65. Nilsson L, Binart N, Bohlooly-Y M, et al. Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(4):1120–1126.
66. Albu A, Florea S, Fica S. Is prolactin the missing link in adipose tissue dysfunction of polycystic ovary syndrome patients? *Endocrine*. 2016;51(1):163–173.

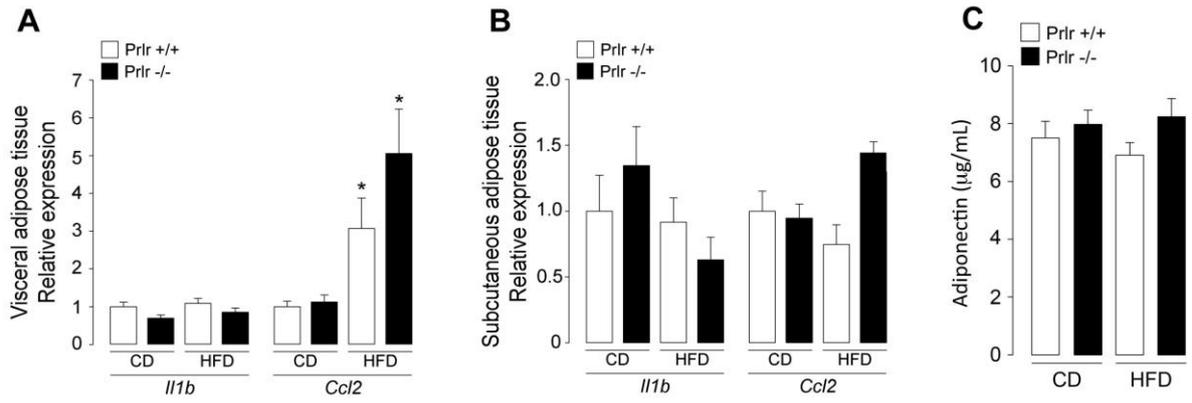
67. Adán N, Guzmán-Morales J, Ledesma-Colunga MG, et al. Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *J Clin Invest*. 2013;**123**(9):3902–3913.
68. McGillicuddy FC, Harford KA, Reynolds CM, et al. Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes*. 2011;**60**(6):1688–1698.
69. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. 2006;**116**(6):1494–1505.
70. LaPensee CR, Horseman ND, Tso P, Brandebourg TD, Hugo ER, Ben-Jonathan N. The prolactin-deficient mouse has an unaltered etabolic phenotype. *Endocrinology*. 2006;**147**(10):4638–4645.
71. Auffret J, Viengchareun S, Carré N, et al. Beige differentiation of adipose depots in mice lacking prolactin receptor protects against high-fat-diet-induced obesity. *FASEB J*. 2012;**26**(9):3728–3737.
72. Almind K, Kahn CR. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes*. 2004;**53**(12):3274–3285.
73. Mori MA, Raghavan P, Thomou T, et al. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metab*. 2012;**16**(3):336–347.
74. Ussar S, Griffin NW, Bezy O, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet modulate the predisposition to obesity and metabolic syndrome. *Cell Metab*. 2015;**22**(3):516–530.

Supplementary Table 1. Oligonucleotide sequences

Gene	Forward primer	Reverse primer
Rat		
<i>Pparg</i>	AGATGACAGTGACTTGGCCA	TGTGACAATCTGCCTGAGGT
<i>Il1b</i>	AAAAGCGGTTTGTCTTCAAC	GGAATAGTGCAGCCATCTTT
<i>Ccl2</i>	CTGTAGCATCCACGTGCTGT	TGCTGCTGGTGATTCTCTTG
<i>Prlr</i>	CCTGCATCTTTCCACCAGTTC	GCACTCAGCAGTTCTTCAGACTTG
<i>18S</i>	CGCGGTTCTATTTTGTGGT	AGTCGGCATCGTTTATGGTC
Mouse		
<i>Pparg</i>	GCATGGTGCCTTCGCTGA	TGGCATCTCTGTGTCAACCATG
<i>Il1b</i>	GTTGATTCAAGGGGACATTA	AGCTTCAATGAAAGACCTCA
<i>Ccl2</i>	ACCAGCCAACTCTCACTGAA	TGAGTAGCAGGTGAGTG
<i>Prlr</i>	ACACGCGCAGATCTCCTTACCA	CCCCTTCTTGACAGCCACTT
<i>Tbp</i>	ACCCTTCACCAATGACTCCTATG	TGACTGCAGCAA ATCGCTTGG
Human		
<i>PRL</i>	CATCAACAGCTGCCACACTT	CGTTTGGTTTGCTCCTCAAT
<i>PRLR</i>	TCATGATGGTCAATGCCACT	GCGTGAACCACCCAGTTTTT
<i>ADIPOQ</i>	GGCATGACCAGGAAACCAC	TTCACCGATGTCTCCCTTAGG
<i>PPARG</i>	GATACACTGTCTGACAACATATCACAA	CCACGGAGCTGATCCCAA
<i>GLUT4</i>	GCCGGACGTTTGACCAGAT	TGGGTTTCACCTCCTGCTCTA
<i>18S</i>	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT



Supplementary Figure 1. Effect of HFD or obesity on PRL receptor expression in adipose tissue. PRL receptor expression in VAT and SAT of control or PRL-treated rats ($n = 5-6$) (A), or mice ($n = 10$) (B) fed a control (CD) or a high fat diet (HFD) for 8 weeks, and of lean ($n = 6$) and overweight (OW) + obese patients ($n = 9$). Gene expression in visceral (VAT) and subcutaneous adipose tissue (SAT) was analyzed by quantitative real time PCR and normalized to the expression of *18S* in rats (A) and humans (C), and *Tbp* (TATA-box binding protein) in mice (B).



Supplementary Figure 2. Inflammatory markers in adipose tissue and adiponectin serum levels in *Prlr*^{-/-} mice. Prlr^{+/+} or Prlr^{-/-} mice were fed a CD or a HFD for 8 weeks. Gene expression in visceral (A) and subcutaneous (B) adipose tissue was analyzed by quantitative real time PCR and normalized to the expression of *Tbp* (TATA-box binding protein) (n = 10). (C) Serum adiponectin levels quantified by ELISA (n = 10). *Il1b*: interleukin-1 beta, *Ccl2*: chemokine (C-C motif) ligand 2.

VII. DISCUSIÓN

La obesidad es una enfermedad que se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa corporal, lo que deriva en la disfunción del tejido adiposo y detona la resistencia a la insulina además de otras alteraciones metabólicas diversas. Se ha reportado que, en humanos, bajos niveles de la hormona PRL se asocian con intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, obesidad, y diabetes tipo 2 en adultos (Balbach et al., 2013; Wang et al., 2013; Wagner et al., 2014) y con síndrome metabólico en niños (Chirico et al., 2013). Por lo tanto, es este estudio evaluamos si los bajos niveles de PRL son un factor causal de las alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad (resistencia a la insulina y disfuncionalidad del tejido adiposo), o si es un evento secundario a la obesidad que carece de consecuencias. En primer lugar, utilizando un modelo de obesidad en ratas inducido por una DG, donde anteriormente habíamos reportado que se presentan bajos niveles de PRL (Lemini et al., 2015), administramos PRL con la finalidad de elevar los niveles de esta hormona, y demostramos que el tratamiento con PRL disminuye la resistencia a la insulina inducida por una DG. Además, utilizando un modelo de pérdida de función de la PRL, encontramos que los ratones *rPrl*^{-/-} alimentados con DG desarrollan mayor obesidad comparados con los animales silvestres alimentados con la misma dieta, y presentan intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina exacerbadas. Mientras que, en humanos, ampliando los resultados ya conocidos, mostramos que pacientes hombres sensibles a la insulina tienen niveles más altos de PRL en suero que los pacientes resistentes a la insulina, independientemente de su IMC. Con estos datos, podemos decir que la PRL tiene un papel importante en la regulación de la sensibilidad a la insulina. Para tratar de dilucidar como la PRL podría preservar la sensibilidad a la insulina sistémica, evaluamos parámetros del tejido adiposo que se sabe están estrechamente relacionados con el desarrollo de resistencia a la insulina (expansión y funcionalidad de dicho tejido) durante la obesidad. Encontramos que los efectos benéficos de la PRL sobre la sensibilidad a la insulina pueden estar mediados por la estimulación de la expansión saludable del tejido adiposo (reducción de la hipertrofia e incremento de la hiperplasia de los adipocitos), la reducción de la inflamación del tejido adiposo (la inflamación está relacionada positivamente con la resistencia a la insulina) y un aumento en la

secreción de adiponectina (adipocina que incrementa la sensibilidad a la insulina) (Gao et al., 2013).

Es bien sabido que, durante la obesidad el exceso de grasa es almacenado en los adipocitos existentes, proceso conocido como hipertrofia, o en nuevos adipocitos formados a partir de células precursoras (hiperplasia), lo que involucra su proliferación, y posterior diferenciación hacia adipocitos maduros, o adipogénesis (Rosen y Spiegelman, 2014; Rutkowski et al., 2015). La hiperplasia es generalmente considerada como un mecanismo benigno e incluso protector de la expansión del tejido adiposo para contender contra el almacenamiento excesivo de grasa, mientras que una hiperplasia deficiente y una hipertrofia exagerada de los adipocitos está ligada a la pérdida de función del tejido adiposo y al desarrollo de síndrome metabólico (Gustafson et al., 2013; Gustafson et al., 2015). Por el contrario, una expansión saludable del tejido adiposo mantiene e incluso puede restaurar la sensibilidad a la insulina sistémica (Kim et al., 2007). En este trabajo, nosotros mostramos que el tratamiento con PRL estimula la hiperplasia de los adipocitos en el TAB visceral y subcutáneo mientras que reduce la hipertrofia del TAB visceral de ratas obesas resistentes a la insulina. Consistente con esta observación, en la ausencia de señalización de PRL (ratón *rPrl*^{-/-}), encontramos que la obesidad inducida por DG resulta en mayor hipertrofia de los adipocitos en ambos depósitos de grasa lo cual se asocia con un incremento de la resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Sin embargo, en humanos no encontramos una relación entre los niveles de PRL y el tamaño de los adipocitos, probablemente por el número de muestras analizadas y a un factor de gran variabilidad entre los pacientes que es el tiempo durante el cual se ha padecido la enfermedad.

Como se mencionó anteriormente, la producción de citocinas proinflamatorias en el tejido adiposo se ve desregulada durante la obesidad. Y la inhibición de mediadores proinflamatorios es otra vía por la cual la PRL podría mejorar la sensibilidad a la insulina y la funcionalidad del tejido adiposo. Se sabe que los adipocitos hipertróficos liberan citocinas proinflamatorias, atrayendo macrófagos que crean un ambiente de inflamación en el tejido adiposo, y favorece el desarrollo de resistencia a la insulina. Además, se ha publicado que la PRL ejerce efectos antiinflamatorios en otras

enfermedades como la artritis (Adan et al., 2013). Nosotros encontramos que en ratas el tratamiento con PRL reduce la expresión de *I11b* y *Ccl2* en el TAB visceral y subcutáneo, respectivamente, y ambos IL-1 β y CCL2 contribuyen a la resistencia a la insulina mediada por inflamación y disfuncionalidad del tejido adiposo en la obesidad (Kanda et al., 2006; McGillicuddy et al., 2011). Mientras que en el ratón *rPrl*^{-/-} no encontramos diferencias en la expresión de marcadores proinflamatorios, posiblemente por efectos compensatorios desarrollados.

La pérdida de función del tejido adiposo durante la obesidad también se refleja en la alteración de la producción de adipocinas; en este estudio, analizamos el efecto de PRL sobre varios marcadores de funcionalidad del tejido adiposo, encontrando una relación con adiponectina, *PPARG* y el transportador 4 de glucosa (*GLUT4*). Particularmente, en ratas encontramos que el tratamiento con PRL aumenta los niveles de adiponectina en suero tanto en dieta control (DC) como en DG; mientras que en el modelo de ausencia de señalización de PRL no lo observamos. Sin embargo, contrario a esto, se ha reportado que la PRL reduce la secreción de adiponectina en explantes de tejido adiposo (Nilsson et al., 2005) y en ratones hembra transgénicos, donde se sobreexpresa la PRL provocando altos niveles de la hormona, se presentan bajos niveles sistémicos de adiponectina (Nilsson et al., 2005). Además, es importante señalar que las diferencias entre las condiciones *in vitro* e *in vivo*, género, estado fisiológico y las concentraciones de PRL en cada experimento pueden contribuir a estas discrepancias. Estudios clínicos demuestran que los niveles circulantes de PRL correlacionan con la sensibilidad a la insulina (Chirico et al., 2013; Wagner et al., 2014) y con adiponectina en suero en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (Albu et al., 2016). Por su parte, en humanos, reportamos que los niveles de PRL en suero se asocian positivamente con los niveles circulantes de adiponectina y con la expresión de marcadores de funcionalidad del tejido adiposo, incluyendo *ADIPOQ*, *PPARG* y *GLUT4*. Además, en este modelo (humanos), se sabe que el propio tejido adiposo produce PRL (Hugo et al., 2008), así que al evaluar la expresión de PRL en este tejido, encontramos que la expresión de *PRL* en el TAB subcutáneo correlaciona con la expresión de *ADIPOQ* y *GLUT4* en este depósito graso.

