



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**“ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE EL CRECIMIENTO  
DEL HÍGADO DEL RATÓN DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL”**

## **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA**

**M. en Nutrición Humana. Marco Antonio Bravo Manríquez**

**TUTOR:**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**DR. FRANCISCO GABRIEL VÁZQUEZ CUEVAS  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.**

**DR. ROLANDO EFRAÍN HERNÁNDEZ MUÑOZ  
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM.**

**JURIQUILLA, QUERÉTARO, MÉXICO, OCTUBRE DE 2020**



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.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Endocrinología Molecular, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular de la Universidad Nacional autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L. Fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto número 220574 y 289568 y por la Universidad Nacional Autónoma de México proyecto DGAPA-PAPIIT IN209417. El alumno fue becado por el CONACyT con el número de registro **499407**.

## **JURADO DE EXAMEN**

### **Integrantes:**

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L

Dr. Carmen Yolanda Aceves Velasco

Dr. Rafael Villalobos Molina

Dra. Marina Macías Silva

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme la oportunidad de formar parte del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas en el Instituto de Neurobiología y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca para finalizar dichos estudios (no. de beca 499407).

- Agradezco el apoyo y tutoría de la Dra. Clapp así como la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Extiendo mi gratitud a los demás miembros de mi comité tutor, el Dr. Francisco Vázquez y el Dr. Rolando Hernández por su asesoría y su apoyo durante este período de mi formación.
- Los consejos y asesorías de la Dra. Bibiana Moreno, el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera y la Dra. Yazmín Macotela.
- El apoyo técnico y valiosa colaboración de la Dra. Xarubet Ruiz Herrera, el M en C. Gabriel Nava Pinto y el Lic. en Nutrición Fernando López Barrera.
- La asistencia técnica de Antonio Prado Galán y de Daniel Mondragón Huerta.
- La asistencia de la M en C Leonor Casanova Rico y de la Dra. Nuri Aranda López responsables de la Unidad de Enseñanza de estudios de Posgrado.
- El valioso apoyo del MVZ. Martín García Servín y de la Dra. Alejandra Castilla, responsables del bioterio del Instituto de Neurobiología, así como a todo el personal en él que labora.
- A la Lic. Lourdes Lara Ayala por su valiosa ayuda con el servicio de videoconferencias en los exámenes tutorales así como en las clases.
- A María del Carmen Mendoza López por su apoyo con todos los trámites administrativos.
- A Marisol Villafañez, Ivonne Torres y todo el personal administrativo que forma parte del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) por su apoyo.
- A todo el personal del área de Cómputo del Instituto de Neurobiología por su valiosa ayuda.

- A la M en C. Adriana Gallardo, así como a todo el personal de la Unidad de Proteogenómica por su ayuda.
- Al personal administrativo del Instituto de Neurobiología.
- Al Dr. Javier Valles Valenzuela de la Biblioteca del Instituto de Neurobiología.
- A todos mis compañeros de los Laboratorios A-14 y A-15 así como todos los amigos que han formado parte de esto y han aligerado la carga.
- A Harry y Gonzalo por estar siempre presentes.
- A Alexandra Elbakyan.

A mis padres por su invaluable apoyo y cariño en todo este trayecto.

A mi hermana.

A mis maravillosos sobrinos.

A Erandi por su amor y su compañía a lo largo de esto, es parte del sueño que estamos construyendo, TE AMO.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known”

Carl Sagan.

“The good thing about science is that it’s true whether or not you believe in it”

Neil deGrasse Tyson.

# Índice

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>14</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>18</b>
<b>HÍGADO: GENERALIDADES.....</b>	<b>18</b>
<b>ARQUITECTURA HEPÁTICA .....</b>	<b>20</b>
<b>METABOLISMO ENERGÉTICO EN EL HÍGADO .....</b>	<b>22</b>
<b>DESARROLLO PRE- Y POSTNATAL DEL HÍGADO.....</b>	<b>24</b>
<b>CRECIMIENTO DEL HÍGADO DURANTE EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA.....</b>	<b>27</b>
<b>REGENERACIÓN HEPÁTICA.....</b>	<b>28</b>
<b>PROLACTINA.....</b>	<b>30</b>
<b>RECEPTOR DE PRL.....</b>	<b>32</b>
<b>PRL E HÍGADO.....</b>	<b>34</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b><i>ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO HEPÁTICO POSTNATAL .....</i></b>	<b>38</b>

<i>RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-PCR)</i> .....	38
<i>ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)</i> .....	39
<i>ESTADÍSTICA</i> .....	39
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>CRECIMIENTO HEPÁTICO Y CORPORAL DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL</b> .....	<b>40</b>
<b>VALORES CIRCULANTES DE PRL Y DE SU RECEPTOR EN EL HÍGADO DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL</b> .....	<b>41</b>
<b>LA FALTA DEL RECEPTOR DE LA PRL MODIFICA EL CRECIMIENTO POSTNATAL DEL HÍGADO</b> .....	<b>44</b>
<b>LA AUSENCIA DEL RECEPTOR DE LA PRL SE ASOCIA CON UN AUMENTO EN LA SEÑALIZACIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN EL HÍGADO DURANTE LA SEGUNDA SEMANA DEL DESARROLLO POSTNATAL</b> .....	<b>46</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>49</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>60</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>74</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>75</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>76</b>
ARTÍCULO 1. MORENO-CARRANZA B, BRAVO-MANRÍQUEZ M, BÁEZ A, LEDESMA-COLUNGA MG, RUIZ-HERRERA X, REYES-ORTEGA P, DE LOS RÍOS EA, MACOTELA Y, MARTÍNEZ DE LA ESCALERA G, CLAPP C. PROLACTIN REGULATES LIVER GROWTH DURING POSTNATAL DEVELOPMENT IN MICE. AM J PHYSIOL REGUL INTEGR COMP PHYSIOL. 2018 JUN 1;314(6):R902-R908. ....	76



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>HPx</b>	Hepatectomía parcial
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>Jak-2</b>	Cinasa de Janus 2
<b>RPRL</b>	Receptor de prolactina
<b>SEC</b>	Células endoteliales sinusoidales
<b>Thy1<sup>+</sup></b>	Células derivadas de hígado fetal de ratón
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Actina de músculo liso alfa
<b>TAG</b>	Triacilglicerol
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad
<b>GLUT2</b>	Transportador de glucosa 2
<b>G6P</b>	Glucosa-6-fosfato
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LBW</b>	Liver-to-body weight ratio
<b>STM</b>	Mesénquima del Septum Transversum
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de proliferación celular
<b>STAT3</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3

<b>NF-kB</b>	Factor nuclear potenciador <i>kappa</i> B
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>FGF-1</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos 1
<b>FGF-2</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>TIDA</b>	Sistema tuberoinfundibular dopaminérgico
<b>GHR</b>	Receptor de hormona de crecimiento
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa
<b>HNF-4</b>	Factor nuclear de hepatocitos 4
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>PH/PC</b>	Peso del hígado corregido por el peso corporal
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

<b>CypA</b>	Ciclofilina A
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>PL</b>	Lactógeno placentario
<b>Pecam1</b>	Marcador de adhesión de plaquetas a endotelio-1
<b>Ccnd1</b>	Ciclina D1
<b>Ap-1</b>	Proteína activadora 1
<b>PKC</b>	Proteína Cinasa C
<b>STAT5</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
<b>Igf-1</b>	Factor de crecimiento similar a insulina tipo 1
<b>Socs2</b>	Supresor de la señalización de citocinas 2
<b>Socs3</b>	Supresor de la señalización de citocinas 3

## RESUMEN

El peso del hígado corresponde aproximadamente al 5% del peso corporal. En el ratón, esta relación se alcanza a la semana cuatro después del nacimiento y se mantiene a lo largo de la vida adulta. La hormona prolactina (PRL) estimula el crecimiento del hígado adulto así como su regeneración posterior a una hepatectomía parcial y se sabe que los niveles circulantes de la PRL están elevados en el recién nacido humano pero se desconoce su influencia sobre el crecimiento hepático postnatal. En este trabajo mostramos en el ratón que el hígado está expuesto a la PRL durante el período postnatal temprano. El hígado del ratón produce PRL y sobre-expresa su receptor durante las primeras dos semanas después del nacimiento cuando los niveles circulantes de la hormona (producidos por la hipófisis anterior) son indetectables. A la semana cuatro post-nacimiento coincide la detección sistémica de la PRL con la desaparición de la síntesis de PRL hepática. Para investigar la influencia de la PRL sobre el hígado en esta fase del desarrollo, examinamos el peso hepático relativo al peso corporal (pH/pC) en ratones nulos (*Prlr*  $-/-$ ) y silvestres (*Prlr*  $+/+$ ) para el receptor de la PRL. Encontramos que el pH/pC disminuye en los ratones *Prlr*  $-/-$  durante las semanas 1, 4, 6 y 10 post-nacimiento en asociación con una baja expresión hepática de marcadores de proliferación celular (ciclina D1) y angiogénesis (*Pecam1*). Sin embargo, a la semana 2 post-nacimiento el pH/pC aumentó en ausencia del receptor de la PRL en coincidencia con una mayor expresión hepática del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF1) y una regulación hepática alta y baja del supresor de señalización de citocinas 2 (SOCS2) y SOCS3, respectivamente. Estos resultados revelaron acciones locales y sistémicas de la PRL capaces de estimular e inhibir el crecimiento del hígado durante el desarrollo postnatal temprano. Se propone que la PRL es parte de los mecanismos que explican la falta de acción de la hormona de crecimiento en roedores durante las primeras dos semanas de desarrollo postnatal.

## ABSTRACT

The liver grows during the early postnatal period first at slower and then at faster rates than the body to achieve the 5% adult liver-to-body weight ratio (LBW), a constant reflecting liver health. The hormone prolactin (PRL) stimulates adult liver growth and regeneration and its levels are high in the circulation of newborn infants, but whether PRL plays a role on neonatal liver growth is unknown. Here, we show that the liver produces PRL and upregulates the PRL receptor in mice during the first 2 weeks after birth, when liver growth lags behind body growth. At postnatal week 4, the production of PRL by the liver ceases coinciding with the elevation of circulating PRL and the faster liver growth that catches up with body growth. PRL receptor null mice (*Prlr*<sup>-/-</sup>) show a significant decrease in the LBW at 1, 4, 6, and 10 postnatal weeks and reduced liver expression of proliferation (*cyclin D1*) and angiogenesis (*CD31*) markers relative to *Prlr*<sup>+/+</sup> mice. However, the LBW increases in *Prlr*<sup>-/-</sup> mice at postnatal week 2 concurring with the enhanced liver expression of IGF-1 and the liver upregulation and downregulation of suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) and SOCS3, respectively. These findings indicate that PRL acts locally and systemically to restrict and stimulate postnatal liver growth, respectively. PRL inhibits liver and body growth by attenuating growth hormone-induced IGF-1 liver expression via SOCS2 and SOCS3-related mechanisms.

## Introducción

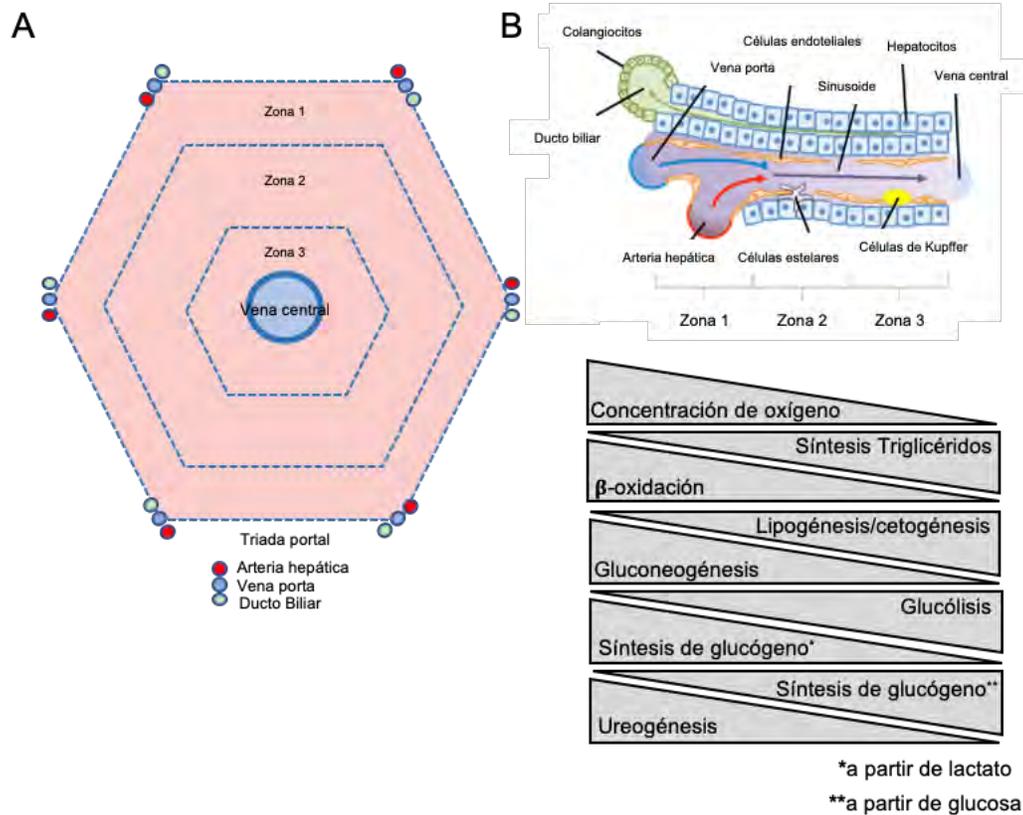
El hígado es un órgano vital con funciones que incluyen la síntesis de proteínas plasmáticas (albúmina, lipoproteínas y factores de la coagulación), la regulación de la glucemia, lípidos y aminoácidos, la síntesis de la bilis (necesaria para la emulsificación y absorción de las grasas), la producción de hormonas, el almacenamiento de vitaminas, minerales y glucógeno y la detoxificación de la sangre. El hígado crece durante el desarrollo posnatal temprano hasta alcanzar el 5% de peso relativo al peso corporal que se mantendrá sin cambio a lo largo de la vida adulta. Sin embargo, el hígado adulto crece temporalmente en eventos que demandan un incremento en sus funciones como son el embarazo y la lactancia. Son varios los factores descritos que promueven el crecimiento del hígado en el modelo de regeneración hepática posterior a una hepatectomía parcial, pero es poco lo que se sabe sobre los factores que participan en estimular el crecimiento del hígado intacto durante el desarrollo postnatal, el embarazo y la lactancia (Dai et al., 2011; Michalopoulos & DeFrances, 1997; Moreno-Carranza et al., 2013; Olazabal et al., 2009; Taub, 2004). Uno de estos factores es la hormona prolactina (PRL). La PRL se produce principalmente por la adenohipófisis, pero también por algunos de sus órganos blanco (que incluyen a glándula mamaria, decidua uterina, células inmunes, endotelio vascular) (Ben-Jonathan et al., 1996). La PRL activa receptores membranales y diversas cascadas de señalización que regulan procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Ben-Jonathan et al., 2008; Freeman et al., 2000). Aunado a esto, se sabe que el receptor de PRL (RPRL) se expresa en una gran variedad de órganos, siendo el hígado en donde se detecta

con mayor abundancia (Nagano & Kelly, 1994). La PRL estimula la proliferación de los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales del hígado adulto, así como la regeneración del tejido (Moreno-Carranza et al., 2013; Olazabal et al., 2009). Además, los niveles de PRL circulante se incrementan en asociación a eventos caracterizados por el crecimiento hepático, como son el embarazo, la lactancia y el desarrollo postnatal (Ben-Jonathan et al., 2008; Buckley et al., 1991; Moreno-Carranza et al., 2013). Es por ello que, en este trabajo se investigó la participación de la PRL como regulador fisiológico del crecimiento del hígado que ocurre durante el desarrollo postnatal temprano utilizando ratones nulos para el receptor de la PRL como modelo experimental.

