



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

**ANÁLISIS DEL EFECTO PROTECTOR DE LA PROLACTINA CONTRA LA DIABETES
INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA EN EL RATÓN**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta:

M. en C. ERIKA GABRIELA RAMÍREZ HERNÁNDEZ

Tutores:

DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L, INB

DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN, INB

Comité tutor:

DRA. ROCÍO BRENDA ANGUIANO SERRANO, INB

DRA. ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDÁRIZ, FAC. MED

Juriquilla, Qro., junio 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 bajo la dirección de las Doctoras Ma. del Carmen Clapp Jiménez L. y Yazmín Macotela Guzmán, en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología, UNAM. Fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyectos números 247164, 289568 y 284771. La alumna fue becada por el CONACYT con el número de registro **589293**.

AGRADECIMIENTOS

Con especial agradecimiento para:

Las doctoras Carmen Clapp y Yazmín Macotela por su extraordinaria dirección académica, por la confianza y oportunidad para seguir formando parte de su grupo de investigación y por todo el apoyo que siempre me brindaron tanto para realizar este proyecto como para mi crecimiento académico y personal.

Las doctoras de mi Comité Tutor Brenda Anguiano y E. Martha Pérez-Armendariz por el tiempo y la buena disposición que tuvieron durante estos cuatro años, así como por las valiosas aportaciones que brindaron para enriquecer el proyecto.

El Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera por todas las ocasiones en que con paciencia escuchó y leyó este proyecto para ayudarme y enseñarme mejores técnicas de comunicación.

Nut. Fernando López Barrera y a la Dra. Xarubet Ruíz Herrera por invaluable apoyo técnico

Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y Maarten Cornelis Antheny Werdler por su dirección y apoyo en la Unidad de Microscopía Confocal e Histología respectivamente.

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

La Dra. Nuri Aranda López, responsable de la Unidad de Enseñanza, el Ing. Ramón Martínez Olvera, responsable de la Unidad de Cómputo y el Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela, responsable de la Biblioteca.

Lic. Lourdes Anaya q.d.e.p. por su invaluable ayuda en las sesiones de
videoconferencia.

Los compañeros: M. en C. Elva Adán, Dra. Nundehui Díaz, Dra. Guadalupe
Ledesma, Dra. Norma Adán por su amistad y apoyo experimental.

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

Todos los compañeros del laboratorio A-14 y A-15 del Instituto de Neurobiología.

Mi *alma máter* y segunda casa la Universidad Nacional Autónoma de México.

DEDICATORIAS

Con inmensa dedicación para:

Mi hermosa familia, mis pilares: Lupita Hernández, Matías Ramírez, Luis Domínguez, Sergio Urbina, David J. Hernández, Martha García, Erick Ramírez, Juan González y Jessica Iglesias por su amor infinito y apoyo incondicional, porque son mi motor y parte vital de lo que soy.

Mis mentores Carmen Clapp, Yazmín Macotella y Gonzalo Martínez de la Escalera, por su confianza, apoyo, cariño y consejos invaluable.

Mis amigos del instituto Elva Adán, Fernando López, Juan Pablo Moctezuma, Daniela Granados, Montserrat Siqueiros, Francisco Núñez, Dina Vázquez y Miguel Ángel Vázquez, por su cariño, compañía y por todas las grandes enseñanzas que me dejaron.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	
II.1. El páncreas y la homeostasis de la glucosa	3
a. Páncreas endócrino	5
b. Páncreas exócrino	8
c. Homeostasis de la glucosa	8
II.2. Diabetes Mellitus	10
II.3. Diabetes experimental	12
a. Modelo de diabetes experimental inducida por estreptozotocina	12
II.4. Hormona prolactina y su receptor	15
II.5. Efecto de la prolactina en las células β y en la diabetes	19
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVOS	
Objetivo general	24
Objetivos particulares	24

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Diseño experimental	25
VI.2. Modelo de inducción de diabetes con estreptozotocina	26
VI.3. Medición de glucosa y peso	26
VI.4. Ensayo de tolerancia a la glucosa	27
VI.5. Ensayo de tolerancia a la insulina	27
VI.6. Determinación de insulina y glucagon séricos.....	27
VI.7. Inmunohistoquímica.....	27
VI.8. Inmunofluorescencia.....	28
VI.9. PCR cuantitativa en tiempo real.....	28
VI.10. Western blot.....	30
VI.11. Ensayos para apoptosis.....	30
VI.12. Análisis estadístico.....	31

VII. RESULTADOS

VII.1. La falta de señalización de prolactina incrementa el número de casos, la latencia de recuperación y la severidad de la diabetes inducida por estreptozotocina	31
VII.2. La falta de señalización de prolactina disminuye la homeostasis de la glucosa en la diabetes inducida por estreptozotocina	34
VII.3. La falta de señalización de prolactina aumenta las alteraciones en el páncreas endócrino (islotes de Langerhans) asociadas a la diabetes inducida por estreptozotocina	36
VII.4. La falta de señalización de prolactina disminuye los niveles circulantes de insulina en la diabetes inducida por estreptozotocina	38
VII.5. La falta de señalización de prolactina disminuye proliferación de las células β en la diabetes inducida por estreptozotocina ..	39

VII.6. La falta de señalización de prolactina incrementa la apoptosis de las células β y la inflamación del páncreas en la diabetes inducida por estreptozotocina	42
VIII. DISCUSIÓN	45
IX. CONCLUSIONES	50
X. REFERENCIAS	52
XI. ÍNDICE DE FIGURAS	60
XII. ÍNDICE DE TABLAS	62
XIII. ANEXOS	
Lista de publicaciones	63
Lista de premios y reconocimientos	64
Lista de presentaciones orales en congresos	64
Lista de presentaciones de carteles en congresos	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Cinasa de serina/ treonina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DM	Diabetes mellitus
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GH	Hormona de crecimiento
GLUT	Transportador de glucosa
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
JAK	Cinasa Janus
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
NO	Óxido nítrico
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
<i>Prlr</i>^{-/-}	Ratón carente del receptor de prolactina
<i>Prlr</i>^{+/+}	Ratón silvestre
RANK	Receptor activador del factor nuclear κ B
ROS	Especies reactivas de oxígeno
STAT	Transductores de señal y reguladores de la transcripción
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Veh	Vehículo

RESUMEN

La diabetes es una enfermedad de gran prevalencia a nivel mundial caracterizada por un estado de hiperglucemia crónico y donde la disminución del número y funcionalidad de las células β pancreáticas tiene una participación protagónica. La hormona prolactina promueve la proliferación, supervivencia y producción de insulina de las células β bajo condiciones fisiológicas. Más aún, niveles circulantes bajos de prolactina se correlacionan con una mayor prevalencia de diabetes. En este trabajo analizamos el efecto protector de la prolactina en el desarrollo y severidad de hiperglucemia inducida por estreptozotocina en ratones carentes (*Prlr*^{-/-}) o no (*Prlr*^{+/+}) del receptor de la prolactina. Los ratones *Prlr*^{-/-} diabéticos mostraron mayor incidencia y menor recuperación de la diabetes inducida por estreptozotocina, así como mayor hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y desarrollo de resistencia a la insulina en comparación con los ratones *Prlr*^{+/+} diabéticos. De acuerdo con la mayor severidad del fenotipo diabético, la ausencia del receptor de la prolactina se asoció con una menor densidad de islotes pancreáticos, disminución en el número de células β y niveles circulantes reducidos de insulina. Por su parte, el aumento en el número de células α que es característico de la diabetes también se exacerbó en los ratones *Prlr*^{-/-} vs los animales silvestres diabéticos. Además, se observó una menor proliferación y mayor apoptosis de las células β y una mayor expresión de citocinas pro-inflamatorias e infiltración de macrófagos en el páncreas de los ratones diabéticos carentes del receptor de la prolactina. En conjunto, nuestros resultados muestran que la prolactina favorece la homeostasis de la glucosa en la diabetes inducida por estreptozotocina mediante mecanismos que incluyen la estimulación de la supervivencia y la proliferación de las células β y la reducción de la inflamación en el páncreas. Estos hallazgos apoyan el efecto protector de la prolactina contra la diabetes y sugieren que fármacos capaces de elevar los niveles circulantes de esta hormona poseen potencialidad terapéutica en este padecimiento.

ABSTRACT

Diabetes is a high prevalence disease worldwide characterized by chronic hyperglycemia and the loss of pancreatic β -cells. The hormone prolactin promotes proliferation, survival, and insulin production of β -cells under physiological conditions, and lower circulating prolactin levels correlate with increased prevalence of diabetes in humans. Here, we have investigated the protective effect of prolactin in development and severity of streptozotocin-induced diabetes by using mice null (*Prlr*^{-/-}) or not (*Prlr*^{+/+}) for the prolactin receptor. Diabetic *Prlr*^{-/-} mice showed a higher incidence and later recovery from streptozotocin-induced diabetes, exacerbated hyperglycemia, glucose intolerance, and development of insulin resistance compared to diabetic *Prlr*^{+/+} mice. Consistent with the worsened diabetic phenotype, absence of the prolactin receptor associated with a reduction in pancreatic islet density, number of β -cells, and circulating insulin levels. Also, the increase in pancreatic α -cells due to diabetes was even higher in *Prlr*^{-/-} vs *Prlr*^{+/+} diabetic mice. Finally, the pancreas from diabetic *Prlr*^{-/-} mice showed less proliferation and more apoptotic β -cells, along with increased expression of pro-inflammatory cytokines and a higher level of macrophage infiltration. In summary, our findings show that prolactin protects whole body glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetes by mechanisms including stimulation of β -cell survival and proliferation and reduced pancreatic inflammation. These findings suggest that medications elevating prolactin levels may be a promising therapy in diabetes.

I. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad que se caracteriza por un estado de hiperglucemia crónica (American Diabetes Association, 2010; Federación Internacional de Diabetes, 2019). Debido a su alta y creciente prevalencia mundial, la diabetes se considera una pandemia que se encuentra entre las diez principales causas de muerte. Hasta el año 2019 se estimó un total de 463 millones de personas adultas con diabetes en el mundo y se calcula que esta cifra incrementará en un 51% durante los próximos 25 años (Organización Mundial de la Salud, 2016; Federación Internacional de Diabetes, 2019). En México, la diabetes es la segunda causa de muerte ubicándose sólo por debajo de las enfermedades cardiovasculares (Secretaría de Salud, 2019).

En la diabetes, la hiperglucemia crónica resulta esencialmente de una producción y secreción nula o deficiente de insulina (en la diabetes tipo-1) o tanto de una respuesta deficiente a esta hormona por parte de sus órganos blanco como la deficiencia de secreción de insulina (en la diabetes tipo-2) (Federación Internacional de Diabetes, 2019).

La insulina es una hormona anabólica producida exclusivamente por las células β del páncreas y que es secretada principalmente en respuesta a la glucosa (Bouwens & Rومان, 2005; Fu, Gilbert, & Liu, 2013). La cantidad total de insulina secretada a la circulación depende del número de células β , y de la capacidad de estas para producir y secretar la hormona en respuesta al aumento de las concentraciones sanguíneas de glucosa (Chen, Cohrs, Stertmann, Bozsak, & Speier, 2017).

La pérdida en el número y la función de las células β ocurre tanto en la diabetes tipo 1 como en la tipo 2 (Aguayo-Mazzucato & Bonner-Weir, 2018). Por lo tanto, enfoques alternativos en el tratamiento de la DM se centran en reducir la pérdida de células β , promover su proliferación y recuperar su función. En este sentido, los factores de crecimiento que promueven la proliferación y supervivencia de las células β revisten gran interés (Bouwens & Rومان, 2005). En el presente trabajo investigamos a la hormona prolactina como uno de estos factores.

El receptor de la prolactina se encuentra presente en células β del páncreas (R. L. Sorenson & Stout, 1995) y se conoce que el tratamiento con prolactina aumenta alrededor de 2.5 veces la proliferación, la síntesis de insulina en respuesta a glucosa y la supervivencia de las células β tanto en islotes aislados de la rata como de la línea celular secretora de insulina INS-1 (Fujinaka, Takane, Yamashita, & Vasavada, 2007; Stout, Svensson, & Sorenson, 1997; Weinhaus, Stout, Bhagroo, Brelje, & Sorenson, 2007). Por su parte, el ratón nulo para el receptor de la prolactina (*Prlr*^{-/-}), cepa 129/SvJ, presenta menor densidad de células β y una reducida expresión del ARNm de insulina y de la proteína (Freemark et al., 2002). Además, la prolactina participa en la expansión de la masa de células β durante el embarazo, necesaria para satisfacer el aumento de la demanda metabólica de dicho estadio reproductor (Banerjee et al., 2016; Gorvin, 2015). Ratones nulos para el receptor de la prolactina, específicamente en las células β , de la cepa C57BL/6J desarrollan diabetes gestacional (Banerjee et al., 2016). Más aún, estudios clínicos han correlacionado niveles bajos de prolactina circulante (dentro del rango fisiológico) con un mayor riesgo y prevalencia de diabetes, así como con alteraciones en la regulación de la glucosa (Balbach et al., 2013; J. Li et al., 2018; Macotela, Triebel, & Clapp, 2020; R. Wagner et al., 2014; T. Wang et al., 2013).

Sin embargo, el efecto de la prolactina en la condición diabética y fuera del embarazo ha sido poco explorado. Hasta el momento, solo un estudio ha reportado el efecto de la administración exógena de prolactina en la diabetes experimental con estreptozotocina (Holstad & Sandler, 1999), encontrándose que el tratamiento con la hormona reduce el estado de hiperglucemia. Sin embargo, no se valoraron los niveles circulantes de prolactina alcanzados después del tratamiento, por lo que es difícil dilucidar entre un efecto farmacológico o fisiológico de la hormona. El mecanismo participante en el efecto protector de la prolactina contra la diabetes inducida por estreptozotocina tampoco fue estudiado.

En esta tesis investigamos la contribución de la prolactina endógena y su posible mecanismo protector en la diabetes inducida por estreptozotocina, a través de comparar la incidencia y severidad de la enfermedad en ratones nulos (*Prlr*^{-/-}) o no (*Prlr*^{+/+}) para el receptor de la prolactina. Encontramos que los ratones *Prlr*^{-/-}

expresaron un fenotipo diabético más severo que se manifestó a través de mayor hiperglucemia e intolerancia a la glucosa, así como con el desarrollo de resistencia a la insulina. Consistente con una mayor gravedad de la diabetes, la ausencia de señalización de prolactina se asoció con menor densidad de islotes pancreáticos, disminución en el número de células β y niveles de insulina circulantes más bajos, así como con una menor proliferación y mayor apoptosis de las células β y mayor inflamación local del páncreas. Estos hallazgos muestran que la prolactina favorece la homeostasis de la glucosa en la diabetes inducida por estreptozotocina mediante mecanismos que incluyen la estimulación de la supervivencia y la proliferación de las células β y la reducción de la inflamación pancreática, lo que respalda el efecto protector de la prolactina en la diabetes.

II. ANTECEDENTES

II.1. El páncreas y la homeostasis de la glucosa

El páncreas es el único órgano en el cuerpo con componentes celulares exócrinos y endócrinos entremezclados en el parénquima (Pandiri, 2014). Es definido como una glándula mixta que desempeña un papel central en la digestión de los macronutrientes y en la homeostasis del metabolismo mediante la liberación de varias enzimas digestivas y hormonas (Roder, Wu, Liu, & Han, 2016).

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

esplénico, que son homólogos a la cabeza, cuerpo y cola del páncreas humano, respectivamente (Dolensek et al., 2015).

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

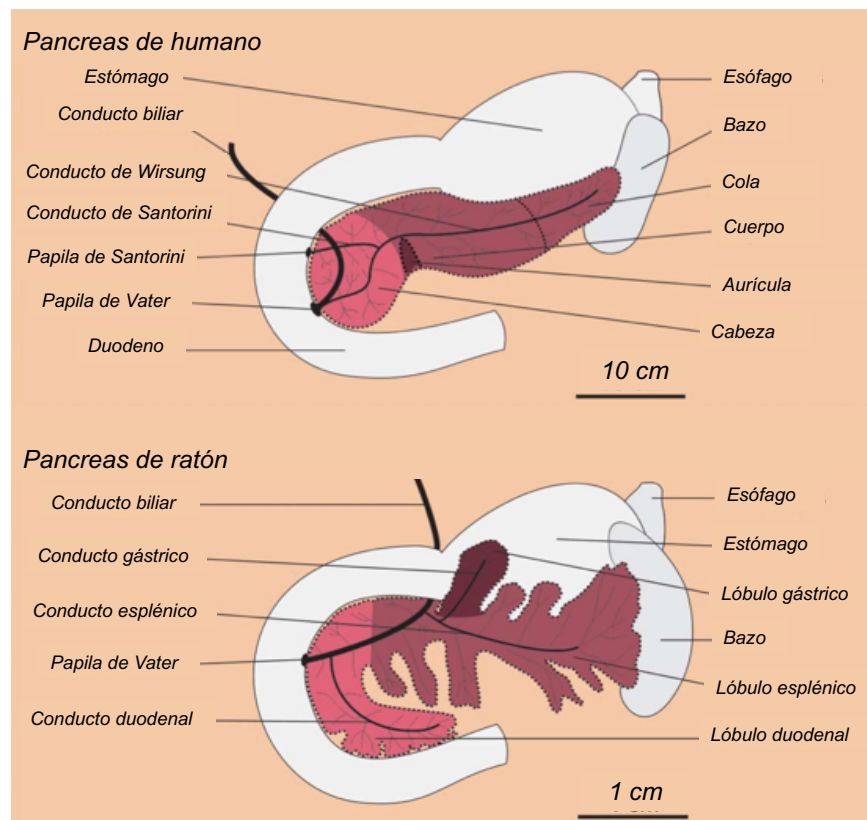


Figura 1. Anatomía macroscópica del páncreas en el humano y el ratón. El páncreas humano consta de la cabeza, cuerpo y cola mientras que el páncreas de ratón tiene tres

lóbulos que están menos definidos que las partes del páncreas humano y son lóbulos duodenal, gástrico y esplénico. El código de colores indica regiones homólogas entre ambas especies [obtenida y modificada de (Dolensek et al., 2015)].

a. *Páncreas endócrino*

Las estructuras multicelulares llamadas islotes de Langerhans constituyen la unidad endócrina, anatómica y funcional del páncreas y comprenden del 1 al 4% del volumen total del órgano (Dolensek et al., 2015). Los islotes de Langerhans se componen de células endócrinas las cuales se agrupan formando a los islotes pancreáticos, además de ubicarse en los islotes, se pueden encontrar diseminadas a lo largo del tejido acinar y ductal como células endocrinas aisladas. Hasta el momento, se han encontrado al menos 5 tipos de células endócrinas en los islotes pancreáticos: las células α que producen glucagon y representan del 20 al 40% de la masa celular de los islotes en humanos y del 10 al 20% en ratón; las células β productoras de insulina, péptido C y amilina que representan entre el 50 y 70% del total de células dentro del islote en humanos y entre el 60 y 80% en ratón; las células γ que producen el polipéptido pancreático (PP) y las células δ productoras de somatostatina que comprenden del 3 al 5% y del 3 al 10% del total de células de los islotes en el humano y el ratón, respectivamente; y finalmente, las células ϵ productoras de grelina que comprenden alrededor 1% de las células de los islotes (Dolensek et al., 2015; Roder et al., 2016). Cada una de las hormonas pancreáticas tiene funciones distintas. El glucagon aumenta los niveles de glucosa en sangre, mientras que la insulina los disminuye. La somatostatina tiene un papel predominantemente parácrino para ajustar la regulación de la glucosa en sangre por el islote. Cuando los niveles de insulina son altos y la glucosa baja, la somatostatina inhibe la liberación de insulina, pero cuando la insulina es baja y la glucosa alta, inhibe la liberación de glucagon. Además, la somatostatina actúa en el intestino para inhibir la secreción de hormonas gastrointestinales, la secreción de pepsina, la motilidad y el flujo sanguíneo. Por su parte el polipéptido pancreático regula la actividad de secreción exócrina y endócrina del páncreas, aunque sus funciones siguen siendo poco claras. Finalmente, se ha sugerido que la grelina

inhibe la secreción de insulina estimulada por glucosa por las células β y puede resultar ser un importante regulador del metabolismo y la obesidad. En conjunto, estas hormonas regulan la homeostasis de la glucosa en los vertebrados (Brennan & Melton, 2009; Roder et al., 2016).

Los nervios parasimpáticos, simpáticos y sensoriales inervan profusamente los islotes de Langerhans y los respectivos neurotransmisores y neuropéptidos liberados de sus terminales nerviosas ejercen importantes efectos reguladores sobre la liberación de las hormonas pancreáticas. La acetilcolina, el polipéptido intestinal vasoactivo, el polipéptido activador del adenilato ciclasa pituitario y el péptido liberador de gastrina son liberados desde las terminales nerviosas parasimpáticas. La noradrenalina, la galanina y el neuropéptido Y se liberan de las terminales nerviosas simpáticas. La activación del nervio vagal estimula la secreción de insulina, glucagon, somatostatina y polipéptido pancreático. La estimulación nerviosa simpática inhibe la secreción de insulina basal y estimulada por glucosa, la liberación de somatostatina y estimula la secreción de glucagon y polipéptido pancreático (Rodríguez-Díaz & Caicedo, 2014).

Aunque los islotes tienen una composición celular similar entre diferentes especies, como humano, rata y ratón, parece que difieren en su citoarquitectura. La arquitectura de los islotes en roedores se caracteriza por la ubicación de células β en el centro y las células no- β en la periferia rodeando las células secretoras de insulina (Fig. 2) (Quesada, Tuduri, Ripoll, & Nadal, 2008). Esta distribución celular, junto con varios estudios sobre la microcirculación dentro del islote, sugiere que el orden de las interacciones parácrinas va de la célula β a las células α y δ . La rica vascularización del islote asegura además una detección rápida de niveles de glucosa en plasma por estas células endocrinas, permitiendo una respuesta secretora hormonal apropiada (Roder et al., 2016). Como se indicó anteriormente, existen diferencias importantes en la composición y organización espacial celular de los islotes humanos en comparación a la de los roedores. Mientras que la proporción de células δ y PP es similar, en el humano las células β son menos abundantes y la población de células α es mayor, lo que sugiere que la secreción de glucagon juega un papel más relevante en humanos. Además, en las personas

las células del islote muestran un patrón de distribución dispersa aleatoria, donde la mayoría de las células β están en contacto con células no β , lo que sugiere que se favorecen las interacciones parácrinas entre las diferentes poblaciones celulares (Quesada et al., 2008; Roder et al., 2016). Sin embargo, a pesar de dichas diferencias, se ha demostrado que en roedores y humanos la arquitectura de los islotes es dependiente de su tamaño, donde los islotes más pequeños ($<100 \mu\text{m}$ de diámetro) muestran una organización tipo manto (células β rodeadas de células no- β) mientras que los islotes más grandes presentan una organización celular más compleja y heterogénea (Dolensek et al., 2015). Además de la intercomunicación parácrina, la mayor parte de las células beta de islote están intercomunicadas por canales intercelulares, lo que permite su sincronía funcional que es necesaria para una adecuada secreción de la insulina (Perez-Armendariz, 2013).