Indagando sobre los posibles mecanismos por los cuales la PRL ejerce sus efectos benéficos, encontramos que en ratas la PRL aumenta la expresión de *Pparg* y *Xbp1s* (isoforma por corte y empalme de la proteína 1 de unión a la caja X), probablemente por la acción directa de la PRL sobre los adipocitos. Ya que se ha reportado que los receptores de PRL se expresan en el tejido adiposo (Ling et al., 2000; Ling et al., 2003), en células precursoras de adipocitos y en los adipocitos maduros (Macotela et al., 2012), y sus niveles son más altos en células adiposas viscerales comparado con las células subcutáneas (Macotela et al., 2012). Además, se ha reportado que en la línea celular 3T3-L1 se incrementa la expresión del *rPrI* durante su diferenciación hacia adipocitos, y en este reporte concluyen que la PRL actúa sobre estas células estimulando su diferenciación (Stewart et al., 2004). Se propone que estos efectos de PRL ocurren a través de la activación de su vía canónica STAT5 (transductor de señal y regulador de la transcripción 5) (Stewart et al., 2004), así como incrementando la expresión de *Cebpb* y *Pparg* (Nanbu-Wakao et al., 2000), factores que se conoce promueven el proceso de adipogénesis. En este trabajo, mostramos que la PRL promueve la expresión de *Pparg* exclusivamente en el TAB visceral en ratas bajo condiciones de DG. Es probable que la PRL ejerza sus efectos protectores contra la resistencia a la insulina por esta vía, ya que se ha reportado que PPAR γ incrementa la sensibilidad a la insulina (Ahmadian et al., 2013) a través de estimular la expresión de adiponectina (Iwaki et al., 2003), como se mencionó anteriormente, una adipocina que promueve la sensibilidad a la insulina. En nuestro trabajo, también observamos un incremento en los niveles de adiponectina en el suero de estos animales bajo ambas dietas (DC y DG), sin embargo, encontramos que la PRL estimula la expresión de *Pparg* solo en condiciones de DG, por lo que el incremento de los niveles de adiponectina inducidos por PRL bajo DC involucra otros factores. Uno de los factores que podría estar involucrado es *Xbp1s*, un factor de transcripción activado por PRL en el tejido adiposo mamario durante la lactancia (Gregor et al., 2013). Encontramos que la PRL incrementa la expresión *Xbp1s* en el TAB visceral de ratas alimentadas tanto en DC como DG. Además se ha reportado que *Xbp1s* induce adipogénesis a través de aumentar la activación transcripcional de *Cebpa* y *Pparg* (Sha et al., 2009; Cho et al., 2014), que repercute en un aumento de la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en ratones delgados y obesos, incrementando además la secreción de

adiponectina (Sha et al., 2014). Fue inesperado que el tratamiento con PRL aumentara los niveles de *Xbp1s* en el tejido adiposo bajo DC y DG, pero que aumentara *Pparg* sólo bajo DG. Varios estudios han demostrado que muchos efectos de PPAR γ ocurren en asociación con obesidad o condiciones de DG (Edvardsson et al., 1999; Yu et al., 2002; Lefebvre et al., 2010; Jonker et al., 2012). Una explicación para esto es que la grasa visceral (pero no la subcutánea) de los ratones obesos es más sensible a agonistas de PPAR γ (rosiglitazona) (Lefebvre et al., 2010).

Existen otros efectos conocidos de la PRL que pueden contribuir al efecto benéfico de la hormona sobre la homeostasis metabólica. Específicamente, la PRL promueve la función de las células beta, no sólo en roedores sino también en humanos (Freemark et al., 2002; Huang et al., 2009), y en ratones estimula la sensibilidad a la insulina en el hígado, la sobreexpresión hepática del receptor de PRL promueve la sensibilidad a la insulina, mientras que la delección del receptor de PRL específicamente en el hígado incrementa la resistencia a la insulina (Yu et al., 2013). En conjunto estos datos indican que el aumento en los niveles de PRL puede tener un valor terapéutico contra la disfunción metabólica inducida por la obesidad, teniendo como blanco no sólo el tejido adiposo sino otros órganos importantes en la regulación de la homeostasis metabólica.

La acción benéfica de la PRL en el metabolismo y en la función del tejido adiposo se ponen en manifiesto durante condiciones de obesidad. Contrario a nuestro trabajo, en el 2012 se reportó que el ratón *rPrl*^{-/-} muestra una obesidad más leve y sin resistencia a la insulina en respuesta a una DG (Auffret et al., 2012), debido al menos en parte a la aparición de células beige en el TAB subcutáneo. Cabe destacar, que en dicho estudio utilizaron ratones *rPrl*^{-/-} de la cepa 129/SvJ, la cual es conocida por ser resistente a la obesidad y a la diabetes (Almind y Kahn, 2004). Por el contrario, en nuestro estudio utilizamos ratones *rPrl*^{-/-} de la cepa C57BL/6 conocida por ser susceptible a la obesidad y la diabetes (Almind y Kahn, 2004). Algunos mecanismos involucrados en la protección contra la obesidad y la diabetes de la cepa 129/SvJ son el incremento de adipocitos beige, mayor capacidad termogénica, y menor inflamación en el tejido adiposo y una flora intestinal distinta

(Mori et al., 2012; Ussar et al., 2015). La agravada alteración metabólica que encontramos en nuestro estudio en los ratones *rPr1-/-* de la cepa C57BL/6 fue consistente con el hecho de que no encontramos adipocitos beige en el TAB bajo una DG.

Por otro lado, hay datos que aun requieren de mayor esclarecimiento y profundización en su estudio. Por ejemplo, investigar cuales son los niveles de PRL mínimos para contrarrestar las alteraciones metabólicas desencadenadas por la obesidad. En nuestro modelo de ratas tratadas con PRL, incrementamos los niveles de esta hormona a 60-80 ng/mL, lo cual es equivalente a lo reportado en ratas macho en respuesta al estrés (Krulich et al., 1975; Sylvester et al., 1989). Esto implica que la PRL a concentraciones relativamente altas, pero en un rango fisiológico encontrado por ejemplo en etapas reproductivas en hembras, puede proteger contra la disfunción metabólica. Sin embargo, podría ser posible que se necesite un aumento menor en los niveles de PRL. Otro aspecto que debemos tener en cuenta, es que la PRL no sólo podría tener efectos directos sobre los adipocitos, sino también sobre otros tipos celulares del tejido adiposo. Y por último faltaría entender las diferencias específicas de los dos depósitos de TAB (visceral y subcutáneo), que hacen que la PRL tenga algunos efectos en uno, pero no en el otro, por ejemplo, previniendo la hipertrofia del TAB visceral y no así del subcutáneo.

En resumen, nuestro trabajo muestra que la PRL aminora la resistencia a la insulina inducida por la obesidad a través de promover la expansión saludable y la función metabólica del tejido adiposo por mecanismos que incluyen el incremento en los niveles de *Xbp1s*, *Pparg*, y adiponectina en el tejido adiposo. Dado que los bajos niveles de PRL circulante correlacionan con la disrupción de la homeostasis metabólica en pacientes, el restablecimiento o la elevación de los niveles de PRL podría ayudar a reducir la disfunción metabólica en individuos obesos con resistencia a la insulina.

VIII. CONCLUSIONES

En este trabajo concluimos que la PRL participa en la regulación de la resistencia a la insulina y el funcionamiento del tejido adiposo en condiciones de obesidad. En términos generales y basándonos en los 3 modelos experimentales utilizados (ganancia de función en ratas, pérdida de función en ratones y análisis de correlación en humanos), la PRL previene algunas alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad evitando la disfuncionalidad del tejido adiposo presente en estas condiciones, es decir, mantiene una expansión saludable del tejido adiposo estimulando la hiperplasia y evitando la hipertrofia. Además, la PRL mantiene un ambiente saludable en la producción de adipocinas durante la obesidad, específicamente se correlaciona positivamente con la producción de adiponectina (factor que estimula la sensibilidad a la insulina) y la expresión de marcadores de la funcionalidad del tejido adiposo como *GLUT4*, *PPARG* y adiponectina, y negativamente con la expresión de citocinas inflamatorias que estimulan resistencia a la insulina. Este panorama general en el mantenimiento de la función del tejido adiposo por parte de la PRL se traduce en una disminución de la resistencia a la insulina, es decir, también concluimos que la PRL estimula de manera sistémica la sensibilidad a la insulina en condiciones de obesidad. Los mecanismos por los cuales la PRL podría estar ejerciendo dichos efectos en el tejido adiposo, es a través de estimular la expresión de *Pparg* y *Xbp1s*. El primero, estimula la sensibilidad a la insulina y aumenta la expresión de adiponectina, mientras que el segundo induce adipogénesis aumentando la expresión de *Cebpa* y *Pparg*, y estimulando la expresión y secreción de adiponectina. En la Figura 7 se esquematizan a manera de conclusión los posibles mecanismos que ejerce la PRL en el tejido adiposo en condiciones de obesidad, representados en el adipocito, el principal componente celular del este tejido, aunque podrían estar participando otros tipos celulares. Por todo lo anterior, una propuesta original derivada de nuestro trabajo es que la PRL puede tener un potencial terapéutico contras las alteraciones metabólicas inducidas por la obesidad a través de contrarrestar la disfuncionalidad del tejido adiposo y la resistencia a la insulina.

IX. PERSPECTIVAS

Este trabajo nos permitió demostrar que la PRL tiene un papel importante en la regulación de la función del tejido adiposo que repercute en la sensibilidad sistémica a la insulina en la obesidad, sin embargo, se derivan los siguientes puntos importantes para evaluar a futuro:

- Analizar cual o cuales son las células blanco (preadipocitos, adipocitos, macrófagos y/o células endoteliales) de la PRL en el tejido adiposo.
- Evaluar si la PRL regula directamente la proliferación y diferenciación de los preadipocitos, mecanismo que origina la expansión saludable del tejido adiposo (hiperplasia).
- Analizar si la PRL regula directamente la sensibilidad a la insulina y la función metabólica de los adipocitos (lipólisis, lipogénesis, absorción de glucosa).
- Evaluar si un fármaco comercial para consumo humano (levosulpirida), que aumenta los niveles de PRL en suero puede aminorar las alteraciones metabólicas inducidas por una dieta alta en grasas.
- Determinar si la PRL participa en la regulación de otros órganos metabólicos (hígado y músculo) que también participan en la sensibilidad sistémica a la insulina.

X. REFERENCIAS

Adan N, Guzman-Morales J, Ledesma-Colunga MG, Perales-Canales SI, Quintanar-Stephano A, Lopez-Barrera F, Mendez I, Moreno-Carranza B, Triebel J, Binart N, Martinez de la Escalera G, Thebault S and Clapp C. (2013). Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 123(9): 3902-3913.

Ahima RS. (2006). Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5: 242S-249S.

Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M and Evans RM. (2013). PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 19(5): 557-566.

Albu A, Florea S and Fica S. (2016). Is prolactin the missing link in adipose tissue dysfunction of polycystic ovary syndrome patients? *Endocrine* 51(1): 163-173.

Almind K and Kahn CR. (2004). Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 53(12): 3274-3285.

Andreasen CH and Andersen G. (2009). Gene-environment interactions and obesity-further aspects of genomewide association studies. *Nutrition* 25(10): 998-1003.

Apovian CM, Aronne LJ, Bessesen DH, McDonnell ME, Murad MH, Pagotto U, Ryan DH, Still CD and Endocrine S. (2015). Pharmacological management of obesity: an endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 100(2): 342-362.

Appleton SL, Seaborn CJ, Visvanathan R, Hill CL, Gill TK, Taylor AW, Adams RJ and North West Adelaide Health Study T. (2013). Diabetes and cardiovascular disease outcomes in the metabolically healthy obese phenotype: a cohort study. *Diabetes Care* 36(8): 2388-2394.

Asai-Sato M, Okamoto M, Endo M, Yoshida H, Murase M, Ikeda M, Sakakibara H, Takahashi T and Hirahara F. (2006). Hypoadiponectinemia in lean lactating women: Prolactin inhibits adiponectin secretion from human adipocytes. *Endocr J* 53(4): 555-562.

Attie AD and Scherer PE. (2009). Adipocyte metabolism and obesity. *J Lipid Res* 50 Suppl: S395-399.

Auffret J, Viengchareun S, Carre N, Denis RG, Magnan C, Marie PY, Muscat A, Feve B, Lombes M and Binart N. (2012). Beige differentiation of adipose depots in mice lacking prolactin receptor protects against high-fat-diet-induced obesity. *FASEB J* 26(9): 3728-3737.