## **Antecedentes**

### **Hígado: Generalidades**

El hígado es un órgano vital que desempeña múltiples funciones en el organismo entre las que se incluyen la regulación del metabolismo, el almacén y redistribución de vitaminas, minerales, carbohidratos y lípidos, la eliminación de sustancias tóxicas, la síntesis de proteínas plasmáticas y de la bilis (Grijalva & Vakili, 2013; Olazabal et al., 2009; Rui, 2014; Si-Tayeb et al., 2010; Taub, 2004). La unidad anatómica funcional del hígado es el lóbulo hepático, que consta de placas de hepatocitos recubiertas por capilares sinusoidales que proyectan hacia una vena central eferente (Si-Tayeb et al., 2010). Los lóbulos del hígado tienen una estructura hexagonal donde cada uno de sus lados se encuentra demarcado por la presencia de una triada portal de vasos que se compone de ramificaciones de la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar (Si-Tayeb et al., 2010; Trefts et al., 2017) (Figura 1). Tanto la arteria hepática como la vena porta transportan sangre hacia el lóbulo, la cual fluye a través de una red de capilares sinusoidales hasta su salida vía la vena central (Rui, 2014; Trefts et al., 2017). Las uniones estrechas entre los hepatocitos forman canalículos que recolectan las sales y los ácidos biliares son transportados hasta el ducto biliar localizado en la triada portal y de ahí a la vesícula biliar para su almacenamiento y subsecuente liberación al duodeno tras la ingesta de alimentos (Si-Tayeb et al., 2010).



**Figura 1. Organización celular del hígado.** **A)** Representación geométrica de un lóbulo hepático. En los vértices se encuentra la triada portal compuesta por ramificaciones de la arteria hepática, la vena porta y el ducto biliar. La sangre rica en oxígeno proveniente de la arteria hepática se mezcla con sangre rica en nutrientes proveniente del intestino. Posteriormente, esta sangre fluye a través del lóbulo hacia los sinusoides vasculares que conducen a las ramificaciones de la vena central. **B)** Representación esquemática de un sinusoides hepático donde la sangre fluye a través del sinusoides dando paso al establecimiento de gradientes a lo largo de su estructura. Los gradientes se muestran abajo del esquema del sinusoides y corresponden a los formados por moléculas esenciales (oxígeno) y diversos procesos metabólicos fundamentales para el adecuado funcionamiento del hígado. Es importante mencionar que estos gradientes están sujetos a modificaciones dependiendo el estado del organismo (i.e., estados de ayuno y alimentación). Obtenida y modificada de Trefts *et al.*, 2017.

## Arquitectura hepática

El hígado está formado por distintos tipos celulares que incluyen a los hepatocitos, las células epiteliales biliares (colangiocitos), las células estrelladas (o células de Ito), las células de Kupffer (macrófagos residentes del hígado), las células endoteliales sinusoidales (SEC) y los linfocitos asociados al hígado denominados células Pit o glandulares (Si-Tayeb et al., 2010). Cada uno de estos tipos celulares lleva a cabo acciones específicas que en su conjunto regulan la función hepática (Tabla 1) (Trefts et al., 2017). Los hepatocitos son responsables de la mayor parte de las funciones del hígado, corresponden al ~70-80% de su masa celular (Si-Tayeb et al., 2010; Wang et al., 2017) y están organizadas en placas (Si-Tayeb et al., 2010). La superficie basolateral de los hepatocitos hace frente a las SEC que gracias a sus fenestraciones facilitan la transferencia de secreciones endócrinas de los hepatocitos hacia el torrente sanguíneo. Los hepatocitos tienen funciones específicas que dependen de su localización dentro del lóbulo (Figura 1). Por ejemplo, los hepatocitos ubicados en la zona periportal se encargan del metabolismo energético y de la producción de aminoácidos, oxidación de lípidos y gluconeogénesis. Por otro lado, la glucólisis y lipogénesis son llevadas a cabo por hepatocitos de la zona pericentral (Trefts et al., 2017).

En un organismo adulto sano, los hepatocitos se encuentran en estado quiescente (fase G0 del ciclo celular) y tienen una vida media de aproximadamente 200-300 días, pero se distinguen porque proliferan rápidamente en respuesta a un daño (Michalopoulos & DeFrances, 1997; Wang et al., 2017). Los colangiocitos son el segundo tipo celular más abundante en el tejido hepático y tienen una función

epitelial más tradicional con respecto a los hepatocitos ya que son las células que recubren el lumen de los conductos biliares (Si-Tayeb et al., 2010). Las células estrelladas se localizan en el espacio perisinusoidal (espacio de Disse), entre la superficie basolateral de los hepatocitos y la superficie luminal de las SEC. Poseen un fenotipo de miofibroblasto y almacenan gotas lipídicas (Si-Tayeb et al., 2010). Su importancia funcional está basada en la evidencia de la línea celular derivada de hígado fetal de ratón (Thy1<sup>+</sup>) que expresa marcadores característicos de células estrelladas como ( $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), desmina y vimentina), promoviendo la maduración de los progenitores hepáticos a través de interacciones célula-célula (Friedman, 2008). Ante un daño o lesión, las células estrelladas se activan, se transdiferencian a miofibroblastos, proliferan y liberan la vitamina A que es importante para el crecimiento, el mantenimiento de la respuesta inmune y la visión. Las células estrelladas participan en la acumulación de colágena en un hígado enfermo, proceso que determina la formación de cicatrices en el tejido hepático y puede conducir al desarrollo de cirrosis (Friedman, 1999). El arreglo complejo conformado por los hepatocitos, las células estrelladas y los capilares endoteliales es determinante de la función exócrina (secreción de la bilis) y endócrina (IGF-1) del hígado (Figura 2). Las células de Kupffer son los macrófagos residentes del hígado, se encargan del reconocimiento y destrucción de patógenos que ingresan al hígado a través de la circulación portal y pueden ejercer acciones pro- y antiinflamatorias dependiendo del microambiente hepático (Si-Tayeb et al., 2010). Finalmente, las SEC son células endoteliales especializadas del hígado con características únicas, sus fenestraciones abundantes forman poros en rangos de

50-280 nm que son fundamentales para el intercambio de componentes del plasma y las células del hígado (Trefts et al., 2017).

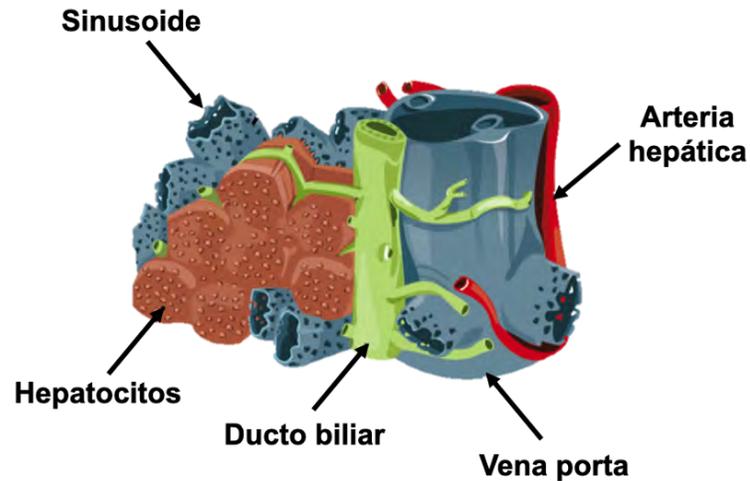
**Tabla 1. Principales tipos celulares hepáticos y sus funciones.** Obtenida y modificada de Tayeb *et al.*, 2010.

Tipo celular	Localización dentro del hígado	Función
Hepatocitos	Parénquima	~70-80% del total del tejido Secreción de proteínas y bilis Metabolismo de urea, colesterol, glucosa y glucógeno Detoxificación Fase de respuesta aguda
Células del ducto biliar (colangiocitos)	Epitelio del ducto biliar	~3% del total de células en el hígado Formar ductos biliares para transportar la bilis Controlar el flujo de la bilis y controlar su pH Secreción de agua y bicarbonato
Células endoteliales	Vasculatura	Formar venas, arterias, vénulas y arteriolas Controlar el flujo sanguíneo Contribuyen a la zonación hepática
Células endoteliales sinusoidales	Sinusoides	~2.5% de las células del lóbulo Facilitan la circulación sanguínea y permiten el intercambio de moléculas entre el suero y los hepatocitos Altamente especializadas Metabolizan desechos Secreción de citocinas Presentación de antígenos Coagulación sanguínea
Células Pit	Células tipo natural killer del hígado	Poco comunes Actividad citotóxica
Células de Kupffer	Sinusoides	~2% del tejido hepático Metabolizan desechos Secreción de citocinas y proteasas
Células hepáticas estelares (Ito)	Perisinusoides	Poco comunes Actividad citotóxica

## Metabolismo energético en el hígado

El hígado es un órgano metabólico clave para el metabolismo energético del cuerpo. Actúa como centro de distribución energética a través de su conexión con tejidos como el músculo esquelético y el tejido adiposo. Una vez que los alimentos son digeridos en el tracto gastrointestinal, la glucosa, los aminoácidos y los ácidos grasos son transportados al hígado a través de la vena porta, donde la glucosa es transformada a glucógeno, ácidos grasos y/o aminoácidos. En los hepatocitos, los ácidos grasos son esterificados para la formación de triacilglicéridos (TAG). Los

TAG puede almacenarse en gotas lipídicas en los hepatocitos o ser secretados a la circulación como lipoproteínas de baja densidad (Rui, 2014). Los aminoácidos son metabolizados para proveer energía o utilizados como sustratos para sintetizar proteínas, glucosa, y/o otras moléculas con actividad biológica. En el estado de ayuno o durante el ejercicio, la glucosa y TAG son liberados por el hígado a la circulación para proveer energía al ser metabolizados en el músculo, tejido adiposo y otros tejidos extra-hepáticos (Rui, 2014). El tejido adiposo produce y libera ácidos grasos no esterificados y glicerol vía la lipólisis. El glucógeno se rompe en el músculo y se liberan proteínas, lactato y alanina. Estos tres elementos son llevados al hígado y utilizados como precursores para sintetizar glucosa vía gluconeogénesis. Los ácidos grasos no esterificados se oxidan en las mitocondrias hepáticas por medio de la  $\beta$ -oxidación y se generan cuerpos cetónicos (cetogénesis). Los cuerpos cetónicos generados en el hígado proveen energía disponible para diferentes tejidos extra-hepáticos (Rui, 2014).



**Figura 2. Relación entre los compartimentos hepáticos.** Se indica la presencia del sinusoide, los hepatocitos, y la triada portal (arteria hepática, vena porta y ducto biliar). Obtenida y modificada de Tayeb *et al.*, 2010.

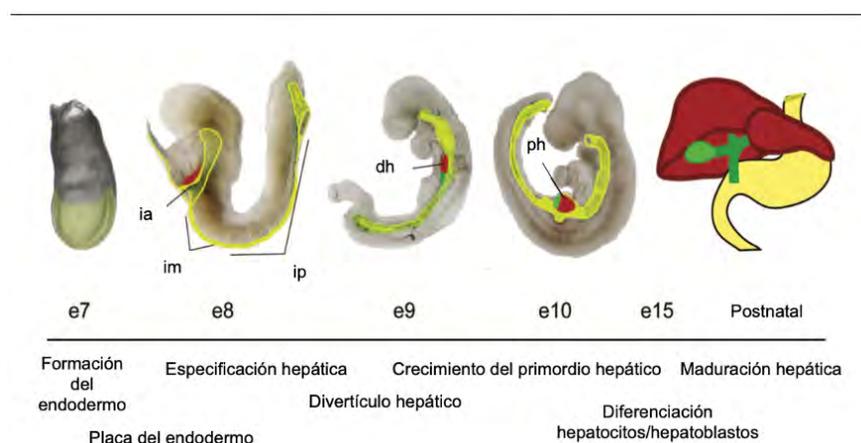
## Desarrollo pre- y postnatal del hígado

Durante la gestación, el feto depende de la función metabólica hepática de la madre hasta que desarrolla la autosuficiencia. En el ser humano, el desarrollo del hígado comienza durante la cuarta semana de gestación con la formación de un brote que se origina a partir del endodermo ventral del intestino y que se conoce como divertículo hepático. A partir de la porción craneal de este divertículo se desarrollan el hígado y el árbol biliar intra-hepático, mientras que la porción caudal da origen a la vesícula biliar y al árbol biliar extra-hepático (Grijalva & Vakili, 2013; Nakagaki *et al.*, 2018; Si-Tayeb *et al.*, 2010). Las células primordiales de este brote son conocidas como hepatoblastos y se han descrito como bipotenciales, lo que significa que estas células pueden dar origen a hepatocitos o a células epiteliales biliares (colangiocitos) (Grijalva & Vakili, 2013; Si-Tayeb *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017;

Zorn, 2008). Por su parte, en el roedor la formación del hígado comienza en el día 8.5 de la gestación y, al igual que en el ser humano, se origina a partir del endodermo ventral del intestino (Grijalva & Vakili, 2013; Nakagaki et al., 2018). Para el día 9.5 de la gestación, los hepatoblastos se despegan del epitelio e invaden el mesénquima del *septum transversum* (STM) adyacente para formar el primordio hepático. El STM aporta fibroblastos y células estrelladas al hígado (Si-Tayeb et al., 2010; Zorn, 2008). Entre los días 10 y 15 de la gestación, el primordio hepático experimenta un período de crecimiento acelerado al ser vascularizado y colonizado por células hematopoyéticas. A partir del día 15 de gestación, los hepatoblastos comienzan a diferenciarse en hepatocitos y colangiocitos. El crecimiento y maduración final del hígado ocurre durante el período postnatal temprano (Figura 3) (Grijalva & Vakili, 2013; Septer et al., 2012; Zorn, 2008).