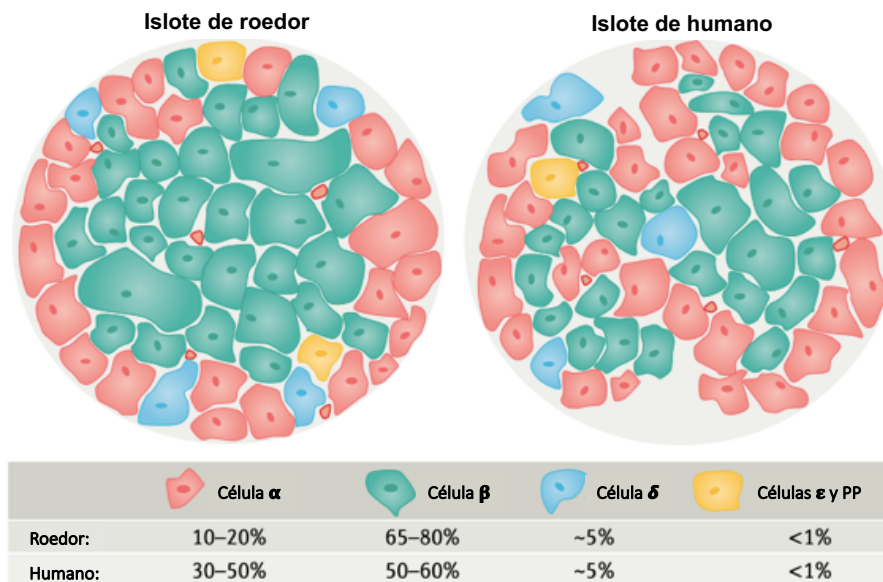


Figura 2. Citoarquitectura del islote de Langerhans en humanos y roedores. El islote de roedor sigue un patrón de distribución celular tipo “manto-núcleo” mientras que en el islote de humano se observa más un patrón tipo “emparedado” de las células β dentro del islote [obtenida y modificada de (Campbell & Newgard, 2021)].

b. Páncreas exócrino

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

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

c. Homeostasis de la glucosa

A través de sus diversas hormonas, particularmente el glucagón y la insulina, el páncreas endócrino mantiene los niveles de glucosa en la sangre dentro de un

rango estrecho. Esta preservación se lleva a cabo por las acciones opuestas y equilibradas del glucagon y la insulina responsables de la homeostasis de la glucosa (Alsahli, Shrayyef, & Gerich, 2017). Durante el sueño o entre comidas, cuando los niveles de glucosa en la sangre son bajos, el glucagon se libera de las células α para promover la glucogenólisis hepática. Además, el glucagon estimula la gluconeogénesis hepática y renal para aumentar los niveles de glucosa endógena en sangre durante el ayuno prolongado. En contraste, la secreción de insulina de las células β es estimulada por niveles elevados de glucosa exógena, como los que ocurren después de una comida (Aronoff, Berkowitz, Shreiner, & Want, 2004; Roder et al., 2016).

La insulina se sintetiza como preproinsulina, la cual experimenta la escisión de su péptido señal durante la inserción en el retículo endoplásmico, generando proinsulina. En el retículo endoplásmico, la proinsulina es procesada por endopeptidasas específicas que dan lugar a la insulina y al péptido C, los cuales se almacenan en gránulos de secreción en espera de ser liberados bajo demanda (Fu et al., 2013).

Las células β se caracterizan por la expresión de insulina y del péptido C, por los transportadores de glucosa (GLUT2 principalmente en roedores, mientras que en humanos se expresa además GLUT1 y GLUT3) y por el factor de transcripción Pdx1, determinantes de la función adecuada de las células β (Brennand & Melton, 2009).

La unión de insulina a su receptor da como resultado la dimerización y transfosforilación de las subunidades beta del receptor, provocando la activación de la tirosina cinasa intrínseca y con ello la activación de una compleja cascada de señalización (Fig. 3) que, dependiendo del tejido donde actúa, da como resultado: 1) la supresión de la liberación de glucosa del hígado y del riñón; 2) la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) a la membrana citoplasmática para aumentar la captación de glucosa en el músculo y tejido adiposo provocando; 3) la inhibición de la liberación de ácidos grasos libres por lipólisis en el tejido adiposo; y 4) la síntesis de proteínas. Por último, la insulina inhibe la secreción de glucagon de

las células α pancreáticas, lo que provoca que el hígado deje de producir glucosa a través de la glucogenólisis y la gluconeogénesis.

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

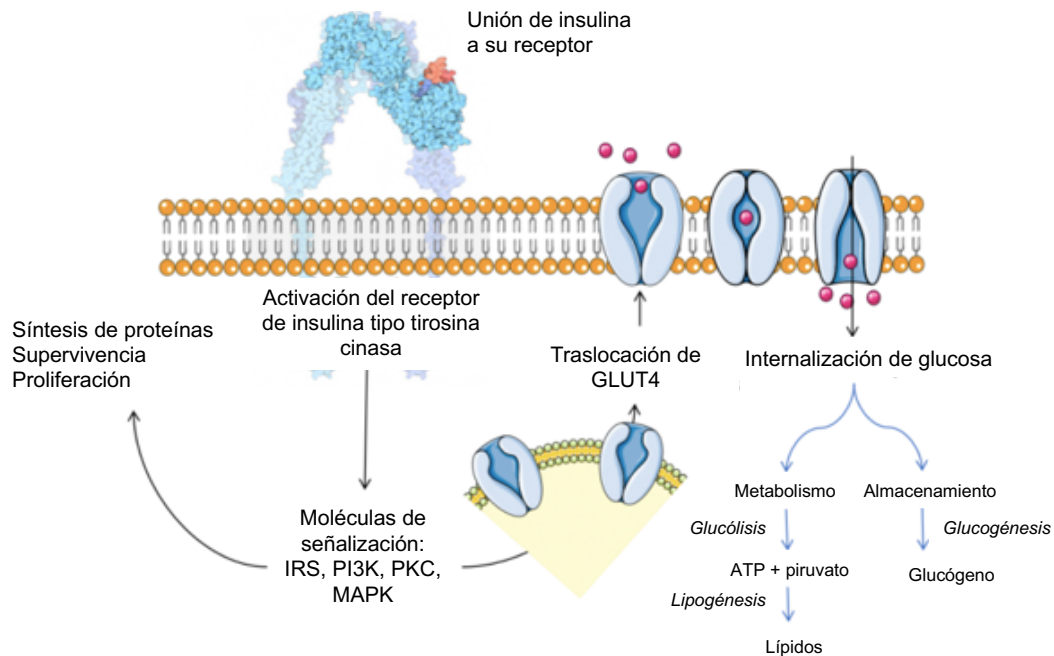


Figura 3. Efectos canónicos de la señalización de la insulina. El esquema resume los principales efectos derivados de la unión de insulina a su receptor [(obtenida y modificada de (Siddle, 2011)].

II.2. Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus o simplemente diabetes es una de las enfermedades más comunes relacionada con trastornos hormonales del páncreas (Sapra & Bhandari, 2021) y se caracteriza por la incapacidad para mantener la homeostasis de la glucosa (Brennand & Melton, 2009). La fisiopatología de la diabetes implica la entrada deficiente de glucosa a las células y la acumulación de glucosa en la sangre,

lo que resulta en un estado de hiperglucemia crónico. En base a la etiopatogenia de la enfermedad, hay dos tipos principales de diabetes, la diabetes autoinmune de tipo-1 (diabetes tipo-1 o diabetes insulino-dependiente), causada por una deficiencia de la secreción de insulina, y la diabetes tipo-2 (diabetes tipo-2 o en el pasado también llamada como diabetes no insulino-dependiente) que es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una insuficiente respuesta compensatoria de la insulina secretada (Cejkova, Fojtikova, & Cerna, 2009; Sapa & Bhandari, 2021).

La diabetes tipo-1 es el resultado de la destrucción de las células β . Representa alrededor del 5 al 10% de los casos, y ocurre más frecuentemente en personas jóvenes, de ahí que también se le conozca como diabetes juvenil. La diabetes tipo-1 se caracteriza por el desarrollo de cetoacidosis en ausencia de terapia con insulina. Por su parte, la diabetes tipo-2 comprende más del 90% de los casos de diabetes y está asociada con la resistencia a la insulina, así como la falta de una compensación adecuada de secreción de insulina por las células β que conduce a una deficiencia relativa de esta hormona. Por lo general, la diabetes tipo-2 se asocia con la obesidad en adultos, se caracteriza por hiperglucemia con niveles más bajos que los presentes en la diabetes tipo-1 y rara vez conduce a la cetoacidosis (King, 2012; Radenkovic, Stojanovic, & Prostran, 2016; Sapa & Bhandari, 2021).

Pese a sus diferencias, es claro que la pérdida de la masa pancreática funcional causada por la muerte y la disfunción de las células β desempeña un papel importante en la patogénesis de los dos tipos de diabetes (Fu et al., 2013). De manera interesante, los pacientes que padecen diabetes por un tiempo prolongado retienen células β residuales a pesar de su pérdida inicial. Por lo tanto, un foco primario para el tratamiento de la diabetes es normalizar la homeostasis de las células β remanentes, reduciendo su pérdida, recuperando su función y promoviendo su regeneración. Sin embargo, las células β tienen una tasa baja de proliferación basal (Kondegowda et al., 2015). Esto sugiere que factores que puedan aumentar el número y función de las células β poseen potencial terapéutico en el tratamiento de la diabetes. La identificación de mediadores químicos con dichos efectos se apoya en gran medida en modelos experimentales de este padecimiento.

II.3. Diabetes experimental

Los estudios en seres humanos que exploran los mecanismos responsables de los cambios causados por la diabetes son limitados no sólo por razones éticas, sino también por la variabilidad interindividual (dieta, factores socioeconómicos, nutrición y factores genéticos) que pueden alterar los resultados. Por lo tanto, se vuelve necesario el desarrollo de modelos experimentales donde generar conocimiento sobre la fisiopatología, el desarrollo de nuevas terapias y los mecanismos moleculares que los determinan (Damasceno et al., 2013). Se han desarrollado varios modelos animales para el estudio de la diabetes, que incluyen estrategias químicas, quirúrgicas (pancreatectomía) y manipulaciones genéticas en varias especies animales para inducir esta enfermedad (Dhuria, Singh, Kaur, Kaur, & Kaur, 2015).

En los modelos químicos de diabetes, un alto porcentaje de las células β se destruyen y la poca producción de insulina endógena conduce a hiperglucemia crónica y pérdida de peso. En este sentido los roedores son excelentes para desarrollar modelos simples y relativamente baratos de diabetes experimental (King, 2012; Radenkovic et al., 2016) mediante el uso de fármacos diabetogénicos que incluyen al aloxan monohidrato, la estreptozotocina, el nitrilotriacetato férrico, la ditizona y el suero anti-insulina, siendo los más frecuentemente utilizados la estreptozotocina y el aloxan (Dhuria et al., 2015). Sin embargo, la estreptozotocina es más usada que el aloxan debido a que presenta algunas ventajas tales como un tiempo de vida media más largo, mayor estabilidad, mejor eficacia para inducir la diabetes y menor número de complicaciones como cetoacidosis o mortalidad (Chatzigeorgiou, Halapas, Kalafatakis, & Kamper, 2009; Radenkovic et al., 2016).

a. Modelo de diabetes experimental inducida por estreptozotocina

La estreptozotocina aislada de *Streptomyces achromogenes* es un antibiótico antitumoral de amplio espectro que posee propiedades diabetogénicas caracterizadas por la destrucción selectiva de las células β de los islotes

pancreáticos que resultan en deficiencia de insulina, hiperglucemia, polidipsia y poliuria y mimetizan de esa manera a la DM (K. K. Wu & Huan, 2008). La estructura química de la estreptozotocina (Fig. 4) consiste en una molécula de glucosa unida a una metilnitrosourea altamente reactiva responsable de los efectos citotóxicos de la estreptozotocina; el residuo de glucosa dirige al compuesto a las células β pancreáticas a través de unirse selectivamente al transportador de glucosa, GLUT2 (K. K. Wu & Huan, 2008). Como se mencionó anteriormente, el GLUT2 es abundante en la membrana plasmática de la célula β , por lo tanto, este tipo celular es el blanco de la estreptozotocina.

Se han propuesto mecanismos para describir cómo es que el residuo de metilnitrosourea provoca su efecto citotóxico y causa tanto necrosis como apoptosis de las células β . Las tres principales vías involucradas incluyen: 1) la metilación del ADN a través de la formación del catión metilo (CH_3^+) que resulta en la activación de la enzima nuclear poli ADP-ribosa sintetasa como parte del mecanismo de reparación celular y agotamiento del NAD^+ ; 2) producción de óxido nítrico (NO) ya que la estreptozotocina actúa como donador de NO aumentando en consecuencia la actividad de la guanilato ciclasa y la formación de GMPc ; y 3), la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo. El tratamiento con estreptozotocina causa un aumento significativo de especies oxidantes como el malonaldehído y disminuye las enzimas antioxidantes tales como catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en el páncreas (Eleazu, Eleazu, Chukwuma, & Essien, 2013). Es importante mencionar que las células β son particularmente susceptibles al efecto del óxido nítrico y al estrés oxidativo debido a su bajo potencial antioxidante (Yamamoto et al., 2010).

La estreptozotocina induce el estado diabético a través de dos mecanismos diferentes que dependen de la dosis empleada. A dosis altas (70-250 mg/kg de peso), provoca de manera rápida e irreversible la destrucción completa de las células β a las cuales dirige sus propiedades alquilantes y proapoptóticas correspondientes a los efectos citotóxicos mencionados del componente nitrosourea. En dosis bajas y múltiples exposiciones (30-55 mg/kg de peso por 5 días) (Deeds et al., 2011), la estreptozotocina provoca una reacción inmune e

inflamatoria, probablemente relacionada con la liberación de autoantígenos como la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) (Graham, Janecek, Kittredge, Hering, & Schuurman, 2011), uno de los antígenos más relevantes para la activación de la autoinmunidad celular β -específica (Jun, Khil, & Yoon, 2002). Bajo esta condición, se induce una lesión subóptima que causa una destrucción parcial de las células β y, por ende, una inducción del estado hiperglucémico asociada a la deficiencia de insulina y a la presencia de infiltrados inflamatorios en los islotes pancreáticos (Graham et al., 2011). Por lo tanto, bajo dosis bajas y repetidas de estreptozotocina, la progresión de la diabetes depende, en parte, de una insulinitis autoinmune secundaria (Tesch & Allen, 2007). Además, la toxicidad inicial de la estreptozotocina causa la destrucción parcial de células β y es de corta duración, dejando una fracción celular residual que sobrevive al daño cuyo deterioro se debe en gran medida a la toxicidad a consecuencia de la hiperglucemia (J. Wu & Yan, 2015). La sensibilidad a la estreptozotocina es muy variable en roedores. Algunos factores que pueden alterar dicha sensibilidad incluyen al estrés, el género (los ratones machos tienden a ser más susceptibles), la edad, la dieta y el peso (Deeds et al., 2011). Este modelo de diabetes permite estudiar la acción de factores capaces de promover la proliferación y supervivencia de las células β -pancreáticas y, por ende, su valor potencial para contrarrestar la diabetes. Entre estos factores se encuentra la hormona prolactina.

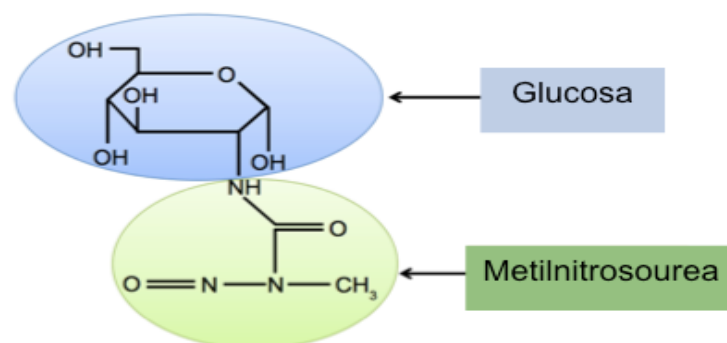


Figura 4. Estructura química de la estreptozotocina. Químicamente la molécula de estreptozotocina está conformada por un residuo de glucosa unido a un residuo de metilnitrosourea. Mientras que la molécula de metilnitrosourea le confiere el poder citotóxico

a la estreptozotocina causando metilación del ADN, la molécula de glucosa se mimetiza con la glucosa endógena para dirigir al fármaco selectivamente hacia los transportadores de glucosa 2 (GLUT 2) que son abundantes en la membrana plasmática de las células β [obtenida y modificada de (K. K. Wu & Huan, 2008)].

II.4. Hormona prolactina y su receptor

La prolactina es una hormona polipeptídica de 199 aminoácidos (aa) que se sintetiza y secreta a partir de células especializadas de la glándula pituitaria anterior, conocidas como lactotrofos. De acuerdo con su estructura terciaria, la prolactina está organizada en 4 α -hélices dispuestas de manera antiparalela que están unidas por asas flexibles (Fig. 5A) (Freeman, Kanyicska, Lerant, & Nagy, 2000).

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

El receptor de la prolactina corresponde a una proteína de un solo pase transmembranal que pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas clase 1 (Freeman et al., 2000). Se expresa en numerosos tipos celulares y tejidos de los mamíferos. De hecho, es difícil encontrar un tejido en el cual no se haya identificado la presencia del receptor de la prolactina (Kelly et al., 2001). Se han descrito esencialmente 3 isoformas del receptor de la prolactina como resultado del procesamiento alternativo de un único gen. Estas isoformas tienen el mismo dominio

extracelular y varían en la longitud y composición de su dominio citoplásmico, por lo que se denominan como corto, intermedio y largo (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000). En la rata, las isoformas del receptor de la prolactina contienen 291 aa (corto), 393 aa (intermedio) y 591 aa (largo). Por su parte, en el ratón, se han identificado una forma larga y tres isoformas cortas, las cuales sólo se diferencian por unos pocos aminoácidos en la región C-terminal de extremo citoplásmico (Bole-Feysot et al., 1998). En este sentido, se ha reportado que el páncreas, al igual que otros órganos como el ovario, la glándula adrenal, el riñón, el intestino delgado, la glándula mamaria y el hígado expresan altos niveles del receptor largo de la prolactina (Binart, Bachelot, & Bouilly, 2010).

Aunque las vías de señalización del receptor largo de la prolactina se han caracterizado bien, se sabe poco acerca de las acciones de la prolactina mediadas por su receptor corto. La señalización de prolactina a través de la isoforma larga activa muchos tipos de cinasas (Bernard, Young, Chanson, & Binart, 2015).

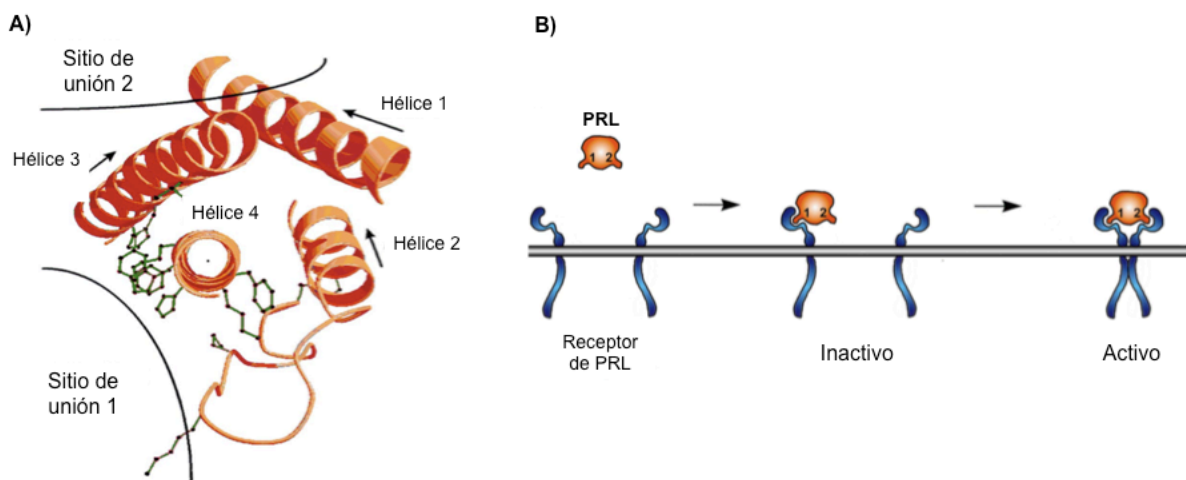


Figura 5. Hormona prolactina y su receptor. A) Estructura terciaria en 3D de la prolactina humana modelada sobre la base de su estructura cristalográfica. Se aprecian las cuatro hélices plegadas que la conforman, así como sus dos sitios de unión al receptor. B) Activación del receptor de la prolactina por dimerización al unirse a una sola molécula de prolactina. La unión de la hormona a su receptor es secuencial. Primero la prolactina interactúa con su receptor a través de su sitio de unión 1 formando un complejo inactivo. En seguida, la hormona se une a un segundo receptor a través de su sitio 2, lo que conduce

a la homodimerización del receptor y a la formación de un complejo activo [obtenida y modificada de (Bole-Feysot et al., 1998)].

El primer paso en la activación del receptor de la prolactina es su homodimerización inducida por ligando, es decir, una molécula de prolactina se une a dos moléculas del receptor a través de dos sitios diferentes en su estructura (Fig. 5B) con una mayor afinidad por el sitio de unión 1 que por el sitio de unión 2 (K_d del sitio 1 de 6.5 nM, K_d del sitio 2 de 32.9 μ M) (Brooks, 2012). Aunque no está presente ninguna actividad enzimática intrínseca en el dominio intracelular del receptor de la prolactina, se ha demostrado que una tirosina cinasa asociada de la familia de las Janus cinasas, la JAK2 (“Janus kinasa 2”) se activa después de la dimerización. Esta etapa de activación implica la fosforilación de la tirosina cinasa JAK, que a su vez fosforila residuos de tirosina presentes en el receptor de la prolactina. Los transductores de señales y activadores de la transcripción STAT (“signal transduction activator of transcription”), que están presentes en el citoplasma, migran al receptor de la prolactina y se enlazan a los residuos de tirosina fosforilados a través de dominios SH2. Las STAT son a su vez fosforiladas por JAK2, lo que determina su disociación del receptor de la prolactina, su dimerización y su migración al núcleo donde se unen a secuencias específicas en el promotor de genes inducidos por prolactina, activando la maquinaria de la transcripción en lo que se conoce como la vía canónica de señalización por prolactina. Además de la vía JAK2-STAT, otras vías como MAPK (“mitogen-activated protein kinases” o proteína cinasas activadas por mitógenos) y PI3K/AKT (fosfatidilinositol 3-cinasa) también son activadas a través del receptor de la prolactina mediante la activación de la familia de Scr de tirosinas cinasas (Fig. 6) (Bernard et al., 2015; Freeman et al., 2000; Kelly et al., 2001).

El desarrollo de una línea de ratón deficiente del receptor de la prolactina es un buen modelo para la mejor comprensión de las múltiples funciones de la hormona y su receptor. Los ratones nulos para el receptor de la prolactina presentan un fenotipo particular. Las hembras homocigóticas son estériles y carecen de un desarrollo mamario normal, mientras que los heterocigóticos son incapaces de lactar después

de su primer embarazo; tanto machos como hembras presentan hiperprolactinemia y en algunos casos la hiperplasia hipofisaria está presente. El comportamiento materno se ve afectado tanto en animales homocigotos como heterocigotos. La formación ósea disminuye en animales jóvenes y adultos (machos y hembras). Finalmente, se ha observado que este tipo de ratones muestran una ligera reducción en el peso corporal que parece ser debido a la reducción de la deposición de grasa abdominal (Kelly et al., 2001). Este fenotipo es consistente con la multiplicidad de los efectos de la hormona que originalmente se identificó por su capacidad de estimular el desarrollo y función de la glándula mamaria. La multiplicidad de efectos de la prolactina se agrupa en seis grandes categorías: reproducción y la lactancia, crecimiento y desarrollo, endocrinología y metabolismo, cerebro y comportamiento, inmunomodulación y osmorregulación (Kelly et al., 2001).