Balbach L, Wallaschofski H, Volzke H, Nauck M, Dorr M and Haring R. (2013). Serum prolactin concentrations as risk factor of metabolic syndrome or type 2 diabetes? *BMC Endocr Disord* 13: 12.

Balistreri CR, Caruso C and Candore G. (2010). The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm* 2010: 802078.

Barber MC, Clegg RA, Finley E, Vernon RG and Flint DJ. (1992). The role of growth hormone, prolactin and insulin-like growth factors in the regulation of rat mammary gland and adipose tissue metabolism during lactation. *J Endocrinol* 135(2): 195-202.

Ben-Jonathan N, LaPensee CR and LaPensee EW. (2008). What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 29(1): 1-41.

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M and Scherer PE. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7(8): 947-953.

Bluher M. (2014). Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Mol Metab* 3(3): 230-240.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N and Kelly PA. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19(3): 225-268.

Borcherding DC, Hugo ER, Idelman G, De Silva A, Richtand NW, Loftus J and Ben-Jonathan N. (2011). Dopamine receptors in human adipocytes: expression and functions. *PLoS One* 6(9): e25537.

Boucher J, Kleinridders A and Kahn CR. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(1).

Brandebourg TD, Bown JL and Ben-Jonathan N. (2007). Prolactin upregulates its receptors and inhibits lipolysis and leptin release in male rat adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 357(2): 408-413.

Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG and Sorenson RL. (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.

Brooks CL. (2012). Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr Rev* 33(4): 504-525.

Brooks CL, Kim BG, Aphale P, Kleeman BE and Johnson GC. (1990). Phosphorylated variant of bovine prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 71(2): 117-123.

Byatt JC, Staten NR, Salsgiver WJ, Kostelc JG and Collier RJ. (1993). Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. *Am J Physiol* 264(6 Pt 1): E986-992.

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J and Shoelson SE. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11(2): 183-190.

Carre N and Binart N. (2014). Prolactin and adipose tissue. *Biochimie* 97: 16-21.

Chirico V, Cannavo S, Lacquaniti A, Salpietro V, Mandolino M, Romeo PD, Cotta O, Munafo C, Giorgianni G, Salpietro C and Arrigo T. (2013). Prolactin in obese children: a bridge between inflammation and metabolic-endocrine dysfunction. *Clin Endocrinol (Oxf)* 79(4): 537-544.

Cho YM, Kwak SN, Joo NS, Kim DH, Lee AH, Kim KS, Seo JB, Jeong SW and Kwon OJ. (2014). X-box binding protein 1 is a novel key regulator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *FEBS J* 281(22): 5132-5146.

Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI and Kim JB. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7: 30.

Clapp C, Thebault S and Martinez de la Escalera G. (2008). Role of prolactin and vasoinhibins in the regulation of vascular function in mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13(1): 55-67.

Clapp C, Torner L, Gutierrez-Ospina G, Alcantara E, Lopez-Gomez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejia S, Morales MA and Martinez de la Escalera G. (1994). The prolactin

gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22): 10384-10388.

Coelho M, Oliveira T and Fernandes R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci* 9(2): 191-200.

Cook A and Cowan C (2008). Adipose. StemBook. Cambridge (MA).

Courcoulas AP, Belle SH, Neiberg RH, Pierson SK, Eagleton JK, Kalarchian MA, DeLany JP, Lang W and Jakicic JM. (2015). Three-Year Outcomes of Bariatric Surgery vs Lifestyle Intervention for Type 2 Diabetes Mellitus Treatment: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Surg* 150(10): 931-940.

de Luca C and Olefsky JM. (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett* 582(1): 97-105.

Doknic M, Pekic S, Zarkovic M, Medic-Stojanoska M, Dieguez C, Casanueva F and Popovic V. (2002). Dopaminergic tone and obesity: an insight from prolactinomas treated with bromocriptine. *Eur J Endocrinol* 147(1): 77-84.

dos Santos Silva CM, Barbosa FR, Lima GA, Warszawski L, Fontes R, Domingues RC and Gadelha MR. (2011). BMI and metabolic profile in patients with prolactinoma before and after treatment with dopamine agonists. *Obesity (Silver Spring)* 19(4): 800-805.

Edvardsson U, Bergstrom M, Alexandersson M, Bamberg K, Ljung B and Dahllof B. (1999). Rosiglitazone (BRL49653), a PPARgamma-selective agonist, causes peroxisome proliferator-like liver effects in obese mice. *J Lipid Res* 40(7): 1177-1184.

Fleenor D, Arumugam R and Freemark M. (2006). Growth hormone and prolactin receptors in adipogenesis: STAT-5 activation, suppressors of cytokine signaling, and regulation of insulin-like growth factor I. *Horm Res* 66(3): 101-110.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A and Nagy G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 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 and Kelly PA. (2002). Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology* 143(4): 1378-1385.

Freemark M, Driscoll P, Maaskant R, Petryk A and Kelly PA. (1997). Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue differentiation and development. *J Clin Invest* 99(5): 1107-1117.

Freemark M, Fleenor D, Driscoll P, Binart N and Kelly P. (2001). Body weight and fat deposition in prolactin receptor-deficient mice. *Endocrinology* 142(2): 532-537.

Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE and Lodish HF. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 2005-2010.

Fujinaka Y, Takane K, Yamashita H and Vasavada RC. (2007). Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *J Biol Chem* 282(42): 30707-30717.

Galic S, Oakhill JS and Steinberg GR. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316(2): 129-139.

Gao H, Fall T, van Dam RM, Flyvbjerg A, Zethelius B, Ingelsson E and Hagg S. (2013). Evidence of a causal relationship between adiponectin levels and insulin sensitivity: a Mendelian randomization study. *Diabetes* 62(4): 1338-1344.

Gerardo-Gettens T, Moore BJ, Stern JS and Horwitz BA. (1989). Prolactin stimulates food intake in a dose-dependent manner. *Am J Physiol* 256(1 Pt 2): R276-280.

Gesta S, Tseng YH and Kahn CR. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131(2): 242-256.

Goffin V, Binart N, Touraine P and Kelly PA. (2002). Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol* 64: 47-67.

Greenman Y, Tordjman K and Stern N. (1998). Increased body weight associated with prolactin secreting pituitary adenomas: weight loss with normalization of prolactin levels. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48(5): 547-553.

Gregor MF, Misch ES, Yang L, Hummasti S, Inouye KE, Lee AH, Birie B and Hotamisligil GS. (2013). The role of adipocyte XBP1 in metabolic regulation during lactation. *Cell Rep* 3(5): 1430-1439.

Gualillo O, Lago F, Garcia M, Menendez C, Senaris R, Casanueva FF and Dieguez C. (1999). Prolactin stimulates leptin secretion by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 140(11): 5149-5153.

Gustafson AB, Banasiak MF, Kalkhoff RK, Hagen TC and Kim HJ. (1980). Correlation of hyperprolactinemia with altered plasma insulin and glucagon: similarity to effects of late human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 51(2): 242-246.

Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S and Smith U. (2013). Restricted adipogenesis in hypertrophic obesity: the role of WISP2, WNT, and BMP4. *Diabetes* 62(9): 2997-3004.

Gustafson B, Hedjazifar S, Gogg S, Hammarstedt A and Smith U. (2015). Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 26(4): 193-200.

Havel PJ, Kasim-Karakas S, Mueller W, Johnson PR, Gingerich RL and Stern JS. (1996). Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 81(12): 4406-4413.

Heilbronn LK and Campbell LV. (2008). Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des* 14(12): 1225-1230.

Heymsfield SB and Wadden TA. (2017). Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *N Engl J Med* 376(15): 1492.

Holland WL and Summers SA. (2008). Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev* 29(4): 381-402.

Huang C, Snider F and Cross JC. (2009). Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology* 150(4): 1618-1626.

Hugo ER, Borcharding DC, Gersin KS, Loftus J and Ben-Jonathan N. (2008). Prolactin release by adipose explants, primary adipocytes, and LS14 adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 93(10): 4006-4012.

Ikramuddin S, Billington CJ, Lee WJ, Bantle JP, Thomas AJ, Connett JE, Leslie DB, Inabnet WB, 3rd, Jeffery RW, Chong K, Chuang LM, Sarr MG, Jensen MD, Vella A, Ahmed L, Belani K, Schone JL, Olofson AE, Bainbridge HA, Laqua PS, Wang Q and

Korner J. (2015). Roux-en-Y gastric bypass for diabetes (the Diabetes Surgery Study): 2-year outcomes of a 5-year, randomised, controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 3(6): 413-422.

Itoh M, Suganami T, Hachiya R and Ogawa Y. (2011). Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. *Int J Inflamm* 2011: 720926.

Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M and Shimomura I. (2003). Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52(7): 1655-1663.

Jonker JW, Suh JM, Atkins AR, Ahmadian M, Li P, Whyte J, He M, Juguilon H, Yin YQ, Phillips CT, Yu RT, Olefsky JM, Henry RR, Downes M and Evans RM. (2012). A PPARgamma-FGF1 axis is required for adaptive adipose remodelling and metabolic homeostasis. *Nature* 485(7398): 391-394.

Kaila B and Raman M. (2008). Obesity: a review of pathogenesis and management strategies. *Can J Gastroenterol* 22(1): 61-68.

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K and Kasuga M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116(6): 1494-1505.

Kim HK, Della-Fera MA, Hausman DB and Baile CA. (2010). Effect of clenbuterol on apoptosis, adipogenesis, and lipolysis in adipocytes. *J Physiol Biochem* 66(3): 197-203.

Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ and Scherer PE. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 117(9): 2621-2637.

Kipke MD, Kubicek K, Weiss G, Wong C, Lopez D, Iverson E and Ford W. (2007). The health and health behaviors of young men who have sex with men. *J Adolesc Health* 40(4): 342-350.

Koerner A, Kratzsch J and Kiess W. (2005). Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19(4): 525-546.

Krulich L, Hefco E and Aschenbrenner JE. (1975). Mechanism of the effects of hypothalamic deafferentation on prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* 96(1): 107-118.

Kusminski CM, Bickel PE and Scherer PE. (2016). Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 15(9): 639-660.

Kusminski CM, McTernan PG and Kumar S. (2005). Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 109(3): 243-256.

Kusminski CM and Scherer PE. (2012). Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* 23(9): 435-443.

Laclaustra M, Corella D and Ordovas JM. (2007). Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17(2): 125-139.

LaPensee CR, Horseman ND, Tso P, Brandebourg TD, Hugo ER and Ben-Jonathan N. (2006). The prolactin-deficient mouse has an unaltered metabolic phenotype. *Endocrinology* 147(10): 4638-4645.

LaPensee EW, Reddy SP, Hugo ER, Schwemberger SJ and Ben-Jonathan N. (2007). LS14 cells: a model for chemoresistance in liposarcoma. *Cancer Biol Ther* 6(4): 519-524.

Le JA, Wilson HM, Shehu A, Devi YS, Aguilar T and Gibori G. (2011). Prolactin activation of the long form of its cognate receptor causes increased visceral fat and obesity in males as shown in transgenic mice expressing only this receptor subtype. *Horm Metab Res* 43(13): 931-937.

Lee MJ, Wu Y and Fried SK. (2013). Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med* 34(1): 1-11.

Lefebvre B, Benomar Y, Guedin A, Langlois A, Hennuyer N, Dumont J, Bouchaert E, Dacquet C, Penicaud L, Casteilla L, Pattou F, Ktorza A, Staels B and Lefebvre P. (2010). Proteasomal degradation of retinoid X receptor alpha reprograms transcriptional activity of PPARgamma in obese mice and humans. *J Clin Invest* 120(5): 1454-1468.

Lemini M, Ruiz-Herrera X, Ledesma-Colunga MG, Diaz-Lezama N, De Los Rios EA, Lopez-Barrera F, Mendez I, Martinez de la Escalera G, Macotella Y and Clapp C.

(2015). Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: role of TGF-beta and TNF-alpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308(9): R792-799.

Ling C, Hellgren G, Gebre-Medhin M, Dillner K, Wennbo H, Carlsson B and Billig H. (2000). Prolactin (PRL) receptor gene expression in mouse adipose tissue: increases during lactation and in PRL-transgenic mice. *Endocrinology* 141(10): 3564-3572.

Ling C, Svensson L, Oden B, Weijdegard B, Eden B, Eden S and Billig H. (2003). Identification of functional prolactin (PRL) receptor gene expression: PRL inhibits lipoprotein lipase activity in human white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 88(4): 1804-1808.

Londrville RL, Macotela Y, Duff RJ, Easterling MR, Liu Q and Crespi EJ. (2014). Comparative endocrinology of leptin: assessing function in a phylogenetic context. *Gen Comp Endocrinol* 203: 146-157.

Lumeng CN, Bodzin JL and Saltiel AR. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117(1): 175-184.