Al nacimiento, el hígado continúa siendo estructural y funcionalmente inmaduro (Septer et al., 2012) y experimenta una serie de cambios en su capacidad funcional durante el desarrollo postnatal temprano (Grijalva & Vakili, 2013; Morton & Brodsky, 2016; Nakagaki et al., 2018; Septer et al., 2012). Este proceso de maduración se lleva a cabo en los primeros 30 días de vida del ratón y en los primeros cinco años de vida en el humano, cuando el hígado alcanza la expresión génica de un hígado adulto, y expresa enzimas relacionadas con procesos metabólicos mayores (Septer et al., 2012). La transición de la vida intrauterina al exterior requiere cambios rápidos, complejos y perfectamente orquestados para asegurar la supervivencia del neonato (Morton & Brodsky, 2016). En los primeros días de vida postnatal, el hígado de la rata crece a una tasa menor que el resto de los órganos del cuerpo. Esta fase

de retraso en el crecimiento se prolonga por aproximadamente 10 días y se nivela hasta los días 20 a 30 del desarrollo postnatal (Oliver et al., 1962). Así, el cociente entre el peso del hígado y el peso corporal menor de las dos primeras semanas de vida se incrementa, a expensas de un aumento masivo en la proliferación celular del hígado (Septer et al., 2012), de manera que a las cuatro semanas post-nacimiento alcanza la constante de 5% que se mantendrá a lo largo de la vida adulta. Esta constante se modifica temporalmente a expensas del crecimiento hepático asociado a eventos reproductivos de las hembras.



**Fig. 3. Línea temporal del desarrollo del hígado en el ratón.** El esquema muestra embriones de ratón en diferentes etapas del desarrollo señalando el endodermo (amarillo), el hígado (rojo) y la vesícula biliar (verde). La capa del endodermo se forma durante la gastrulación (días 6.5-7.5 de gestación). A lo largo de la gastrulación y del desarrollo temprano de somitas (días 7.5-8.5 gestación), el endodermo se muestra a lo largo del eje anterior-posterior en los dominios progenitores del intestino anterior (ia), intestino medio (im) y del intestino posterior (ip). A lo largo del desarrollo embrionario, el endodermo forma un tubo intestinal y el hígado se mueve hacia el intestino medio. El divertículo hepático (dh) formado para el día 9 de gestación se expande hasta convertirse en el primordio hepático (pr) para el día 10 de gestación. El hígado continúa su crecimiento y para el día 15 de la gestación se inicia la diferenciación de hepatoblastos que darán origen tanto a hepatocitos como a colangiocitos. La maduración del hígado finaliza durante el periodo postnatal temprano. Obtenida y modificada de Zorn *et al.*, 2008.

## **Crecimiento del hígado durante el embarazo y la lactancia**

La demanda metabólica impuesta por el embarazo requiere de adaptaciones fisiológicas en la función de algunos de los órganos maternos como el páncreas, el cerebro, el sistema cardiovascular y el hígado (Bustamante et al., 2010; Dai et al., 2011). Se ha mostrado que el hígado de la madre responde al embarazo incrementando significativamente su tamaño y que este crecimiento es debido a la inducción de la proliferación de los hepatocitos y a cambios en la expresión génica de enzimas, receptores nucleares y factores de transcripción (Bustamante et al., 2010). Por ejemplo, la fosforilación/activación de STAT3 aumenta en el embarazo y contribuye a la proliferación de los hepatocitos (Dai et al., 2011). El crecimiento del hígado durante el embarazo ocurre en momentos específicos. Dai y colaboradores reportaron que en ratonas de la cepa CD-1 tiene lugar un incremento significativo en el peso del hígado (pH) debido al aumento de la proliferación de los hepatocitos en los días 8, 13 y 15 de la gestación que se sostiene hasta el final del embarazo y que se traduce en un aumento en el pH/peso corporal (pC) de la madre (Dai et al., 2011).

Durante la lactancia el hígado crece, por sobre su tamaño alcanzado durante el embarazo, en respuesta al incremento en la demanda metabólica impuesta por la producción de la leche (Kennedy et al., 1958) y existen reportes que muestran que dicho crecimiento hepático se debe a un aumento en el tamaño de los hepatocitos mas que en el número de los mismos (Hollister et al., 1986). La hipertrofia de los hepatocitos se revierte al término de la lactancia con la consecuente reducción de la masa hepática (Hollister et al., 1986).

## Regeneración hepática

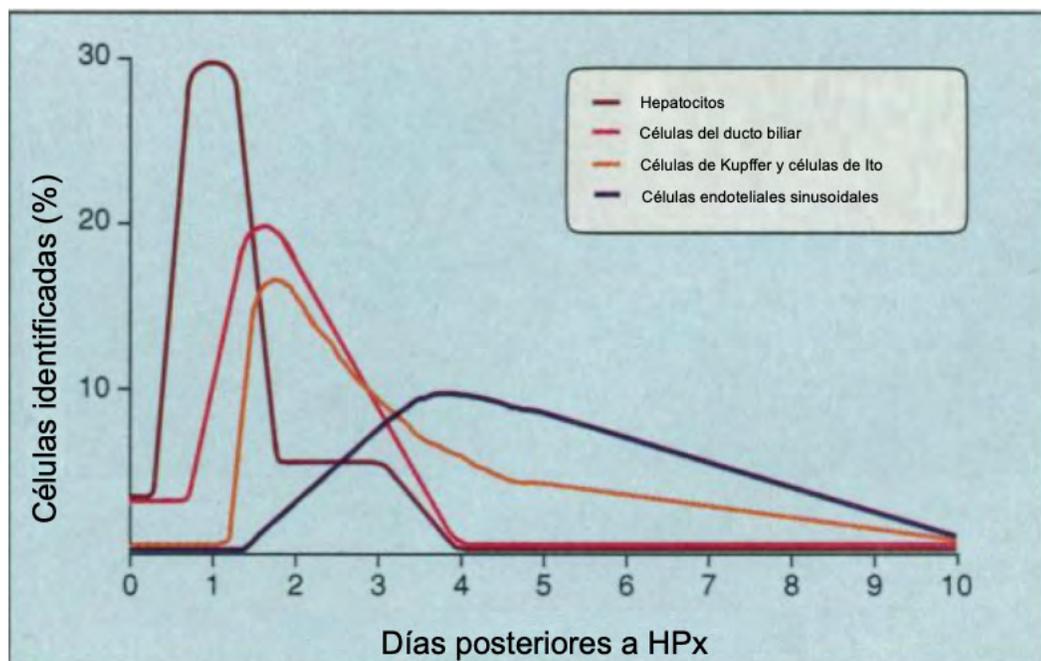
La regeneración hepática es un proceso que se desencadena por una pérdida aguda de tejido hepático que concluye en la recuperación de la masa original. En los roedores, la restauración total de la masa hepática debida a eliminación quirúrgica de dos terceras partes del hígado (hepatectomía parcial, HPx) se recupera aproximadamente en una semana (Michalopoulos & DeFrances, 1997; Michalopoulos & Khan, 2015). La capacidad regenerativa del hígado se demostró en el trabajo pionero de Higgins & Anderson en 1931 quienes realizaron la HPx en roedores por primera vez (Higgins & Anderson, 1931). Se ha debatido sobre el uso correcto del término “regeneración” ya que a diferencia del proceso regenerativo que ocurre en los anfibios, en el modelo de la HPx los lóbulos removidos no vuelven a crecer, sino que el tejido se restablece a través de una respuesta hiperplásica generalizada donde se replican todas las células maduras funcionales del hígado remanente (Si-Tayeb et al., 2010).

La división celular de los hepatocitos ocurre de manera esporádica en el hígado adulto, ya que estas células permanecen quiescentes (Wang et al., 2017). Sin embargo, posterior a la remoción masiva de la masa hepática, aproximadamente el 95% de los hepatocitos ingresan rápidamente al ciclo celular. En la rata, la tasa de síntesis de DNA en los hepatocitos se incrementa a las 12 h post-hepatectomía parcial y presenta un pico a las 24 h. Sin embargo, la síntesis de DNA ocurre mas tardíamente en las células no parenquimales (~48 h para células de Kupffer, colangiocitos y células estrelladas y ~96 h para células endoteliales) (Figura 4), (Michalopoulos & DeFrances, 1997; Taub, 2004). El proceso regenerativo se inicia

con una serie de cambios hemodinámicos en los cuales se triplica el flujo sanguíneo portal que recibe el hígado por unidad de tejido. Esto desencadena una serie de eventos tempranos donde se promueve la inducción génica masiva (~100 genes) que incluye la expresión de factores de transcripción (c-Jun- c-Fos, c-Myc, NF- $\kappa$ B, STAT3 y C/EBP $\beta$ ) que median la transición a la fase G1 del ciclo celular por acción de factores de crecimiento y citocinas (Fausto et al., 1995; Olazabal et al., 2009). Si bien, la proliferación de los hepatocitos es máxima 24 h posteriores a la HPx, el incremento significativo en la masa hepática no se manifiesta sino hasta varios días después (Dai et al., 2011). Los principales promotores de la regeneración hepática incluyen al factor de crecimiento hepático (HGF), la interleucina 6, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), y el factor de crecimiento derivado de fibroblastos 1 y 2 (FGF-1 y 2). Estos factores actúan directamente sobre los distintos tipos celulares del hígado estimulando su proliferación y promoviendo la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) responsable de la angiogénesis necesaria para sostener la expansión del tejido hepático (Friedman, 2008).

Se ha propuesto que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), que es un inhibidor de la proliferación de los hepatocitos, participa en la terminación del proceso regenerativo (Michalopoulos & Khan, 2015). Estudios con resecciones hepáticas en mamíferos superiores como perros o primates, establecieron que la respuesta regenerativa es proporcional a la cantidad de tejido hepático removida y que incluso resecciones de <10% son acompañadas del proceso regenerativo para restaurar la masa hepática a su tamaño original. Además, se observó que cuando se trasplantó hígado en perros donde el receptor posee un tamaño corporal menor

al donante, el órgano se adaptó al nuevo organismo receptor (Michalopoulos & DeFrances, 1997). Cabe señalar que la capacidad regenerativa hepática tiende a disminuir a medida que transcurre la edad de los animales (Wang et al., 2017).



**Fig. 4. Cinética de proliferación celular post-hepatectomía parcial (HPx).** Las células que conforman el hígado presentan diferencias en los tiempos de su proliferación posterior a la HPx. La síntesis de DNA por parte de los hepatocitos presenta un pico a las 24 horas post-HPx, mientras que los otros tipos celulares lo hacen después. Se ha propuesto que la replicación de los hepatocitos produce factores de crecimiento que funcionan como mitógenos para los otros tipos celulares. Esto sugiere que los hepatocitos actúan a través de un mecanismo parácrino para estimular la proliferación de dichas células y completar el proceso regenerativo post HPx. Obtenida y modificada de Michalopoulos et al., 1997.

## Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona protéica de 23 kDa formada por 199 aminoácidos (Ben-Jonathan et al., 2008). La PRL fue originalmente identificada por su habilidad para estimular el desarrollo mamario y la producción de leche en los

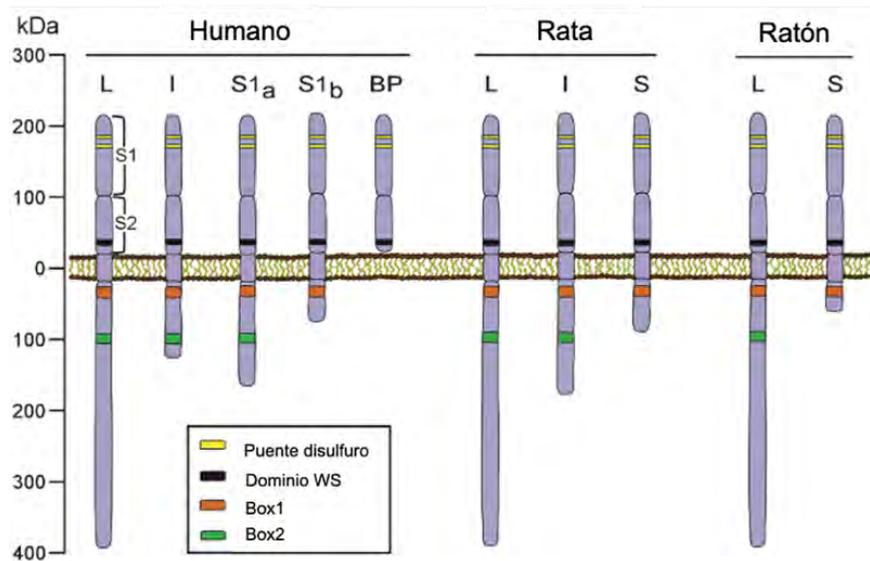
mamíferos (Bole-Feysot et al., 1998). Si bien, la principal isoforma molecular de la PRL es la de 23 kDa, se han descrito variantes moleculares en diferentes mamíferos, incluyendo los humanos, que resultan del corte y empalme del transcrito primario y de modificaciones post-traduccionales como el procesamiento proteolítico de la cadena de aminoácidos (Freeman et al., 2000). La PRL es sintetizada y secretada por los lactotopos, células especializadas de la hipófisis anterior y por diversos órganos extra-hipofisarios que incluyen: al cerebro, la decidua uterina, la glándula lagrimal, el timo, el bazo y la glándula mamaria entre otras (Ben-Jonathan et al., 1996). La PRL está presente en el suero y otros fluidos corporales tales como el líquido amniótico, la leche, las lágrimas, etc. Consistentemente, las ratas hipofisectomizadas mantienen aproximadamente un ~20% de la PRL en la circulación que, con el paso del tiempo, llega incluso hasta ~50% (Bole-Feysot et al., 1998). Las principales funciones que se han descrito para la PRL están asociadas con la reproducción, el crecimiento, el metabolismo, la osmo-regulación, la regulación de la respuesta inmune, las funciones cerebrales, el comportamiento (Ben-Jonathan et al., 2008; Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000) y la angiogénesis (Clapp et al., 2009). Los estímulos fisiológicos más importantes que promueven la secreción hipofisaria de PRL son: la succión de las crías durante la lactancia, el estrés y el incremento de esteroides ováricos, principalmente estrógenos (Freeman et al., 2000). Los reguladores de la secreción de PRL pueden clasificarse en cuatro categorías: endocrinos, parácrinos, yuxtacrinos y autócrinos (Ben-Jonathan et al., 2008). Estos estímulos actúan al interferir con la inhibición de la secreción de PRL que ejerce la dopamina hipotalámica a través de sus receptores D2 presentes en la membrana de los

lactotropos (Ben-Jonathan et al., 2008; Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000). De hecho, se conoce que la PRL ejerce una retroalimentación negativa de su propia secreción al estimular la secreción hipotalámica de la dopamina (Ben-Jonathan et al., 2008).

## **Receptor de PRL**

El receptor de la PRL (RPRL) es una proteína con un solo dominio intramembranal que carece de actividad enzimática propia y forma parte de la superfamilia de receptores a citocinas tipo 1 de la que también es parte el receptor de la hormona de crecimiento (Ben-Jonathan et al., 2008; Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000). El RPRL se expresa ubicuamente en una gran diversidad de tejidos (Ben-Jonathan et al., 2008). Existen tres isoformas del RPRL que resultan del corte y empalme del transcrito primario que difieren en la longitud de su dominio citoplásmico y se clasifican como corta, intermedia y larga (Freeman et al., 2000). En la rata, 291, 393 y 591 aminoácidos definen las isoformas corta, intermedia y larga, respectivamente. En el ratón se han identificado una isoforma larga y tres cortas, las isoformas cortas difieren en pocos aminoácidos localizados en la región C-terminal de su extremo citoplásmico, (Bole-Feysot et al., 1998) (Figura 5). La activación del RPRL activa distintas vías de señalización que incluyen: la tirosina cinasa “Janus” (JAK)/transductor de señales y activador de la transcripción (STAT), MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno) y PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa). La activación de estas cascadas deriva en procesos de proliferación, supervivencia y diferenciación (Ben-Jonathan et al., 2008; Freeman et al., 2000).

El gen que codifica para el RPRL se encuentra en el cromosoma 5 en el humano y en el cromosoma 2 en la rata, y el tejido en el cual se expresa en mayor abundancia es el hígado (Nagano & Kelly, 1994). Tiene 100 kb de longitud, 11 exones y 3 regiones promotoras: PI (específico de las gónadas), PII (específico del hígado) y PIII (ubicuo). A pesar de la alta expresión hepática del RPRL, es poco lo que se sabe de la región PII excepto que es activada por factor nuclear de hepatocitos 4 (HNF4) (Ben-Jonathan et al., 2008).



**Fig. 5. Representación esquemática de las isoformas del receptor de la PRL (RPRL) en el humano, la rata y el ratón.** La estructura del RPRL consta de un dominio extracelular y un dominio transmembranar que son similares entre especies, así como un dominio citoplásmico que difiere en la composición de aminoácidos y en longitud. Las isoformas del RPRL se generan por corte y empalme del transcrito primario y guardan ciertas similitudes estructurales en común entre especie como la presencia de un puente disulfuro, un dominio WS (triptófano, serina), así como los motivos denominados Box1 y Box2 (ausente en las isoformas cortas). Se representa también una isoforma expresada únicamente en humanos que está formada solamente por el dominio extracelular y que funciona como una proteína de unión a la PRL. Obtenida y modificada de Ben-Jonathan et al., 2008.

## **PRL e hígado**

El hígado es el tejido con el mayor contenido de receptores a PRL (Nagano & Kelly, 1994) y la PRL es capaz de inducir la expresión de la isoforma larga de su receptor, que es la responsable de mediar sus acciones (Olazabal et al., 2009). La PRL puede participar en la promoción del crecimiento fisiológico del hígado. La HPx eleva los niveles de PRL sérica a partir de los primeros 5 min y durante los 15 min posteriores a la cirugía y, se ha propuesto a la PRL como un mediador temprano de la respuesta regenerativa del hígado posterior a la HPx (Buckley et al., 1991). Además, el embarazo y la lactancia son condiciones de hiperprolactinemia que se asocian con el crecimiento fisiológico del hígado (Moreno-Carranza et al., 2013). Se ha observado que la expresión del RPRL tiene una regulación tejido-específica durante el embarazo y la lactancia, cuando la expresión hepática del RPRL se incrementa considerablemente (Moldrup et al., 1993). Mas aún, se conoce que la PRL es un agente mitogénico y promotor de tumores en el hígado de la rata adulta (Buckley et al., 1985). La PRL estimula la hepatomegalia (Buckley et al., 1991) y la síntesis de DNA al estimular la expresión de factores de transcripción como (c-fos, c-jun, c-src y c-myc) en hepatocitos en cultivo (Berlanga et al., 1995).

En roedores, el crecimiento del hígado relativo al resto del cuerpo disminuye durante las primeras dos semanas de vida postnatal concomitante con la ausencia de PRL en la circulación (Oliver et al., 1980) debido a la reducida producción de esta hormona por la hipófisis anterior (Hoeffler et al., 1985). En las semanas subsecuentes, se acelera el crecimiento proporcional del hígado en asociación con la detección de la PRL circulante, a consecuencia de mayor actividad de la hipófisis

para secretar a la PRL (Oliver et al., 1980; Shah et al., 1988). Dado el efecto mitogénico de la PRL sobre el hígado, la correlación entre los valores bajos y altos de PRL con la disminución y aumento en el pH/pC, respectivamente, sugiere que esta hormona participa en la regulación del crecimiento del hígado durante el desarrollo postnatal.

## **Justificación**

El hígado es un órgano blanco de las acciones mitogénicas de la PRL. La PRL estimula el crecimiento del hígado en animales adultos sanos (Moreno-Carranza et al., 2013) y acelera su respuesta regenerativa posterior a la HPx (Buckley et al., 1991; Olazabal et al., 2009). El hígado aumenta de tamaño en las hembras durante el embarazo y la lactancia (Dai et al., 2011), etapas caracterizadas por hiperprolactinemia (Ben-Jonathan et al., 2008; Oliver et al., 1980; Shah et al., 1988). Finalmente, durante el desarrollo postnatal temprano hay cambios en el crecimiento hepático que podrían estar relacionados con los altos valores circulantes de la hormona que se presentan en humanos recién nacidos (Guyda & Friesen, 1973) y en roedores, alrededor de la cuarta semana del desarrollo postnatal (Oliver et al., 1980; Shah et al., 1988). Sin embargo, aún se desconoce si la PRL es capaz de regular el crecimiento fisiológico del hígado. En este estudio, investigamos esta posibilidad utilizando como modelo el crecimiento postnatal temprano del hígado en el ratón nulo para el receptor de la PRL.

## **Hipótesis**

La PRL es un regulador fisiológico del crecimiento del hígado durante el desarrollo postnatal temprano del ratón.

## Objetivos

1. Evaluar los valores circulantes de PRL y la expresión hepática de su receptor durante el desarrollo postnatal.
2. Analizar el crecimiento postnatal del hígado en ratones nulos y silvestres para el receptor de la PRL.
3. Evaluar la proliferación de los hepatocitos y la angiogénesis del hígado durante el desarrollo postnatal en ratones nulos y silvestres para el receptor de la PRL.

## **Materiales y Métodos**

### ***Análisis del crecimiento hepático postnatal.***

Ratonas nulíparas gestantes de la cepa C57BL/6 heterocigotas para una mutación de pérdida de función en el receptor de PRL (*Prlr +/-*) y silvestres se evaluaron diariamente a partir del día 15 de embarazo para identificar el día del parto (día 0 del nacimiento). Los animales contaron con acceso a agua y alimento *ad libitum* y se mantuvieron bajo condiciones de 12 h de luz /12 h de oscuridad. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Las crías se sacrificaron a distintos tiempos después del nacimiento (1, 2, 4, 6, 8 y 10 semanas). Se determinó su peso corporal, el peso del hígado, su genotipificación y se obtuvo el suero. El peso del hígado corregido por el peso corporal (PH/PC) se calculó tomando el peso del órgano y dividiéndolo por el peso corporal al momento del sacrificio.

### ***Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).***

El RNA se aisló por extracción fenólica (Chomczynski & Sacchi, 1987) y se retrotranscribió a cDNA con el *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los productos de PCR se detectaron y se cuantificaron con el *kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) en una reacción final de 10  $\mu$ l conteniendo templado y 0.5  $\mu$ M de cada par de oligonucleótidos para diferentes genes. La amplificación se hizo en un termociclador (CFX96 real time PCR detection system; Bio-Rad, Richmond, CA) con el siguiente protocolo: 1 ciclo de 10 min de desnaturalización a 95°C y 35 ciclos de amplificación (10 seg a 95°C, 30 seg a la temperatura específica para cada par de oligonucleótidos y 30 seg a 72°C). La expresión relativa del mRNA se calculó con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  normalizada a los genes constitutivos, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) y ciclofilina A (*CypA*). Los oligos utilizados para la amplificación del mRNA de diferentes genes se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos. Secuencias utilizadas para la cuantificación de la expresión de diversos genes.

Gene	Secuencia 5'-3' (Fw)	Secuencia 5'-3' (Rv)
<i>Prlr</i>	5'-ACACGCGCAGATCTCCTTACCA-3'	5'-CCCCTTGCACAGCCACTT-3'
<i>Prl</i>	5'-AACCTGATCCTCAGTTTGGTG-3'	5'-CCTCAATCTCTTTGGCTCTTG
<i>Ccnd1</i>	5'ACTGGTCCCCTGAGGTCTGAGT-3'	5'-ACATGATCCTCCAAACCTCTTCTC-3'
<i>Vegf</i>	5'-CGCGAGTCTGTGTTTTTGA-3'	5'-CAGAGCGGAAAGCATTGT-3'
<i>Pecam1</i>	5'-AGCAGGACAGGTCCAACAAC-3'	5'-CAAGCAAAGCAGTGAAGCTG-3'
<i>Ghr</i>	5'-CCAACTCGCCTCTACACC-3'	5'-GGGAAAGGACTACACCACCTG-3'
<i>Igf-1</i>	5'-CTGAGCTGGTGGATGCTCTT-3'	5'-CACTCATCCACAATGCCTGT-3'
<i>Socs3</i>	5'-CCCGCGGGCACCTTTCTTAT-3'	5'-CACTGGATGCGTAGGTTCTTGGTC-3'
<i>Socs2</i>	5'-TGTGAGTCCCAACCTAGTGC-3'	5'-GTAGAAGGGAGGCAGCTGTT-3'
<i>CypA</i>	5'-GGCGGCAGGTCCATCTACG-3'	5'-CTTGCCATCCAGCCATTGAGTC-3'
<i>Gadph</i>	5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3'	5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3'

### ***Ensayo inmunoenzimático (ELISA).***

La concentración de PRL en el suero de los animales se determinó según el método descrito por (Guillou et al., 2015). Brevemente, el suero se incubó con el anticuerpo policlonal de captura (anti-PRL de rata AFP65191/Guinea Pig, Institutos Nacionales de Salud, EUA) a una dilución 1:1000 y su unión al antígeno (PRL) se reveló con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa y o-feniledeniamina, que actúa como sustrato de la peroxidasa y permite detectar el complejo antígeno/anticuerpo mediante una reacción colorimétrica. El límite de detección fue 0.2 ng/ml.

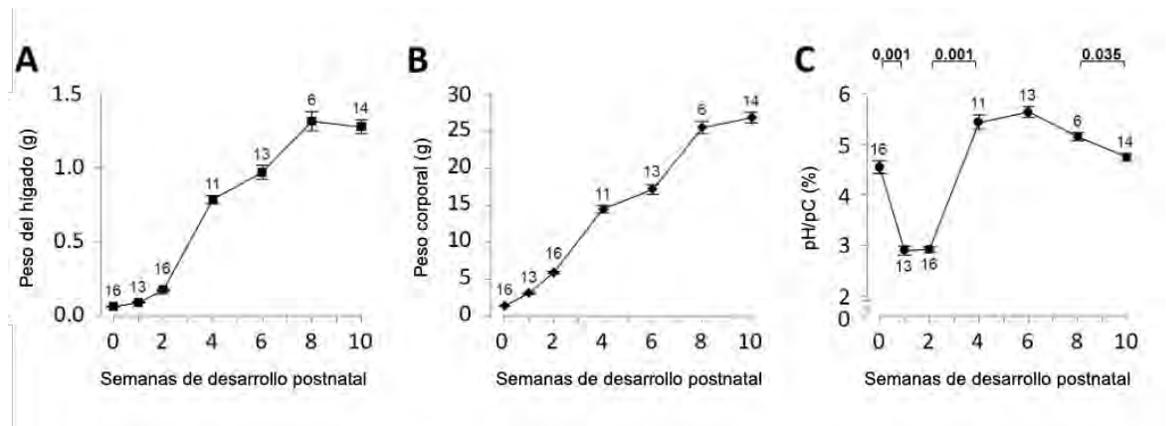
### ***Estadística.***

El análisis se hizo por ANOVA de 1 vía seguida de la prueba *post-hoc* de Tukey y el programa Sigma Stat 7.0 considerándose una diferencia estadísticamente significativa para valores de  $p < 0.05$  (Systat Software, San Jose, CA).