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

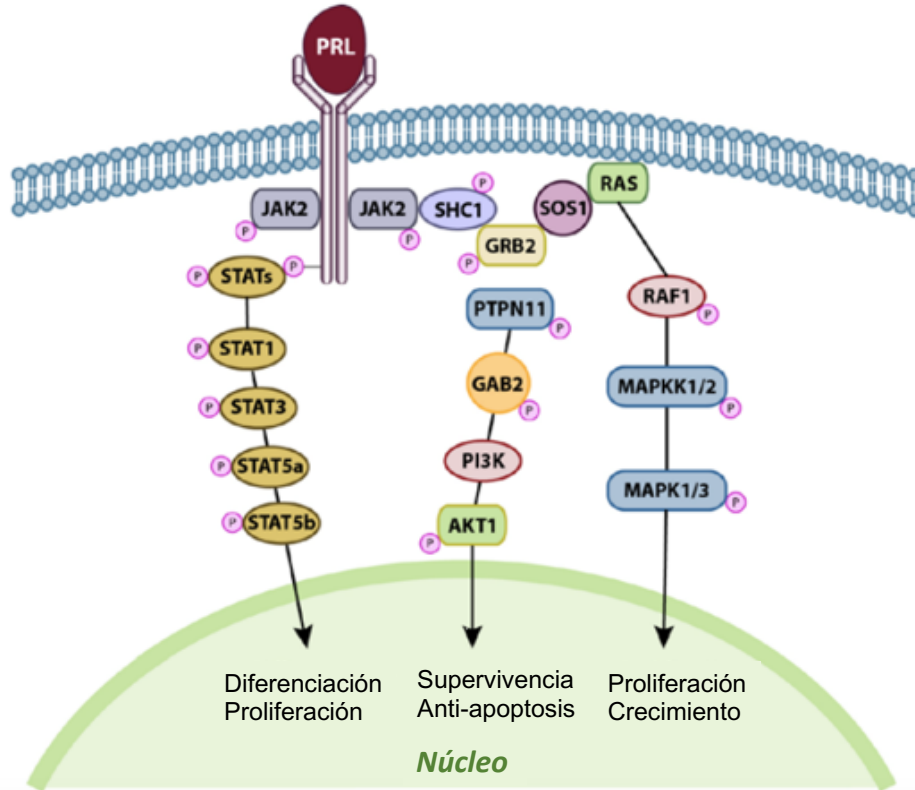


Figura 6. Principales vías de señalización activadas por la unión prolactina-receptor de prolactina. La activación del receptor de la prolactina inducida por su ligando (prolactina) desencadena varias cascadas de señalización. La vía principal involucra JAK2-STAT5. Las vías MAPK y PI3K son otras cascadas de señalización importantes activadas por prolactina [obtenida y modificada de (George, 2013)].

II.5. Efecto de la prolactina en las células β y en la diabetes

El papel de las hormonas pituitarias en la regulación de la homeostasis de la glucosa fue reconocido por primera vez por Bernardo Houssay en 1936. A partir de entonces, en varios estudios se ha demostrado que la prolactina y la hormona del crecimiento hipofisarias, así como el lactógeno placentario, secretado por la placenta durante el embarazo, están implicados en la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos y causan cambios en la función de los islotes pancreáticos. Si bien se desconocía hasta qué punto esto era reflejo de un efecto directo de las hormonas sobre los islotes o consecuencia de sus acciones indirectas

sobre otros tejidos. Para la década de 1960, fue posible examinar el efecto directo de estas hormonas tanto en islotes aislados (*in vitro*) como en el páncreas de animales (*in vivo*). Desafortunadamente, en dichos experimentos, se utilizaron hormonas humanas, que dado a su alto grado de relación estructural comparten receptores entre sí. Por ejemplo, la hormona del crecimiento humana es un muy buen agonista del receptor de la prolactina por lo que no se les pudo atribuir con certeza la especificidad hormonal de los efectos observados (Robert L. Sorenson & Brelje, 2001).

Para obtener una mejor comprensión de si estas hormonas tienen efectos únicos o compartidos sobre la función de los islotes, se examinó el efecto de la prolactina, la hormona del crecimiento y el lactógeno placentario en islotes aislados de varias especies. Los primeros estudios que sugirieron efectos de la prolactina específicamente sobre las células β del páncreas se llevaron a cabo hace más de 30 años. Nielsen reportó que la hormona del crecimiento, la prolactina y el lactógeno placentario estimulan la producción de insulina y la síntesis de ADN en islotes de Langerhans aislados de la rata, pero no dejó en claro si el efecto observado se presentaba por una acción directa sobre las células β o bien a través de factores de crecimiento producidos localmente (Nielsen, 1982). Años después, se demostró que las células productoras de insulina expresan al receptor de la prolactina (Moldrup, Billestrup, & Nielsen, 1990) y que los receptores de la prolactina se expresan también en las células α pero no en las células δ de los islotes del páncreas (R. L. Sorenson & Stout, 1995). Para 1993, el equipo de Brelje reprodujo el trabajo de Nielsen y concluyó que el lactógeno placentario y la prolactina son considerablemente más eficaces que la hormona del crecimiento para estimular la proliferación celular y la secreción de insulina en islotes de Langerhans aislados de rata, ratón y humano (Brelje et al., 1993). Estos resultados fueron apoyados a través de nuevos experimentos *in vitro* sobre cultivos de células β pancreáticas, donde se demostró que la prolactina estimula su proliferación y la síntesis de insulina (Brelje & Sorenson, 1991; Hugl & Merger, 2007) por medio de la activación de la vía de la JAK2 y la consecuente fosforilación/activación del factor de transcripción STAT5,

que, como se mencionó anteriormente, es la vía canónica de señalización de esta hormona (R. L. Sorenson & Stout, 1995; Weinhaus et al., 2007).

La acción fisiológica de la prolactina sobre la funcionalidad de las células β del páncreas se fundamentó en estudios *in vivo* utilizando animales desprovistos genéticamente del receptor de la prolactina, bajo el fondo genético 129/SvJ. En estos animales se encontró una disminución en el tamaño y densidad de los islotes, menor densidad de células β , disminución en la expresión de insulina y una menor secreción de insulina a la circulación ante un reto con alta glucosa (Freemark et al., 2002; Gorvin, 2015).

Por su parte, estudios en roedores han demostrado que los lactógenos (prolactina y lactógeno placentario) contribuyen a la expansión de la masa y aumento en la función de las células β durante el embarazo para contender con la alta demanda metabólica de dicho estado reproductivo, esto a través de la señalización del receptor de la prolactina (Baeyens, Hindi, Sorenson, & German, 2016). Además, ratones heterocigotos del receptor de prolactina y nulos de señalización de la prolactina específicamente en las células β del páncreas, desarrollan diabetes gestacional (Banerjee et al., 2016; Huang, Snider, & Cross, 2009).

Notablemente, los niveles circulantes de prolactina se encuentran disminuidos en ratas diabéticas bajo el modelo de estreptozotocina (Lemini et al., 2015) y, en la clínica, los pacientes con bajos niveles de prolactina sérica (menores a 6 ng/mL en promedio) se han correlacionado con un mayor riesgo de diabetes y alteraciones metabólicas en comparación con aquellos pacientes con altos niveles de prolactina dentro del rango fisiológico pero superior a 15 ng/mL (Balbach et al., 2013; J. Li et al., 2018; R. Wagner et al., 2014; D. Wang et al., 2013). Por lo tanto, es evidente que niveles bajos de prolactina circulante afectan negativamente la homeostasis de la glucosa (Fig. 7) (Macotela et al., 2020).

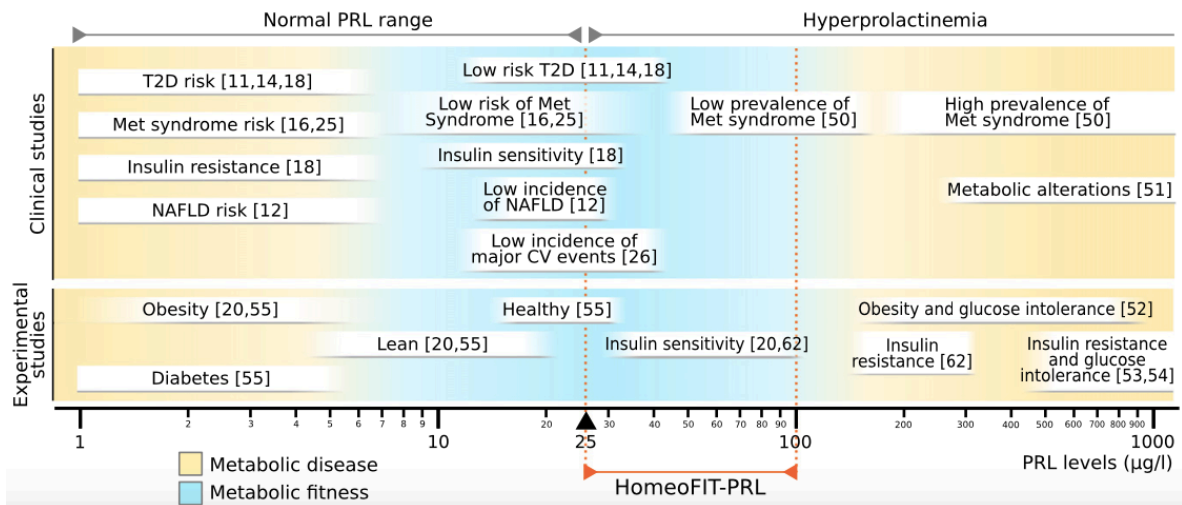


Figura 7. Niveles de prolactina sérica y sus efectos metabólicos. Diversos estudios señalan que niveles circulantes de prolactina dentro del rango fisiológico y del rango HomeoFIT-PRL, es decir, entre 7 y 100 ng/mL, están asociados con pocas alteraciones metabólicas y una condición saludable de los pacientes (mayor sensibilidad a la insulina, baja prevalencia de síndrome metabólico y bajo riesgo de desarrollo de DM). PRL: prolactina, T2D: diabetes tipo-2, HomeoFIT-PRL: prolactinemia transitoria homeostática funcionalmente aumentada [tomada íntegramente de (Macotela et al., 2020)].

En su conjunto, estos hallazgos sugieren un papel protector de la prolactina en la diabetes. Hasta el momento, el único estudio reportado *in vivo* sobre el efecto protector la prolactina en la diabetes es el realizado por Holstad y colaboradores hace 22 años en el modelo inducido por estreptozotocina. En este estudio se encontró que la administración de prolactina reduce los niveles de glucosa después del tratamiento con estreptozotocina (Holstad & Sandler, 1999), sin embargo, no se midieron los niveles de prolactina circulante alcanzados después del tratamiento, ni se determinó si la prolactina modifica la incidencia de la diabetes. Tampoco se analizaron los mecanismos a través de los cuales la prolactina estaría protegiendo contra la diabetes inducida por estreptozotocina. Al respecto, se reconoce que la estreptozotocina tiene efectos variables en parte debido al número residual de células β con potencial proliferativo que sobreviven al efecto de la toxina (Fig. 8) (J. Wu & Yan, 2015). Queda por determinar si la prolactina endógena tiene la

potencialidad de proteger o estimular la proliferación de esta población residual de células β , que fue uno de los objetivos del presente trabajo.

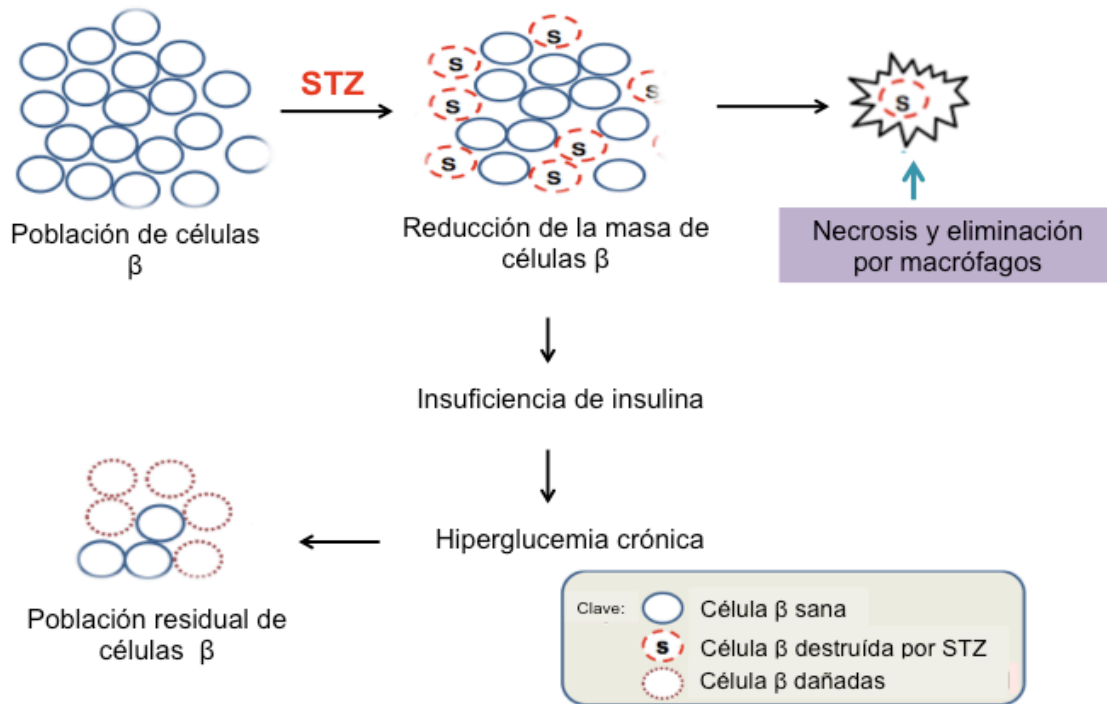


Figura 8. Mecanismo de glucotoxicidad de la célula β por estreptozotocina. En el esquema se muestra la destrucción parcial de la población de células β causada por estreptozotocina así como la reducción de su masa celular que induce insuficiencia de insulina e hiperglucemia crónica. STZ: estreptozotocina [obtenida y modificada de (J. Wu & Yan, 2015)].

III. JUSTIFICACIÓN

La diabetes es una enfermedad con alta prevalencia mundial caracterizada por un estado de hiperglucemia crónica debido a la producción insuficiente de insulina o a la disfunción en su vía de señalización. La pérdida del número y función de las células β del páncreas productoras de insulina subyacen a la patología tanto de la diabetes tipo-1 como tipo-2. El estudio de factores endógenos con capacidad de promover la proliferación y función de las células β representa un área de

oportunidad para el desarrollo de alternativas terapéuticas para el control de la diabetes. La prolactina es uno de estos factores, por lo que en esta tesis se propuso analizar el efecto protector de la prolactina a través de evaluar la prevalencia y severidad de la diabetes inducida por estreptozotocina en ratones carentes o no del receptor de la prolactina.

IV. HIPÓTESIS

La prolactina reduce la prevalencia y severidad del efecto diabetogénico de la estreptozotocina a través de estimular la supervivencia y proliferación de las células β pancreáticas.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la prolactina sobre la severidad y progresión de la diabetes a través de evaluar la supervivencia y proliferación de las células β en el modelo de diabetes inducida por estreptozotocina.

Objetivos particulares

Evaluar en ratones controles y diabéticos, nulos (*Prlr*^{-/-}) o no (*Prlr*^{+/+}) para el receptor de la prolactina:

- a. La prevalencia y severidad de la diabetes inducida por estreptozotocina
- b. La densidad de islotes de Langerhans y el número de célula β pancreáticas
- c. La proliferación de las células β pancreáticas
- d. La supervivencia de las células β pancreáticas

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Diseño experimental

Se emplearon ratones hembra ($Prlr^{+/+}$ y $Prlr^{-/-}$) de la cepa C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, distribuidos aleatoriamente, con acceso a agua y alimento *ad libitum*, bajo condiciones de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad y a una temperatura ambiental de 22°C aproximadamente. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

El experimento consistió en la inducción de diabetes con estreptozotocina durante la semana designada como semana 0 y el seguimiento semanal de los ratones durante las 11 semanas subsecuentes.

Desde la semana 0 y hasta la semana 11 se midieron los niveles de glucosa en sangre y el peso corporal de los ratones una vez por semana. En la semana 9 y 10 se realizaron las pruebas de tolerancia a la glucosa (GTT) y tolerancia a la insulina (ITT), respectivamente. Una vez iniciada la semana 11 los ratones fueron sacrificados (bajo anestesia con dióxido de carbono) y se recolectó el suero y el páncreas para su análisis histológico, celular y molecular (Fig. 9).

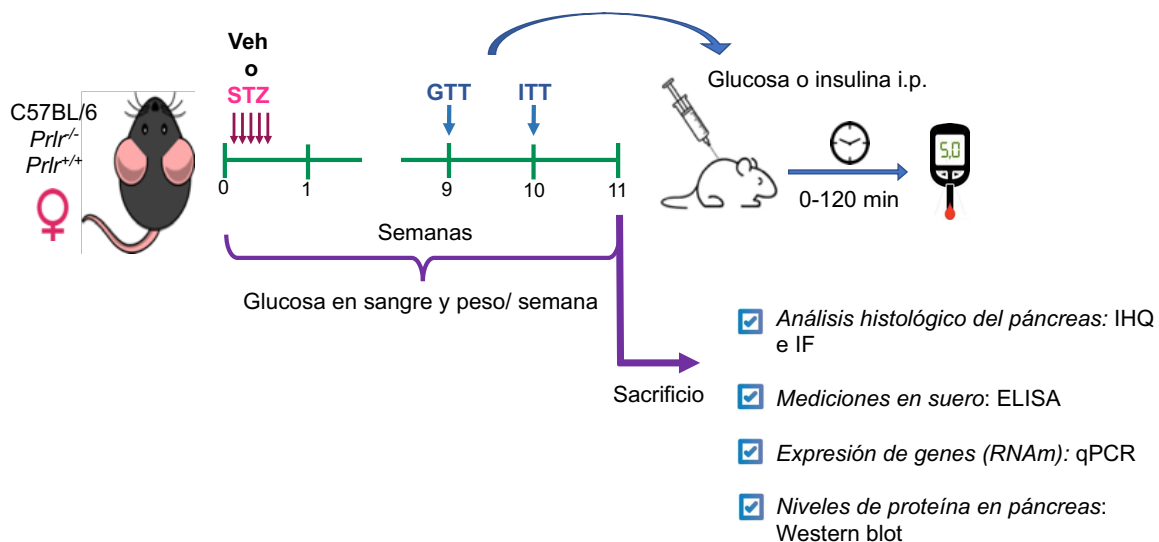


Figura 9. Esquema del diseño experimental. Se emplearon ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad, $Prlr^{+/+}$ y $Prlr^{-/-}$, las cuales recibieron 5 inyecciones intraperitoneales de estreptozotocina o vehículo durante la semana 0. Sus niveles de glucosa en sangre y peso

corporal fueron medidos una vez por semana desde la semana 0 hasta la semana 11. En la semana 9 y 10 se realizaron las pruebas metabólicas de tolerancia a la glucosa y tolerancia a la insulina. Finalmente, en la semana 11 los ratones fueron sacrificados y se recolectaron diferentes órganos para su posterior análisis. STZ: estreptozotocina, Veh: vehículo, GTT: prueba de tolerancia a la glucosa, ITT: prueba de tolerancia a la insulina, IP: intraperitoneal, IHQ: inmunohistoquímica, IF: inmunofluorescencia, ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, qPCR: ensayo de reacción en cadena de la polimerasa.

Se evaluaron los siguientes grupos experimentales:

- *Prlr*^{+/+} control (9 animales)
- *Prlr*^{-/-} control (8 animales)
- *Prlr*^{+/+} diabético (7 animales)
- *Prlr*^{-/-} diabético (17 animales)

VI.2. Modelo de inducción de diabetes con estreptozotocina

Para la inducción de diabetes se utilizó el modelo de dosis bajas y repetidas de estreptozotocina, el cual consiste en tratar a los animales por 5 días consecutivos con inyecciones intraperitoneales de estreptozotocina (55 mg/kg) (S0130-5G, Sigma), preparadas en fresco en solución amortiguadora de citratos pH 4.5 y administradas después de 4 h de ayuno (Tesch & Allen, 2007). Los grupos controles se inyectaron con vehículo (Veh) (solución amortiguadora de citratos) bajo el mismo esquema.

Niveles de glucosa en sangre por arriba de los 180 mg/dL indicaron la presencia de diabetes en un ratón joven (Grant et al., 2012), por lo tanto se empleó dicho valor para definir la presencia o ausencia de diabetes en los ratones del estudio.

VI.3. Medición de glucosa y peso

Los niveles de glucosa en sangre y el peso corporal de los ratones fueron determinados una vez por semana bajo condiciones de 4 h de ayuno. Para medir los niveles de glucosa se utilizó un glucómetro digital convencional y tiras reactivas (ACCU CHEK ACTIVE, Roche). La muestra de sangre se obtuvo a través de la vena

de la cola. Para medir el peso de los ratones se empleó una balanza digital (MS1602S, Mettler Toledo).

VI.4. Ensayo de tolerancia a la glucosa (“glucose tolerance test” o GTT)

Los animales fueron ayunados por un periodo de 12 h (de 21:00 a 9:00 h). Posteriormente se midieron los niveles de glucosa en sangre al tiempo 0 (niveles basales) y a los 15, 30, 60 y 120 min posteriores a la administración intraperitoneal de 2 g/kg de glucosa (Dextrosa 50%, Pisa Farmacéutica).

VI.5. Ensayo de tolerancia a la insulina (“insulin tolerance test” o ITT)

Los animales fueron ayunados por un periodo de 2 h (de 7:00 a 9:00 h). Posteriormente se midieron los niveles de glucosa en sangre al tiempo 0 (niveles basales) y a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la administración intraperitoneal de 0.75 UI/kg de insulina (Humulin R, Lilly).

VI.6. Determinación de insulina y glucagon séricos

Se cuantificaron los niveles séricos de insulina y glucagon mediante un ELISA comercial [Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit (90080, Crystal Chem) y Mouse Glucagon ELISA Kit (81518, Crystal Chem), respectivamente].

VI.7. Inmunohistoquímica (IHQ)

Las secciones correspondientes al lóbulo esplénico de los páncreas fueron fijadas en formalina al 10% y procesadas para parafina. Se realizaron cortes longitudinales de 5 μ m a intervalos de 200 μ m los cuales se desparafinaron, rehidrataron en tren de alcoholes y permeabilizaron con Triton X-100 al 0.1% y citrato de sodio al 0.1%. La recuperación del antígeno se llevó a cabo en una solución amortiguadora de citratos (citrato de sodio 10 mM, Tween 20 0.5%, pH=6.0) y presión a 110°C. Para la inmunohistoquímica se utilizaron diluciones de 1:1000 y 1:500 de los anticuerpos primarios policlonal anti-insulina de conejo (4590, Cell Signaling) y monoclonal anti-glucagon de ratón (ab10988, Abcam), respectivamente, y 1:1000 de los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch

Laboratories) y anti-IgG biotinilado de ratón acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) empleando los estuches comerciales VECTASTAIN ABC-HRT Kit (Peroxidase) (PK-4001, Vector Laboratories) y DAB Peroxidase Substrate Kit (SK-4100, Vector Laboratories). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Las imágenes se digitalizaron bajo el objetivo 40X (Aperio ScanScope slide scanner). El número de células β y α se cuantificó utilizando el software Image-Pro Plus 5.1.