Macotela Y, Emanuelli B, Mori MA, Gesta S, Schulz TJ, Tseng YH and Kahn CR. (2012). Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* 61(7): 1691-1699.

Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I and Matsuzawa Y. (2001). PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50(9): 2094-2099.

Matarese G, Moschos S and Mantzoros CS. (2005). Leptin in immunology. *J Immunol* 174(6): 3137-3142.

Matsubara M, Maruoka S and Katayose S. (2002). Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol* 147(2): 173-180.

McCarthy MI. (2010). Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N Engl J Med* 363(24): 2339-2350.

McGillicuddy FC, Harford KA, Reynolds CM, Oliver E, Claessens M, Mills KH and Roche HM. (2011). Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-

fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes* 60(6): 1688-1698.

Mori MA, Raghavan P, Thomou T, Boucher J, Robida-Stubbs S, Macotela Y, Russell SJ, Kirkland JL, Blackwell TK and Kahn CR. (2012). Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metab* 16(3): 336-347.

Naef L and Woodside B. (2007). Prolactin/Leptin interactions in the control of food intake in rats. *Endocrinology* 148(12): 5977-5983.

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

Naliato EC, Violante AH, Caldas D, Lamounier Filho A, Loureiro CR, Fontes R, Schrank Y, Souza RG, Costa PL and Colao A. (2007). Body fat in nonobese women with prolactinoma treated with dopamine agonists. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67(6): 845-852.

Nanbu-Wakao R, Fujitani Y, Masuho Y, Muramatu M and Wakao H. (2000). Prolactin enhances CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) messenger RNA expression and stimulates adipogenic conversion of NIH-3T3 cells. *Mol Endocrinol* 14(2): 307-316.

Nguyen DM and El-Serag HB. (2010). The epidemiology of obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 39(1): 1-7.

Nilsson L, Binart N, Bohlooly YM, Bramnert M, Egecioglu E, Kindblom J, Kelly PA, Kopchick JJ, Ormandy CJ, Ling C and Billig H. (2005). Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 331(4): 1120-1126.

Nilsson LA, Roepstorff C, Kiens B, Billig H and Ling C. (2009). Prolactin suppresses malonyl-CoA concentration in human adipose tissue. *Horm Metab Res* 41(10): 747-751.

Noel MB and Woodside B. (1993). Effects of systemic and central prolactin injections on food intake, weight gain, and estrous cyclicity in female rats. *Physiol Behav* 54(1): 151-154.

Otto TC and Lane MD. (2005). Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40(4): 229-242.

Palomer X, Perez A and Blanco-Vaca F. (2005). [Adiponectin: a new link between obesity, insulin resistance and cardiovascular disease]. *Med Clin (Barc)* 124(10): 388-395.

Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y and Meyre D. (2016). Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clin Sci (Lond)* 130(12): 943-986.

Primeau V, Coderre L, Karelis AD, Brochu M, Lavoie ME, Messier V, Sladek R and Rabasa-Lhoret R. (2011). Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int J Obes (Lond)* 35(7): 971-981.

Puzziferri N, Roshek TB, 3rd, Mayo HG, Gallagher R, Belle SH and Livingston EH. (2014). Long-term follow-up after bariatric surgery: a systematic review. *JAMA* 312(9): 934-942.

Rosen ED and Spiegelman BM. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 145-171.

Rosen ED and Spiegelman BM. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444(7121): 847-853.

Rosen ED and Spiegelman BM. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156(1-2): 20-44.

Rutkowski JM, Stern JH and Scherer PE. (2015). The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol* 208(5): 501-512.

Samocha-Bonet D, Dixit VD, Kahn CR, Leibel RL, Lin X, Nieuwdorp M, Pietilainen KH, Rabasa-Lhoret R, Roden M, Scherer PE, Klein S and Ravussin E. (2014). Metabolically healthy and unhealthy obese--the 2013 Stock Conference report. *Obes Rev* 15(9): 697-708.

Samuel VT, Petersen KF and Shulman GI. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375(9733): 2267-2277.

Sanchez-Gurmaches J, Hung CM and Guertin DA. (2016). Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity. *Trends Cell Biol* 26(5): 313-326.

Sauve D and Woodside B. (2000). Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. *Brain Res* 868(2): 306-314.

Schauer PR, Mingrone G, Ikramuddin S and Wolfe B. (2016). Clinical Outcomes of Metabolic Surgery: Efficacy of Glycemic Control, Weight Loss, and Remission of Diabetes. *Diabetes Care* 39(6): 902-911.

Scherer PE. (2006). Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55(6): 1537-1545.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ and Baskin DG. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778): 661-671.

Sha H, He Y, Chen H, Wang C, Zenno A, Shi H, Yang X, Zhang X and Qi L. (2009). The IRE1 α -XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis. *Cell Metab* 9(6): 556-564.

Sha H, Yang L, Liu M, Xia S, Liu Y, Liu F, Kersten S and Qi L. (2014). Adipocyte spliced form of X-box-binding protein 1 promotes adiponectin multimerization and systemic glucose homeostasis. *Diabetes* 63(3): 867-879.

Singla P, Bardoloi A and Parkash AA. (2010). Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes* 1(3): 76-88.

Sinha YN. (1995). Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 16(3): 354-369.

Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J and Arner P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453(7196): 783-787.

Spooner PM, Chernick SS, Garrison MM and Scow RO. (1979). Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. Separation and dependence of hormonal effects on hexose metabolism and synthesis of RNA and protein. *J Biol Chem* 254(20): 10021-10029.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS and Lazar MA. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409(6818): 307-312.

Stewart WC, Baugh JE, Jr., Floyd ZE and Stephens JM. (2004). STAT 5 activators can replace the requirement of FBS in the adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324(1): 355-359.

Sun K, Kusminski CM and Scherer PE. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 121(6): 2094-2101.

Sun K, Tordjman J, Clement K and Scherer PE. (2013). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab* 18(4): 470-477.

Sylvester PW, Forczek S, Ip MM and Ip C. (1989). Exercise training and the differential prolactin response in male and female rats. *J Appl Physiol* (1985) 67(2): 804-810.

Tang QQ and Lane MD. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 81: 715-736.

Tiret L, Poirier O, Nicaud V, Barbaux S, Herrmann SM, Perret C, Raoux S, Francomme C, Lebard G, Tregouet D and Cambien F. (2002). Heterogeneity of linkage disequilibrium in human genes has implications for association studies of common diseases. *Hum Mol Genet* 11(4): 419-429.

Tran TT and Kahn CR. (2010). Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol* 6(4): 195-213.

Ussar S, Griffin NW, Bezy O, Fujisaka S, Vienberg S, Softic S, Deng L, Bry L, Gordon JI and Kahn CR. (2015). Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab* 22(3): 516-530.

Uvnas-Moberg K, Widstrom AM, Werner S, Matthiesen AS and Winberg J. (1990). Oxytocin and prolactin levels in breast-feeding women. Correlation with milk yield and duration of breast-feeding. *Acta Obstet Gynecol Scand* 69(4): 301-306.

Vasavada RC, Gonzalez-Pertusa JA, Fujinaka Y, Fiaschi-Taesch N, Cozar-Castellano I and Garcia-Ocana A. (2006). Growth factors and beta cell replication. *Int J Biochem Cell Biol* 38(5-6): 931-950.

Viengchareun S, Bouzinba-Segard H, Laigneau JP, Zennaro MC, Kelly PA, Bado A, Lombes M and Binart N. (2004). Prolactin potentiates insulin-stimulated leptin

expression and release from differentiated brown adipocytes. *J Mol Endocrinol* 33(3): 679-691.

Viengchareun S, Servel N, Feve B, Freemark M, Lombes M and Binart N. (2008). Prolactin receptor signaling is essential for perinatal brown adipocyte function: a role for insulin-like growth factor-2. *PLoS One* 3(2): e1535.

Wagner R, Heni M, Linder K, Ketterer C, Peter A, Bohm A, Hatziagelaki E, Stefan N, Staiger H, Haring HU and Fritsche A. (2014). Age-dependent association of serum prolactin with glycaemia and insulin sensitivity in humans. *Acta Diabetol* 51(1): 71-78.

Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva ME and Santos RF. (2002). Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 34(11-12): 616-621.

Wang T, Lu J, Xu Y, Li M, Sun J, Zhang J, Xu B, Xu M, Chen Y, Bi Y, Wang W and Ning G. (2013). Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation: a population-based study. *Diabetes Care* 36(7): 1974-1980.

Weinhaus AJ, Stout LE and Sorenson RL. (1996). Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets. *Endocrinology* 137(5): 1640-1649.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL and Ferrante AW, Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112(12): 1796-1808.

Whittle AJ, Lopez M and Vidal-Puig A. (2011). Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol Med* 17(8): 405-411.

Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS and Frezza EE. (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 54(9): 1847-1856.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB and Kadowaki T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8(11): 1288-1295.

Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY and Chuang LM. (2001). Weight reduction increases plasma levels of an adipose-

derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86(8): 3815-3819.

Yu J, Xiao F, Zhang Q, Liu B, Guo Y, Lv Z, Xia T, Chen S, Li K, Du Y and Guo F. (2013). PRLR regulates hepatic insulin sensitivity in mice via STAT5. *Diabetes* 62(9): 3103-3113.

Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M and Olefsky JM. (2002). The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 51(10): 2968-2974.

Zinger M, McFarland M and Ben-Jonathan N. (2003). Prolactin expression and secretion by human breast glandular and adipose tissue explants. *J Clin Endocrinol Metab* 88(2): 689-696.

XI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del tejido adiposo y su plasticidad en respuesta a temperatura. ...	5
Figura 2. Células precursoras de los adipocitos cafés, beige y blancos.....	6
Figura 3. Funciones metabólicas de la adiponectina	8
Figura 4. Comparación entre la expansión saludable y no saludable del tejido adiposo.....	12
Figura 5. Relación entre la disfuncionalidad del tejido adiposo provocada por la obesidad y el desarrollo de alteraciones metabólicas en otros tejidos	13
Figura 6. Obesidad y desarrollo de resistencia a la insulina	15
Figura 7. Mecanismos propuestos para explicar las acciones de la prolactina en el tejido adiposo en condiciones de obesidad	51

XII. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medicamentos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos para el control a largo plazo del peso corporal	2
--	---

XIII. ANEXOS

PUBLICACIONES:

- **Ruiz-Herrera X**, de los Ríos EA, Díaz JM, Lerma-Alvarado RM, Martínez de la Escalera L, López-Barrera F, Lemini M, Arnold E, Martínez de la Escalera G, Clapp C, Macotela Y. 2017. **Prolactin promotes adipose tissue fitness and insulin sensitivity on obese males.** *Endocrinology* 158 (1): 56-68. **F1000 Prime Recommended.
- Meléndez-García R, Arredondo-Zamarripa D, Arnold E, **Ruiz-Herrera X**, Noguez-Imm R, Baeza-Cruz G, Adán N, Binart N, Riesgo-Escovar J, Goffin V, Ordaz B, Peña- Ortega F, Martínez-Torres A, Clapp C, Thebault S. 2016. **Prolactin protects retinal pigment epithelium by inhibiting situin 2-dependent cell death.** *EBioMedicine* 7: 35-49.
- Lemini M, **Ruiz-Herrera**, Ledesma-Colunga MG, Díaz-Lezama N, de los Ríos EA, López-Barrera F, Méndez I, Martínez de la Escalera G, Macotela Y, Clapp C. 2015. **Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced obese and diabetic rats: role of TGF- β and TNF- α .** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308: R792-R799. (Anexo al final del trabajo).

PREMIOS Y RECONOCIMIENTOS:

- **Primer lugar** en la Exposición de carteles en el XXI Aniversario de las Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM. Trabajo presentado: “La prolactina reduce la resistencia a la insulina, previene la hipertrofia de adipocitos viscerales y regula la producción de adipocinas y citocinas proinflamatorias en ratas obesas”. Juriquilla, Querétaro, México. Septiembre, 2014.

- **Travel award** de “The Endocrine Society” por la presentación del trabajo titulado: “Reduced prolactin receptor expression induced by shRNA-lentiviral vectors diminishes preadipocyte differentiation and lowers the expression of adipocyte function markers”. Orlando, Florida, USA. Abril, 2017.
- **Artículo 1** recomendado en F1000 como de especial significancia:
<http://f1000.com/prime/726914793?bd=1>

2 Prolactin Promotes Adipose Tissue Fitness and Insulin Sensitivity in Obese Males.

Ruiz-Herrera X, de Los Ríos EA, Díaz JM, Lerma-Alvarado RM, de la Escalera LM, López-Barrera F, Lemini M, Arnold E, de la Escalera GM, Clapp C, Macotela Y

show author affiliations

Endocrinology. 2016 Nov 2;en20161444

Save/Follow | Export | Get Article



RECOMMENDATIONS 1 | ABSTRACT | COMMENTS

expand all

Recommendations:

Very Good

18 Nov 2016



Amira Klip

F1000 Physiology

The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada.