## Resultados

### Crecimiento hepático y corporal durante el desarrollo postnatal.

Tanto el peso del hígado como el peso corporal se incrementaron gradualmente después del nacimiento y se estabilizaron hasta la semana 8 postnatal (Figura 6, A). De acuerdo a lo reportado previamente (Septer et al., 2012), el peso del hígado aumentó más lento que el peso del cuerpo durante las primeras dos semanas de vida postnatal y esta relación se invirtió a favor de un mayor aumento del peso corporal a las 4 semanas post-nacimiento (Figura 6, A y B). Estas diferencias se ilustran mediante las variaciones en la proporción pH/pC (Figura 6, C). Así, en el ratón silvestre la proporción pH/pC disminuyó a través de las primeras dos semanas de vida postnatal y se elevó a la cuarta semana hasta valores que se mantienen en la vida adulta (Figura 6, C)



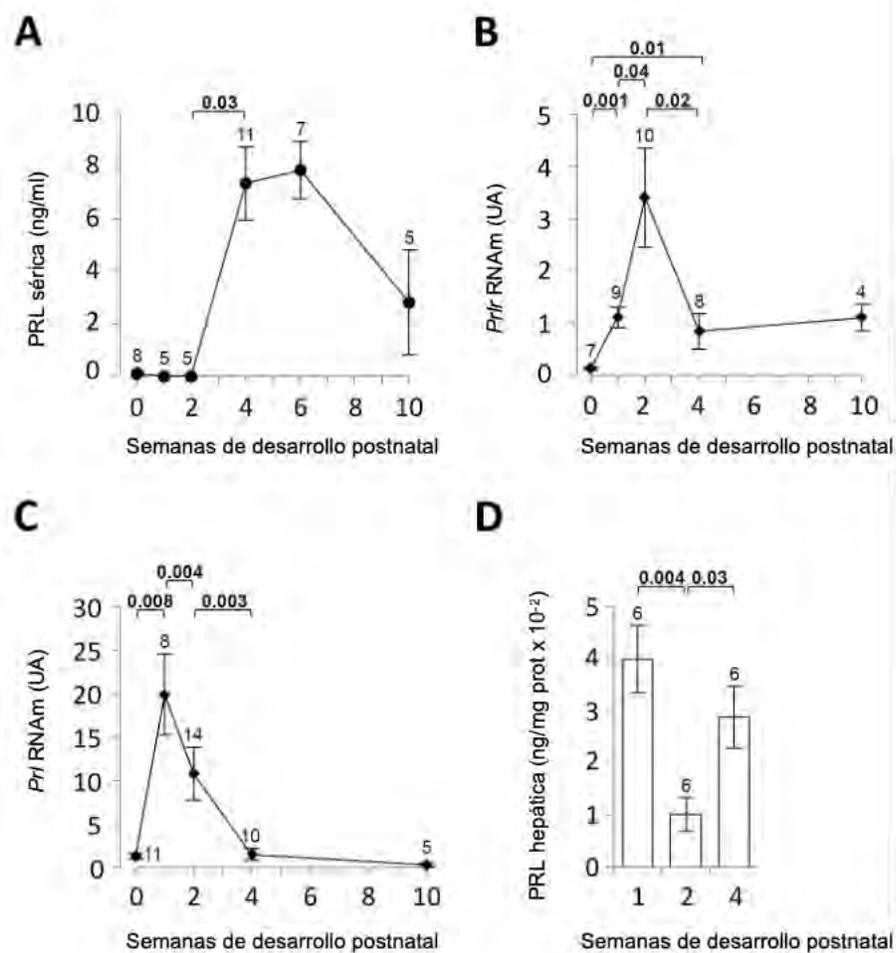
**FIGURA 6. Crecimiento hepático y corporal durante el desarrollo postnatal del ratón.** Peso del hígado (A), peso corporal (B) y cociente del peso del hígado corregido por el peso corporal (pH/pC) (C) al nacimiento (Semana 0) y las semanas postnatales 1 a la 10. Los valores corresponden a los promedios  $\pm$  SEM. El número de animales (n) se indica en las gráficas para cada tiempo. Se muestra el valor de  $p$  sólo cuando las diferencias son estadísticamente significativas.

## **Valores circulantes de PRL y de su receptor en el hígado durante el desarrollo postnatal.**

Se sabe que el hígado adulto expresa el receptor de PRL (Nagano & Kelly, 1994) y que la PRL estimula el crecimiento del hígado adulto y su regeneración posterior a una HPx (Buckley et al., 1985; Moreno-Carranza et al., 2013; Olazabal et al., 2009). Para dilucidar la posible influencia de la PRL sobre el crecimiento del hígado durante el desarrollo postnatal, determinamos mediante ELISA los valores séricos de PRL en ratones durante las primeras 10 semanas después del nacimiento. Corroboramos la ausencia y presencia de PRL en el suero durante las dos primeras semanas y la cuarta semana de vida postnatal, respectivamente (Shah et al., 1988) (Figura 7A). Por lo tanto, valores no detectables y altos de PRL circulante se asocian con la disminución y elevación del pH/pC que tienen lugar, respectivamente, antes y después de las 2 semanas de vida postnatal.

La isoforma larga del RPRL (RPRL<sub>L</sub>) es la isoforma responsable de mediar la mayoría de los efectos hormonales (Ben-Jonathan et al., 2008). Por lo tanto, evaluamos la expresión del RPRL<sub>L</sub> en el hígado durante el desarrollo postnatal temprano del ratón. El análisis por qRT-PCR mostró que, en el hígado, el RNA mensajero del RPRL<sub>L</sub> es apenas detectable al nacimiento, aumenta y alcanza un pico de expresión a la segunda semana y disminuye a la cuarta semana a un valor comparable a la vida adulta (Figura 7B). El que la expresión del RPRL en el hígado sea máxima a las dos semanas de vida postnatal, cuando no se detecta a la PRL en la circulación, nos llevó a investigar cuál pudiera ser el origen de la PRL que activa su receptor hepático en este tiempo. Conociendo que la PRL también se

produce en tejidos extrahipofisarios (~~Ben-Jonathan et al., 1996~~), nos planteamos la posibilidad de que el hígado pudiera estar produciendo PRL durante las primeras dos semanas de vida postnatal. El análisis por qRT-PCR mostró que la expresión del mRNA de la PRL en el hígado es casi indetectable al nacimiento y se eleva 20- y 10-veces durante la primera y segunda semanas de vida postnatal, respectivamente (Figura 7C). En apoyo a que el mRNA de la PRL se traduce a proteína, encontramos la presencia de PRL en el hígado en un patrón similar al de su transcrito, en tanto que la proteína está elevada en la primera semana y disminuida a la semana 2 después del nacimiento (Figura 7D). Sin embargo, a la cuarta semana del desarrollo postnatal, cuando los valores de expresión del mRNA de PRL en el hígado son mínimos, tiene lugar una concentración de PRL hepática comparable a la presente en la segunda semana del desarrollo postnatal. Dado que la PRL está presente en la circulación a la cuarta semana de vida postnatal, es posible que la PRL detectada en hígado provenga de la PRL circulante. A este respecto, se conoce que la PRL circulante se incorpora y concentra en sus órganos blanco, como el cerebro (Brown et al., 2016) y la glándula mamaria (Seddiki et al., 2002). Estos hallazgos muestran que el hígado está bajo la influencia de la PRL a lo largo del desarrollo postnatal.



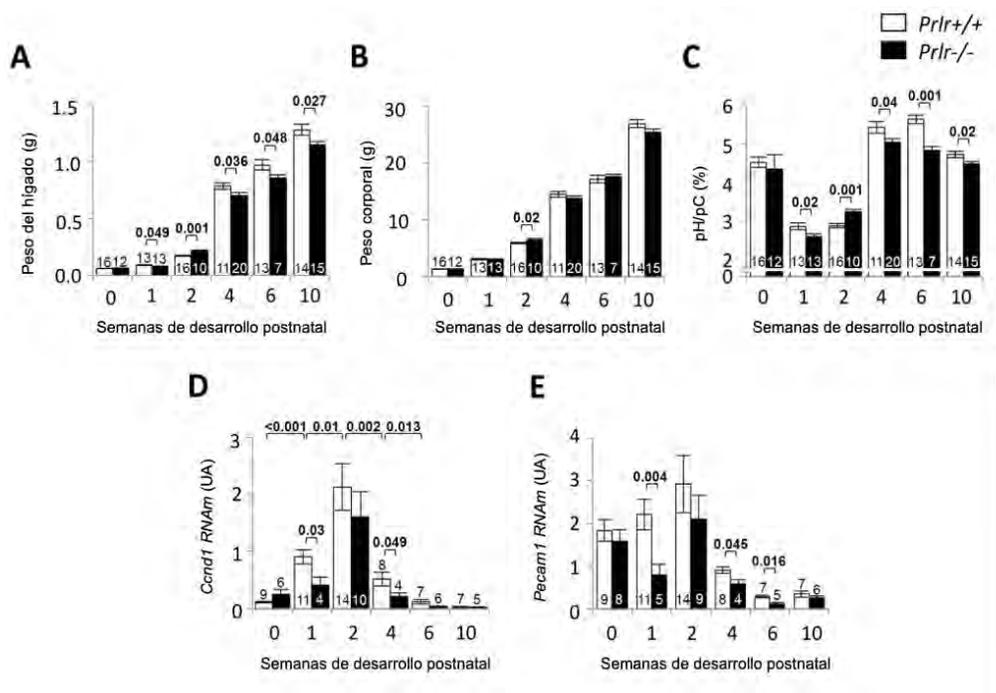
**Figura 7. El hígado está bajo la influencia de la PRL a lo largo del desarrollo postnatal.** Niveles séricos de PRL (A), expresión hepática del RNA mensajero (RNAm) del receptor de la PRL (B) y expresión del RNA mensajero de PRL (C) y de la PRL (D) en el hígado de ratones silvestres sacrificados al nacimiento (semana 0) y de las semanas postnatales 1 a la 10. La PRL en suero e hígado se evaluó mediante ELISA y la expresión del RNA mensajero se determinaron por qRT-PCR utilizando *Gapdh* y *CypA* como genes constitutivos y los valores se expresan como unidades arbitrarias (UA). Los valores corresponden a los promedios  $\pm$  SEM. El número de animales (n) se indica en las gráficas para cada tiempo. Se muestra el valor de *p* sólo cuando las diferencias son estadísticamente significativas.

## **La falta del receptor de la PRL modifica el crecimiento postnatal del hígado.**

Para determinar si la PRL puede tener un efecto sobre el crecimiento del hígado durante el desarrollo postnatal, evaluamos el pH, el pC y la relación pH/pC en ratones nulos para el receptor de PRL (*Prlr*  $-/-$ ) y los comparamos con los valores respectivos de ratones silvestres (*Prlr*  $+/+$ ). No encontramos diferencias al momento del nacimiento, lo que implica que la PRL no afecta el crecimiento del hígado y del cuerpo durante el desarrollo prenatal (Figura 8 A-C). Sin embargo, en los ratones *Prlr*  $-/-$  el peso del hígado fue menor, el peso corporal no cambió y, por ende, el pH/pC fue menor en los ratones *Prlr*  $-/-$  a las semanas 1, 4, 6 y 10 del desarrollo postnatal. En contraposición, el pH, el pC y el pH/pC de los ratones *Prlr*  $-/-$  fueron mayores en la segunda semana del desarrollo postnatal (Figura 8 A, C). Estos resultados muestran que la PRL puede tanto estimular como inhibir el crecimiento del hígado. Desde hace más de 30 años se ha reportado que la PRL es un mitógeno para el hígado, al observarse que el tratamiento con PRL incrementa la síntesis hepática de DNA y el pH/pC (Buckley et al., 1985). Desde entonces, varios reportes han confirmado estos hallazgos (Ben-Jonathan et al., 1996; Buckley et al., 1991; Moreno-Carranza et al., 2013; Olazabal et al., 2000; Olazabal et al., 2009; Zabala & Garcia-Ruiz, 1989), pero el papel de la PRL durante el crecimiento fisiológico del hígado permanece poco claro y no se han reportado acciones negativas de esta hormona sobre el crecimiento del hígado.

La reducción del peso del hígado en ausencia del receptor de la PRL se asoció con una menor proliferación celular y angiogénesis hepáticas, como lo sugieren las

variaciones en la expresión de genes que codifican para ciclina D1 (*Ccnd1*), determinante de la progresión del ciclo celular, y para PECAM (*Pecam1*), o molécula de adhesión de plaquetas a endotelio, que se utiliza como marcador específico de células endoteliales (Figura 8 D, E). La expresión de ambos genes está regulada a la baja en las semanas 1 y 4 del desarrollo postnatal, pero permanece sin cambio en la semana 2 del desarrollo postnatal. Con este resultado se apoya la observación de que la PRL estimula el crecimiento del hígado durante la mayor parte del desarrollo postnatal, excepto a la semana 2 cuando la ausencia de señalización de la PRL refleja acciones inhibitorias de dicha hormona sobre el peso del hígado y el cuerpo.