VI.8. Inmunofluorescencia (IF)

Se emplearon cortes longitudinales de 5 μm del lóbulo esplénico del páncreas. Las secciones incluidas en parafina fueron sometidas a inmunohistoquímica de fluorescencia tal y como se describe previamente (Campbell-Thompson et al., 2012) usando una dilución 1:200 de los anticuerpos primarios monoclonal anti-insulina de ratón (I2018, Sigma Aldrich) y policlonal anti-Ki67 de conejo (ab66155, Abcam), marcadores de células β y de proliferación, respectivamente. Se empleó también una dilución 1:500 de los anticuerpos secundarios anti-IgG Alexa Flour 488 de ratón y anti-IgG Alexa Fluor 555 de conejo (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Las secciones fueron montadas con Vectashield conteniendo DAPI (H-1200-10, Vector Laboratories) y se observaron bajo microscopio de fluorescencia (Microscopio BX60F5, Olympus Optical) con el objetivo 40X. La señal de fluorescencia se cuantificó utilizando el software Image-Pro Plus 5.1, en al menos 15 islotes por animal.

VI.9. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Las secciones de páncreas correspondientes al lóbulo duodenal se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Las muestras fueron trituradas con pistilo en mortero y nitrógeno líquido y divididas en dos porciones, una para extracción de proteína y la otra para extracción de ARN. El ARN total se extrajo utilizando 1 mL de TRIzol (15596026, Invitrogen) y se retrotranscribió utilizando el equipo High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Los productos de la PCR se detectaron y cuantificaron utilizando

Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) en una reacción final de 10 μ L conteniendo templado y 0.5 μ M de cada par de oligonucleótidos. La amplificación se llevó a cabo con el equipo CFX96 real time PCR detection System (Bio-Rad) bajo el siguiente protocolo: un ciclo de desnaturalización por 10 min a 95°C, y 35 ciclos de amplificación por 10 s a 95°C, 30 s a la temperatura específica de cada par de oligonucleótidos y 30 s a 72°C. La expresión relativa del ARNm se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ referente al gen constitutivo ciclofilina A. Los pares de cebadores utilizados en este estudio se encuentran enlistados en la Tabla 1.

Gen	Sentido	Antisentido
<i>Ins</i>	5'-CCGCTACAATCAAAAACCATC-3'	5'-CAAAGGTGCTGCTTGACAAA-3'
<i>Gcg</i>	5'-ACCAGCGACTACAGCAAATA-3'	5'-CATGCCTCTCAAATTCATCA-3'
<i>Ccna2</i>	5'-AGTCCTTGCTTTTGACTTGG-3'	5'-TACGGGTCAGCATCTATCAA-3'
<i>Ccnb1</i>	5'-TGCTCTTGAGACATTGGTA-3'	5'-CAGGTTTTGGTAGGGCTTTA-3'
<i>Ccnb2</i>	5'-TGCAAGATCGAGGACATAGA-3'	5'-GAAACTTGGAATGGACTTGG-3'
<i>Ccnd1</i>	5'-AAGATGAAGGAGACCATTCC-3'	5'-TTGAGCTTGTTACCAGAAG-3'
<i>Ccnd2</i>	5'-CTATTTCAAGTGCGTGCAGA-3'	5'-CAAGAAACGGTCCAGGTAAT-3'
<i>Il6</i>	5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3'	5'-AAGTGCATCATCGTTGTTACATA-3'
<i>Tnfa</i>	5'-CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA-3'	5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
<i>Ifng</i>	5'-GCGTCATTGAATCACACCTG-3'	5'-GACCTGTGGGTTGTTGACCT-3'
<i>Il1b</i>	5'-GTTGATTCAAGGGGACATTA-3'	5'-AGCTTCAATGAAAGACCTCA-3'
<i>Il10</i>	5'-AGAAATCAAGGAGCATTTGA-3'	5'-ATTCATGGCCTTGTTAGACAC-3'
<i>Tnfrsf11b</i>	5'-TGAGTGTTTTGGTGGACAGT-3'	5'-TGCTTTCACAGAGGTCAATG-3'
<i>CypA</i>	5'GGCGGCAGGTCCATCTACG-3'	5'-CTTGCCATCCAGCCATTCAGTC-3'

Tabla 1. Secuencia específica de oligonucleótidos para la amplificación de genes por qPCR

VI.10. Western blot

La sección del páncreas correspondiente al lóbulo duodenal, fue congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -80°C hasta su procesamiento. La mitad del tejido se homogenizó en una solución amortiguadora de lisis celular (5 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM ortovanadato de sodio, 50 mM fluoruro de sodio, 100 mM pirofosfato ácido de sodio, 250 mM sacarosa, 1% Igepal Ca-630, pH= 7.5) y el contenido total de proteína medido por el método de Bradford. Cantidades iguales de proteína (100 µg) se procesaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% bajo condiciones desnaturalizantes reductoras (SDS-PAGE); se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, bloquearon e incubaron durante toda la noche con una dilución 1:1000 del anticuerpo primario anti-caspasa-3 (9662, Cell Signaling). Como anticuerpo secundario se utilizó una dilución 1:10000 del anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (323005025, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Como control de carga se reveló a la β-tubulina utilizando una dilución 1:1000 de su anticuerpo (AB6046, Abcam).

VI.11. Ensayos para apoptosis

ELISA: el porcentaje de apoptosis se determinó en lisados de páncreas (utilizando 60 µg de proteína total) mediante la cuantificación del ADN fragmentado utilizando un ELISA comercial [Cell Death Detection ELISA Kit (11544675001, Roche)].

TUNEL: para evaluar apoptosis *in situ* se emplearon cortes longitudinales de 5 µm del lóbulo esplénico del páncreas, los cuales se desparafinaron, rehidrataron, permeabilizaron e incubaron en solución amortiguadora de citratos pH 6 por 1 minuto a 86°C. La apoptosis se detectó mediante el ensayo de TUNEL utilizando el estuche de detección de muerte celular *in situ* (1684795910, Roche). Posteriormente las muestras fueron teñidas con una dilución 1:200 del anticuerpo primario anti-insulina de ratón descrito anteriormente y una dilución 1:500 del anticuerpo secundario anti-IgG Alexa Fluor 594 de ratón (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). La señal positiva para apoptosis e insulina se visualizó bajo el microscopio de fluorescencia (Microscopio BX60F5, Olympus Optica), objetivo 40X.

El número de células β en apoptosis se cuantificó utilizando el software Image-Pro Plus 5.1.

VI.12. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism Version 6.0c. Los valores se expresan como media \pm error estándar (EE). Para la comparación de datos se utilizaron pruebas estadísticas paramétricas (t de Student para la comparación de dos grupos y ANOVAs de una o dos vías acopladas a prueba post hoc de Tukey para la comparación de varios grupos) y no paramétricas (Kaplan-Meier, prueba de Fisher y Curva ROC) según corresponda. El valor mínimo de significancia estadística fue de $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

VII.1. El número de casos, la latencia de recuperación y la severidad de la diabetes inducida por estreptozotocina aumentan en ratones nulos para el receptor de la prolactina

Para analizar si la falta de señalización de prolactina influye en el número de casos y la severidad de la diabetes inducida por estreptozotocina, se determinó la glucosa en sangre a través del tiempo en ratones *Prlr^{+/+}* y *Prlr^{-/-}*. Los ratones fueron considerados diabéticos cuando sus niveles de glucosa fueron mayores a 180mg/dL (Grant et al., 2012).

Se conoce que en el modelo de inducción de diabetes con dosis bajas y repetidas de estreptozotocina, los niveles de glucosa en sangre se elevan por arriba de los 180 mg/dL a partir de la primera semana posterior al tratamiento (Tesch & Allen, 2007) y que la tasa máxima de diabetes se alcanza dentro de la segunda y tercera semana post-estreptozotocina (Z. Li, Karlsson, & Sandler, 2000)(Li *et al.*, 2000). Consistentemente, encontramos que la diabetes comenzó a presentarse y alcanzó su pico máximo en la primera y tercera semana post-estreptozotocina, respectivamente, tanto en los ratones silvestres (*Prlr^{+/+}*) como en los nulos para el

receptor de la prolactina (*Prlr*^{-/-}) (Fig. 10A). Si bien, en ambos grupos experimentales el efecto diabetogénico de la estreptozotocina se presenta en la misma ventana de tiempo, el porcentaje de animales con hiperglucemia fue menor en los ratones *Prlr*^{+/+} que en los *Prlr*^{-/-} (48% y 70%, respectivamente) y esta diferencia se observó a lo largo de las 11 semanas del experimento, siendo las semanas 4, 5, 7, 8 y 9 estadísticamente diferentes entre grupos (Fig. 10A). Más aún, el área bajo la curva del porcentaje de ratones diabéticos fue significativamente mayor en los ratones *Prlr*^{-/-} que en los *Prlr*^{+/+} (Fig. 10B). Estos hallazgos indican que la presencia del receptor de la prolactina reduce el número de casos de diabetes inducida por estreptozotocina.

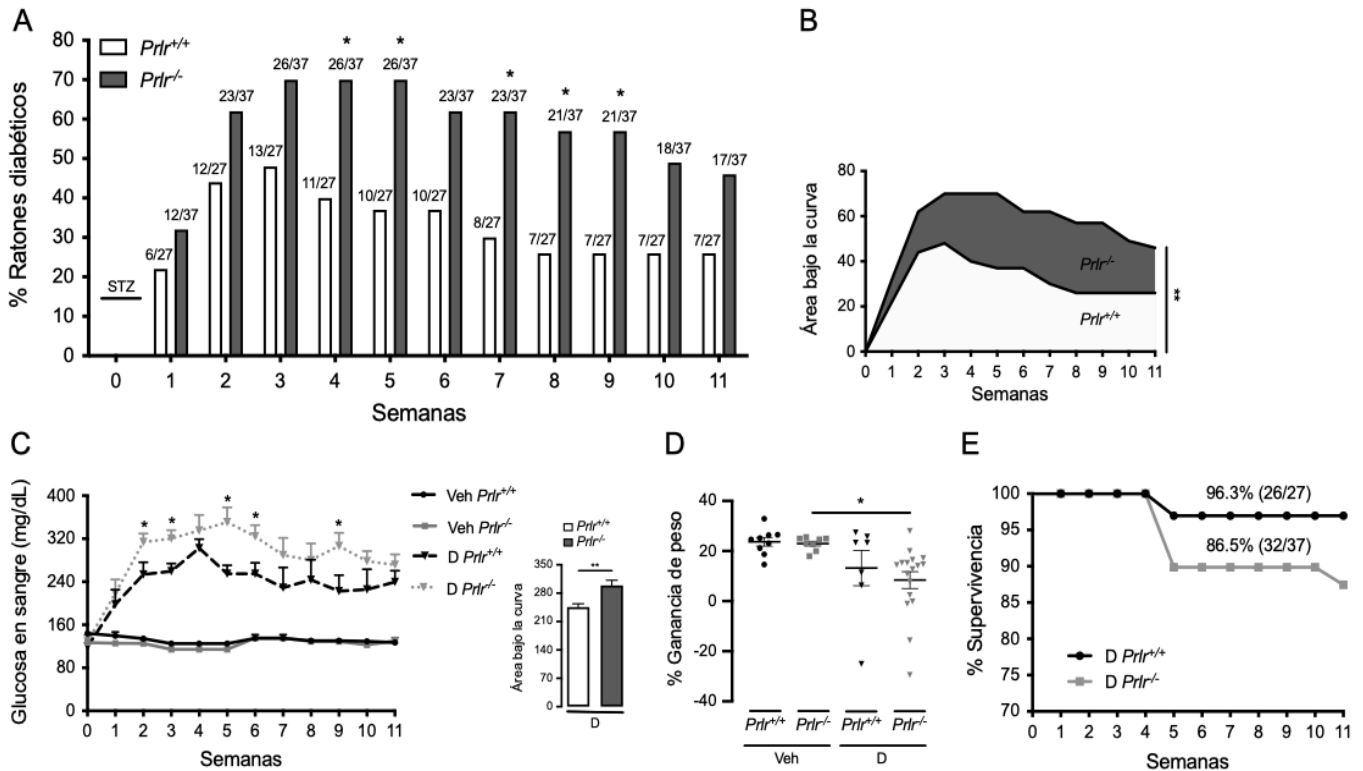


Figura 10. El número de casos, la latencia de recuperación y la severidad de la diabetes inducida por estreptozotocina aumenta en ratones nulos para el receptor de la prolactina. (A) Número de animales diabéticos (glucosa en sangre >180 mg/dL) a lo largo de las 11 semanas posteriores a la administración de estreptozotocina (STZ) (semana 0). (B) Área bajo la curva del porcentaje de diabetes en los ratones nulos (*Prlr*^{-/-}) o no (*Prlr*^{+/+}) para el receptor de la prolactina. (C) Niveles de glucosa en sangre después de un ayuno de

4 h a lo largo de 11 semanas en ratones diabéticos (D) inyectados con estreptozotocina o no-diabéticos inyectados con vehículo (Veh). (D) Porcentaje de ganancia total de peso a las 11 semanas. (E) Curva de supervivencia Kaplan-Meier. Los valores representan la media \pm EE, n= 7 a 17 animales por grupo, * p <0.05, ** p <0.01.

Más aún, a partir de la semana 3 post-estreptozotocina se empezó a observar una reversión del estado hiperglucémico de algunos animales del grupo *Prlr*^{+/+}, que fue máxima a la octava cuando el 74% de los ratones se recuperaron de la diabetes inducida por estreptozotocina, es decir, presentaron niveles de glucosa en sangre <180 mg/dL (Fig. 10A). Por su parte, en ausencia del receptor de la prolactina, la recuperación de la diabetes de los animales empezó más tarde, a partir de la sexta semana y continuó hasta la semana 11 post-estreptozotocina, momento en el cual solamente el 54% de los ratones *Prlr*^{-/-} se recuperaron de la diabetes (Fig. 10A). Estudios previos han reportado una recuperación espontánea de la diabetes inducida por dosis bajas de estreptozotocina en ratones neonatos desde en el estadio postnatal 5 hasta el 7 (es decir, de P5 a P7), que inicia a partir de las semanas 5 y 6 post-inyección con estreptozotocina, y siendo uno de los mecanismos propuestos para dicho efecto la proliferación de las células β residuales que sobreviven a la acción del citotóxico (Hartmann, Besch, & Zuhlke, 1989; Kataoka et al., 2013). Hasta ahora se desconocen los mediadores químicos participantes en este proceso de recuperación, nuestros resultados sugieren que la señalización de la prolactina contribuye a promover la recuperación de la diabetes inducida por estreptozotocina en el ratón adulto.

Además de un mayor número de casos y progresión de la diabetes, encontramos que la severidad del padecimiento también aumenta en los ratones nulos para el receptor de la prolactina. Se ha establecido que el grado de hiperglucemia refleja la severidad de la diabetes y las alteraciones metabólicas que conlleva (American Diabetes Association, 2010) y se conoce que tras la inducción química de diabetes con estreptozotocina se presenta una pérdida significativa de peso en ratas (King, 2012). Por tanto, en nuestro estudio utilizamos los niveles de glucosa en sangre y el porcentaje total de ganancia de peso como parámetros de severidad de la diabetes inducida por estreptozotocina. Observamos que no hay diferencias en los

niveles de glucosa en sangre ni en la ganancia de peso entre los ratones *Prlr*^{+/+} y *Prlr*^{-/-} controles; sin embargo, en el estado diabético, los niveles de glucosa en sangre (Fig. 10C) y la ganancia de peso menor (Fig. 10D) fueron significativamente mayores en los animales carentes del receptor de la prolactina en comparación con la contraparte silvestre. Lo que indica que los ratones *Prlr*^{-/-} expresan un fenotipo diferente cuando son retados por el efecto citotóxico de la estreptozotocina a favor de una diabetes más severa. Además, en los ratones diabéticos *Prlr*^{+/+} se presentó 1 caso de muerte durante la semana 5 post-estreptozotocina, mientras en los ratones diabéticos *Prlr*^{-/-} se presentaron 4 y 1 casos de muerte durante las semanas 5 y 11 post-estreptozotocina, respectivamente (Fig. 10E).

El mayor número de casos, menor recuperación y mayor severidad de la diabetes observada en ausencia del receptor de la prolactina muestran el efecto protector de la prolactina endógena contra la diabetes inducida por estreptozotocina.

VII.2. La homeostasis de la glucosa disminuye en ratones diabéticos nulos para el receptor de la prolactina

La homeostasis de glucosa es función de dos factores principales, la tasa de liberación de insulina en respuesta a la glucosa y la sensibilidad de los tejidos diana a la insulina (Bowe et al., 2014). Dado que los ratones nulos para el receptor de la prolactina presentaron una diabetes más severa, comparamos su capacidad para mantener la homeostasis de la glucosa en relación con los ratones *Prlr*^{+/+} a través de realizar dos pruebas de función metabólica, la tolerancia a la glucosa a la semana 9 de diabetes y la tolerancia a la insulina a la semana 10 de diabetes.

Tanto en la prueba de tolerancia a la glucosa como en la de tolerancia a la insulina observamos que no hay diferencias en la capacidad de internalizar la glucosa ni en la sensibilidad a la insulina entre los ratones *Prlr*^{+/+} y *Prlr*^{-/-} controles no diabéticos (tratados con vehículo) (Fig. 11A y B). Esta observación reproduce el hallazgo reportado por Ruiz-Herrera *et al* (2017) y sugiere que la ausencia del receptor de la prolactina por sí sola no produce alteraciones en la homeostasis de la glucosa en el ratón (Ruiz-Herrera et al., 2017). En contraste, bajo la condición diabética, la prueba de tolerancia a la glucosa mostró la misma intolerancia a la glucosa en los ratones

Prlr^{-/-} que en los ratones *Prlr*^{+/+} solamente hasta los 60 minutos posteriores al bolo de glucosa; a partir de ese momento, la intolerancia a la glucosa disminuyó solamente en los animales silvestres y al final de la prueba (minuto 120), los ratones *Prlr*^{-/-} no lograron alcanzar sus niveles basales de glucosa (Fig. 11A). El efecto en los animales *Prlr*^{-/-} diabéticos podría deberse tanto a una menor secreción de insulina, una menor respuesta a la insulina endógena, o ambas condiciones.

En la prueba de sensibilidad a la insulina observamos que mientras que los ratones *Prlr*^{+/+} diabéticos respondieron a la administración de insulina exógena (acción esperada puesto que en el modelo de inducción de diabetes por estreptozotocina no se desencadena resistencia a la insulina (Grant et al., 2012; Qinna & Badwan, 2015)), los ratones *Prlr*^{-/-} diabéticos mostraron una respuesta atenuada a la insulina, es decir, desarrollaron resistencia a la insulina, lo que refleja una menor incorporación de glucosa a los tejidos diana insulino-dependientes como el músculo y tejido adiposo (Fig. 11B).

En su conjunto, estos resultados sugieren que, en la condición de diabetes, la prolactina actúa sobre la homeostasis de la glucosa, a través de disminuir la intolerancia a la glucosa y el desarrollo de resistencia a la insulina.

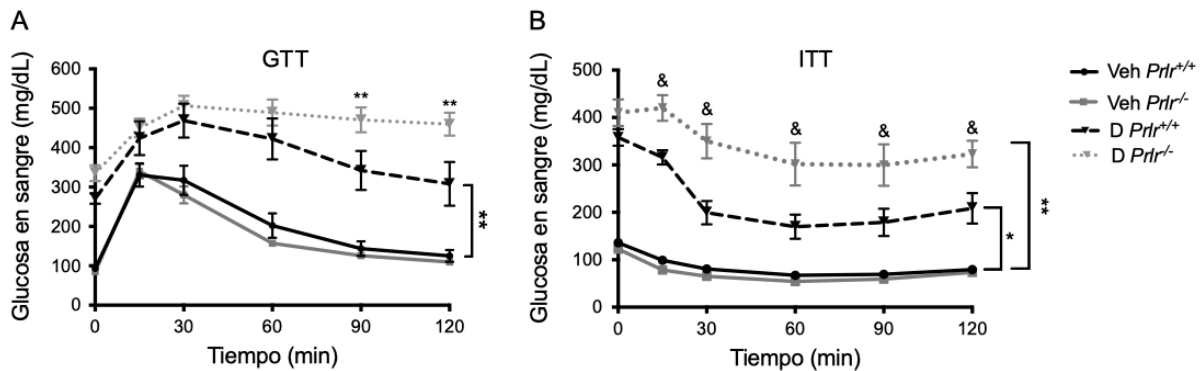


Figura 11. La tolerancia a la glucosa y la respuesta a la insulina en la diabetes inducida por estreptozotocina disminuyen en ausencia del receptor de la prolactina. (A) Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (GTT) en la semana 9 post-estreptozotocina. (B) Prueba de tolerancia a la insulina (ITT) en la semana 10 post-estreptozotocina. Ratones no diabéticos control inyectados con vehículo (Veh); ratones diabéticos inyectados con

estreptozotocina (D). Los valores son medias \pm EE de 6 a 10 animales por grupo, * $p < 0.05$ diabético vs. vehículo, & $p < 0.05$ *PrIr*^{-/-} diabéticos vs. *PrIr*^{+/+} diabéticos.

VII.3. Las alteraciones en el páncreas endócrino asociadas a la diabetes aumentan en ratones nulos para el receptor de la prolactina

Con la finalidad de evaluar si la mayor prevalencia y severidad de la diabetes, mayor intolerancia a la glucosa y desarrollo de resistencia a la insulina que se presenta en la ausencia del receptor de la prolactina se podían deber a un menor número de células β productoras de insulina, analizamos histológicamente la densidad de islotes de Langerhans y cuantificamos el número de células β contenidas en ellos a las 11 semanas posteriores a la administración de estreptozotocina o del vehículo. De igual manera, marcamos y cuantificamos a las células α , con el objetivo de tener una visión más amplia de la citoarquitectura del islote, puesto que son el segundo tipo celular más abundante después de las células β en el islote (Dolensek et al., 2015).

No observamos diferencias en la densidad de islotes, células β y α entre *PrIr*^{+/+} y *PrIr*^{-/-} no diabéticos (inyectados con vehículo) (Fig. 12). En la condición diabética, disminuyó la densidad de los islotes y de las células β dentro del islote, al tiempo que aumentó la densidad de las células α cuya distribución dentro del islote cambió de una ubicación periférica a una central (Fig. 12A). Estas diferencias fueron significativas después de evaluar secciones de experimentos independientes (Fig. 12B, C y D). Nuestras observaciones confirman resultados previos que indican que la diabetes inducida por estreptozotocina resulta en una reducción de la densidad de islotes y de las células β (Zhang et al., 2012) y en un aumento en el número de células α (Gromada, Chabosseau, & Rutter, 2018). Tanto la disminución en la densidad de islotes y células β , y el aumento en el número de células α fueron mayores intensificados en los ratones nulos para el receptor de la prolactina (Fig. 12B, C y D).

Estos hallazgos sugieren que la mayor severidad de la diabetes inducida por estreptozotocina en ausencia del receptor de la prolactina se debe a una mayor pérdida de células β y, por ende, que la prolactina protege contra la diabetes a través

de promover la proliferación y/o supervivencia de estas células. Futuras investigaciones deben analizar el significado funcional del efecto inhibitorio de la prolactina sobre las células α .