NEW FINDING | NOVEL DRUG TARGET

DOI: 10.3410/f.726914793.793525395

This interesting study makes the case for prolactin as a potential therapeutic agent to combat adipose tissue expansion and insulin resistance during high fat feeding. Prolactin was found to be reduced in the serum of obese, insulin-resistant individuals, and prolactin levels in humans correlated positively with 'fitness' genes in adipocytes such as those for adiponectin, PPARγ and GLUT4. Mechanistically, osmotic-pump delivery of prolactin in obese rats reduced adipocyte hypertrophy and improved insulin tolerance. Importantly, prolactin also reduced inflammatory gene expression (*Il1b*, *Ccl2*) in adipose tissue. Conversely, depleting the prolactin receptor in high fat-fed mice enhanced adiposity and lowered insulin sensitivity. The study hence provides all the elements to support exploration for a therapeutic use of prolactin in the treatment of obesity and its consequences.

Disclosures

None declared

Add a comment

Abstract:

ABSTRACT

Excessive accumulation of body fat triggers insulin resistance and features of the metabolic syndrome. Recently, evidence has accumulated that obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome are associated with reduced levels of serum prolactin (PRL) in humans and rodents, raising the question of whether low PRL levels contribute to metabolic dysfunction. Here, we have addressed this question by investigating the role of PRL in insulin sensitivity and adipose tissue fitness in obese rodents and humans. In diet-induced

obese rats, treatment...

more »

with PRL delivered via osmotic mini-pumps, improved insulin sensitivity, prevented adipocyte hypertrophy, and reduced inflammatory cytokine expression in visceral fat. PRL also induced increased expression of Pparg and Xbp1s in visceral adipose tissue and elevated circulating adiponectin levels. Conversely, PRL receptor null mice challenged with a high fat diet developed greater insulin resistance, glucose intolerance, and increased adipocyte hypertrophy compared to wild-type mice. In humans, serum PRL values correlated positively with systemic adiponectin levels and were reduced in insulin-resistant patients. Furthermore, PRL circulating levels and PRL produced by adipose tissue correlated directly with the expression of PPARγ, ADIPOQ, and GLUT4 in human visceral and subcutaneous adipose tissue. Thus, PRL, acting through its cognate receptors, promotes healthy adipose tissue function and systemic insulin sensitivity. Increasing the levels of PRL in the circulation may have therapeutic potential against obesity-induced metabolic diseases.

DOI: 10.1210/en.2016-1444

PMID: 27805870



Abstract courtesy of PubMed: A service of the National Library of Medicine and the National Institutes of Health.

Comments:

COMMENTS

add a comment

Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: role of TGF- β and TNF- α

María Lemini, Xarubet Ruiz-Herrera, María G. Ledesma-Colunga, Nundehui Díaz-Lezama, Ericka A. De los Ríos, Fernando López-Barrera, Isabel Méndez, Gonzalo Martínez de la Escalera, Yazmín Macotela, and Carmen Clapp

Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, México

Submitted 8 August 2014; accepted in final form 17 February 2015

Lemini M, Ruiz-Herrera X, Ledesma-Colunga MG, Díaz-Lezama N, De los Ríos EA, López-Barrera F, Méndez I, Martínez de la Escalera G, Macotela Y, Clapp C. Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: role of TGF- β and TNF- α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308: R792–R799, 2015. First published February 25, 2015; doi:10.1152/ajpregu.00327.2014.—The levels of the hormone prolactin (PRL) are reduced in the circulation of patients with Type 2 diabetes and in obese children, and lower systemic PRL levels correlate with an increased prevalence of diabetes and a higher risk of metabolic syndrome. The secretion of anterior pituitary (AP) PRL in metabolic diseases may be influenced by the interplay between transforming growth factor β (TGF- β) and tumor necrosis factor α (TNF- α), which inhibit and can stimulate AP PRL synthesis, respectively, and are known contributors to insulin resistance and metabolic complications. Here, we show that TGF- β and TNF- α antagonize the effect of each other on the expression and release of PRL by the GH4C1 lactotrope cell line. The levels of AP mRNA and circulating PRL decrease in high-fat diet-induced obese rats in parallel with increased and reduced AP levels of TGF- β and TNF- α mRNA, respectively. Likewise, AP expression and circulating levels of PRL are reduced in streptozotocin-induced diabetic rats and are associated with higher AP expression and protein levels of TGF- β and TNF- α . The opposing effects of the two cytokines on cultured AP cells, together with their altered expression in the AP of obese and diabetic rats suggest they are linked to the reduced PRL production and secretion characteristics of metabolic diseases.

prolactin; TGF- β ; TNF- α ; obesity; diabetes

OBESITY AND ITS ASSOCIATED disorders, such as Type 2 diabetes, constitute the most prominent socioeconomic health-related burden in the developed world and parts of the underdeveloped world. Obesity and diabetes are characterized mainly by alterations in glucose and lipid metabolism but also in the hormonal and cytokine milieu. Understanding how such changes arise and lead to further complications is essential to developing effective therapies against these metabolic diseases. Prolactin (PRL) is a peptide hormone secreted mainly by the anterior pituitary gland (AP) and is known for its fundamental role in lactation; however, PRL exerts a wide variety of actions in reproduction, osmoregulation, brain function, immune response, and angiogenesis (16, 25). A very relevant, but still underappreciated, role of PRL is the regulation of energy homeostasis and, particularly, its possible contribution to the development and progression of metabolic syndrome and dia-

betes. Recently, large cohort studies have shown that high circulating PRL levels correlate with reduced prevalence of glucose intolerance and Type 2 diabetes in adults (6, 60) and that low PRL serum levels are observed in obese children compared with lean controls and constitute a predictive factor for progression toward metabolic syndrome (15). Therefore, identifying factors responsible for the downregulation of PRL-circulating levels in obesity and diabetes has potential value for the treatment of these metabolic disorders.

In the present work, we investigated whether the production of PRL is downregulated in the AP of obese and diabetic rats and evaluated whether alterations in the AP expression of TGF- β and/or TNF- α correlated with these changes. TGF- β and TNF- α increase in the circulation of obese and diabetic patients (15, 19, 29, 61, 63) and play important roles in insulin resistance and diabetes pathophysiology (59, 61). Also, these cytokines and their receptors are ubiquitously expressed in a variety of tissues from rodents and humans, including the AP PRL-producing cell (lactotrope) (17, 65), where TGF- β inhibits (24, 49) and TNF- α can stimulate (27, 36), but also inhibit (30, 58), PRL synthesis and release; however, there is little or no information regarding the actions of TNF- α or TGF- β on PRL secretion in the context of metabolic diseases.

MATERIALS AND METHODS

GH4C1 cell culture. GH4C1 cells are a subclone of the cell line GH3 isolated from an AP rat tumor that produces both growth hormone and PRL (56). The stock line was maintained between passages 3 and 10. GH4C1 cells were cultured in F10 medium (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) supplemented with 15% heat-inactivated horse serum (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), 2.5% heat-inactivated FBS (Gibco), and 1% penicillin-streptomycin at 37°C in 5% CO₂. Subconfluent GH4C1 cell cultures (5×10^5 cells/well in 24-well plates or 10^6 cells/well in 12-well plates) were plated and incubated for 48 h. Medium was then changed to high-glucose DMEM-containing 0.5% FBS and antibiotics for 24 h, and the cells were treated with different concentrations of TGF- β and/or TNF- α for 48 h. Recombinant human TGF- β and TNF- α were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). The concentrations of both cytokines were comparable to those used previously in similar in vitro studies (18, 27). At the end of the incubation, the cells were counted, and their viability was evaluated by the dye-exclusion method.

Animal models of obesity and diabetes. Male Wistar rats were housed under standard laboratory conditions (22°C; 12:12-h light-dark cycle, free access to food and water). All animal procedures were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the National University of Mexico and comply with the U.S. National Research Council's *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8th ed., National Academy Press, Washington, D.C.). To induce obesity, 4-wk-old rats were fed with a 60% high-fat diet

Address for reprint requests and other correspondence: Y. Macotela, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, 76230 Querétaro, México (e-mail: macotelag@unam.mx).

(HFD) (Open Source Diet D12492; Research Diets) or a standard chow (CD) in which 13% of calories comes from lipids (Laboratory rodent Diet 5001, LabDiet, Richmond, IN). To induce diabetes, male Wistar rats (250–300 g) were injected with a single intraperitoneal dose of streptozotocin (STZ; 60 mg/kg in citrate buffer, at pH 4.5) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or vehicle (citrate buffer) after an overnight fast. Rats with a blood glucose concentration ≥ 250 mg/dl were considered diabetic. After 10 wk on the HFD or 6 wk after the STZ injection, animals were anesthetized by CO₂ inhalation followed by decapitation between 1000 and 1400 to determine the AP mRNA and circulating levels of PRL, TGF- β , and TNF- α . TGF- β and TNF- α protein levels were also evaluated in the AP of control and diabetic rats 6 wk after STZ injection. To avoid stress-induced PRL release, animals were handled daily for 7 days before death.

Blood glucose and insulin tolerance test. After rats were either fasted overnight or not fasted, blood glucose levels were measured with a glucometer. Blood was collected from the tip of the tail using a lancet needle. ITT was performed by intraperitoneal injection of 0.75 U/kg insulin (Humulin R, Eli Lilly, Indianapolis, IN) after a 1-h fast, and blood glucose was evaluated before (*time 0*) and at 15, 30, 60, and 120 min after insulin.

Real-time quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from frozen AP or cultured GH4C1 cells using the guanidine isothiocyanate method, and cDNA was synthesized using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Warrington UK). PCR products were detected and quantified with Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Auburn, AL) in a 10- μ l final reaction volume containing template and 0.5 μ M of each of the primer pairs for rat *PRL*: forward 5'-TGG CAG AAC AGA AGG TTT GA-3', reverse 5'-CCA TGA ACA GCC AAG TGT CA-3'; rat *TNF- α* : forward 5'-GGG CTT GTC ACT CGA GTT TT-3', reverse 5'-TGC CTC AGC CTC TTC TCA TT-3'; and rat *TGF- β* : forward 5'-CAC GAT CAT GTT GGA CAA CTG CTCC-3', reverse 5'-CTT CAG CTC CAC AGA GAA GAA CTGC-3'. Amplification performed in the CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA) included a denaturation step of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of amplification (10 s at 95°C, 30 s at the primer pair-specific annealing temperature and 30 s at 72°C). The PCR data were analyzed by the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method, and cycle thresholds were normalized to the housekeeping genes *GAPDH* (in AP) or *18S* (in GH4C1 cells) to calculate the expression levels of genes of interest. Different housekeeping genes were used because the expression of *GAPDH* was very stable in the APs from the different groups of rats, but not in GH4C1 cells, where its expression varied among treatments. *18S* was a good constitutive expression gene in the cell line.

PRL, TGF- β , and TNF- α levels. PRL was measured in serum of CD- and HFD-fed rats by conventional radioimmunoassay (RIA) using standard procedures and reagents provided by the National Hormone and Pituitary Program and by Dr. A. F. Parlow (Harbor University of California, Los Angeles Medical Center) or in control and STZ-induced diabetic rats by the Nb2 cell bioassay, a standard procedure based on the proliferative response of the Nb2 lymphoma cells to PRL (55). Serum TGF- β and TNF- α were quantified by ELISA from R&D Systems (Minneapolis, MN) and BD Biosciences (San Diego, CA), respectively. AP TGF- β and TNF- α levels were measured by ELISAs from Cloud-Clone (Houston, TX) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), respectively, that were designed to evaluate tissue lysates.

Statistics. All data were replicated in three or more experiments. The statistical analyses were performed using the Sigma Stat 7.0 (Sigma Stat 7.0; Systat Software, San Jose, CA) and the GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA) software. Statistical differences were determined by the Student's *t*-test (between two groups) or by ANOVA (for more than two groups). Differences comparing a combination of two factors (TGF- β or TNF- α) were analyzed by a two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test. The effect of different doses of only TGF- β were evaluated using one-way

ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. The threshold for significance was set at 5%.

RESULTS

Opposing effects of TGF- β and TNF- α on PRL expression and release by GH4C1 cells. Consistent with the effects shown on AP primary cultures (36, 49), TGF- β inhibits (18, 24), while TNF- α stimulates (27), PRL expression by the GH3 or GH4 lactotrope cell lines. Here, we confirm these findings in GH4C1 cells, a cell line derived from the somatomammotropin GH3 cells, which in contrast to their precursors primarily produce PRL (56). We show that treatment with different concentrations of TGF- β reduced the levels of PRL mRNA in cell lysates (Fig. 1, *A* and *B*) and of PRL in the cell-conditioned media (Fig. 1, *E* and *F*). Both effects were prevented and, in some cases, turned into stimulation by the coaddition of a high concentration of TNF- α (50 ng/ml) (Fig. 1, *B* and *F*); moreover, stimulation by this TNF- α concentration was reduced in the presence of the higher concentrations of TGF- β (Fig. 1, *B* and *F*). Similarly, we found that TNF- α , at various concentrations, stimulates PRL mRNA and secreted protein levels, and showed that stimulation was blocked by the coincubation with a maximal inhibitory concentration of TGF- β (10 ng/ml) (Fig. 1, *C* and *G*). The antagonism between the two factors was further illustrated when cells were treated with high concentrations of both cytokines simultaneously, in which case, the levels of PRL mRNA and secreted protein were significantly different from those observed when the cells were treated with each cytokine alone and similar to those of the control, untreated cells, essentially cancelling each other's effects (Fig. 1, *D* and *H*). Neither TGF- β nor TNF- α at their high inhibitory (10 ng/ml) or high stimulatory (50 ng/ml) concentration modified the viability or the number of cells (Fig. 1, *I* and *J*).