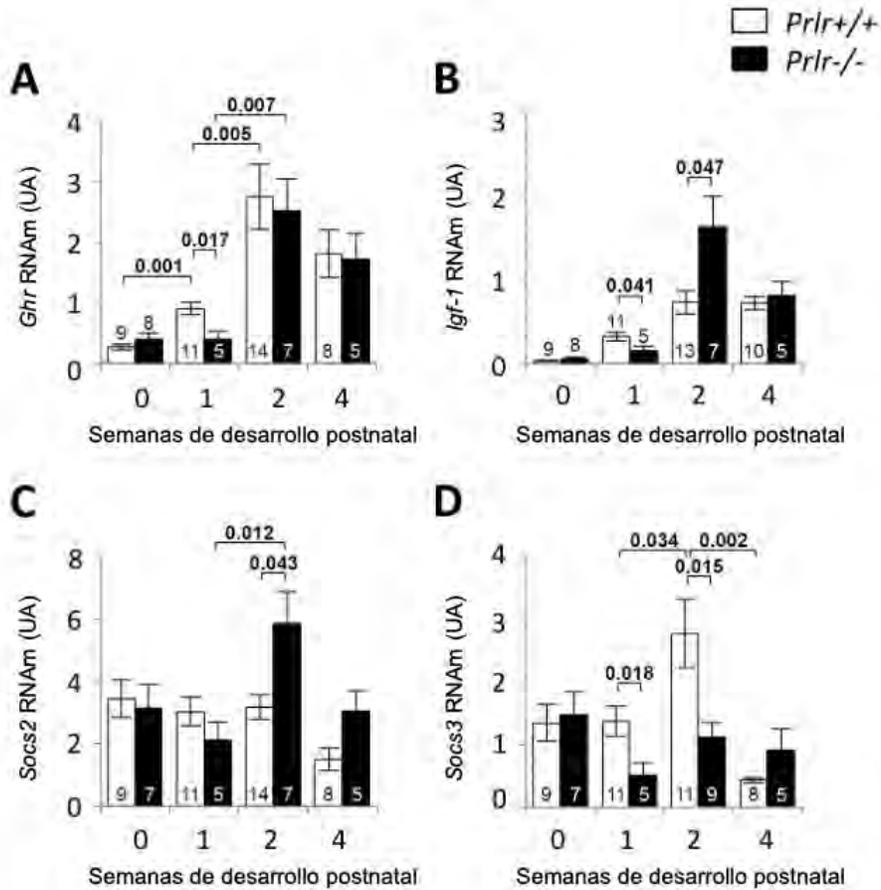


**Figura 8. La falta del receptor de la PRL altera el crecimiento del hígado durante el desarrollo postnatal.** Peso del hígado (pH) (A), peso del cuerpo (pC) (B), pH/pC (C) y expresión de marcadores de proliferación celular [ciclina D1 (Ccnd1)] (D) y angiogénesis [molécula de adhesión de plaquetas a endotelio (Pecam1)] (E) en ratones nulos (Prlr  $-/-$ ) y silvestres (Prlr  $+/+$ ) para el receptor de PRL al nacimiento (semana 0) y de las semanas postnatales 1 a 10. Los valores del RNA mensajero (RNAm) se determinaron por qRT-PCR utilizando *Gapdh* y *CypA* como genes constitutivos y los valores se expresan como unidades arbitrarias (UA). Los valores corresponden a los promedios  $\pm$  SEM. El número de animales (n) se indica en las gráficas para cada tiempo. Se muestra el valor de  $p$  sólo cuando las diferencias son estadísticamente significativas.

### **La ausencia del receptor de la PRL se asocia con un aumento en la señalización de la hormona de crecimiento (GH) en el hígado durante la segunda semana del desarrollo postnatal.**

En roedores, las primeras dos semanas del desarrollo postnatal se han definido como fase de crecimiento independiente de GH y están caracterizadas por una insensibilidad a la señalización de la GH en el hígado (Martinez et al., 2015; Martinez et al., 2013). Para evaluar si la PRL inhibe el crecimiento hepático y corporal través de favorecer la insensibilidad hepática a la acción de la GH, analizamos durante el desarrollo postnatal la expresión del mRNA del receptor hepático de la GH y de las proteínas inducidas por la GH que median sus efectos en el hígado, a saber: IGF-1 y los inhibidores de la señalización de citocinas SOCS-2 y SOCS-3. El nivel de expresión del gen que codifica para el receptor de la GH (*Ghr*) en los ratones silvestres fue bajo al nacimiento, mayor en la semana 1 y máximo en las semanas 2 y 4 del desarrollo postnatal (Figura 9, A), lo cual confirma observaciones previas de otros autores (Martinez et al., 2013). El nivel de expresión en los ratones *Prlr* $-/-$  fue similar excepto en la semana 1 cuando la expresión del *Ghr* fue reducida en estos animales. El *Igf-1* es un gen que está bajo el control de la GH en el hígado y

es un mediador clave del crecimiento corporal estimulado por la GH (Liu & LeRoith, 1999). Los ratones *Prlr*<sup>-/-</sup> presentaron una disminución en la expresión de *Igf-1* en la semana 1 y un incremento en la semana 2 del desarrollo postnatal, comparados con los ratones silvestres (Figura 9, B). La GH induce la expresión de SOCS-2 y -3 en el hígado, estas proteínas interfieren con la fosforilación/activación de STAT-5b reinducida por la GH, lo que resulta en una reducción de la expresión del IGF-1 (Greenhalgh, Bertolino, et al., 2002; Greenhalgh, Metcalf, et al., 2002). Sin embargo, a diferencia de SOCS-3 que es siempre inhibitoria (Adams et al., 1998), SOCS-2 puede también estimular las acciones de la GH (Metcalf et al., 2000) al través de unirse a SOCS-3 y direccionarla para su degradación vía el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) (Piessevaux et al., 2006; Tannahill et al., 2005). La expresión hepática del mRNA de SOCS-2 fue mayor en la semana 2 del desarrollo postnatal (Figura 9, C) y la de SOCS-3 fue menor durante las semanas 1 y 2 del desarrollo postnatal en los ratones *Prlr*<sup>-/-</sup> con respecto a los silvestres (Figura 9, D). No se encontraron diferencias en la expresión de IGF-1, SOCS-2 y SOCS-3 al nacimiento (semana 0) ni en la semana 4 del desarrollo postnatal entre ratones *Prlr*<sup>-/-</sup> y *Prlr*<sup>+/+</sup>.



**Figura 9. La falta del receptor de la PRL modifica la señalización de la GH en el hígado.** Expresión hepática de genes que codifican para el receptor a GH (rGh; A), Igf-1 (B) y los supresores de la señalización de citocinas 2 (Socs2; C) y 3 (Socs3; D) en ratones nulos (Prlr  $-/-$ ) o no (Prlr  $+/+$ ) para el receptor de PRL al nacimiento (semana 0) y en las semanas 1, 2 y 4 del desarrollo postnatal. Los valores del RNA mensajero (RNAm) se determinaron por qRT-PCR utilizando *Gapdh* y *CypA* como genes constitutivos y los valores se expresan como unidades arbitrarias (UA). Los valores corresponden a los promedios  $\pm$  SEM. El número de animales (n) se indica en las gráficas para cada tiempo. Se muestra el valor de  $p$  sólo cuando las diferencias son estadísticamente significativas.

## Discusión

El papel central de las hormonas en el crecimiento fisiológico del hígado se conoce desde hace décadas, pero la contribución hormonal específica permanece sin establecerse. A través de experimentos en donde se une la circulación sanguínea de dos animales vivos, se observó que si se realizaba una HPx a uno de los animales del experimento, este estímulo provocaba una respuesta de regeneración en el hígado intacto del otro animal y que el efecto era de máximo crecimiento cuando el hígado era removido en su totalidad (Michalopoulos & DeFrances, 1997). La PRL es una de estas hormonas involucradas en el crecimiento y la regeneración hepática (Buckley et al., 1985; Moreno-Carranza et al., 2013; Olazabal et al., 2009).

Desde hace más de 30 años se reportó que la PRL actúa como mitógeno del hígado adulto. Buckley y colaboradores (1985) demostraron que la administración de PRL incrementa la síntesis de DNA, la mitosis de los hepatocitos y el pH/pC. Además, se conoce que la PRL se incrementa en la circulación en respuesta a la HPx (Buckley et al., 1991) y que su administración estimula la regeneración hepática evaluada a través del peso, diferenciación y metabolismo energético del hígado (Olazabal et al., 2009). Diversos estudios corroboran estos hallazgos (Berlanga et al., 1995; Moreno-Carranza et al., 2013; Olazabal et al., 2000; Vergani et al., 1994). Además, el hígado de ratones nulos para el RPRL es más pequeño que en el ratón silvestre (Moreno-Carranza et al., 2013). El hecho de que el aumento de la PRL circulante estimula la proliferación de los hepatocitos y de las células endoteliales sinusoidales hepáticas en roedores adultos (Moreno-Carranza et al., 2013), sugiere que la hiperprolactinemia que tiene lugar en el embarazo y la lactancia puede

participar en la promoción del crecimiento del hígado, que tiene lugar en ambas fases del ciclo reproductor y, por ende, en la contribución de la PRL al crecimiento fisiológico del hígado. En este trabajo de tesis obtuvimos evidencias que apoyan la acción fisiológica de la PRL durante el desarrollo postnatal temprano del ratón. Encontramos que el hígado produce PRL durante las primeras 2 semanas de vida postnatal y que la PRL es requerida para un adecuado crecimiento hepático. Aunado a esto, mostramos un nuevo mecanismo a través del cual la PRL puede restringir el crecimiento del hígado y del cuerpo del ratón, exclusivamente durante la segunda semana del desarrollo postnatal.

La glándula hipófisis produce muy poca PRL en las crías de roedores recién nacidas (Hoeffler et al., 1985) y no es posible detectar valores circulantes de la hormona durante las primeras dos semanas del desarrollo postnatal (Oliver et al., 1980). Posteriormente (tercera semana de vida postnatal), ocurre un incremento significativo en la producción de PRL por la glándula hipófisis que se traduce en la elevación de la PRL circulante (Oliver et al., 1980; Shah et al., 1988). Nosotros corroboramos estos hallazgos en el ratón y encontramos que la ausencia de PRL circulante durante las primeras 2 semanas de vida postnatal es compensada por la producción hepática de PRL. El mRNA y la proteína se elevan 20 y 5 veces respectivamente, durante la primera semana de vida. Si bien la PRL se genera en una gran diversidad de tejidos extra-pituitarios (Ben-Jonathan et al., 1996), esta es la primera evidencia de su producción por el hígado. Desconocemos cuál es el tipo celular del hígado que produce a la PRL, pero estos hallazgos sugieren la capacidad de la hormona de actuar como un regulador hepático local en ausencia de su

presencia endócrina. También es posible que en este tiempo participe la PRL presente en la leche materna. La leche materna contiene niveles elevados de PRL (de Los Ríos et al., 2018) y ha sido reportado que posterior a la ingesta de leche materna por parte de las crías, un gran porcentaje de esta hormona logra sobrevivir el paso por no se degrada en el tracto gastrointestinal (Shyr et al., 1986) y aparece en la circulación (Shah et al., 1988), lo cual hace posible que la PRL que se encuentra en de la leche se acumule en el hígado durante la segunda semana de desarrollo postnatal, cuando se sabe que el intestino es permeable a grandes moléculas (Clarke & Hardy, 1969). Por otra parte, la PRL se detectó en el hígado a las 4 semanas post-nacimiento, cuando la expresión hepática del mRNA de la PRL es prácticamente indetectable. Como en esta etapa del desarrollo los niveles circulantes de la hormona son altos, es posible que la PRL presente en el hígado a las 4 semanas de vida postnatal provenga de la circulación. La PRL se incorpora y concentra en diferentes órganos como son el ojo (Arnold et al., 2010), la glándula mamaria (Seddiki et al., 2002) y el cerebro (Brown et al., 2016). Todas estas observaciones nos permiten concluir que el hígado se encuentra bajo la influencia de la PRL durante el desarrollo postnatal temprano y que esta hormona actúa inicialmente como un regulador local (producido por el propio hígado y derivado de la leche materna) y posteriormente, como un regulador endócrino (producido por la glándula hipófisis).

Se han descrito 3 isoformas del RPRL que se generan por corte y empalme del transcrito primario y que han sido clasificadas como corta, intermedia y larga de acuerdo con la longitud de su dominio citoplásmico (Ben-Jonathan et al., 2008), si

bien en el ratón solamente se expresan las isoformas corta y larga (Ben-Jonathan et al., 2008; Freeman et al., 2000). La isoforma intermedia (ausente en el ratón) transmite señales de supervivencia y proliferación, la isoforma larga es considerada la principal isoforma responsable de la señalización de la PRL y la corta silencia las acciones de la isoforma larga (Ben-Jonathan et al., 2008; Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000). De acuerdo con una acción directa de la PRL en el hígado, encontramos que la expresión hepática de la isoforma larga del RPRL, indetectable al día del nacimiento, se eleva marcadamente a la segunda semana de vida postnatal, para posteriormente disminuir hacia valores estables. Estos hallazgos corroboran estudios previos que muestran que la expresión del RPRL (mRNA y de la proteína) aumentan en el hígado de la rata durante el desarrollo postnatal (Jolicoeur et al., 1989). Por lo tanto, el aumento en la expresión de la isoforma larga del RPRL en el hígado implica que la PRL puede actuar directamente en este órgano durante el desarrollo temprano postnatal.

Mas aún, el uso de animales *Prlr*<sup>-/-</sup> mostró que esta hormona se requiere para un crecimiento postnatal normal del hígado y del cuerpo. Nuestro trabajo corroboró resultados previos en el adulto que muestran hígados mas pequeños en ausencia del RPRL (Moreno-Carranza et al., 2013). La reducción en el tamaño del hígado en estos ratones es leve, pero similar a lo reportado para otros reguladores del crecimiento hepático. Por ejemplo, la delección de la proteína asociada a Yes (YAP), involucrada en la proliferación y diferenciación hepática durante el desarrollo postnatal, resulta en una reducción significativa del 8% en el pH/pC durante la cuarta semana del desarrollo postnatal (Septer et al., 2012), que es equivalente a la

reducción del 7% en el pH/pC encontrada por nosotros en los ratones *Prlr*<sup>-/-</sup>. Asimismo, cambios similares ( $\approx$  10% pH/pC) en el peso relativo del hígado adulto se reportaron bajo el tratamiento con PRL (Moreno-Carranza et al., 2013) y para otros mitógenos conocidos como el HGF, del cual se conoce que induce el crecimiento de hígados normales y que, a su vez, este incremento se acompaña del aumento en la proliferación de los hepatocitos y también el incremento de proteínas séricas y lípidos (Roos et al., 1995).