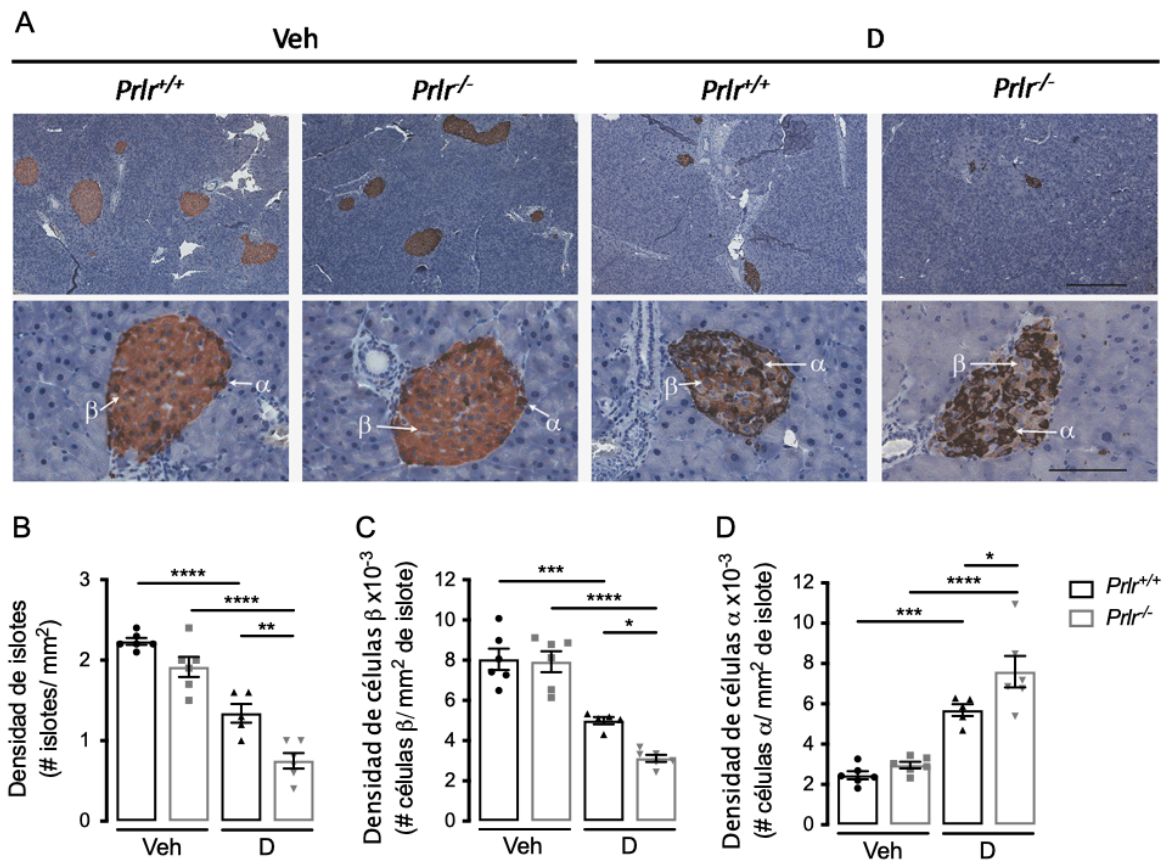


Figura 12. La ausencia del receptor de la prolactina agrava los cambios en densidad de islotes y el número de células β y α en la diabetes inducida por estreptozotocina.

(A) Secciones representativas del páncreas endócrino (islotes de Langerhans) evaluadas por inmunohistoquímica para insulina (café claro) y glucagon (café fuerte). El páncreas exócrino (azul) se contratiñó con hematoxilina. Escala: 200 μm (panel superior) y 50 μm (panel inferior). (B) Densidad de islotes, (C) de células β y de células α (D). El análisis histológico se realizó a las 11 semanas de diabetes. Ratones no diabéticos inyectados con vehículo (Veh); ratones diabéticos inyectados con estreptozotocina (D). Los valores representan la media \pm EE de 5 a 6 animales por grupo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

VII.4. Los niveles circulantes de insulina disminuyen en ratones diabéticos nulos para el receptor de la prolactina

La insulina producida en las células β del páncreas es un regulador crítico del metabolismo y su síntesis y secreción son parámetros de la funcionalidad de estas células (Fu et al., 2013).

Puesto que los ratones diabéticos $PrIr^{-/-}$ muestran un menor número de células β y, con la finalidad de saber si esta reducción se traduce en una menor producción y secreción de insulina, evaluamos la expresión del gen de insulina en el páncreas y los niveles de insulina en circulación a las 11 semanas de diabetes. En ausencia de diabetes, no observamos diferencias en el ARN mensajero de la insulina ni en la proteína en suero entre los ratones $PrIr^{+/+}$ y $PrIr^{-/-}$ (Fig. 13A y B).

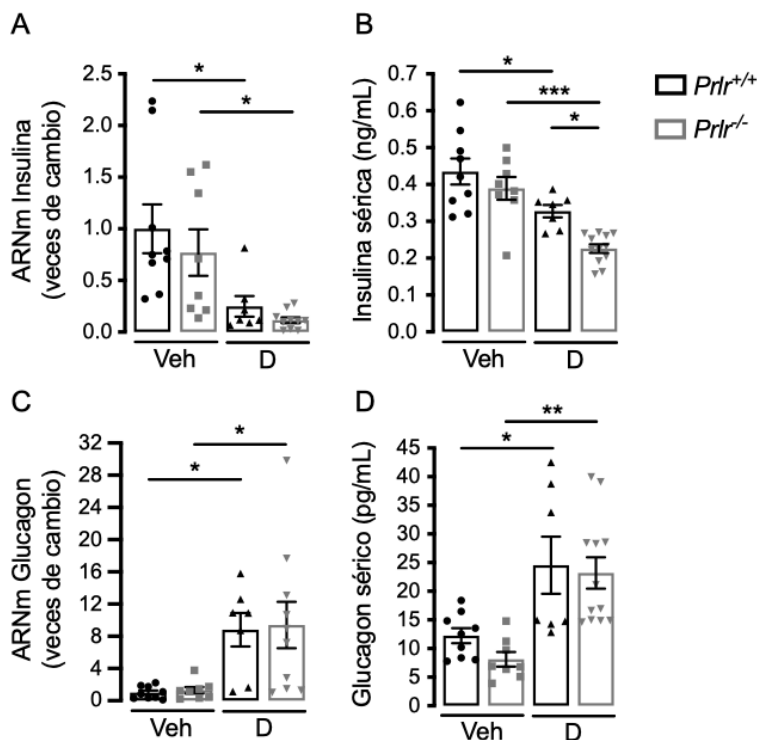


Figura 13. La ausencia del receptor de la prolactina agudiza la reducción de los niveles circulantes de insulina y no modifica los niveles circulantes de glucagon en la diabetes inducida por estreptozotocina. Expresión en el páncreas (A) y niveles circulantes (B) de insulina. Expresión en el páncreas (C) y niveles circulantes (D) de glucagon. Las mediciones se hicieron bajo ayuno de 4 h a las 11 semanas de diabetes.

Ratones no diabéticos control inyectados con vehículo (Veh); ratones diabéticos inyectados con estreptozotocina (D). Los valores son medias \pm EE de 7 a 12 animales por grupo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Confirmamos que la expresión de la insulina y sus niveles séricos disminuyen en la diabetes inducida por estreptozotocina (Fig. 13A y B). Observamos también una disminución, aunque no significativa, en la expresión del ARNm de la insulina entre los dos grupos de ratones diabéticos (Fig. 13A). No obstante, los niveles circulantes de insulina fueron más bajos en los ratones *Prlr*^{-/-} diabéticos en comparación con los ratones *Prlr*^{+/+} diabéticos (Fig. 13B). La reducción en los niveles circulantes de la insulina en ausencia del receptor de la prolactina se correlaciona con el menor número de células β encontrada en los estudios histológicos.

Por otra parte, dado que el número de células α aumenta en los ratones diabéticos nulos para el receptor de la prolactina (Fig. 12D), medimos la expresión del ARNm del glucagon y sus niveles circulantes. Otros estudios han reportado un incremento en los niveles de glucagon en la circulación durante la diabetes (Gromada et al., 2018). En nuestro trabajo, también encontramos niveles elevados de glucagon, tanto en la expresión del ARNm como en los niveles circulantes de la hormona en la diabetes. Sin embargo, no observamos diferencias significativas entre los ratones *Prlr*^{+/+} y *Prlr*^{-/-} diabéticos (Fig. 13C y D) a pesar de que los ratones *Prlr*^{-/-} presentaron un mayor número de células α (Fig. 12D). Esta aparente inconsistencia puede explicarse debido a que la menor densidad de islotes en los ratones *Prlr*^{-/-} diabéticos pudo haber contrarrestado el aumento en la producción y liberación de glucagon derivado del aumento en células α por islote.

VII.5. La proliferación de las células β disminuye en ratones diabéticos nulos para el receptor de la prolactina

Como ya se mencionó, el modelo de inducción de diabetes con estreptozotocina a dosis bajas y repetidas causa una destrucción parcial de las células β por lo que una fracción residual de estas células sobrevive al daño (J. Wu & Yan, 2015). De hecho, la recuperación de la diabetes inducida por estreptozotocina observada en

ratones neonatos se asocia con la proliferación de la población remanente de células β (Kataoka et al., 2013). Dado que los ratones *Prlr*^{-/-} mostraron una recuperación más lenta de la diabetes y una menor densidad de células β , investigamos si ambos factores se debían a una menor proliferación de las células β debido a la ausencia de acción de la prolactina. Para esto, a las 11 semanas posteriores a la administración de estreptozotocina o vehículo, determinamos la expresión del ARN mensajero de ciclinas que se sabe participan en la proliferación de las células β (ciclinas A2, B1, B2, D1 y D2) (Banerjee et al., 2016). Encontramos una regulación disminuida de las ciclinas A2, B1, D1 y D2 en los ratones *Prlr*^{-/-} diabéticos (Fig. 14A) Más aún, la expresión de ARN mensajero del gen que codifica al factor de crecimiento transformante β (*Tgfb*), un inhibidor de la proliferación y diferenciación de células β (Wang et al., 2019), fue mayor en el páncreas de ratones *Prlr*^{-/-} diabéticos en comparación con ratones *Prlr*^{+/+} diabéticos (Fig. 14B). La expresión génica fue similar entre los grupos *Prlr*^{+/+} y *Prlr*^{-/-} no diabéticos inyectados con vehículo e incluso tuvo poca variación en el grupo *Prlr*^{+/+} diabético.

Estas observaciones sugieren que la proliferación de las células β disminuye en ausencia del receptor de la prolactina. Para verificar esta posibilidad, realizamos un doble inmunomarcaje doble con anticuerpos anti-insulina y anti-Ki67 para marcar a las células β y a las células en proliferación, respectivamente (Fig. 14C). Encontramos que el porcentaje de células doblemente positivas a insulina y Ki67 resultó ser un 67% menor en los ratones diabéticos nulos para el receptor de la prolactina que en su contraparte silvestre (Fig. 14D). Esto indica que la reducción en la proliferación de las células β contribuye a la mayor pérdida de células β y recuperación más lenta de la diabetes en ausencia de señalización de la prolactina.

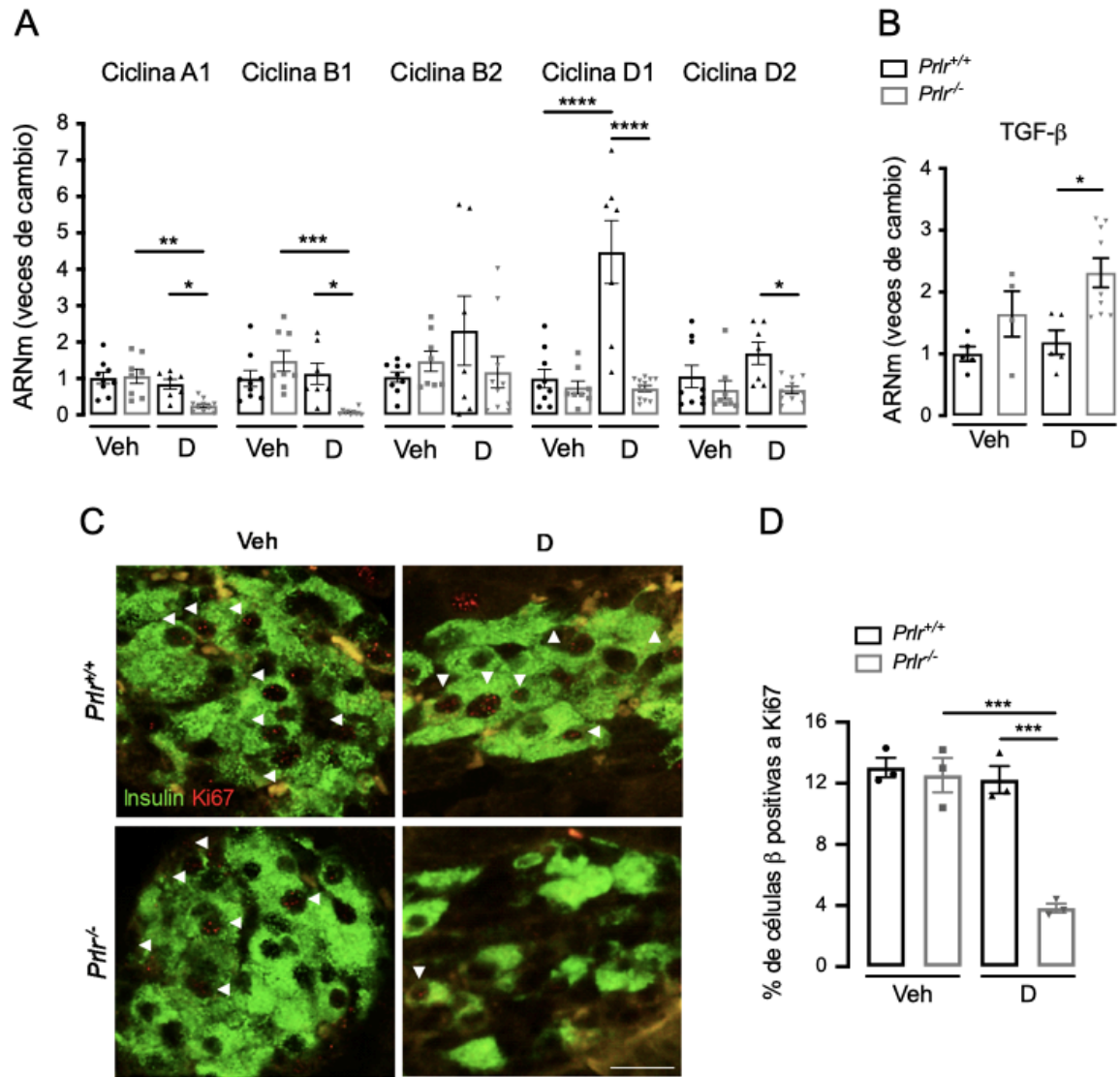


Figura 14. La proliferación de las células β se reduce en ratones diabéticos nulos para el receptor de la prolactina. Expresión del ARN mensajero de las ciclinas A1, B1, B2, D1 y D2 (A) y del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en el páncreas (B). (C) Imágenes representativas de secciones de páncreas inmunomarcadas para insulina (verde) y el marcador de proliferación celular Ki67 (rojo). Las flechas blancas indican la marca roja en los núcleos. Barra = 20 μ m. (D) Porcentaje de células doblemente positivas para insulina y Ki67 relativas al total de células positivas para insulina. Todos los análisis se realizaron a las 11 semanas de diabetes. Ratones no diabéticos control inyectados con vehículo (Veh); ratones diabético inyectados con estreptozotocina (D). Los valores son medias \pm EE de 3 a 12 animales por grupo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

VII.6. La apoptosis de las células β y la inflamación del páncreas aumentan en ratones diabéticos nulos para el receptor de la prolactina.

Se conoce que el modelo de inducción de diabetes con estreptozotocina (dosis bajas y repetidas) utilizado en este trabajo induce la apoptosis de las células β tanto por la vía dependiente (a través de la activación de la caspasa-3 y caspasa-9) como independiente (mediante la fragmentación del DNA) de caspasas (Eleazu et al., 2013; Fujinaka et al., 2007; Nahdi, John, & Raza, 2017). Además, se ha reportado que los lactógenos, como la prolactina, reducen significativamente la activación de la caspasa-3 en la línea celular de células β (INS-1) (Fujinaka et al., 2007).

Con el objetivo de estudiar si en la disminución en el número de células β observado en los ratones *Prlr*^{-/-} diabéticos participa una mayor muerte celular, evaluamos la presencia de apoptosis en el páncreas mediante la valoración de los fragmentos nucleosomales del ADN por ELISA, la activación de la caspasa-3 y el marcado del final de corte de dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL).

Once semanas después de la inyección con estreptozotocina o vehículo, encontramos que el porcentaje de apoptosis, medido por la fragmentación del DNA, aumentó en un 50% en los ratones diabéticos *Prlr*^{-/-} vs. la contraparte silvestre (Fig. 15A). En apoyo al resultado anterior, los niveles de caspasa-3 activa fueron más altos en el grupo diabético nulo para el receptor de la prolactina (Fig. 15B). Finalmente, la apoptosis *in situ* de los islotes de Langerhans medida por TUNEL fue mayor en los islotes de los ratones diabéticos *Prlr*^{-/-} (Fig. 15C).

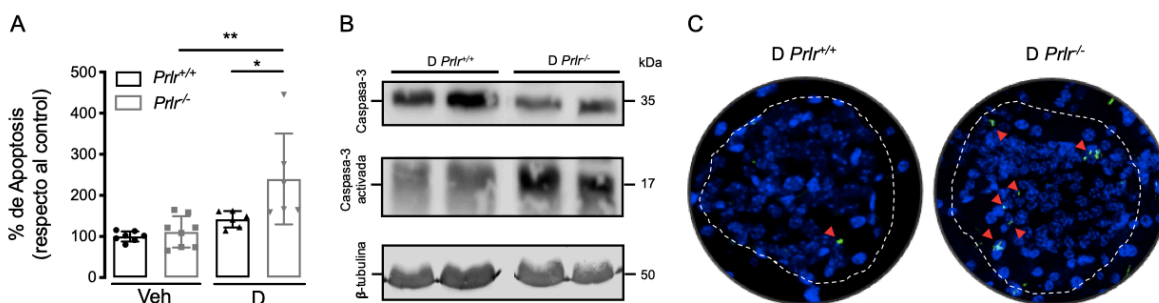


Figura 15. La apoptosis aumenta en el páncreas de ratones diabéticos nulos para el receptor de la prolactina. (A) Porcentaje de apoptosis (cuantificación de la fragmentación del ADN por ELISA) relativo al control de ratones no diabéticos silvestres inyectados con

vehículo (Veh). (B) Western blot representativo de caspasa-3, no activa y activa, presente en lisados de secciones del páncreas duodenal. (C) Inmunotinción positiva para TUNEL (flechas rojas) en el islote de ratones diabéticos. Todos los análisis se realizaron a las 11 semanas de diabetes. Ratones no diabéticos inyectados con vehículo (Veh). Ratones diabéticos inyectados con estreptozotocina (D). Los valores son medias \pm EE de 3 a 9 animales por grupo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Estos hallazgos muestran mayor apoptosis en el páncreas de los ratones diabéticos *Prlr*^{-/-} y, en particular, en los islotes de Langerhans. Para esclarecer si la apoptosis ocurre en las células β , llevamos un doble marcaje con anticuerpos anti-insulina y TUNEL (Fig. 16A) a las dos semanas de diabetes, tiempo en el cual ocurre el pico del efecto citotóxico de la estreptozotocina. La proporción de células β en apoptosis fue mayor en los ratones *Prlr*^{-/-} diabéticos vs. los ratones *Prlr*^{+/+} diabéticos (Fig. 16B). Concluimos que la prolactina participa positivamente en la supervivencia de las células β en el modelo de diabetes inducido por estreptozotocina.

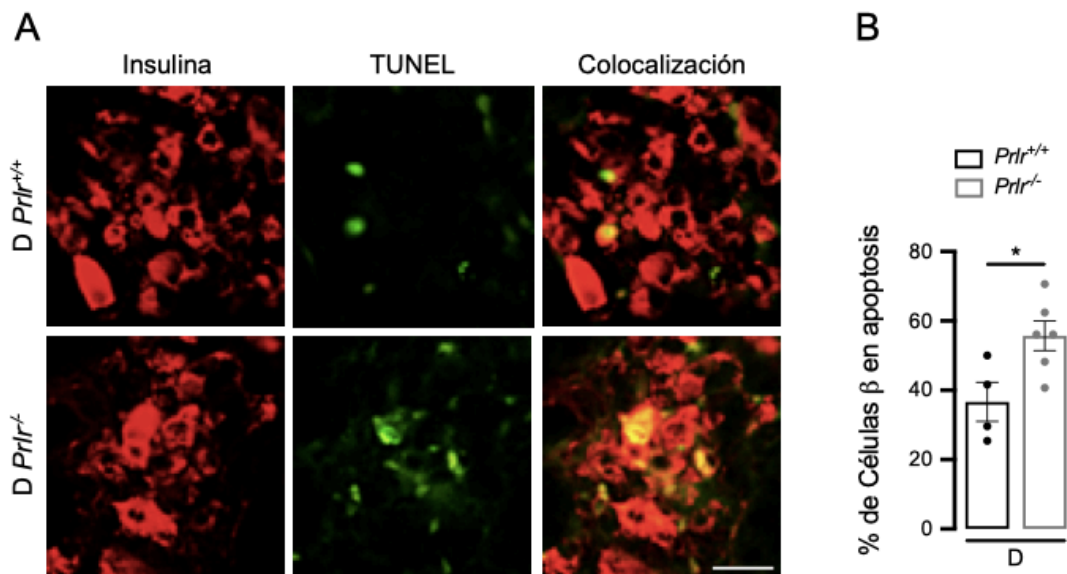


Figura 16. La muerte celular por apoptosis aumenta en las células β del páncreas en ratones diabéticos nulos para el receptor de la prolactina. (A) Imágenes representativas de secciones de páncreas doblemente marcadas con anticuerpos anti-insulina (rojo) y TUNEL (verde). Barra = 20 μ m. (B) Porcentaje de células que colocalizaron insulina y

TUNEL relativo al total de células positivas para insulina. El análisis se realizó a las 2 semanas posteriores al tratamiento con estreptozotocina en ratones *Prlr^{+/+}* y *Prlr^{-/-}* diabéticos. Los valores son medias \pm EE de 4 a 6 animales por grupo, * $p < 0.05$.

La inflamación es un proceso muy relacionado con la apoptosis. Se ha descrito que las citocinas pro-inflamatorias promueven la apoptosis de las células β en la diabetes (Lambelet et al., 2018). Además, dosis bajas y repetidas de estreptozotocina provocan una reacción inmune e inflamatoria en el páncreas, presuntamente relacionada con la liberación de autoantígenos de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y la infiltración de linfocitos y macrófagos hacia los islotes pancreáticos (Androulidaki, Wachsmuth, Polykratis, & Pasparakis, 2018; Graham et al., 2011; Lukic, Stosic-Grujicic, & Shahin, 1998). Puesto que la apoptosis aumenta en los ratones diabéticos *Prlr^{-/-}*, y sabiendo que la prolactina ejerce acciones anti-inflamatorias sobre diversos órganos blanco (Corbacho et al., 2003), evaluamos la expresión de algunas citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias y la infiltración de macrófagos en el páncreas a las 2 semanas de diabetes (Fig. 17).