PRL, TGF- β , and TNF- α AP mRNA and serum levels are modified in HFD-fed rats. Next, we investigated whether PRL levels were altered in rats fed a HFD, a widely accepted model of obesity and metabolic syndrome (1). After 10 wk on a HFD, the rats showed a 30% increase in body weight (Fig. 2*A*), and they were hyperglycemic in fasted and fed states (Fig. 2*B*) and insulin-resistant, as evaluated by the insulin tolerance test (Fig. 2*C*). While both groups responded similarly to a high bolus of exogenous insulin, glucose levels remained higher at all time points in HFD-fed rats compared with controls. Similar curves are commonly observed in this type of experiment and imply that, because of insulin resistance, endogenous insulin is not able to maintain normoglycemia.

The HFD-fed rats showed a 46% reduction in AP PRL mRNA levels, in line with a similar decrease (45%) in serum PRL levels (Fig. 3, *A* and *D*). TGF- β mRNA values increased by 3.5-fold, and those of TNF- α decreased by 56% in the AP of HFD-fed rats compared with CD-fed animals (Fig. 3, *B* and *C*). The levels of both TGF- β ($P = 0.008$) and TNF- α ($P = 0.006$) increased in the circulation of obese animals (Fig. 3, *E* and *F*).

PRL, TGF- β , and TNF- α AP mRNA and serum levels are modified in STZ-induced diabetic rats. We then investigated whether similarly altered PRL, TGF- β , and TNF- α AP mRNA and serum levels found in the HFD-induced obesity model could be observed in other diabetes models, particularly in the STZ-treated rat, a well-characterized model of Type 1 diabetes

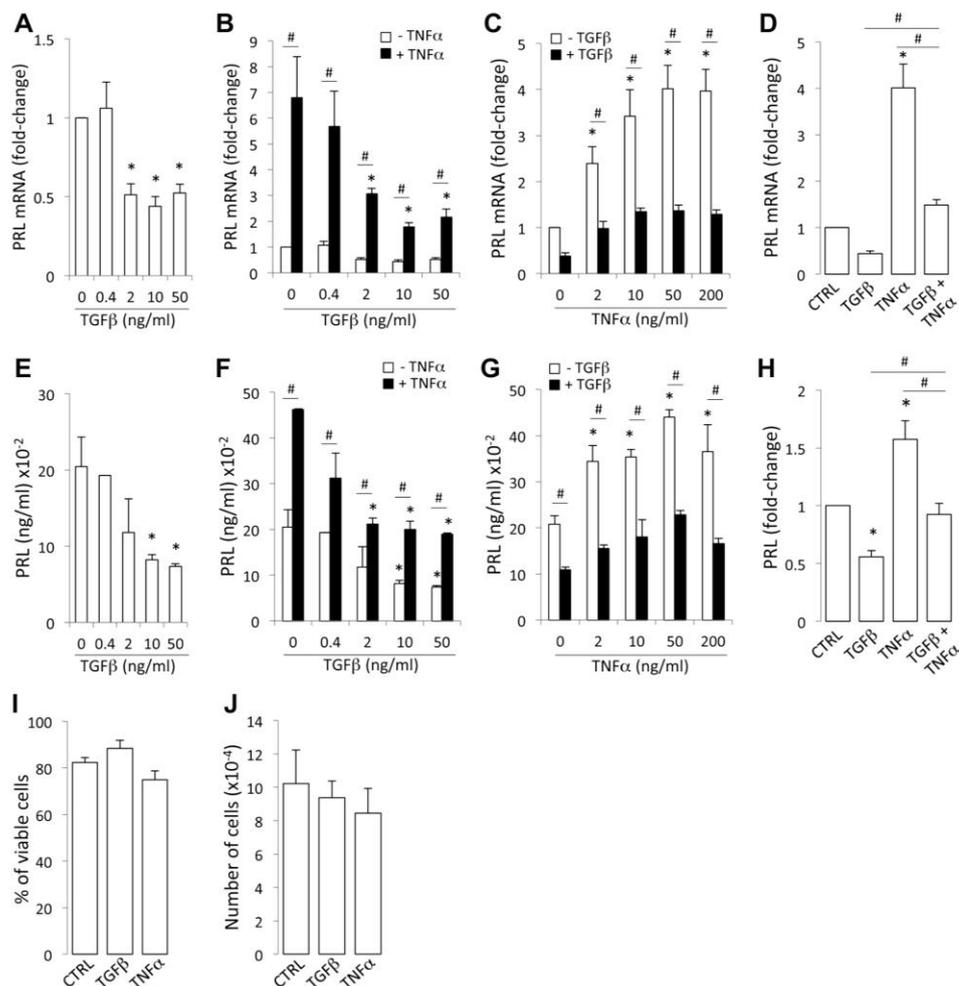


Fig. 1. Antagonism of TNF- α and TGF- β actions on prolactin (PRL) expression and release in GH4C1 cells. PRL mRNA expression was evaluated by qRT-PCR in cell lysates (A, B, C, D), and PRL levels were measured by RIA in the culture medium (E, F, G, H) of GH4C1 cells treated or not with a series of TGF- β (A, B, E, F) or TNF- α (C, G) concentrations with (B, F) or without high TNF- α (50 ng/ml) (A, B, E, F) or TGF- β (10 ng/ml) (C, G). PRL expression (D) and protein levels are shown in culture medium (H) and in the absence (CTRL) or presence of 10 ng/ml TGF- β or 50 ng/ml TNF- α alone or in combination. Viability relative to total number of cells (I) and number of cells after incubation (J) with or without TGF- β (10 ng/ml) or TNF- α (50 ng/ml) during 48 h. Values are expressed as means \pm SE from four independent experiments. * P < 0.05 vs. 0, analyzed by a one-way ANOVA and Bonferroni comparison test (A, E). * P < 0.05 vs. respective 0 or CTRL. # P < 0.05 vs. each cytokine alone, analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni comparison test (B, C, D, F, G, H).

(33). Six weeks after a single intraperitoneal injection of STZ, rats showed a 21% reduction in body weight and marked hyperglycemia, compared with control, vehicle-treated rats (Fig. 4, A and B). PRL AP mRNA and circulating levels were reduced by 26% and 85%, respectively, in STZ-treated compared with control rats (Fig. 5, A and D). Of note, the serum PRL values in control rats were slightly higher than expected for normoprolactinemia and may reflect a mild stress response to the handling procedure. AP TGF- β and TNF- α mRNA values increased significantly in STZ-injected rats (P = 0.0006 and P = 0.03 vs. control for TGF- β and TNF- α , respectively) (Fig. 5, B and C). Moreover, in line with their mRNA levels,

the protein values of both cytokines increase in the AP of STZ-treated rats compared with control animals (P = 0.048 and P = 0.002 vs. control for TGF- β and TNF- α , respectively) (Fig. 5, B and C). The serum levels of TGF- β were reduced (P = 0.011) in STZ-treated rats compared with control rats, while those of TNF- α were increased (P = 0.047) (Fig. 5, E and F).

DISCUSSION

PRL functions as a metabolic hormone. It affects metabolic homeostasis by promoting the proliferation, survival, and in-

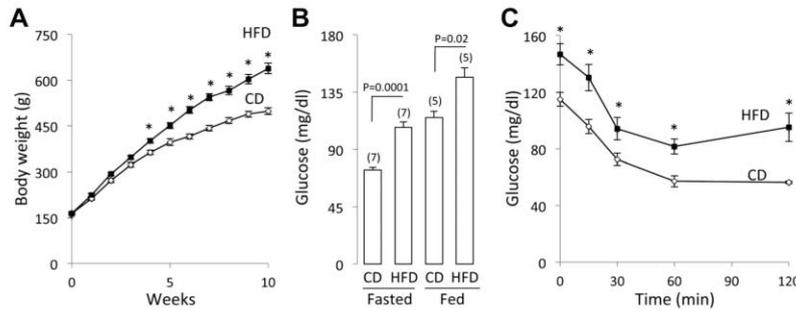


Fig. 2. High-fat diet for 10 wk induces increased body weight, hyperglycemia, and insulin resistance in rats. Body weight (A), blood glucose levels in the fed and fasted states (B), and insulin tolerance (C) were evaluated in rats fed with a control (CD) or with a high-fat diet (HFD) for 10 wk. Values are expressed as means \pm SE of 5–12 animals per group. * P < 0.05 vs. CD analyzed by Student's t -test.

ulin production of pancreatic β -cells (26, 57), and by stimulating food intake (11), liver insulin sensitivity (64), and adipose tissue growth and function (8). Large cohort clinical studies showed that reduced PRL serum levels, within the physiological range, are associated with diabetes and impaired glucose regulation (6, 60). Also, lower PRL circulating levels in obese children correlate with increased insulin resistance, inflammation, and body mass index (15). Consistent with the clinical studies, circulating levels of PRL are reduced in STZ-treated diabetic rats (9, 54), in mice rendered obese by chemical means (51), and in the *ob/ob* (38) and *db/db* mouse (50) models of diabetes and obesity. The 24-h pattern of plasma PRL levels is also disrupted in HFD-fed male rats (13), and serum PRL levels are reduced in HFD-fed female mice (52).

Here, we confirmed the reduced circulating levels of PRL found in STZ-induced diabetes in rats and found lower PRL serum levels in obese male rats fed a HFD. Moreover, we show

that PRL mRNA levels are also reduced in the AP of both STZ-induced diabetic and HFD-fed obese rats, suggesting that downregulation of PRL synthesis contributes to the decrease in systemic PRL. Lower PRL mRNA levels may also reflect a reduction in the number of lactotropes. Along this line, the AP PRL content and the number of AP PRL secretory granules and lactotropes are reduced, and lactotrope apoptosis is increased in STZ-induced diabetic rats (3, 4, 62).

Dopamine (DA) is the main inhibitor of AP PRL synthesis and release (7), and several DA-dependent and independent factors may act centrally and locally to regulate AP PRL synthesis and release in metabolic diseases (37, 43). Increased fat mass, hyperinsulinemia, and hyperleptinemia may modify PRL secretion in obesity and diabetes (37). However, both HFD-fed obese rats and STZ-induced diabetic rats show reduced AP PRL synthesis and release despite their opposite changes in weight gain (Refs. 1 and 33, present results), leptin (5, 53), and insulin (33, 44) levels, suggesting that other factors

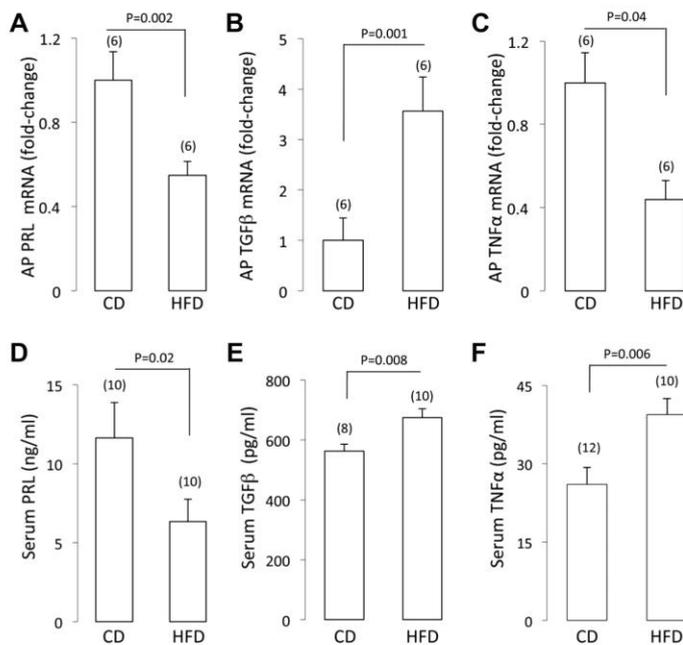


Fig. 3. PRL, TGF- β , and TNF- α anterior pituitary expression and their serum levels are altered in HFD-induced obese rats. Anterior pituitary (AP) expression of PRL (A), TGF- β (B), or TNF- α (C) were evaluated by qRT-PCR, serum levels of PRL (D) were evaluated by RIA, and those of TGF- β (E) and TNF- α (F) by ELISA in rats fed with control (CD) or with a high-fat diet (HFD) for 10 wk. Values are expressed as means \pm SE. Numbers inside parentheses indicate n values. P values are provided above each panel.