La disminución en el tamaño del hígado debido a la falta del RPRL no se observó al momento del nacimiento, indicando que ni la PRL ni el lactógeno placentario (cuyo receptor es el RPRL) (Ben-Jonathan et al., 2008; Bole-Feysot et al., 1998) están involucrados en el crecimiento del hígado durante el período embrionario o fetal. La reducción en el peso del hígado y en el pH/pC que tuvo lugar en los ratones *Prlr*<sup>-/-</sup> a las semanas 1, 4, 6 y 10 se apoya en que también disminuyeron los niveles de la expresión de ciclina D1, marcador de proliferación celular y de *Pecam-1* marcador de angiogénesis en el hígado. Estos hallazgos concuerdan con reportes que muestran que el tratamiento con PRL en ratas adultas estimula la proliferación de los hepatocitos y de las células endoteliales (Moreno-Carranza et al., 2013) y la actividad de factores de transcripción (AP-1, Jun y STAT-3), involucrados en inducir la síntesis de DNA y la proliferación celular (Olazabal et al., 2009). Mas aún, la PRL ejerce sus acciones proliferativas en hepatocitos aislados de ratas adultas o de ratas de 3 semanas de edad al estimular la expresión de *c-myc* (Zabala & Garcia-Ruiz, 1989), *c-fos*, *c-jun* y *c-src* (Berlanga et al., 1995) o la proliferación celular (Vergani et al., 1994), respectivamente. En los efectos proliferativos de la PRL sobre los

hepatocitos y las células endoteliales participa la activación de las vías de señalización JNK, p-38-MAPK, PKC, pp60<sup>c-src</sup>, STAT3, STAT5 y la hemo oxigenasa-1 (Berlangua et al., 1995; Malaguarnera et al., 2002; Olazabal et al., 2009; Yang et al., 2013). Aunado a esto, también se conoce que la PRL estimula la proliferación de células endoteliales de manera indirecta, al inducir la síntesis de VEGF y FGF-2 (Clapp et al., 2009; Moreno-Carranza et al., 2013).

Queda pendiente evaluar si en el efecto estimulador de la PRL sobre el crecimiento hepático participa la estimulación de la hipertrofia de los hepatocitos. Al respecto, se conoce que la hepatomegalia participa en el crecimiento del hígado durante el embarazo y que se asocia con la sobre-expresión de ciclina E (Dai et al., 2011). Sin embargo, no se ha evaluado la expresión de la ciclina E en respuesta a la hiperprolactinemia.

Un resultado novedoso de nuestro estudio fue el mostrar que la PRL también restringe el crecimiento del hígado. Se han explorado algunos factores que estimulan el crecimiento del hígado durante el desarrollo postnatal, pero aquellos que restringen su crecimiento durante esta etapa siguen sin conocerse (Apte et al., 2007). Este efecto negativo de la PRL sobre el crecimiento del hígado se manifestó solamente durante la segunda semana del desarrollo postnatal, cuando el peso hepático, corporal y su relación (pH/pC) se incrementaron en los ratones *Prlr* <sup>-/-</sup>. Esta acción inhibitoria de la PRL no ha sido reportada previamente, tal vez porque ocurre durante las primeras dos semanas del desarrollo postnatal, una etapa de crecimiento en el ratón descrita como fase de crecimiento independiente de las

acciones de la hormona del crecimiento (GH) (Martinez et al., 2015; Martinez et al., 2013).

La GH es el principal estimulador del crecimiento corporal, excepto durante el desarrollo prenatal y en etapa postnatal temprana, a pesar de que el receptor de la GH está presente en ambos períodos (Martinez et al., 2015; Martinez et al., 2013). En los roedores se han descrito dos fases de crecimiento corporal postnatal acelerado, la primera es independiente de los efectos de la GH y ocurre inmediatamente después del nacimiento y la segunda fase, que es dependiente de los efectos de la GH y comienza después de la segunda semana de vida (Lupu et al., 2001; Martinez et al., 2015). Mutantes espontáneos deficientes de GH poseen un peso normal al momento del nacimiento y en la segunda semana de vida postnatal pero después de este tiempo retrasan su crecimiento (Kiousi et al., 1999). Por su parte, ratones transgénicos que sobre-expresan a la GH tienen crecimiento acelerado del cuerpo que se manifiesta a partir de la tercera semana del desarrollo postnatal, a pesar de que la GH circulante está elevada desde el nacimiento (Martinez et al., 2015). La GH estimula el crecimiento somático al estimular, en el hígado, la transcripción y secreción del factor de crecimiento similar a la insulina-tipo 1 (IGF-1) responsable de estimular el crecimiento hepático y corporal (Liu & LeRoith, 1999; Lupu et al., 2001; Tronche et al., 2004). El hígado es la principal fuente de IGF-1 (Lupu et al., 2001) y la expresión de la secreción hepática de IGF-1 es refractaria a la GH durante las primeras dos semanas post-nacimiento (Mathews et al., 1988). Dada esta temporalidad, investigamos si el efecto inhibitorio de la PRL sobre el crecimiento del hígado y del cuerpo, observado en la segunda

semana del desarrollo postnatal, pudiera deberse a que la PRL estimula la insensibilidad hepática a la GH. A este respecto, la falta de efecto de la GH se ha intentado explicar en función del bajo contenido hepático de su receptor, aunque existen diferentes opiniones al respecto, ya que algunos autores han descrito que la expresión de su RNA mensajero es apenas detectable en la etapa fetal y prenatal temprana en el hígado de la rata, mientras que otros han descrito la presencia de la GH y de su receptor, y de los altos valores de moduladores negativos de las acciones de la GH (Martinez et al., 2013; Martinez et al., 2015). Encontramos que la ausencia del RPRL no modifica la expresión hepática del mRNA del receptor a la GH durante el desarrollo postnatal, excepto durante la primera semana cuando estos niveles disminuyen. Consistentemente con estos hallazgos encontramos reducida la expresión de los genes blanco de la GH, *Igf-1* y *Socs3*, durante la primera semana del desarrollo postnatal en ratones *Prlr*<sup>-/-</sup>. Por lo tanto, proponemos que la PRL promueve la señalización de la GH y, por ende, el pH/pC en la primera semana de vida neonatal, al través de incrementar el receptor de la GH en el hígado. No obstante, la expresión de *Igf-1* y *Socs2* aumentó en el hígado de ratones *Prlr*<sup>-/-</sup> en la segunda semana del desarrollo postnatal, sugiriendo que la PRL promueve la insensibilidad hepática a la GH en este tiempo.

Las acciones opuestas sobre la señalización de la GH son consistentes con el efecto estimulador de la PRL sobre el pH/pC, en la primera semana de vida postnatal, y el efecto inhibitorio de la PRL sobre el pH/pC y el crecimiento corporal en la segunda semana post-nacimiento. Estos efectos opuestos pudieran ser explicados por efectos diferenciales sobre la expresión hepática de SOCS-2 y SOCS-3. Las SOCS

pertenecen a la familia de supresores de la señalización de citocinas y se conoce que la GH induce su expresión como mecanismo de retroalimentación negativa sobre su efecto. Por ejemplo, se conoce que SOCS-3 inhibe la fosforilación/activación de STAT3 inducida por GH que conduce a la expresión hepática de IGF1 (Adams et al., 1998; Martinez et al., 2013; Martinez et al., 2015; Metcalf et al., 2000; Pezet et al., 1999). La información en torno a SOCS-2 es menos clara. Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado efectos tanto inhibitorios como y estimulatorios de SOCS-2 sobre la señalización de la GH. Se ha reportado que SOCS-2 puede estimular la acción de la GH al unirse a SOCS-3 e inactivarlo vía su degradación, dependiente del proteasoma (Martinez et al., 2013; Piessevaux et al., 2006). Por otro lado, la acción de SOCS-2 es menos clara e involucra efectos duales sobre la acción de la GH. Ratones nulos para SOCS-2 (Metcalf et al., 2000) y transgénicos que sobre-expresan SOCS-2 (Greenhalgh , Bertolino, et al., 2002) exhiben un fenotipo de crecimiento excesivo. Estos resultados contrastantes se explican por la observación de que concentraciones bajas y altas de SOCS-2 inhiben y promueven, respectivamente, la señalización de la GH (Favre et al., 1999). Por lo tanto, se ha sugerido que el efecto dual de SOCS-2 es dependiente de su concentración en la célula (Favre et al., 1999; Greenhalgh, Metcalf, et al., 2002). De acuerdo a estas observaciones, especulamos que la regulación a la alza y a la baja de *Socs2* y *Socs3*, respectivamente, observada durante la segunda semana del desarrollo postnatal en los ratones *Prlr*<sup>-/-</sup> promueve la señalización de GH y, como consecuencia, eleva la producción de IGF-1 para aumentar el peso hepático y corporal. Durante la primera semana del desarrollo postnatal, la disminución en la transcripción del receptor de la GH y de *Socs3* en los ratones *Prlr*<sup>-/-</sup> reduciría las

acciones de la GH (menor expresión de *Igf-1*) y, por ende, explicaría la reducción en el peso hepático y corporal, observada en ausencia de señalización de la PRL. Estos mecanismos deben ser validados en futuras investigaciones.

## Conclusión

En este trabajo se muestra que la PRL es un regulador fisiológico local y sistémico del crecimiento del hígado durante el desarrollo neonatal. Si bien es claro que el efecto neto de la PRL es estimular el crecimiento del hígado, también encontramos que esta hormona es capaz de restringir el crecimiento corporal y hepático durante el desarrollo postnatal temprano del ratón. Dicha inhibición se manifiesta durante la segunda semana del desarrollo postnatal, un periodo que se caracteriza por ser independiente de las acciones de la GH. Hasta el momento se desconocen los mediadores químicos responsables de la insensibilidad temprana a la GH. Nuestro trabajo propone que la PRL es uno de estos factores, y que lo hace a través de la atenuación tardía de la transcripción de *Igf-1* inducida por la GH vía la regulación a la alza y a la baja de *Socs2* y *Socs3*, respectivamente. Pensamos que mecanismos similares pueden actuar ajustando el crecimiento del hígado a lo largo de la vida en estadios que cursan con niveles elevados de la PRL. El estudio de estos mecanismos tiene implicaciones para el manejo terapéutico de las patologías hepáticas.

## Bibliografía

- Adams, T. E., Hansen, J. A., Starr, R., Nicola, N. A., Hilton, D. J., & Billestrup, N. (1998, Jan 16). Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signaling. *J Biol Chem*, 273(3), 1285-1287. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1285>
- Apte, U., Zeng, G., Thompson, M. D., Muller, P., Micsenyi, A., Cieply, B., Kaestner, K. H., & Monga, S. P. (2007, Jun). beta-Catenin is critical for early postnatal liver growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292(6), G1578-1585. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00359.2006>
- Arnold, E., Rivera, J. C., Thebault, S., Moreno-Paramo, D., Quiroz-Mercado, H., Quintanar-Stephano, A., Binart, N., Martinez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2010, Dec). High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes*, 59(12), 3192-3197. <https://doi.org/10.2337/db10-0873>
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R., & LaPensee, E. W. (2008, Feb). What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev*, 29(1), 1-41. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0017>
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L., & Steinmetz, R. W. (1996, Dec). Extrahypothalamic prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*, 17(6), 639-669. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-6-639>

Berlanga, J. J., Fresno Vara, J. A., Martin-Perez, J., & Garcia-Ruiz, J. P. (1995, Nov). Prolactin receptor is associated with c-src kinase in rat liver. *Mol Endocrinol*, 9(11), 1461-1467. <https://doi.org/10.1210/mend.9.11.8584023>

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998, Jun). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*, 19(3), 225-268. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>

Brown, R. S., Wyatt, A. K., Herbison, R. E., Knowles, P. J., Ladyman, S. R., Binart, N., Banks, W. A., & Grattan, D. R. (2016, Feb). Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor. *FASEB J*, 30(2), 1002-1010. <https://doi.org/10.1096/fj.15-276519>

Buckley, A. R., Crowe, P. D., Bauman, P. A., Neumayer, L. A., Laird, H. E., 2nd, Russell, D. H., & Putnam, C. W. (1991, Sep). Prolactin-provoked alterations of cytosolic, membrane, and nuclear protein kinase C following partial hepatectomy. *Dig Dis Sci*, 36(9), 1313-1319. <https://doi.org/10.1007/BF01307529>

Buckley, A. R., Putnam, C. W., & Russell, D. H. (1985, Dec 30). Prolactin is a tumor promoter in rat liver. *Life Sci*, 37(26), 2569-2575. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90616-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90616-2)

Bustamante, J. J., Copple, B. L., Soares, M. J., & Dai, G. (2010, Mar). Gene profiling of maternal hepatic adaptations to pregnancy. *Liver Int*, 30(3), 406-415. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2009.02183.x>

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987, Apr). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156-159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>

Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M. C., & Martinez De La Escalera, G. (2009, Oct). Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev*, 89(4), 1177-1215. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2009>

Clarke, R. M., & Hardy, R. N. (1969, Sep). An analysis of the mechanism of cessation of uptake of macromolecular substances by the intestine of the young rat ('closure'). *J Physiol*, 204(1), 127-134. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1969.sp008903>

Dai, G., Bustamante, J. J., Zou, Y., Myronovych, A., Bao, Q., Kumar, S., & Soares, M. J. (2011, Nov). Maternal hepatic growth response to pregnancy in the mouse. *Exp Biol Med (Maywood)*, 236(11), 1322-1332. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011076>

de Los Rios, E. A., Ruiz-Herrera, X., Tinoco-Pantoja, V., Lopez-Barrera, F., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C., & Macotela, Y. (2018, Jun). Impaired prolactin actions mediate altered offspring metabolism induced by maternal high-fat feeding during lactation. *FASEB J*, 32(6), 3457-3470.

<https://doi.org/10.1096/fj.201701154R>

Fausto, N., Laird, A. D., & Webber, E. M. (1995, Dec). Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J*, 9(15), 1527-1536.

<https://doi.org/10.1096/fasebj.9.15.8529831>

Favre, H., Benhamou, A., Finidori, J., Kelly, P. A., & Edery, M. (1999, Jun 18). Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. *FEBS Lett*, 453(1-2), 63-66.