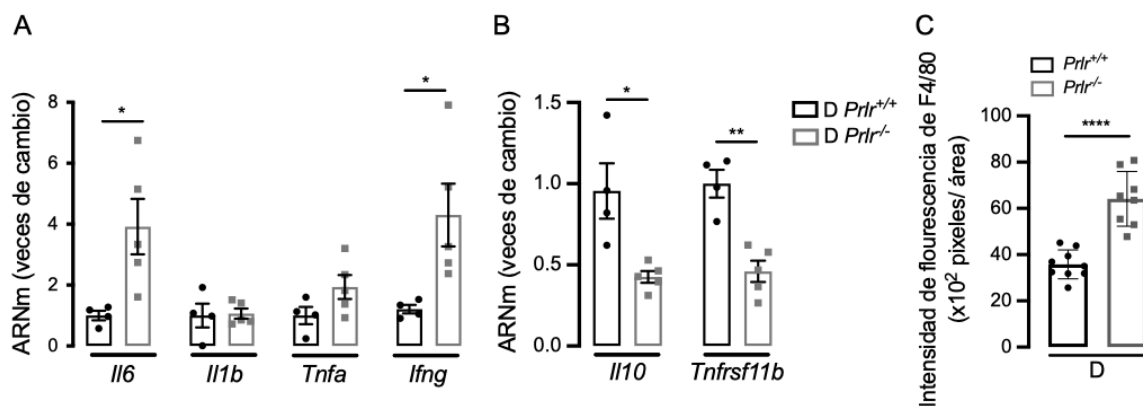


Figura 17. La inflamación aumenta en el páncreas de ratones diabéticos nulos para el receptor de la prolactina. Expresión del ARN mensajero de los genes que codifican para las citocinas pro-inflamatorias (*Il6*, *Il1b*, *Tnfa* y *Ifng*) (A), anti-inflamatoria (*Il10*) y el mitógeno de células β , osteoprotegerina (*Tnfrsf11b*) (B) en el páncreas. (C) Intensidad de fluorescencia de la señal positiva para F4/80 (marcador de macrófagos) en cortes de páncreas. Todos los análisis se realizaron a las 2 semanas posteriores al tratamiento con

estreptozotocina en ratones diabéticos *Prlr*^{+/+} y *Prlr*^{-/-}. Los valores son las medias \pm EE de 4 a 9 animales por grupo, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

Se encontró un aumento en la expresión del ARN mensajero de los genes que codifican para las citocinas pro-inflamatorias interleucina-6 (*Il-6*) e interteferón gamma (*Ifng*) (Fig. 17A), así como una mayor infiltración de macrófagos, inmunomarcados con F4/80, en ratones diabéticos *Prlr*^{-/-} en relación con su contraparte silvestre (Fig. 17C). En contraste, en los ratones diabéticos *Prlr*^{-/-} la expresión de los genes que codifican para la citocina anti-inflamatoria interleucina-10 (*Il-10*) y el mitógeno de células beta osteoprotegerina (*Tnfrsf11b*) se encontraron regulados a la baja (Fig. 17B). Estos resultados sugieren que la prolactina reduce la inflamación local en el páncreas, protegiendo así contra la pérdida de células β y la disfunción de los islotes en la diabetes inducida por estreptozotocina.

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos que la señalización de prolactina es esencial para mantener la integridad de las células β y la homeostasis de la glucosa en la diabetes inducida por estreptozotocina a través de múltiples acciones que incluyen la estimulación de la supervivencia, proliferación y función de las células β , y por el otro, reduciendo la inflamación e infiltración de células inmunes en el páncreas.

Tanto la diabetes tipo-1 como la diabetes tipo-2 se caracterizan por la pérdida de células β , por lo tanto, factores que previenen la muerte y/o promueven la proliferación de las células β tienen repercusiones terapéuticas importantes. El modelo de diabetes inducido por estreptozotocina permite estudiar estos factores. La estreptozotocina es citotóxica para las células β ya que a través del transportador de glucosa de la membrana celular 2 (GLUT2) se incorpora selectivamente en estas células donde causa la alquilación del ADN y de las proteínas lo que conduce a su apoptosis y la consecuente inflamación e hiperglucemia (Lenzen, 2008; O'Brien,

Harmon, Cameron, & Allan, 1996; J. Wu & Yan, 2015). Debido a que el tratamiento con prolactina promueve la proliferación de las células β , su supervivencia y la secreción de insulina en respuesta a glucosa (Hyslop, Tsai, Shrivastava, Santamaria, & Huang, 2016; Johansson et al., 2008; R. L. Sorenson & Brelje, 2009), buscamos evaluar si la diabetes inducida por estreptozotocina se agrava en ausencia de señalización de prolactina.

Como estrategia experimental, utilizamos ratones nulos del receptor de la prolactina con fondo genético C57BL/6, una cepa adecuada para estudios de homeostasis de la glucosa (Berglund et al., 2008) que es altamente sensible a los efectos de la estreptozotocina (Deeds et al., 2011; Gurley et al., 2006). Estos ratones no mostraron alteraciones en el metabolismo de la glucosa bajo condiciones no diabéticas, como lo revelan sus valores de normoglucemia, tolerancia a la glucosa, sensibilidad a la insulina, densidad de islotes y de células β , producción y secreción de insulina. Estos resultados son los esperados de acuerdo a reportes previos en ratones de la misma cepa nulos y heterocigóticos para el receptor de la prolactina tanto globales (Huang et al., 2009) como específicos para las células β (Banerjee et al., 2016); pero contrastan con resultados obtenidos en la cepa 129/SvJ, donde la delección global del receptor de la prolactina en ratones sanos produjo una reducción en la densidad de islotes y células β y una menor expresión y liberación de insulina (Freemark et al., 2002). Los estudios contrastantes son consistentes con las diferencias reportadas en el metabolismo de la glucosa entre ambas cepas de ratón (Berglund et al., 2008) e indican que el fondo genético de los animales influye en el resultado de la acción de la prolactina sobre el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, a pesar de no presentar alteraciones metabólicas bajo condiciones de salud, la exposición de ratones *Prlr*^{-/-} de la cepa C57BL/6 a retos metabólicos como son el embarazo (Banerjee et al., 2016; Huang et al., 2009) o la diabetes inducida por estreptozotocina (resultados de esta tesis) les impide conservar la homeostasis de la glucosa, la masa y la función de las células β e indica que la señalización de prolactina desempeña un papel determinante en el metabolismo de la glucosa que es independiente del fondo genético.

En la diabetes tipo-1, la muerte de las células β es consecuencia de la autoinmunidad, ocurre durante las primeras fases de la enfermedad y conduce a una pérdida de los niveles de insulina e hiperglucemia (Achenbach, Bonifacio, Koczwara, & Ziegler, 2005). De manera interesante, en algunos pacientes con diabetes tipo-1 tiene lugar una fase de recuperación parcial espontánea de la función de las células β y los niveles de insulina (Akirav, Kushner, & Herold, 2008). El modelo de dosis bajas y repetidas de estreptozotocina mimetiza algunos aspectos básicos de la enfermedad en humanos. La apoptosis de los islotes comienza en etapas tempranas, desde dos días y hasta 2 a 3 semanas después del tratamiento con estreptozotocina, cuando alcanza su punto máximo (Kataoka et al., 2013; O'Brien et al., 1996). Además, algunos animales se recuperan del estado hiperglucémico (Hartmann et al., 1989; Kataoka et al., 2013). Nuestro estudio confirmó esta dinámica y mostró que el número de casos aumenta y la recuperación de la diabetes disminuye en ausencia del receptor de la prolactina. Más aún, la falta de señalización del receptor de la prolactina se asocia con una mayor apoptosis de las células β , regulación al alza de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e $\text{INF}\gamma$, regulación a la baja de la citocina anti-inflamatoria IL-10 y mayor infiltración de macrófagos en el páncreas dos semanas después de la inducción de diabetes con estreptozotocina.

Debido a que la estreptozotocina provoca la apoptosis de las células β a través de la generación de radicales libres citotóxicos (Eleazu et al., 2013) y la promoción de una respuesta inflamatoria pancreática (O'Brien et al., 1996), nuestros resultados sugieren que la prolactina puede contrarrestar la diabetes bloqueando el estrés oxidativo y la inflamación del páncreas. En apoyo a esta afirmación, se sabe que la prolactina tiene propiedades antioxidantes (Melendez Garcia et al., 2016) y antiinflamatorias (Clapp et al., 2016) sobre diferentes tejidos, incluidas las células β , donde protege contra un donador de óxido nítrico, H_2O_2 y la apoptosis inducida por citosinas pro-inflamatorias *in vitro* (Yamamoto et al., 2010).

De acuerdo con la menor supervivencia de las células β , la diabetes se exacerbó durante las 11 semanas después del tratamiento con estreptozotocina en los ratones nulos para el receptor de la prolactina. Estos ratones mostraron niveles

circulantes de glucosa más altos, menor ganancia de peso corporal, menor supervivencia, aumento a la intolerancia a la glucosa y desarrollo de resistencia a la insulina. Estas observaciones complementan los hallazgos del estudio previo que muestra que el tratamiento con prolactina reduce la hiperglucemia inducida por estreptozotocina, pero que no exploró el mecanismo participante en tal efecto (Holstad & Sandler, 1999).

La mayor severidad en la diabetes en ausencia del receptor de la prolactina se correlacionó con una reducción en la densidad de islotes, el número de células β , la producción y secreción de insulina y el aumento en el número de células α . La pérdida de células β refleja tanto una menor supervivencia como una capacidad reducida de proliferación. Los ratones diabéticos nulos para el receptor de la prolactina mostraron menos células β en proliferación (positivas para Ki67) y una reducción en la expresión pancreática de los genes que codifican para las ciclinas G1/S (ciclina A2, ciclina D1 y ciclina D2) y las ciclinas G1/M (ciclina B1). Se ha reportado que estas ciclinas están reguladas negativamente en las células β con delección tejido-específica del receptor de la prolactina (Banerjee et al., 2016) y que se regulan positivamente en respuesta a lactógenos (Kim et al., 2010).

Entre los mecanismos que median el efecto mitogénico de la prolactina sobre las células β se encuentra la sobre-expresión de osteoprotegerina, una proteína que conduce a la inactivación del ligando de RANK, un inhibidor de la proliferación de las células β (Kondegowda et al., 2015), y al mantenimiento de la expresión de las ciclinas arriba mencionadas, asociadas a la proliferación de las células β (Banerjee et al., 2016). De manera interesante, los ratones diabéticos nulos para el receptor de la prolactina, también mostraron una mayor expresión de TGF- β en el páncreas, y se conoce que la inhibición de TGF- β resulta en estimulación de la proliferación de células β tanto en humanos como en ratón (Dhawan, Dirice, Kulkarni, & Bhushan, 2016). Esto sugiere que la prolactina al inhibir la expresión de TGF- β favorece la proliferación de las células β . Sin embargo, la regulación de TGF- β mediada por prolactina no ha sido descrita antes y dicha asociación requiere mayor investigación.

Nuestro trabajo también confirmó la expansión y localización central de las células α dentro del islote de ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina (Z. Li et al., 2000) y mostró que estos cambios se exacerban en ausencia del receptor de la prolactina. No obstante, el aumento de la densidad de las células α en los ratones diabéticos *Prlr*^{-/-} no se asoció con una mayor producción y secreción de glucagon. Esta aparente contradicción puede explicarse cuando se considera que la mayor densidad de células α por islote se contrarresta con la disminución en el número de islotes pancreáticos observada en ausencia del receptor de la prolactina. Existe evidencia de que la expansión de las células α en el estado diabético puede resultar de la des-diferenciación de las células β hacia células α y/o de la proliferación de células α (Gromada et al., 2018). Se requieren más estudios para caracterizar el efecto de la prolactina sobre la función de las células α en la diabetes.

El hallazgo de que la prolactina reduce la gravedad de la diabetes inducida por estreptozotocina va de la mano con el papel de esta hormona como guardiana de la homeostasis metabólica (Macotela et al., 2020). Recientemente se reconoció que la prolactina ejerce un efecto benéfico sobre el metabolismo que depende de que sus niveles circulantes se mantengan dentro de un rango (entre 7 y 100 ng/ mL) definido como “prolactinemia transitoria homeostática funcionalmente aumentada” o niveles de HomeoFIT-PRL (Macotela et al., 2020). Estas consideraciones, aunadas al presente estudio, apoyan la posibilidad de que fármacos que elevan los niveles de prolactina dentro del rango HomeoFIT-PRL pudiera tener potencialidad terapéutica en la diabetes.

Finalmente, un resultado importante derivado de este trabajo es que en ausencia del receptor de la prolactina genera resistencia a la insulina en el modelo de diabetes tipo-1 inducido por estreptozotocina. Esto es novedoso, dado que se conoce que los animales tratados con estreptozotocina conservan su capacidad de respuesta a la insulina (Manell, Ryden, Hedenqvist, Jacobson, & Jensen-Waern, 2014; Nordquist & Sjoquist, 2009) y, por lo tanto, implica que la señalización de prolactina promueve la sensibilidad a la insulina bajo condiciones de diabetes. Nuestros experimentos en curso estudian el mecanismo molecular por el cual la prolactina favorece sensibilidad a la insulina en sus diversos órganos blanco. Al

respecto se sabe que la unión de prolactina a su receptor puede activar la transducción de señales de la fosfoinositido 3 kinasa (PI3K), un mediador crítico en la cascada de señalización de insulina que es determinante de la traslocación del transportador de glucosa GLUT4 del citosol hacia la membrana plasmática en los tejidos insulino-dependientes (K. U. Wagner & Schmidt, 2011). Más aun, se ha descrito que la sobreexpresión del receptor de la prolactina, tanto *in vitro* como *in vivo*, mejora la sensibilidad a la insulina hepática a través estimular la fosforilación tanto del receptor de insulina como de Akt, y que de la activación de STAT5 es necesaria regular la sensibilidad a la insulina mediada el receptor de la prolactina (Yu et al., 2013).

IX. CONCLUSIONES

En este trabajo reportamos que la ausencia de señalización de prolactina resulta en un fenotipo diabético más severo representado por un mayor número de casos de diabetes, mayor latencia de recuperación, niveles de glucosa en sangre más elevados, menor ganancia de peso, mayor intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. Estos cambios parecen resultar de una menor proliferación y mayor apoptosis de las células β promovidas por una intensificación de la inflamación local (Fig. 18),

Concluimos que la prolactina protege contra la diabetes inducida por estreptozotocina en el ratón y proponemos que fármacos que elevan los niveles circulantes de prolactina tienen relevancia potencial para el tratamiento de la diabetes.

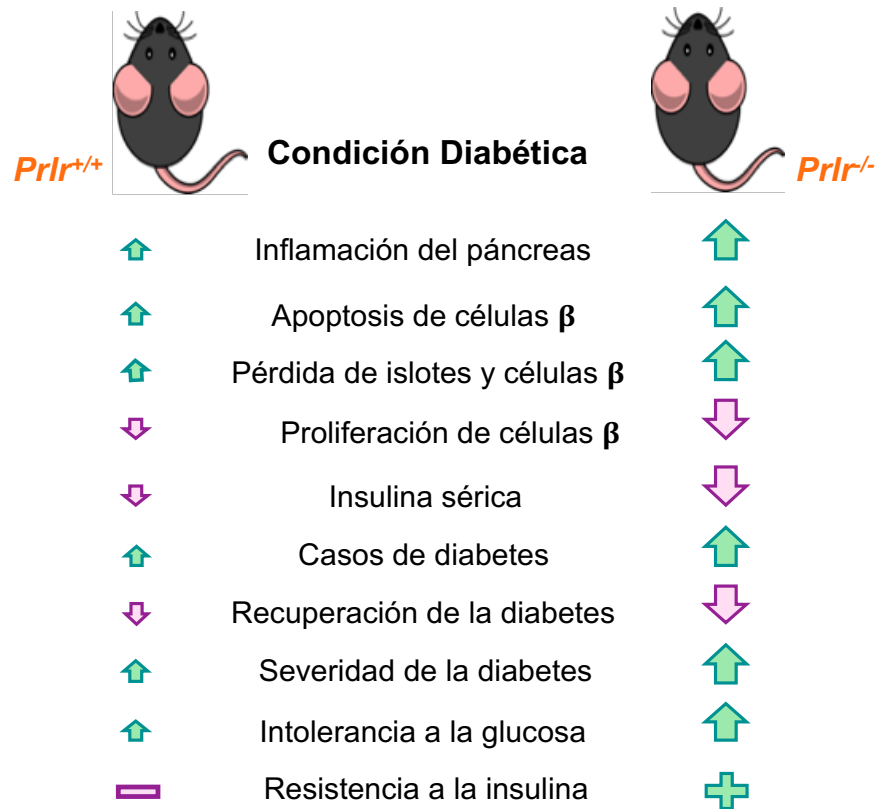


Figura 18. Integración de las alteraciones funcionales y metabólicas derivadas de la ausencia del receptor de la prolactina en la diabetes inducida por estreptozotocina. Los ratones diabéticos *Prlr^{-/-}* presentan una mayor inflamación en el páncreas, pérdida de islotes pancreáticos, mayor apoptosis y menor proliferación de células β , menos insulina, más animales diabéticos, menor recuperación y mayor severidad de la diabetes, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina.

X. REFERENCIAS

- Achenbach, P., Bonifacio, E., Koczwara, K., & Ziegler, A. G. (2005). Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes*, *54 Suppl 2*, S25-31. doi:10.2337/diabetes.54.suppl_2.s25
- Aguayo-Mazzucato, C., & Bonner-Weir, S. (2018). Pancreatic beta Cell Regeneration as a Possible Therapy for Diabetes. *Cell Metab*, *27*(1), 57-67. doi:10.1016/j.cmet.2017.08.007
- Akirav, E., Kushner, J. A., & Herold, K. C. (2008). Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone? *Diabetes*, *57*(11), 2883-2888. doi:10.2337/db07-1817
- Alsahli, M., Shrayyef, M. Z., & Gerich, J. E. (2017). Normal Glucose Homeostasis. In L. Poretsky (Ed.), *Principles of Diabetes Mellitus* (pp. 23-42). Cham: Springer International Publishing.
- Androulidaki, A., Wachsmuth, L., Polykratis, A., & Pasparakis, M. (2018). Differential role of MyD88 and TRIF signaling in myeloid cells in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *PLoS One*, *13*(3), e0194048. doi:10.1371/journal.pone.0194048
- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B., & Want, L. (2004). Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*, *17*(3), 183-190. doi:10.2337/diaspect.17.3.183
- Baeyens, L., Hindi, S., Sorenson, R. L., & German, M. S. (2016). beta-Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes Obes Metab*, *18 Suppl 1*, 63-70. doi:10.1111/dom.12716
- Balbach, L., Wallaschofski, H., Volzke, H., Nauck, M., Dorr, M., & Haring, R. (2013). Serum prolactin concentrations as risk factor of metabolic syndrome or type 2 diabetes? *BMC Endocr Disord*, *13*, 12. doi:10.1186/1472-6823-13-12
- Banerjee, R. R., Cyphert, H. A., Walker, E. M., Chakravarthy, H., Peiris, H., Gu, X., . . . Kim, S. K. (2016). Gestational Diabetes Mellitus From Inactivation of Prolactin Receptor and MafB in Islet beta-Cells. *Diabetes*, *65*(8), 2331-2341. doi:10.2337/db15-1527
- Berglund, E. D., Li, C. Y., Poffenberger, G., Ayala, J. E., Fueger, P. T., Willis, S. E., . . . Wasserman, D. H. (2008). Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains. *Diabetes*, *57*(7), 1790-1799. doi:10.2337/db07-1615
- Bernard, V., Young, J., Chanson, P., & Binart, N. (2015). New insights in prolactin: pathological implications. *Nat Rev Endocrinol*, *11*(5), 265-275. doi:10.1038/nrendo.2015.36
- Binart, N., Bachelot, A., & Bouilly, J. (2010). Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinol Metab*, *21*(6), 362-368. doi:10.1016/j.tem.2010.01.008
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*, *19*(3), 225-268. doi:10.1210/edrv.19.3.0334

- Bouwens, L., & Rooman, I. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev*, 85(4), 1255-1270. doi:10.1152/physrev.00025.2004
- Bowe, J. E., Franklin, Z. J., Hauge-Evans, A. C., King, A. J., Persaud, S. J., & Jones, P. M. (2014). Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. *J Endocrinol*, 222(3), G13-25. doi:10.1530/JOE-14-0182
- Brelje, T. C., Scharp, D. W., Lacy, P. E., Ogren, L., Talamantes, F., Robertson, M., . . . Sorenson, R. L. (1993). Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology*, 132(2), 879-887. doi:10.1210/endo.132.2.8425500
- Brelje, T. C., & Sorenson, R. L. (1991). Role of prolactin versus growth hormone on islet B-cell proliferation in vitro: implications for pregnancy. *Endocrinology*, 128(1), 45-57. doi:10.1210/endo-128-1-45
- Brennand, K., & Melton, D. (2009). Slow and steady is the key to beta-cell replication. *J Cell Mol Med*, 13(3), 472-487. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00635.x
- Brooks, C. L. (2012). Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr Rev*, 33(4), 504-525. doi:10.1210/er.2011-1040
- Campbell, J. E., & Newgard, C. B. (2021). Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22(2), 142-158. doi:10.1038/s41580-020-00317-7
- Campbell-Thompson, M. L., Montgomery, E. L., Foss, R. M., Kolheffer, K. M., Phipps, G., Schneider, L., & Atkinson, M. A. (2012). Collection protocol for human pancreas. *J Vis Exp*(63), e4039. doi:10.3791/4039
- Cejkova, P., Fojtikova, M., & Cerna, M. (2009). Immunomodulatory role of prolactin in diabetes development. *Autoimmun Rev*, 9(1), 23-27. doi:10.1016/j.autrev.2009.02.031
- Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., Kalafatakis, K., & Kamper, E. (2009). The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo*, 23(2), 245-258.
- Chen, C., Cohrs, C. M., Stertmann, J., Bozsak, R., & Speier, S. (2017). Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Metab*, 6(9), 943-957. doi:10.1016/j.molmet.2017.06.019
- Clapp, C., Adan, N., Ledesma-Colunga, M. G., Solis-Gutierrez, M., Triebel, J., & Martinez de la Escalera, G. (2016). The role of the prolactin/vasoinhibin axis in rheumatoid arthritis: an integrative overview. *Cell Mol Life Sci*, 73(15), 2929-2948. doi:10.1007/s00018-016-2187-0
- Corbacho, A. M., Macotela, Y., Nava, G., Eiserich, J. P., Cross, C. E., Martinez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2003). Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett*, 544(1-3), 171-175. doi:10.1016/s0014-5793(03)00499-x
- Damasceno, D. C., Sinzato, Y. K., Bueno, A., Netto, A. O., Dallaqua, B., Gallego, F. Q., . . . Rudge, M. V. (2013). Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. *J Diabetes Res*, 2013, 473575. doi:10.1155/2013/473575
- Deeds, M. C., Anderson, J. M., Armstrong, A. S., Gastineau, D. A., Hiddinga, H. J., Jahangir, A., . . . Kudva, Y. C. (2011). Single dose streptozotocin-induced

- diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim*, 45(3), 131-140. doi:10.1258/la.2010.010090
- Dhawan, S., Dirice, E., Kulkarni, R. N., & Bhushan, A. (2016). Inhibition of TGF-beta Signaling Promotes Human Pancreatic beta-Cell Replication. *Diabetes*, 65(5), 1208-1218. doi:10.2337/db15-1331
- Dhuria, R. S., Singh, G., Kaur, A., Kaur, R., & Kaur, T. (2015). Current status and patent prospective of animal models in diabetic research. *Adv Biomed Res*, 4, 117. doi:10.4103/2277-9175.157847
- Dolensek, J., Rupnik, M. S., & Stozer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, 7(1), e1024405. doi:10.1080/19382014.2015.1024405
- Eleazu, C. O., Eleazu, K. C., Chukwuma, S., & Essien, U. N. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord*, 12(1), 60. doi:10.1186/2251-6581-12-60
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*, 80(4), 1523-1631. doi:10.1152/physrev.2000.80.4.1523
- Freemark, M., Avril, I., Fleenor, D., Driscoll, P., Petro, A., Opara, E., . . . Kelly, P. A. (2002). Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology*, 143(4), 1378-1385. doi:10.1210/endo.143.4.8722
- Fu, Z., Gilbert, E. R., & Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev*, 9(1), 25-53.
- Fujinaka, Y., Takane, K., Yamashita, H., & Vasavada, R. C. (2007). Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *J Biol Chem*, 282(42), 30707-30717. doi:10.1074/jbc.M702607200
- George, D. (2013). *Prolactin & Prolactin Signaling Pathways in Cancer Risk & Tumorigenesis*.
- Gorvin, C. M. (2015). The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *J Clin Transl Endocrinol*, 2(3), 85-91. doi:10.1016/j.jcte.2015.05.001
- Graham, M. L., Janecek, J. L., Kittredge, J. A., Hering, B. J., & Schuurman, H. J. (2011). The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comp Med*, 61(4), 356-360.
- Grant, C. W., Duclos, S. K., Moran-Paul, C. M., Yahalom, B., Tirabassi, R. S., Arreaza-Rubin, G., . . . Guberski, D. L. (2012). Development of standardized insulin treatment protocols for spontaneous rodent models of type 1 diabetes. *Comp Med*, 62(5), 381-390.
- Gromada, J., Chabosseau, P., & Rutter, G. A. (2018). The alpha-cell in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 14(12), 694-704. doi:10.1038/s41574-018-0097-y
- Gurley, S. B., Clare, S. E., Snow, K. P., Hu, A., Meyer, T. W., & Coffman, T. M. (2006). Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290(1), F214-222. doi:10.1152/ajprenal.00204.2005