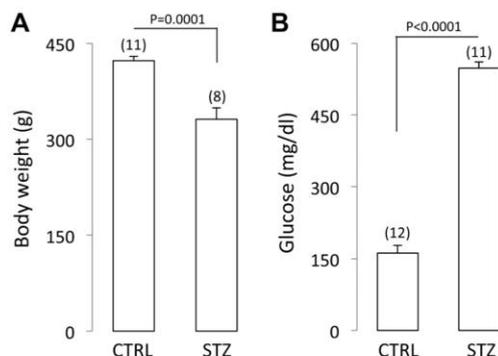


Fig. 4. Streptozotocin injection results in body weight loss and hyperglycemia in rats. Body weight (A) and blood glucose levels (B) were evaluated in rats 6 wk after a single intraperitoneal injection of vehicle (CTRL) or streptozotocin (STZ; 60 mg/kg). Values are expressed as means \pm SE. Numbers inside parentheses indicate *n* values. *P* values are provided above each panel.

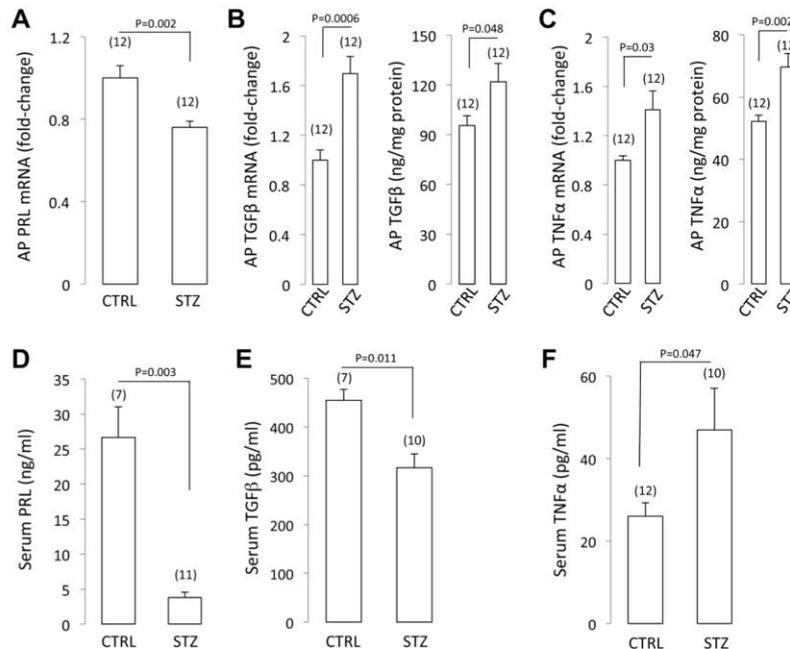
besides increased fat mass, hyperleptinemia, and hyperinsulinemia may affect PRL levels in these animals. In search of PRL regulators common to both models, we evaluated TGF- β and TNF- α .

TGF- β and TNF- α increase in the circulation of obese and diabetic humans (15, 19, 29, 61, 63), HFD-fed rodents (20, 61), and STZ-diabetic rats (4, 21, 22). TGF- β promotes adiposity and glomerular pathology in obesity and diabetes, and both the adipose and renal tissues are major sources of TGF- β released into the circulation (14, 22, 23, 61). Also, TNF- α is produced and released by stressed adipocytes from fat depots and by activated macrophages from tissues such as fat, muscle, and

liver to have local and systemic effects on metabolism, inflammation, and vascular function (29, 31). Of note, both cytokines have direct effects on PRL secretion. TGF- β inhibits and TNF- α can stimulate PRL synthesis and release by cultured lactotropes (18, 24, 27, 36, 49). Because both cytokines increase in obesity and diabetes, we investigated the outcome of their combined treatment on PRL secretion by the GH4C1 lactotrope cell line. We observed that TGF- β inhibited and TNF- α stimulated PRL synthesis and release in a dose-dependent manner, and these effects did not appear to involve altered cell viability or proliferation. Notably, the two cytokines antagonized the effect of each other, suggesting that their relative concentrations could determine whether PRL synthesis is up-regulated or downregulated. We hypothesized that, if these cytokines were involved in the PRL downregulation seen in obesity and diabetes, TGF- β inhibitory effects would prevail over the stimulatory action of TNF- α .

Our findings measuring the circulating concentrations of both cytokines agree with studies showing increased TGF- β levels in HFD-fed rodents and of TNF- α in HFD-fed and STZ-treated rats. However, in contrast to previous work (22), TGF- β systemic levels were reduced in STZ-treated diabetic rats. The reason for this discrepancy is unclear. TGF- β in serum may represent TGF- β released by the kidney due to diabetic nephropathy (14). It is possible that the earlier stage of nephropathy associated with the shorter exposure to diabetes in our study (6 vs. 10 wk) influenced TGF- β circulating levels. However, TGF- β and TNF- α values affecting PRL secretion in the pituitary milieu may not necessarily mirror their circulating levels. Both cytokines are expressed in the AP. The production of TGF- β appears to be restricted to folliculostellate cells (32) and lactotropes (10). In the latter, TGF- β synthesis is upregu-

Fig. 5. Levels of PRL, TGF- β , and TNF- α mRNA in the anterior pituitary and the corresponding proteins in serum are altered in STZ-induced diabetic rats. Anterior pituitary (AP) mRNA levels of PRL (A), TGF- β (B), and TNF- α (C) were evaluated by qRT-PCR, serum levels of PRL (D) were evaluated by the Nb2 cell bioassay, and AP and serum levels of TGF- β (B, E) and TNF- α (C, F) were determined by ELISA in rats 6 wk after a single intraperitoneal injection with vehicle (CTRL) or STZ. Values are expressed as means \pm SE. Numbers inside parentheses indicate *n* values. *P* values are provided above each panel.



lated by dopamine and downregulated by estrogens to modulate PRL secretion and lactotrope proliferation (10, 46, 48). TNF- α is produced by AP macrophages and somatotrophs (2). Therefore, an important question is whether the levels of TGF- β and TNF- α are altered in the AP under the conditions of obesity and diabetes.

To our knowledge, this is the first report showing that the expression of TGF- β increases and that of TNF- α decreases in the AP of HFD-induced obese rats, reciprocal changes that, if translated into opposite protein levels, could together explain the decrease in PRL synthesis and release. We also show that the AP mRNA and protein levels of TGF- β and TNF- α are upregulated in STZ-induced diabetic rats. The increase in TNF- α expression is consistent with a previous report showing elevated levels of the TNF- α protein in the AP of STZ-induced diabetic rats that were investigated as a mechanism inducing the apoptosis-mediated loss of lactotropes occurring in diabetes (4).

The higher expression of both TGF- β and TNF- α in the AP of diabetic rats, the reduced levels of circulating TGF- β in diabetes, and the systemic rise of TNF- α in obesity and diabetes are difficult to reconcile with the lower expression and circulating levels of PRL. From the cell line data, an increase in TNF- α would cancel out the inhibitory effect of TGF- β on PRL. A possible explanation for a prevailing effect of TGF- β in spite of the upregulation of TNF- α may relate to the endogenous concentrations of the two cytokines and their receptor binding affinities. In diabetic rats, the AP concentrations are similar (122 vs. 72 pg/mg of protein for TGF- β and TNF- α , respectively) but the K_d value (50 pM) of the TGF- β receptor-2 (TGF- β R-2) is 20- and 7-fold lower than the K_d values of the TNF- α R-1 (1.23 nM) and the TNF- α R-2 (0.35 nM), respectively (40, 47). TGF- β R2 forms a heteromeric complex with TGF- β R1 and is essential for all TGF- β -induced signaling (40, 45). Moreover, the circulating levels of TGF- β measured in diabetic (316 pg/ml, i.e., 25.3 pM) and in HFD-fed (674 pg/ml, i.e., 53.9 pM) rats are similar to the K_d concentration of the TGF- β R-2, whereas the systemic levels of TNF- α in diabetic (47 pg/ml, i.e., 2.8 pM) and HFD-fed (39 pg/ml, i.e., 2.3 pM) rats are more than 400- and 100-fold lower than the K_d values of the TNF- α R-1 and TNF- α R-2, respectively. Therefore, it is possible that TGF- β would be more effective than TNF- α at their endogenous levels. Alternatively, it should also be noted that the effect of TNF- α may not occur or may turn into inhibition, depending on complex in vivo interactions. Concentrations of TNF- α similar to those found to be stimulatory in our study, may have either no effect (41), inhibit PRL release (30, 58), or promote lactotrope apoptosis (12), depending on the duration of TNF- α exposure, and on the sex, influence of gonadal steroids, and age of animals from which the cells were obtained. Also, lactotrope apoptosis occurs in STZ-treated rats (4), so it is possible that STZ-mediated upregulation of TNF- α could help lower AP PRL indirectly by promoting lactotrope apoptosis.

The altered pituitary TGF- β and TNF- α expression profiles and circulating levels found in obesity and diabetes, together with the direct reciprocal effects of the two cytokines on AP PRL synthesis and release, suggest that TGF- β and TNF- α play both local and systemic regulatory roles to inhibit PRL secretion in metabolic diseases. Evaluating whether specific, in

vivo blockage of the two cytokines in the AP milieu modifies PRL secretion should test this putative causative link.

The functional interaction between TGF- β and TNF- α raises the question of what controls their AP production in obesity and diabetes. TGF- β is upregulated by DA in lactotropes (46, 48) and may be linked to the overactivation of hypothalamic DA occurring in obesity (51, 52) and diabetes (54). Production of TNF- α in the AP could be a stress response (34). TNF- α can affect the secretion of ACTH by AP cells (28), and TNF- α is upregulated in the AP by a relatively weak, systemic inflammatory stress (34), which occurs in obesity (39) and Type 1 diabetes (42). Chronic poor metabolic control also triggers TNF- α expression (21), and hypoglycemia stimulates PRL secretion in poorly controlled diabetic patients (35). Further research is needed to investigate whether the altered expression of TGF- β and TNF- α in the AP could influence metabolic disorders by other mechanisms besides PRL.

Perspectives and Significance

The present study demonstrates that reduced AP PRL secretion in obese and diabetic rats correlates with altered changes in the AP expression of two metabolically relevant cytokines, TGF- β and TNF- α . We hypothesize that an imbalance in the AP between the two cytokines, derived from their altered local and systemic levels, favors PRL downregulation in metabolic disorders. These findings help establish the context of TGF- β and TNF- α regulation of PRL, a hormone with recognized influence on metabolic homeostasis that, when downregulated, may aggravate metabolic alterations resulting from obesity and diabetes. However, further studies are needed to prove these hypotheses.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Gabriel Nava, Martín García, Alejandra Castilla, Francisco Javier Valles Valenzuela, Daniel Mondragón, and Antonio Prado for excellent technical assistance, as well as Dorothy D. Pless for critically editing of the manuscript.