[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00681-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00681-x)

Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000, Oct). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*, 80(4), 1523-

1631. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>

Friedman, S. L. (1999). Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis*, 19(2), 129-

140. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1007105>

Friedman, S. L. (2008, Jan). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 88(1), 125-172.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>

Greenhalgh, C. J., Bertolino, P., Asa, S. L., Metcalf, D., Corbin, J. E., Adams, T. E., Davey, H. W., Nicola, N. A., Hilton, D. J., & Alexander, W. S. (2002, Jun). Growth enhancement in suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2)-deficient mice is dependent on signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b). *Mol Endocrinol*, 16(6), 1394-1406.

<https://doi.org/10.1210/mend.16.6.0845>

Greenhalgh, C. J., Metcalf, D., Thaus, A. L., Corbin, J. E., Uren, R., Morgan, P. O., Fabri, L. J., Zhang, J. G., Martin, H. M., Willson, T. A., Billestrup, N., Nicola, N. A., Baca, M., Alexander, W. S., & Hilton, D. J. (2002, Oct 25). Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling. *J Biol Chem*, 277(43), 40181-40184.

<https://doi.org/10.1074/jbc.C200450200>

Grijalva, J., & Vakili, K. (2013, Nov). Neonatal liver physiology. *Semin Pediatr Surg*, 22(4), 185-189. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2013.10.006>

Guillou, A., Romano, N., Steyn, F., Abitbol, K., Le Tissier, P., Bonnefont, X., Chen, C., Mollard, P., & Martin, A. O. (2015, May). Assessment of lactotroph axis functionality in mice: longitudinal monitoring of PRL secretion by ultrasensitive-ELISA. *Endocrinology*, 156(5), 1924-1930.

<https://doi.org/10.1210/en.2014-1571>

Guyda, H. J., & Friesen, H. G. (1973, May). Serum prolactin levels in humans from birth to adult life. *Pediatr Res*, 7(5), 534-540.

<https://doi.org/10.1203/00006450-197305000-00007>

Higgins, G. M., & Anderson, R. M. (1931). Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Archives of Pathology*, 12, 186-202.

Hoeffler, J. P., Boockfor, F. R., & Frawley, L. S. (1985, Jul). Ontogeny of prolactin cells in neonatal rats: initial prolactin secretors also release growth hormone. *Endocrinology*, 117(1), 187-195. <https://doi.org/10.1210/endo-117-1-187>

Hollister, A., Okubara, P., J., G. W., & Chaykin, S. (1986). Reproduction in mice: liver enlargement in mice during pregnancy and lactation. *Life Sciences*, 40, 11-18.

Jolicoeur, C., Boutin, J. M., Okamura, H., Raguette, S., Djiane, J., & Kelly, P. A. (1989, Jun). Multiple regulation of prolactin receptor gene expression in rat liver. *Mol Endocrinol*, 3(6), 895-900. <https://doi.org/10.1210/mend-3-6-895>

Kennedy, G. C., Pearce, W. M., & Parrott, D. M. (1958, Jul). Liver growth in the lactating rat. *J Endocrinol*, *17*(2), 158-160.

<https://doi.org/10.1677/joe.0.0170158>

Kioussi, C., Carriere, C., & Rosenfeld, M. G. (1999, Mar). A model for the development of the hypothalamic-pituitary axis: transcribing the hypophysis.

*Mech Dev*, *81*(1-2), 23-35. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(98\)00229-9](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(98)00229-9)

Liu, J. L., & LeRoith, D. (1999, Nov). Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology*, *140*(11),

5178-5184. <https://doi.org/10.1210/endo.140.11.7151>

Lupu, F., Terwilliger, J. D., Lee, K., Segre, G. V., & Efstratiadis, A. (2001, Jan 1).

Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol*, *229*(1), 141-162. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9975>

Malaguarnera, L., Pilastro, M. R., Quan, S., Ghattas, M. H., Yang, L., Mezentsev, A. V., Kushida, T., Abraham, N. G., & Kappas, A. (2002, Oct). Significance of heme oxygenase in prolactin-mediated cell proliferation and angiogenesis in human endothelial cells. *Int J Mol Med*, *10*(4), 433-440.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239590>

Martinez, C. S., Piazza, V. G., Diaz, M. E., Boparai, R. K., Arum, O., Ramirez, M. C., Gonzalez, L., Becu-Villalobos, D., Bartke, A., Turyn, D., Miquet, J. G., & Sotelo, A. I. (2015, Apr). GH/STAT5 signaling during the growth period in livers of mice overexpressing GH. *J Mol Endocrinol*, *54*(2), 171-184.

<https://doi.org/10.1530/JME-14-0262>

Martinez, C. S., Piazza, V. G., Ratner, L. D., Matos, M. N., Gonzalez, L., Rulli, S. B., Miquet, J. G., & Sotelo, A. I. (2013, Feb-Apr). Growth hormone STAT5-mediated signaling and its modulation in mice liver during the growth period. *Growth Horm IGF Res*, *23*(1-2), 19-28.

<https://doi.org/10.1016/j.ghir.2012.11.002>

Mathews, L. S., Hammer, R. E., Brinster, R. L., & Palmiter, R. D. (1988, Jul). Expression of insulin-like growth factor I in transgenic mice with elevated levels of growth hormone is correlated with growth. *Endocrinology*, *123*(1), 433-437.

<https://doi.org/10.1210/endo-123-1-433>

Metcalf, D., Greenhalgh, C. J., Viney, E., Willson, T. A., Starr, R., Nicola, N. A., Hilton, D. J., & Alexander, W. S. (2000, Jun 29). Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature*, *405*(6790), 1069-1073.

<https://doi.org/10.1038/35016611>

Michalopoulos, G. K., & DeFrances, M. C. (1997, Apr 4). Liver regeneration.

*Science*, *276*(5309), 60-66. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.60>

- Michalopoulos, G. K., & Khan, Z. (2015, Oct). Liver Stem Cells: Experimental Findings and Implications for Human Liver Disease. *Gastroenterology*, 149(4), 876-882. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.08.004>
- Moldrup, A., Petersen, E. D., & Nielsen, J. H. (1993, Sep). Effects of sex and pregnancy hormones on growth hormone and prolactin receptor gene expression in insulin-producing cells. *Endocrinology*, 133(3), 1165-1172. <https://doi.org/10.1210/endo.133.3.8365359>
- Moreno-Carranza, B., Goya-Arce, M., Vega, C., Adan, N., Triebel, J., Lopez-Barrera, F., Quintanar-Stephano, A., Binart, N., Martinez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2013, Oct 1). Prolactin promotes normal liver growth, survival, and regeneration in rodents: effects on hepatic IL-6, suppressor of cytokine signaling-3, and angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 305(7), R720-726. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00282.2013>
- Morton, S. U., & Brodsky, D. (2016, Sep). Fetal Physiology and the Transition to Extrauterine Life. *Clin Perinatol*, 43(3), 395-407. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.04.001>
- Nagano, M., & Kelly, P. A. (1994, May 6). Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem*, 269(18), 13337-13345. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8175764>

Nakagaki, B. N., Mafra, K., de Carvalho, E., Lopes, M. E., Carvalho-Gontijo, R., de Castro-Oliveira, H. M., Campolina-Silva, G. H., de Miranda, C. D. M., Antunes, M. M., Silva, A. C. C., Diniz, A. B., Alvarenga, D. M., Lopes, M. A. F., de Souza Lacerda, V. A., Mattos, M. S., Araujo, A. M., Vidigal, P. V. T., Lima, C. X., Mahecha, G. A. B., Madeira, M. F. M., Fernandes, G. R., Nogueira, R. F., Moreira, T. G., David, B. A., Rezende, R. M., & Menezes, G. B. (2018, Dec). Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. *J Hepatol*, 69(6), 1294-1307. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.08.018>

Olazabal, I., Munoz, J., Ogueta, S., Obregon, E., & Garcia-Ruiz, J. P. (2000, Apr). Prolactin (PRL)-PRL receptor system increases cell proliferation involving JNK (c-Jun amino terminal kinase) and AP-1 activation: inhibition by glucocorticoids. *Mol Endocrinol*, 14(4), 564-575. <https://doi.org/10.1210/mend.14.4.0442>

Olazabal, I. M., Munoz, J. A., Rodriguez-Navas, C., Alvarez, L., Delgado-Baeza, E., & Garcia-Ruiz, J. P. (2009, Jun). Prolactin's role in the early stages of liver regeneration in rats. *J Cell Physiol*, 219(3), 626-633. <https://doi.org/10.1002/jcp.21707>

Oliver, C., Eskay, R. L., & Porter, J. C. (1980). Developmental changes in brain TRH and in plasma and pituitary TSH and prolactin levels in the rat. *Biol Neonate*, 37(3-4), 145-152. <https://doi.org/10.1159/000241266>

Oliver, I. T., Ballard, F. J., Shield, J., & Bentley, P. J. (1962, Feb). Liver growth in early postpartum rat. *Dev Biol*, 4, 108-116. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(62\)90035-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(62)90035-0)

Pezet, A., Favre, H., Kelly, P. A., & Edery, M. (1999, Aug 27). Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J Biol Chem*, 274(35), 24497-24502. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.24497>

Piessevaux, J., Lavens, D., Montoye, T., Wauman, J., Catteeuw, D., Vandekerckhove, J., Belsham, D., Peelman, F., & Tavernier, J. (2006, Nov 3). Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling. *J Biol Chem*, 281(44), 32953-32966. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600776200>

Roos, F., Ryan, A. M., Chamow, S. M., Bennett, G. L., & Schwall, R. H. (1995, Feb). Induction of liver growth in normal mice by infusion of hepatocyte growth factor/scatter factor. *Am J Physiol*, 268(2 Pt 1), G380-386. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.268.2.G380>

Rui, L. (2014, Jan). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 4(1), 177-197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>

Seddiki, T., Delpal, S., Aubourg, A., Durand, G., & Ollivier-Bousquet, M. (2002, Jun). Endocytic prolactin routes to the secretory pathway in lactating mammary epithelial cells. *Biol Cell*, 94(3), 173-185.  
[https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(02\)01188-7](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(02)01188-7)

Septer, S., Edwards, G., Gunewardena, S., Wolfe, A., Li, H., Daniel, J., & Apte, U. (2012, Mar 1). Yes-associated protein is involved in proliferation and differentiation during postnatal liver development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302(5), G493-503. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00056.2011>

Shah, G. V., Shyr, S. W., Grosvenor, C. E., & Crowley, W. R. (1988, May). Hyperprolactinemia after neonatal prolactin (PRL) deficiency in rats: evidence for altered anterior pituitary regulation of PRL secretion. *Endocrinology*, 122(5), 1883-1889. <https://doi.org/10.1210/endo-122-5-1883>

Shyr, S. W., Crowley, W. R., & Grosvenor, C. E. (1986, Sep). Effect of neonatal prolactin deficiency on prepubertal tuberoinfundibular and tuberohypophyseal dopaminergic neuronal activity. *Endocrinology*, 119(3), 1217-1221. <https://doi.org/10.1210/endo-119-3-1217>

Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P., & Duncan, S. A. (2010, Feb 16). Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*, 18(2), 175-189.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.011>

Tannahill, G. M., Elliott, J., Barry, A. C., Hibbert, L., Cacalano, N. A., & Johnston, J. A. (2005, Oct). SOCS2 can enhance interleukin-2 (IL-2) and IL-3 signaling by accelerating SOCS3 degradation. *Mol Cell Biol*, 25(20), 9115-9126. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.20.9115-9126.2005>

Taub, R. (2004, Oct). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10), 836-847. <https://doi.org/10.1038/nrm1489>

Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017, Nov 6). The liver. *Curr Biol*, 27(21), R1147-R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>

Tronche, F., Opherk, C., Moriggl, R., Kellendonk, C., Reimann, A., Schwake, L., Reichardt, H. M., Stangl, K., Gau, D., Hoeflich, A., Beug, H., Schmid, W., & Schutz, G. (2004, Mar 1). Glucocorticoid receptor function in hepatocytes is essential to promote postnatal body growth. *Genes Dev*, 18(5), 492-497. <https://doi.org/10.1101/gad.284704>

Vergani, G., Mayerhofer, A., & Bartke, A. (1994, Jun). Acute effects of rat growth hormone (GH), human GH and prolactin on proliferating rat liver cells in vitro: a study of mitotic behaviour and ultrastructural alterations. *Tissue Cell*, 26(3), 457-465. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0040-8166(94)90029-9)

Wang, M. J., Chen, F., Lau, J. T. Y., & Hu, Y. P. (2017, May 18). Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes. *Cell Death Dis*, 8(5), e2805. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.167>

Yang, X., Meyer, K., & Friedl, A. (2013, Jul 19). STAT5 and prolactin participate in a positive autocrine feedback loop that promotes angiogenesis. *J Biol Chem*, 288(29), 21184-21196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.481119>

Zabala, M. T., & Garcia-Ruiz, J. P. (1989, Nov). Regulation of expression of the messenger ribonucleic acid encoding the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver and small intestine of lactating rats. *Endocrinology*, 125(5), 2587-2593. <https://doi.org/10.1210/endo-125-5-2587>

Zorn, A. M. (2008). Liver development. In *StemBook*.  
<https://doi.org/10.3824/stembook.1.25.1>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización celular del hígado y zonación hepática.	19
Figura 2. Relación entre los compartimentos hepáticos.	24
Figura 3. Línea temporal del desarrollo del hígado en el ratón.	26
Figura 4. Cinética de proliferación celular post HPx.	30
Figura 5. Representación de isoformas del RPRL en humano, rata y ratón.	33
Figura 6. Crecimiento hepático y corporal durante el desarrollo postnatal del ratón.	40
Figura 7. El hígado está bajo la influencia de la PRL a lo largo del desarrollo postnatal.	43
Figura 8. La falta del receptor de la PRL altera el crecimiento del hígado durante el desarrollo postnatal.	45
Figura 9. La falta del receptor de la PRL modifica la señalización de la GH en el hígado.	48

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales tipos celulares hepáticos y sus funciones.	22
Tabla 2. Oligonucleótidos. Secuencias utilizadas para la amplificación del mRNA de diferentes genes de interés.	39

## ANEXOS

Artículo 1. Moreno-Carranza B, Bravo-Manríquez M, Báez A, Ledesma-Colunga MG, Ruiz-Herrera X, Reyes-Ortega P, de los Ríos EA, Macotela Y, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Prolactin regulates liver growth during postnatal development in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018 Jun 1;314(6):R902-R908.