- Hartmann, K., Besch, W., & Zuhlke, H. (1989). Spontaneous recovery of streptozotocin diabetes in mice. *Exp Clin Endocrinol*, 93(2-3), 225-230. doi:10.1055/s-0029-1210861
- Holstad, M., & Sandler, S. (1999). Prolactin protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *J Endocrinol*, 163(2), 229-234. doi:10.1677/joe.0.1630229
- Huang, C., Snider, F., & Cross, J. C. (2009). Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology*, 150(4), 1618-1626. doi:10.1210/en.2008-1003
- Hugl, S. R., & Merger, M. (2007). Prolactin stimulates proliferation of the glucose-dependent beta-cell line INS-1 via different IRS-proteins. *JOP*, 8(6), 739-752.
- Hyslop, C. M., Tsai, S., Shrivastava, V., Santamaria, P., & Huang, C. (2016). Prolactin as an Adjunct for Type 1 Diabetes Immunotherapy. *Endocrinology*, 157(1), 150-165. doi:10.1210/en.2015-1549
- Johansson, U., Rasmusson, I., Niclou, S. P., Forslund, N., Gustavsson, L., Nilsson, B., . . . Magnusson, P. U. (2008). Formation of composite endothelial cell-mesenchymal stem cell islets: a novel approach to promote islet revascularization. *Diabetes*, 57(9), 2393-2401. doi:10.2337/db07-0981
- Jun, H. S., Khil, L. Y., & Yoon, J. W. (2002). Role of glutamic acid decarboxylase in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Cell Mol Life Sci*, 59(11), 1892-1901. doi:10.1007/pl00012512
- Kataoka, M., Kawamuro, Y., Shiraki, N., Miki, R., Sakano, D., Yoshida, T., . . . Kume, S. (2013). Recovery from diabetes in neonatal mice after a low-dose streptozotocin treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, 430(3), 1103-1108. doi:10.1016/j.bbrc.2012.12.030
- Kelly, P. A., Binart, N., Freemark, M., Lucas, B., Goffin, V., & Bouchard, B. (2001). Prolactin receptor signal transduction pathways and actions determined in prolactin receptor knockout mice. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 2), 48-52. doi:10.1042/0300-5127:0290048
- Kim, H., Toyofuku, Y., Lynn, F. C., Chak, E., Uchida, T., Mizukami, H., . . . German, M. S. (2010). Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med*, 16(7), 804-808. doi:10.1038/nm.2173
- King, A. J. (2012). The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*, 166(3), 877-894. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x
- Kondegowda, N. G., Fenutria, R., Pollack, I. R., Orthofer, M., Garcia-Ocana, A., Penninger, J. M., & Vasavada, R. C. (2015). Osteoprotegerin and Denosumab Stimulate Human Beta Cell Proliferation through Inhibition of the Receptor Activator of NF-kappaB Ligand Pathway. *Cell Metab*, 22(1), 77-85. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.021
- Lambelet, M., Terra, L. F., Fukaya, M., Meyerovich, K., Labriola, L., Cardozo, A. K., & Allagnat, F. (2018). Dysfunctional autophagy following exposure to pro-inflammatory cytokines contributes to pancreatic beta-cell apoptosis. *Cell Death Dis*, 9(2), 96. doi:10.1038/s41419-017-0121-5
- Lemini, M., Ruiz-Herrera, X., Ledesma-Colunga, M. G., Diaz-Lezama, N., De Los Rios, E. A., Lopez-Barrera, F., . . . Clapp, C. (2015). Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: role

- of TGF-beta and TNF-alpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 308(9), R792-799. doi:10.1152/ajpregu.00327.2014
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216-226. doi:10.1007/s00125-007-0886-7
- Li, J., Rice, M. S., Huang, T., Hankinson, S. E., Clevenger, C. V., Hu, F. B., & Tworoger, S. S. (2018). Circulating prolactin concentrations and risk of type 2 diabetes in US women. *Diabetologia*, 61(12), 2549-2560. doi:10.1007/s00125-018-4733-9
- Li, Z., Karlsson, F. A., & Sandler, S. (2000). Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice. *J Endocrinol*, 165(1), 93-99. doi:10.1677/joe.0.1650093
- Lukic, M. L., Stosic-Grujicic, S., & Shahin, A. (1998). Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunol*, 6(1-2), 119-128. doi:10.1155/1998/92198
- Macotela, Y., Triebel, J., & Clapp, C. (2020). Time for a New Perspective on Prolactin in Metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 31(4), 276-286. doi:10.1016/j.tem.2020.01.004
- Manell, E. A., Ryden, A., Hedenqvist, P., Jacobson, M., & Jensen-Waern, M. (2014). Insulin treatment of streptozotocin-induced diabetes re-establishes the patterns in carbohydrate, fat and amino acid metabolisms in growing pigs. *Lab Anim*, 48(3), 261-269. doi:10.1177/0023677213517683
- Marano, R. J., & Ben-Jonathan, N. (2014). Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Mol Endocrinol*, 28(5), 622-633. doi:10.1210/me.2013-1349
- Melendez Garcia, R., Arredondo Zamarripa, D., Arnold, E., Ruiz-Herrera, X., Noguez Imm, R., Baeza Cruz, G., . . . Thebault, S. (2016). Prolactin protects retinal pigment epithelium by inhibiting sirtuin 2-dependent cell death. *EBioMedicine*, 7, 35-49. doi:10.1016/j.ebiom.2016.03.048
- Moldrup, A., Billestrup, N., & Nielsen, J. H. (1990). Rat insulinoma cells express both a 115-kDa growth hormone receptor and a 95-kDa prolactin receptor structurally related to the hepatic receptors. *J Biol Chem*, 265(15), 8686-8690.
- Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*, 34(2-3), 121-138. doi:10.1016/j.mam.2012.07.001
- Nahdi, A., John, A., & Raza, H. (2017). Elucidation of Molecular Mechanisms of Streptozotocin-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Rin-5F Pancreatic beta-Cells. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 7054272. doi:10.1155/2017/7054272
- Nielsen, J. H. (1982). Effects of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on insulin content and release, and deoxyribonucleic acid synthesis in cultured pancreatic islets. *Endocrinology*, 110(2), 600-606. doi:10.1210/endo-110-2-600
- Nordquist, L., & Sjoquist, M. (2009). Improvement of insulin response in the streptozotocin model of insulin-dependent diabetes mellitus. Insulin response with and without a long-acting insulin treatment. *Animal*, 3(5), 685-689. doi:10.1017/S175173110800387X

- O'Brien, B. A., Harmon, B. V., Cameron, D. P., & Allan, D. J. (1996). Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol*, 178(2), 176-181. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199602)178:2<176::AID-PATH433>3.0.CO;2-8
- Pandiri, A. R. (2014). Overview of exocrine pancreatic pathobiology. *Toxicol Pathol*, 42(1), 207-216. doi:10.1177/0192623313509907
- Perez-Armendariz, E. M. (2013). Connexin 36, a key element in pancreatic beta cell function. *Neuropharmacology*, 75, 557-566. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.08.015
- Qinna, N. A., & Badwan, A. A. (2015). Impact of streptozotocin on altering normal glucose homeostasis during insulin testing in diabetic rats compared to normoglycemic rats. *Drug Des Devel Ther*, 9, 2515-2525. doi:10.2147/DDDT.S79885
- Quesada, I., Tuduri, E., Ripoll, C., & Nadal, A. (2008). Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol*, 199(1), 5-19. doi:10.1677/JOE-08-0290
- Radenkovic, M., Stojanovic, M., & Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 78, 13-31. doi:10.1016/j.vascn.2015.11.004
- Roder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*, 48, e219. doi:10.1038/emm.2016.6
- Rodriguez-Diaz, R., & Caicedo, A. (2014). Neural control of the endocrine pancreas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 28(5), 745-756. doi:10.1016/j.beem.2014.05.002
- Ruiz-Herrera, X., de Los Rios, E. A., Diaz, J. M., Lerma-Alvarado, R. M., Martinez de la Escalera, L., Lopez-Barrera, F., . . . Macotella, Y. (2017). Prolactin Promotes Adipose Tissue Fitness and Insulin Sensitivity in Obese Males. *Endocrinology*, 158(1), 56-68. doi:10.1210/en.2016-1444
- Sapra, A., & Bhandari, P. (2021). Diabetes Mellitus. In *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Siddle, K. (2011). Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol*, 47(1), R1-10. doi:10.1530/JME-11-0022
- Sorenson, R. L., & Brelje, T. C. (2001). Regulation of Pancreatic Islets by Prolactin, Growth Hormone and Placental Lactogen. In N. D. Horseman (Ed.), *Prolactin* (pp. 297-316). Boston, MA: Springer US.
- Sorenson, R. L., & Brelje, T. C. (2009). Prolactin receptors are critical to the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology*, 150(4), 1566-1569. doi:10.1210/en.2008-1710
- Sorenson, R. L., & Stout, L. E. (1995). Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an immunohistochemical analysis. *Endocrinology*, 136(9), 4092-4098. doi:10.1210/endo.136.9.7649117
- Stout, L. E., Svensson, A. M., & Sorenson, R. L. (1997). Prolactin regulation of islet-derived INS-1 cells: characteristics and immunocytochemical analysis of STAT5 translocation. *Endocrinology*, 138(4), 1592-1603. doi:10.1210/endo.138.4.5089

- Tesch, G. H., & Allen, T. J. (2007). Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 12(3), 261-266. doi:10.1111/j.1440-1797.2007.00796.x
- Vetere, A., Choudhary, A., Burns, S. M., & Wagner, B. K. (2014). Targeting the pancreatic beta-cell to treat diabetes. *Nat Rev Drug Discov*, 13(4), 278-289. doi:10.1038/nrd4231
- Wagner, K. U., & Schmidt, J. W. (2011). The two faces of Janus kinases and their respective STATs in mammary gland development and cancer. *J Carcinog*, 10, 32. doi:10.4103/1477-3163.90677
- Wagner, R., Heni, M., Linder, K., Ketterer, C., Peter, A., Bohm, A., . . . Fritsche, A. (2014). Age-dependent association of serum prolactin with glycaemia and insulin sensitivity in humans. *Acta Diabetol*, 51(1), 71-78. doi:10.1007/s00592-013-0493-7
- Wang, D., Zhu, H., Zhu, Y., Liu, Y., Shen, H., Yin, R., . . . Su, Z. (2013). CD133(+)/CD44(+)/Oct4(+)/Nestin(+) stem-like cells isolated from Panc-1 cell line may contribute to multi-resistance and metastasis of pancreatic cancer. *Acta Histochem*, 115(4), 349-356. doi:10.1016/j.acthis.2012.09.007
- Wang, P., Karakose, E., Liu, H., Swartz, E., Ackeifi, C., Zlatanic, V., . . . Stewart, A. F. (2019). Combined Inhibition of DYRK1A, SMAD, and Trithorax Pathways Synergizes to Induce Robust Replication in Adult Human Beta Cells. *Cell Metab*, 29(3), 638-652 e635. doi:10.1016/j.cmet.2018.12.005
- Wang, T., Lu, J., Xu, Y., Li, M., Sun, J., Zhang, J., . . . Ning, G. (2013). Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation: a population-based study. *Diabetes Care*, 36(7), 1974-1980. doi:10.2337/dc12-1893
- Weinhaus, A. J., Stout, L. E., Bhagroo, N. V., Brelje, T. C., & Sorenson, R. L. (2007). Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *J Endocrinol*, 193(3), 367-381. doi:10.1677/JOE-07-0043
- Wu, J., & Yan, L. J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic beta cell glucotoxicity. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 8, 181-188. doi:10.2147/DMSO.S82272
- Wu, K. K., & Huan, Y. (2008). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol*, Chapter 5, Unit 5 47. doi:10.1002/0471141755.ph0547s40
- Yamamoto, T., Mita, A., Ricordi, C., Messinger, S., Miki, A., Sakuma, Y., . . . Ichii, H. (2010). Prolactin supplementation to culture medium improves beta-cell survival. *Transplantation*, 89(11), 1328-1335. doi:10.1097/TP.0b013e3181d98af1
- Yu, J., Xiao, F., Zhang, Q., Liu, B., Guo, Y., Lv, Z., . . . Guo, F. (2013). PRLR regulates hepatic insulin sensitivity in mice via STAT5. *Diabetes*, 62(9), 3103-3113. doi:10.2337/db13-0182
- Zhang, Y., Zhang, Y., Bone, R. N., Cui, W., Peng, J. B., Siegal, G. P., . . . Wu, H. (2012). Regeneration of pancreatic non-beta endocrine cells in adult mice following a single diabetes-inducing dose of streptozotocin. *PLoS One*, 7(5), e36675. doi:10.1371/journal.pone.0036675

International Diabetes Federation. (2019). *IDF Diabetes Atlas, 9th edn.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.

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

American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 33(Supplement 1), S62-S69.

XI. ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1. Anatomía macroscópica del páncreas humano y de ratón...	5
Figura 2. Citoarquitectura del islote de Langerhans en humanos y roedores.....	8
Figura 3. Vías canónicas de señalización de la insulina.....	10
Figura 4. Estructura química de la estreptozotocina	15
Figura 5. Hormona prolactina y su receptor.....	17
Figura 6. Principales vías de señalización activadas por la unión prolactina-receptor de la prolactina	19
Figura 7. Niveles de prolactina sérica y sus efectos metabólicos	22
Figura 8. Mecanismo de glucotoxicidad de la célula β por estreptozotocina	23
Figura 9. Resumen esquemático del diseño experimental.....	26
Figura 10. La ausencia del receptor de la prolactina aumenta el número de casos, la latencia de recuperación y la severidad de la diabetes inducida por estreptozotocina	34
Figura 11. La ausencia del receptor de la prolactina reduce la tolerancia a la glucosa y la respuesta a la insulina en la diabetes inducida por estreptozotocina	37
Figura 12. La ausencia del receptor de la prolactina agrava los cambios en densidad de islotes y el número de células β y α en la diabetes inducida por estreptozotocina	38
Figura 13. La ausencia del receptor de la prolactina agudiza la reducción de los niveles circulantes de insulina y no modifica los niveles circulantes de glucagon en la diabetes inducida por estreptozotocina	40

Figura 14. La ausencia del receptor de la prolactina reduce la proliferación de las células β en la diabetes inducida por estreptozotocina	42
Figura 15. La ausencia del receptor de la prolactina aumenta la muerte celular por apoptosis del páncreas en la diabetes inducida por estreptozotocina	44
Figura 16. La ausencia del receptor de la prolactina aumenta la muerte celular por apoptosis en las células β del páncreas en la diabetes inducida por estreptozotocina	45
Figura 17. La ausencia del receptor de la prolactina aumenta la inflamación del páncreas en la diabetes inducida por estreptozotocina	46
Figura 18. Comparación de las alteraciones metabólicas derivadas de la diabetes inducida por estreptozotocina entre el ratón silvestre (<i>Prlr^{+/+}</i>) vs el carente de señalización de prolactina (<i>Prlr^{-/-}</i>)	54

XII. ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Secuencia específica de oligonucleótidos para la amplificación de genes por qPCR.....	30
--	----

XIII. ANEXOS

Lista de publicaciones

1. Robles, J. P., Zamora, M., Siqueiros-Marquez, M., Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Nuñez, F. F., Lopez-Casillas, F., Millar, R. P., Bertsch, T., Martinez de la Escalera, G., Triebel, J., and Clapp, C. (2021). The HGR motif is the antiangiogenic determinant of vasoinhibin: implications for a therapeutic orally active oligopeptide. *Angiogenesis*.
2. **Ramirez-Hernandez, G.**, Adan-Castro, E., Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Martinez de la Escalera, G., Macotela, Y., and Clapp, C. (2021). Global deletion of the prolactin receptor aggravates streptozotocin-induced diabetes in mice. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 619696.
3. Nuñez-Amaro, C. D., Moreno-Vega, A. I., Adan-Castro, E., Zamora, M., Garcia-Franco R., Ramirez-Neria, P., Garcia-Roa, M., Villalpando, Y., Robles, J. P., **Ramirez-Hernandez, G.**, Lopez, M., Sanchez, J., Lopez-Star, E., Bertsch, T., Martinez de la Escalera, G., Robles-Osorio, M. L., Triebel J., and Clapp, C. (2020). Levosulpiride Increases the Levels of Prolactin and Antiangiogenic Vasoinhibin in the Vitreous of Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. *Translational Vision Science and Technology*, 9(9), 27.
4. Vazquez-Membrillo, M., Siqueiros-Marquez, L., Nuñez, F., Diaz-Lezama, N., Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Adan, N., Macotela, T., Martinez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2020). Prolactin stimulates the vascularization of the retina in newborn mice under hyperoxia conditions. *Journal of Neuroendocrinology*, 2020; 00:e12858.
5. Perez-Ortiz, A. C., Peralta-Ildefonso, M. J., Lira-Romero, E., Moya-Albor, E., Brieva, J., Ramirez-Sanchez, I., Clapp, C., Luna-Angulo, A., Rendon, A., Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Diaz-Lezama, N., Coral-Vazquez, R. M., and Estrada-Mena, F. J. (2019). Lack of Delta-Sarcoglycan (Sgcd) Results in Retinal Degeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), E5480.

6. Clapp, C., Diaz-Lezama, N., Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Moreno-Carranza, B., Sarti, A. C., Falzoni, S., Solini, A. and Di Virgilio, F. (2019). Pharmacological blockade of the P2X7 receptor reverses retinal damage in a rat model of type 1 diabetes. *Acta Diabetologica*, 59(9), 1039-1036.

Lista de premios y reconocimientos

1. **Primer lugar**, en la exposición de carteles. Categoría: Doctorado. XXV Aniversario de las Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM. Trabajo presentado "*Prolactin protects against diabetes in mice by promoting pancreatic β cell survival, number and function*". Juriquilla, Querétaro, México. Septiembre 2018.
2. **Travel Award** por "Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB)", en el marco de las conferencias "The GH/ PRL Family in Biology and Disease". Trabajo presentado "*Prolactin protects against experimental diabetes in mice*". West Palm Beach, Florida, USA. Julio 2019.
3. **Segundo lugar**, en presentación oral. XXVI Aniversario de las Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM. Trabajo presentado "*Prolactin protects against diabetes induced by streptozotocin in mice*". Juriquilla, Querétaro, México. Septiembre 2019.
4. **Scholarship Award** por Keystone eSymposia, en el marco del Virtual Meeting "Diabetes: Many Faces of the Disease". Trabajo presentado "*Prolactin reduces the severity of diabetes by preventing β cells loss and pancreas inflammation*". VKS International. Febrero 2021.

Lista de presentaciones orales en congresos

1. "Prolactin protects against experimental diabetes in mice", The Growth Hormone (GH)/ Prolactin (PRL) Family in Biology and Disease Conference, FASEB, West Palm Beach, Florida, USA. Julio 2019.

2. "Prolactin protects against diabetes induced by streptozotocina in mice", 26 Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología-UNAM, Juriquilla, Querétaro, México. Septiembre 2019.

Lista de presentaciones de carteles en congresos

1. **Ramirez-Hernandez, G.**, Gonzalez-Marcos, O., Mendez-Puga, M. A., Pasaye Chavez, K. (2012). Interacción Farmacocinética entre fenitoína y ácido fólico: reporte de un caso en Centro Médico ABC. VI Congreso Nacional de Farmacovigilancia, 6 y 7 de septiembre, Querétaro, México.
2. **Ramirez-Hernandez G.**, Adan-Castro, E., Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Martinez de la Escalera, G., Macotela, Y., Clapp, C. (2016). Prolactin protects against the diabetes induced by streptozotocin in mice. XXIII Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM, 26-30 de septiembre, Querétaro, México.
3. Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Arnold, E., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C. (2016). Pharmacological hyperprolactinemia protects against diabetic retinopathy in rats. XXIII Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM, 26-30 de septiembre, Querétaro, México.
4. **Ramirez-Hernandez G.**, Adan-Castro, E., Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Macotela, Y., Clapp, C., Martinez de la Escalera, G. (2017). Efecto protector de la prolactina en el modelo experimental de diabetes mellitus inducido por estreptozotocina en el ratón. XLII Reunión anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción (AIBIR), 22-24 de mayo, Guadalajara, México.
5. Adan-Castro, E., Diaz-Lezama, N., **Ramirez-Hernandez, G.**, Ruiz-Herrera, X., Arnold, E., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C. (2017). La hiperprolactinemia inducida por sulpirida protege contra la vasopermeabilidad excesiva debida a la diabetes en la rata. XLII Reunión anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción (AIBIR), 22-24 de mayo, Guadalajara, México.

6. **Ramirez-Hernandez, G.**, Diaz-Lezama, N., Adan-Castro, E., Ruiz-Herrera, X., Macotela, Y., Arnold, E., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C. (2017). Prolactin protects neuroretinal function and vascular stability in diabetic mice. XXIV Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM, 25-29 de septiembre, Querétaro, México.
7. Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Arnold, E., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C. (2017). Sulpiride protects against diabetic retinopathy in rats by increasing systemic prolactin and the accumulation of ocular vasoinhibins. XXIV Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM, 25-29 de septiembre, Querétaro, México.
8. Vazquez-Membrillo, M., Diaz-Lezama, N., Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Ledezma-Colunga, M. G., Ruiz-Herrera, X., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C. (2017). Prolactin promotes the hyperoxia-induced inhibition of retinal neovascularization in newborn mice. XXIV Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM, 25-29 de septiembre, Querétaro, México.
9. **Ramirez-Hernandez, G.**, Diaz-Lezama, N., Adan-Castro, E., Ruiz-Herrera, X., Macotela, Y., Arnold, E., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C. (2017). Prolactin protects neuroretinal function and vascular stability in diabetic mice. II Congreso de Neurobiología de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, 15-17 de octubre, Querétaro, México.
10. Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Arnold, E., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C. (2017). Sulpiride protects against diabetic retinopathy in rats by increasing systemic prolactin and the accumulation of ocular vasoinhibins. II Congreso de Neurobiología de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, 15-17 de octubre, Querétaro, México.
11. Vazquez-Membrillo, M., Diaz-Lezama, N., Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Ledezma-Colunga, M. G., Ruiz-Herrera, X., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C. (2017). Prolactin promotes the hyperoxia-induced inhibition of retinal neovascularization in newborn mice. II Congreso de

Neurobiología de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, 15-17 de octubre, Querétaro, México.