GRANTS

M. Lemini (228328), X. Ruiz-Herrera (245847), María G. Ledesma-Colunga (245828), Nundehui Díaz-Lezama (245224), and Ericka A. De los Ríos (230452) are doctoral students from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and were supported by fellowships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). The study was supported by CONACYT Grants SALUD-2011-1-161594 to C. Clapp and CB-2011-01-164423 to Y. Macotela, and UNAM Grants IB200411 and IA200113 to Y. Macotela.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.L., Y.M. and C.C. conceived and designed research; M.L., X.R.-H., M.G.L.-C., N. D.-L., F.L.-B. and I.M. performed experiments; M.L., E.A.D.I.R., Y.M., and C.C. analyzed data; M.L., G.M.d.I.E., Y.M. and C.C. interpreted results of experiments; M.L. and Y.M. prepared figures; Y.M. and C.C. wrote the manuscript; M.L., G.M.d.I.E. edited and revised manuscript; M.L., X.R.-H., M.G.L.-C., N. D.-L., E.A.D.I.R., F.L.-B., I.M., G.M.d.I.E., Y.M. and C.C. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. Akbay E, Ulusu NN, Toroner F, Ayvaz G, Taneri F, Akturk M, Arslan M, Karasu C. Effects of rosiglitazone treatment on the pentose phosphate

- pathway and glutathione-dependent enzymes in liver and kidney of rats fed a high-fat diet. *Curr Ther Res Clin Exp* 65: 79–89, 2004.
2. Arras M, Hoche A, Bohle R, Eckert P, Riedel W, Schaper J. Tumor necrosis factor- α in macrophages of heart, liver, kidney, and in the pituitary gland. *Cell Tissue Res* 285: 39–49, 1996.
 3. Arroba AI, Frago LM, Paneda C, Argente J, Chowen JA. The number of lactotrophs is reduced in the anterior pituitary of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 46: 634–638, 2003.
 4. Arroba AI, Lechuga-Sancho AM, Frago LM, Argente J, Chowen JA. Increased apoptosis of lactotrophs in streptozotocin-induced diabetic rats is followed by increased proliferation. *J Endocrinol* 191: 55–63, 2006.
 5. Bahecci M, Tuzcu A, Akkus M, Yaldiz M, Ozbay A. The effect of high-fat diet on the development of obesity and serum leptin level in rats. *Eat Weight Disord* 4: 128–132, 1999.
 6. Balbach L, Wallaschofski H, Volzke H, Nauck M, Dorr M, Haring R. Serum prolactin concentrations as risk factor of metabolic syndrome or type 2 diabetes? *BMC Endocr Disord* 13: 12, 2013.
 7. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22: 724–763, 2001.
 8. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 29: 1–41, 2008.
 9. Boujon CE, Bestetti GE, Abramo F, Locatelli V, Rossi GL. The reduction of circulating growth hormone and prolactin in streptozotocin-induced diabetic male rats is possibly caused by hypothalamic rather than pituitary changes. *J Endocrinol* 145: 19–26, 1995.
 10. Burns G, Sarkar DK. Transforming growth factor β -1-like immunoreactivity in the pituitary gland of the rat: effect of estrogen. *Endocrinology* 133: 1444–1449, 1993.
 11. Byatt JC, Staten NR, Salsgiver WJ, Kostelc JG, Collier RJ. Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 264: E986–E992, 1993.
 12. Candolfi M, Zaldivar V, De Laurentis A, Jaita G, Pisera D, Seilico-vich A. TNF- α induces apoptosis of lactotrophs from female rats. *Endocrinology* 143: 3611–3617, 2002.
 13. Cano P, Jimenez-Ortega V, Larrad A, Reyes Toso CF, Cardinali DP, Esquifino AI. Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine* 33: 118–125, 2008.
 14. Chen S, Jim B, Ziyadeh FN. Diabetic nephropathy and transforming growth factor- β : transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up. *Semin Nephrol* 23: 532–543, 2003.
 15. Chirico V, Cannavo S, Lacquaniti A, Salpietro V, Mandolino M, Romeo PD, Cotta O, Munafò C, Giorgianni G, Salpietro C, Arrigo T. Prolactin in obese children: a bridge between inflammation and metabolic-endocrine dysfunction. *Clin Endocrinol* 79: 537–544, 2013.
 16. Clapp C, Thebault S, Jezierski MC, Martinez de la Escalera G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 89: 1177–1215, 2009.
 17. De A, Morgan TE, Speth RC, Boyadjieva N, Sarkar DK. Pituitary lactotrope expresses transforming growth factor beta (TGF- β) type II receptor mRNA and protein and contains 125I-TGF β 1 binding sites. *J Endocrinol* 149: 19–27, 1996.
 18. Delidow BC, Billis WM, Agarwal P, White BA. Inhibition of prolactin gene transcription by transforming growth factor-beta in GH3 cells. *Mol Endocrinol* 5: 1716–1722, 1991.
 19. Doganay S, Evereklioglu C, Er H, Turkoz Y, Sevinc A, Mehmet N, Savli H. Comparison of serum NO, TNF- α , IL-1 β , sIL-2R, IL-6, and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye* 16: 163–170, 2002.
 20. El-Moselhy MA, Taye A, Sharkawi SS, El-Sisi SF, Ahmed AF. The antihyperglycemic effect of curcumin in high fat diet fed rats. Role of TNF-alpha and free fatty acids. *Food Chem Toxicol* 49: 1129–1140, 2011.
 21. El-seweidy MM, El-Sweify SE, Ameen RS, Hashem RM. Effect of age receptor blocker and/or anti-inflammatory coadministration in relation to glycation, oxidative stress and cytokine production in stz diabetic rats. *Pharmacol Res* 45: 391–398, 2002.
 22. Erman A, Veksler S, Gafter U, Boner G, Wittenberg C, van Dijk DJ. Renin-angiotensin system blockade prevents the increase in plasma transforming growth factor β 1, and reduces proteinuria and kidney hypertrophy in the streptozotocin-diabetic rat. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 5: 146–151, 2004.
 23. Fain JN, Tichansky DS, Madan AK. Transforming growth factor β 1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity. *Metabolism* 54: 1546–1551, 2005.
 24. Farrow KN, Gutierrez-Hartmann A. Transforming growth factor-beta1 inhibits rat prolactin promoter activity in GH4 neuroendocrine cells. *DNA Cell Biol* 18: 863–873, 1999.
 25. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80: 1523–1631, 2000.
 26. Freemark M, Avril I, Fleenor D, Driscoll P, Petro A, Opara E, Kendall W, Oden J, Bridges S, Binart N, Breat B, Kelly PA. Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology* 143: 1378–1385, 2002.
 27. Friedrichsen S, Harper CV, Semprini S, Wilding M, Adamson AD, Spiller DG, Nelson G, Mullins JJ, White MR, Davis JR. Tumor necrosis factor- α activates the human prolactin gene promoter via nuclear factor- κ B signaling. *Endocrinology* 147: 773–781, 2006.
 28. Gaillard RC, Turnill D, Sappino P, Muller AF. Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinology* 127: 101–106, 1990.
 29. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 3171–3182, 2009.
 30. Harel G, Shamoun DS, Kane JP, Magner JA, Szabo M. Prolonged effects of tumor necrosis factor- α on anterior pituitary hormone release. *Peptides* 16: 641–645, 1995.
 31. Jiang S, Gavrikova TA, Sharifov OF, Messina JL. Role of tissue macrophages in the development of critical illness diabetes. *Shock* 37: 70–76, 2012.
 32. Jin L, Tsumanuma I, Ruebel KH, Bayliss JM, Lloyd RV. Analysis of homogeneous populations of anterior pituitary folliculostellate cells by laser capture microdissection and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology* 142: 1703–1709, 2001.
 33. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 48: 2129–2139, 1969.
 34. Kariagina A, Romanenko D, Ren SG, Chesnokova V. Hypothalamic-pituitary cytokine network. *Endocrinology* 145: 104–112, 2004.
 35. Kinsley BT, Levy CJ, Simonson DC. Prolactin and beta-endorphin responses to hypoglycemia are reduced in well-controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 45: 1434–1440, 1996.
 36. Koike K, Masumoto N, Kasahara K, Yamaguchi M, Tasaka K, Hirota K, Miyake A, Tanizawa O. Tumor necrosis factor- α stimulates prolactin release from anterior pituitary cells: a possible involvement of intracellular calcium mobilization. *Endocrinology* 128: 2785–2790, 1991.
 37. Kopelman PG. Physiopathology of prolactin secretion in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2: S104–S108, 2000.
 38. Larson BA, Sinha YN, Vanderlaan WP. Serum growth hormone and prolactin during and after the development of the obese-hyperglycemic syndrome in mice. *Endocrinology* 98: 139–145, 1976.
 39. Lee YH, Pratley RE. The evolving role of inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 5: 70–75, 2005.
 40. Lin HY, Moustakas A, Knaus P, Wells RG, Henis YI, Lodish HF. The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF)- β receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF- β ligands. *J Biol Chem* 270: 2747–2754, 1995.
 41. Milenkovic L, Rettori V, Snyder GD, Beutler B, McCann SM. Cachectin alters anterior pituitary hormone release by a direct action in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2418–2422, 1989.
 42. Ozer G, Tekler Z, Cetiner S, Yilmaz M, Topaloglu AK, Onenli-Mungan N, Yuksel B. Serum IL-1, IL-2, TNF α and IFN γ levels of patients with type 1 diabetes mellitus and their siblings. *J Pediatr Endocrinol Metab* 16: 203–210, 2003.
 43. Perez-Castro C, Renner U, Haedo MR, Stalla GK, Arzt E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol Rev* 92: 1–38, 2012.
 44. Peters WH, Gottschling D, Ziegler M, Haude W. Basal hyperinsulinemia in Wistar-rats rendered obese by a high-fat diet. *Acta Biol Med Ger* 36: 1343–1346, 1977.
 45. Qian SW, Burmester JK, Tsang ML, Weatherbee JA, Hinck AP, Ohlsen DJ, Sporn MB, Roberts AB. Binding affinity of transforming growth factor-beta for its type II receptor is determined by the C-terminal region of the molecule. *J Biol Chem* 271: 30,656–30,662, 1996.

46. **Recouvreur MV, Guida MC, Rifkin DB, Becu-Villalobos D, Diaz-Torga G.** Active and total transforming growth factor- β_1 are differentially regulated by dopamine and estradiol in the pituitary. *Endocrinology* 152: 2722–2730, 2011.
47. **Reed C, Fu ZQ, Wu J, Xue YN, Harrison RW, Chen MJ, Weber IT.** Crystal structure of TNF- α mutant R31D with greater affinity for receptor R1 compared with R2. *Protein Eng* 10: 1101–1107, 1997.
48. **Sarkar DK, Chaturvedi K, Oomizu S, Boyadjieva NI, Chen CP.** Dopamine, dopamine D₂ receptor short isoform, transforming growth factor (TGF)- β_1 , and TGF- β type II receptor interact to inhibit the growth of pituitary lactotropes. *Endocrinology* 146: 4179–4188, 2005.
49. **Sarkar DK, Kim KH, Minami S.** Transforming growth factor- β_1 messenger RNA and protein expression in the pituitary gland: its action on prolactin secretion and lactotropic growth. *Mol Endocrinol* 6: 1825–1833, 1992.
50. **Sinha YN, Baxter SR, Larson BA, Vanderlaan WP.** Levels of prolactin, growth hormone and insulin in genetically diabetic (*db/db*) mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 161: 78–81, 1979.
51. **Sinha YN, Salocks CB, Vanderlaan WP.** Prolactin and growth hormone secretion in chemically induced and genetically obese mice. *Endocrinology* 97: 1386–1393, 1975.
52. **Sinha YN, Thomas JW, Salocks CB, Wickes MA, VanderLaan WP.** Prolactin and growth hormone secretion in diet-induced obesity in mice. *Horm Metab Res* 9: 277–282, 1977.
53. **Sivitz WI, Walsh S, Morgan D, Donohoue P, Haynes W, Leibel RL.** Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats. *Metabolism* 47: 584–591, 1998.
54. **Steger RW, Amador A, Lam E, Rathert J, Weis J, Smith MS.** Streptozotocin-induced deficits in sex behavior and neuroendocrine function in male rats. *Endocrinology* 124: 1737–1743, 1989.
55. **Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG.** A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 51: 1058–1063, 1980.
56. **Tashjian AH Jr, Bancroft FC, Levine L.** Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts. *J Cell Biol* 47: 61–70, 1970.
57. **Terra LF, Garay-Malpartida MH, Wailemann RA, Sogayar MC, Labriola L.** Recombinant human prolactin promotes human β -cell survival via inhibition of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Diabetologia* 54: 1388–1397, 2011.
58. **Theas S, Pisera D, Duvilanski B, De Laurentiis A, Pampillo M, Lasaga M, Seilicovich A.** Estrogens modulate the inhibitory effect of tumor necrosis factor- α on anterior pituitary cell proliferation and prolactin release. *Endocrine* 12: 249–255, 2000.
59. **Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS.** Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389: 610–614, 1997.
60. **Wang T, Lu J, Xu Y, Li M, Sun J, Zhang J, Xu B, Xu M, Chen Y, Bi Y, Wang W, Ning G.** Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation: a population-based study. *Diabetes Care* 36: 1974–1980, 2013.
61. **Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, Gavrilova O, Malek R, Chen W, Zervas P, Zhigang D, Wright EC, Stuelten C, Sun P, Lanning S, Skarulis M, Sumner AE, Finkel T, Rane SG.** Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β /Smad3 signaling. *Cell Metab* 14: 67–79, 2011.
62. **Yamauchi K, Shiino M.** Pituitary prolactin cells in diabetic rats induced by the injection of streptozotocin. *Exp Clin Endocrinol* 88: 81–88, 1986.
63. **Yener S, Comekci A, Akinci B, Akan P, Demir T, Bayraktar F, Yesil S.** Serum transforming growth factor- β_1 levels in normoalbuminuric and normotensive patients with type 2 diabetes. Effect of metformin and rosiglitazone. *Hormones* 7: 70–76, 2008.
64. **Yu J, Xiao F, Zhang Q, Liu B, Guo Y, Lv Z, Xia T, Chen S, Li K, Du Y, Guo F.** PRLR regulates hepatic insulin sensitivity in mice via STAT5. *Diabetes* 62: 3103–3113, 2013.
65. **Zaldivar V, Magri ML, Zarate S, Jaita G, Eijo G, Radl D, Ferraris J, Pisera D, Seilicovich A.** Estradiol increases the expression of TNF- α and TNF receptor 1 in lactotropes. *Neuroendocrinology* 93: 106–113, 2011.