12. **Ramirez-Hernandez G.**, Adan-Castro, E., Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Martinez de la Escalera, G., Macotela, Y., Clapp, C., (2018). Prolactin Protects Against Diabetes in Mice. 100th Annual Meeting of the Endocrine Society, 17-20 de marzo, Chicago, USA.
13. Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Arnold, E., Robles-Osorio, M. L., Garcia-Franco, R., Bertsch, T., Triebel, J., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C. (2018). Increasing Systemic Prolactin and Ocular Vasoinhibins by a Dopamine D2 Antagonist Protects Against Diabetic Retinopathy In Rats. 100th Annual Meeting of the Endocrine Society, 17-20 de marzo, Chicago, USA.
14. **Ramirez-Hernandez, G.**, Adan-Castro, E., Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C., Macotela, Y. (2018). Prolactin protects against diabetes in mice by promoting pancreatic β cell survival, number and function. XXV Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM, 24-28 de septiembre, Querétaro, México.
15. Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Arnold, E., Martinez de la Escalera, G., Robles-Osorio, M. L., Clapp, C. (2018). Hyperprolactinemia increases intraocular vasoinhibins and protects against diabetic retinopathy in rats. XXV Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM, 24-28 de septiembre, Querétaro, México.
16. Vazquez-Membrillo, M., Diaz-Lezama, N., Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Ledezma-Colunga, M. G., Adan, N., Siqueiros-Marquez, L., Freinet, F., Zamora, M., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C. (2019). Prolactin Reduces the Hyperoxia-Induced Inhibition of Retinal Neovascularization in Newborn Mice. 101st Annual Meeting of the Endocrine Society, 23-26 de marzo, New Orleans, USA.
17. **Ramirez-Hernandez, G.**, Adan-Castro, E., Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Martinez de la Escalera, G., Macotela, Y., Clapp, C. (2019). Prolactin protects against diabetes induced by streptozotocin in mice. The Growth Hormone/

Prolactin Family in Biology and Disease Conference, FASEB, 7-12 de julio, West Palm Beach, Florida, USA.

18. **Ramirez-Hernandez, G.**, Adan-Castro, E., Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Martinez de la Escalera, G., Macotela, Y., Clapp, C. (2019). Prolactin protective effect on experimental diabetes induced by streptozotocin in mice. ICFO-UNAM International Schools on the Frontiers of Light: Biophotonics, 21-25 de octubre, Querétaro, México.
19. Adan-Castro, E., Diaz-Lezama, N., **Ramirez-Hernandez, G.**, Ruiz-Herrera, X., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C. (2019). La hiperprolactinemia eleva a la vasoinhibina ocular y protege contra retinopatía diabética en la rata. LXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, 11-15 de agosto, Querétaro, México.
20. Vazquez-Carrillo, D., Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Martinez de la Escalera, G., Clapp, C., Macotela, Y. (2019). La sulpirida reduce la hiperglucemia y la hipertrofia de los adipocitos en ratones con obesidad. LXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, 11-15 de agosto, Querétaro, México.
21. Núñez, F. F., Siqueiros-Marquez, L., Vazquez-Membrillo, M., Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Martínez de la Escalera, G., Clapp, C. (2019). Analysis of the generation of vasoinhibin in the retina during the early postnatal development of the mouse. XXVI Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM, 23-27 de septiembre, Querétaro, México.
22. Siqueiros-Marquez, L., Adan-Castro, E., Núñez, F. F., **Ramirez-Hernandez, G.**, Granados-Carrasco, D. Martínez de la Escalera, G., Clapp, C. (2019). Pharmacologic hyperprolactinemia protects retinal function in diabetic rats. XXVI Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM, 23-27 de septiembre, Querétaro, México.
22. Vazquez-Carrillo, D., Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., Macotela, Y. (2019). Sulpiride, a dopamine D2 receptor antagonist elevates PRL levels and reduces hyperglycemia and

adipocyte hypertrophy in obese mice. XXVI Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM, 23-27 de septiembre, Querétaro, México.

23. Adan-Castro, E., **Ramirez-Hernandez, G.**, Diaz-Lezama, N., Siqueiros-Marquez, L. M., Granados-Carrasco, D., Ruiz-Herrera, X., Lopez-Barrera, F., Robles-Osorio, L., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C. (2020). Sulpiride increases intraocular vasoinhibin and protects against diabetic retinopathy in rats. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Annual Meeting, 61, 1881.
24. **Ramirez-Hernandez, G.**, Adan-Castro, E., Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Martinez de la Escalera, G., Macotela, Y., Clapp, C. (2020). Prolactin protects against diabetes induced by streptozotocin in mice. XXVII Jornadas Académicas del Instituto de Neurobiología, UNAM, 23 de agosto - 24 de septiembre, Querétaro, México.
25. **Ramirez-Hernandez, G.**, Adan-Castro, E., Diaz-Lezama, N., Ruiz-Herrera, X., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C., Macotela, Y. (2021). Prolactin reduces the severity of diabetes by preventing β -cells loss and pancreas inflammation. Keystone eSymposia Virtual Meeting "Diabetes: Many Faces of the Disease", VKS International.



Global Deletion of the Prolactin Receptor Aggravates Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice

Gabriela Ramirez-Hernandez, Elva Adan-Castro, Nundehui Díaz-Lezama, Xarubet Ruiz-Herrera, Gonzalo Martinez de la Escalera, Yazmin Macotela* and Carmen Clapp*

Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Åke Sjöholm,
Gävle Hospital, Sweden

Reviewed by:

Erik Joly,
University of Montreal Hospital Centre
(CRCHUM), Canada
Victor Alan Gault,
Ulster University, United Kingdom

*Correspondence:

Carmen Clapp
clapp@unam.mx
Yazmin Macotela
macotelag@unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Diabetes: Molecular Mechanisms,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 13 November 2020

Accepted: 12 January 2021

Published: 05 March 2021

Citation:

Ramirez-Hernandez G,
Adan-Castro E, Díaz-Lezama N,
Ruiz-Herrera X,
Martinez de la Escalera G,
Macotela Y and Clapp C
(2021) Global Deletion of the Prolactin
Receptor Aggravates Streptozotocin-
Induced Diabetes in Mice.
Front. Endocrinol. 12:619696.
doi: 10.3389/fendo.2021.619696

Prolactin (PRL) levels are reduced in the circulation of rats with diabetes or obesity, and lower circulating levels of PRL correlate with increased prevalence of diabetes and a higher risk of metabolic alterations in the clinic. Furthermore, PRL stimulates β -cell proliferation, survival, and insulin production and pregnant mice lacking PRL receptors in β -cells develop gestational diabetes. To investigate the protective effect of endogenous PRL against diabetes outside pregnancy, we compared the number of cases and severity of streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemia between C57BL/6 mice null for the PRL receptor gene ($Prlr^{-/-}$) and wild-type mice ($Prlr^{+/+}$). STZ-treated diabetic $Prlr^{-/-}$ mice showed a higher number of cases and later recovery from hyperglycemia, exacerbated glucose levels, and glucose intolerance compared to the $Prlr^{+/+}$ mice counterparts. Consistent with the worsening of hyperglycemia, pancreatic islet density, β -cell number, proliferation, and survival, as well as circulating insulin levels were reduced, whereas α -cell number and pancreatic inflammation were increased in the absence of PRL signaling. Deletion of the PRL receptor did not alter the metabolic parameters in vehicle-treated animals. We conclude that PRL protects whole body glucose homeostasis by reducing β -cell loss and pancreatic inflammation in STZ-induced diabetes. Medications elevating PRL circulating levels may prove to be beneficial in diabetes.

Keywords: STZ-induced diabetes, prolactin, prolactin receptor null mice, beta-cell, glucose homeostasis

INTRODUCTION

Loss of pancreatic β -cells is a hallmark of diabetes type 1 and type 2, and factors that prevent β -cell loss or promote the generation of new β -cells are promising therapeutics (1). One such factor is the pituitary hormone prolactin (PRL). The PRL receptor (PRLR) is expressed in β -cells, where PRL stimulates proliferation, survival, insulin synthesis, glucose-induced insulin secretion, and glucose transporter 2 expression (2–6). The global $Prlr$ null mouse (on a 129svj background) has reduced

Abbreviations: BW, body weight; PRL, prolactin; PRLR, Prolactin receptor; $Prlr^{-/-}$, prolactin receptor null mice; $Prlr^{+/+}$, wild type mice (same genetic background as $Prlr^{-/-}$ mice); STZ, streptozotocin.

islet size and density, decreased β -cell mass, and lowered production and secretion of insulin in response to glucose treatment (7). Also, mice lacking the PRLR in the pancreas (8) and specifically in β -cells, develop gestational diabetes (9).

The protective role of PRL in diabetes is further suggested by the facts that the circulating levels of PRL are reduced in rats with streptozotocin (STZ)-induced diabetes and diet-induced obesity (10–12), and low circulating PRL levels are deleterious for glucose homeostasis (13). Treatment of obese rats with PRL improves insulin sensitivity and challenging global *Prlr* null mice with an obesogenic diet exacerbates insulin resistance and glucose intolerance (12). Moreover, low serum PRL levels are associated with an increased prevalence of type 2 diabetes, insulin resistance, glucose intolerance, and fatty liver in the clinic (13–18). Nevertheless, the influence of the endogenous hormone on diabetes development and progression outside pregnancy remains unclear. PRL treatment reduces blood glucose levels in STZ-induced diabetes in mice (19) but high doses of the hormone induce β -cell apoptosis in 90% pancreatectomized rats (20). Here, we used the global *Prlr* null mice on a C57BL/6 background, a strain highly sensitive to the diabetogenic drug STZ (21, 22), and show that, when challenged with STZ, these animals are more susceptible to developing hyperglycemia and have a more severe hyperglycemic phenotype as revealed by higher blood glucose levels, glucose intolerance, islet loss, reduced β -cell number and survival, and increased pancreatic inflammation. These observations show the requirement of PRL signaling for glucose homeostasis and β -cell mass and function in STZ-induced diabetes and suggest the therapeutic benefit of PRL in diabetes.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female C57BL/6 mice (5–7 weeks old), wild type (*Prlr*^{+/+}) or null for the PRL receptor gene (*Prlr*^{-/-}), were housed at 22°C under a 12/12 h light/dark cycle with free access to food and water. Females were selected because they are less susceptible to STZ than males (22, 23). All animal procedures and biosecurity measurements were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the National University of Mexico (UNAM) in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (Eighth Edition, National Academy Press, Washington, D.C.). The use of streptozotocin followed the safety procedures established by the Office of Environmental Health and Safety of Virginia Commonwealth University (<http://www.vcu.edu/oehs/chemical/biosafe/STZinfo.pdf>).

STZ-Induced Diabetes

Mice were injected with five IP doses of STZ (55 mg/kg in 10 mM citrate buffer, pH 4.5) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) or vehicle (citrate buffer) after a 4-h fasting (24, 25) (one injection per day for five days). Animals with blood glucose levels >180 mg/dl one week after STZ treatment were considered diabetic (26, 27). Blood glucose levels (tail vein samples) and body weight

(BW) were measured under 4-h fasting before STZ treatment and weekly during the following 11 weeks. Animals under 4-h fasting were euthanized by CO₂ inhalation followed by decapitation at 2 or 11 weeks post-STZ. To avoid stress-induced PRL release, animals were handled daily during the seven days before sacrifice.

Serum Measurements

Insulin and glucagon serum levels were quantified using commercial ELISA kits (Crystal Chem, Downers Grove, IL, USA).

IP Glucose Tolerance Test

IP glucose tolerance test was performed 9 weeks after STZ treatment in control and diabetic *Prlr*^{+/+} and *Prlr*^{-/-} mice subjected to a 12-h fasting. Glucose levels were measured before and 15, 30, 60, 90, and 120 min after an IP injection of 2 g/kg of 50% (w/v) dextrose (PiSA Pharmaceuticals, Guadalajara, Mexico).

Light Immunohistochemistry

Pancreatic tissues were collected 11 weeks post-STZ and divided into duodenal and splenic lobes. The splenic lobes of the pancreas were fixed in 10% formalin, and 5- μ m-thick longitudinal sections were obtained. Three to four pancreatic sections per animal (each separated by 40 sections in between) were dehydrated and embedded in paraffin. Sections were deparaffinized at 60°C for 60 min and 99.5% xylene for 10 min, rehydrated with decreasing grades of ethanol (100, 95, 85, 70 and 50%) for 3 to 5 min, permeabilized (0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate) for 30 min, and incubated with antigen-retrieval buffer (10 mM sodium citrate, 0.5% Tween 20, pH 6.0) in a pressure cooker for 3 min. Double immunohistochemistry for insulin and glucagon-labeled β -cells and α -cells, respectively, used a 1:500 dilution of rabbit polyclonal anti-insulin antibody (4590, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) and mouse monoclonal anti-glucagon antibody (ab10988, Abcam, UK). The sections were then incubated with a 1:1000 dilution of biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and peroxidase-coupled goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA), and the reaction was developed using the Vectastain ABC-HRT Kit (Peroxidase) (PK-4001, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and DAB Substrate Kit (SK-4100, Vector Laboratories). Sections were counterstained with hematoxylin. The images were digitalized (Aperio ScanScope, Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) using a 40X objective. The number of β - and α -cells was quantified from at least 15 islets per animal using the Image-Pro Plus software (version 7.0.9.591, Media Cybernetics, Inc, Bethesda, MD, USA) in a blinded manner.

Fluorescence Immunohistochemistry

Paraffin-embedded sections (5- μ m-thick) of the pancreatic splenic lobe were subjected to fluorescence immunohistochemistry as described previously (28) using a 1:200 dilution of mouse monoclonal anti-insulin antibody (I2018, Sigma Aldrich, St.

Louis, MO, USA) or rabbit polyclonal antibodies against the proliferation marker, Ki67 (ab66155, Abcam, UK), and a 1:500 dilution of Alexa Fluor 488 anti-mouse or Alexa Fluor 555 anti-rabbit secondary antibodies (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sections were cover-slipped with Vectashield mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) and observed under fluorescence microscopy (Microscope BX60F5, Olympus) using the 40X objective, and the fluorescence signal was quantified from at least 15 islets per animal using the Image-Pro Plus 5.1 software.

Apoptosis Assay

TUNEL. Sections (5- μ m-thick) from the splenic lobe of the pancreas were deparaffinized, rehydrated, permeabilized, and submitted to heat-induced antigen retrieval with citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.5% Tween 20, pH 6.0) in the microwave for 1 min. Apoptosis was detected by TUNEL using the in-situ cell death detection kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Sections were then stained for insulin with a 1:200 dilution of the mouse monoclonal anti-insulin antibody described above and a 1:500 dilution of Alexa Fluor 594 anti-mouse secondary antibody (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). The sections were mounted using Vectashield mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories) and visualized under fluorescence microscopy (Microscope BX60F5, Olympus). **ELISA.** The duodenal lobe of the pancreas was fragmented, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Fragments were homogenized in lysis buffer (5 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 1mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 100 mM sodium acid pyrophosphate, 250 mM sucrose, 1% Igepal Ca-630, pH 7.5) and total protein was determined by Bradford. Equal amounts of protein (60 μ g) were evaluated by the cell death detection ELISA kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

RT-qPCR

Frozen pancreatic duodenal lobes were pulverized in liquid nitrogen, total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and cDNA was synthesized with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR products were detected and quantified using Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) in a final reaction of 10 μ l containing template and 0.5 μ M of each of the primer pairs defined in **Supplementary Table 1**. The PCR data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method and gene expression was normalized to the housekeeping gene cyclophilin A.

Statistics

Statistical data analysis was performed using GraphPad Prism 6.0c software (Systat Software, San Jose, CA). When the distribution was normal and variances equal, the unpaired two-tailed Student's *t*-test evaluated differences between two groups, whereas one-way ANOVA or two-way repeated measures ANOVA, as required, followed by Tukey's *post-hoc* test compared means of multiple groups. The Log-Rank test compared the Kaplan-Meier survival analysis. Fisher's test evaluated the association between numerical variables. The threshold for significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

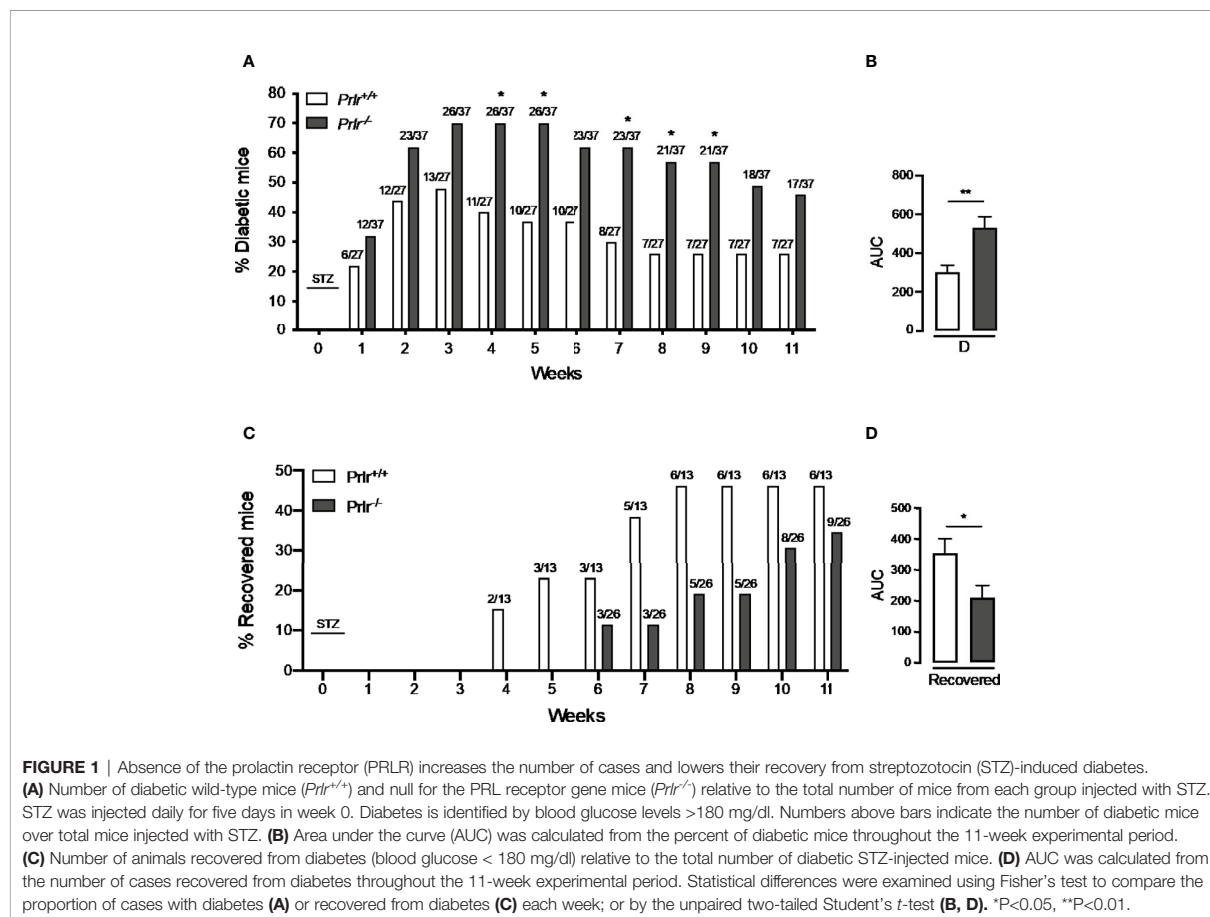
Deletion of the PRLR Increases the Cases, Reduces the Recovery, and Enhances the Severity of STZ-Induced Diabetes

To analyze whether the lack of PRL signaling influences the number of cases and the severity of STZ-induced diabetes, blood glucose was determined in *Prlr*^{-/-} mice and *Prlr*^{+/+} mice once a week for the 11 weeks after treatment with STZ. Animals were considered diabetic when blood glucose levels were above 180 mg/dl (26, 27). At week 3, the number of diabetic cases relative to the total number of STZ-injected mice was maximal in both *Prlr*^{+/+} mice (48%) and *Prlr*^{-/-} mice (70%), and dropped gradually thereafter, reaching a minimum at weeks 8 and 11 in *Prlr*^{+/+} mice (26%) and *Prlr*^{-/-} mice (46%), respectively (**Figure 1A**). The proportion of total diabetic cases, defined by the area under the curve (AUC), was higher ($P=0.003$) in *Prlr* null mice than in wild-type mice (**Figure 1B**). The number of animals recovered from diabetes (blood glucose <180 mg/dl) relative to the total number of diabetic STZ-injected mice is indicated in **Figure 1C**. Recovery started earlier (4 versus 6 weeks post-STZ) and was higher in *Prlr*^{+/+} mice than in *Prlr*^{-/-} mice. The proportion of total recovered cases, defined by the area under the curve (AUC), was lower ($P=0.04$) in *Prlr* null mice than in wild-type mice (**Figure 1D**). Once recovered, BW and blood glucose levels were similar between *Prlr*^{+/+} and *Prlr*^{-/-} mice (data not shown). Furthermore, diabetic STZ-injected *Prlr*^{-/-} mice showed higher fasting glucose levels in the circulation, particularly during the first half of the experimental period (weeks 2 to 6 post-STZ) (**Figure 2A**). Glucose levels were similar between vehicle-injected groups. The AUC defined by glucose levels showed that glucose values were in average 21% higher in diabetic *Prlr*^{-/-} mice than in diabetic *Prlr*^{+/+} mice (299 ± 8.1 vs. 246 ± 12.7 , $P=0.002$) (**Figure 2B**).

Vehicle-injected wild type mice and *Prlr* null mice gained around 4 g of BW from week 0 to week 11, which represented a 24% and a 23% increase in their BW, respectively (**Figure 2C**). The BW gain of diabetic STZ-injected *Prlr*^{+/+} mice appeared lower (13%) than that of the vehicle-injected counterparts (24%), but the difference was not statistically significant. However, the reduction in BW gain observed between STZ-induced diabetic and vehicle-treated *Prlr*^{-/-} mice (8% vs. 23%, respectively) was significant ($P<0.04$) (**Figure 2C**). Also, the survival rate throughout the 11 weeks of diabetes appeared lower in the absence of the PRLR (86% diabetic *Prlr*^{-/-} mice and 96% diabetic *Prlr*^{+/+} mice survived) (**Figure 2D**). These findings indicate that absence of PRL signaling increases the number of cases and worsens the progression and health outcome of STZ-induced diabetes in mice.

Deletion of the PRLR Aggravates Glucose Metabolism in STZ-Induced Diabetes

Next, we performed the glucose tolerance test to evaluate the capacity of *Prlr*^{-/-} mice to maintain glucose homeostasis. Vehicle-treated *Prlr*^{+/+} mice and *Prlr*^{-/-} mice showed a similar handling of a glucose load (**Figure 3A**). The glucose load resulted in higher



blood glucose levels in the diabetic STZ-treated *Prlr*^{+/+} mice that decreased more slowly than in the vehicle-treated mice. The glucose levels in the diabetic *Prlr*^{-/-} mice were similar to those of the diabetic *Prlr*^{+/+} mice at the peak but did not decline afterwards during the assay (**Figure 3A**). Total glucose levels, defined by the AUC, were higher in diabetic mice lacking the PRLR (**Figure 3B**). This indicated that diabetic mice null for the PRLR exhibit worse glucose intolerance than diabetic wild type mice.

Deletion of the PRLR Reduces Islet and β -Cell Densities and Increases α -Cell Density in STZ-Induced Diabetes

To investigate the basis for the worsening of diabetes in *Prlr*^{-/-} mice, we examined the histology of the endocrine pancreas 11 weeks after inducing diabetes with STZ. Islets immunostained with anti-insulin and anti-glucagon antibodies showed that their number per area of the pancreas (islet density) was similar between the vehicle-treated groups and reduced (*P*<0.0001) in STZ-induced diabetes (**Figures 4A, B**). The diabetes-induced reduction in islet density was more severe (*P*=0.0031) in *Prlr*^{-/-} mice than in *Prlr*^{+/+} mice (**Figures 4A, B**).

Additional morphometric analysis evaluated the localization and content of insulin-positive β -cells and glucagon-positive α -cells within the islets (**Figure 4A**). The findings confirmed the distribution of β -cells and α -cells in the core and periphery of rodent islets, respectively (29) (**Figure 4A**). As expected (30), the diabetic condition was associated with a reduction in the proportion of β -cells and with more α -cells that were distributed in the core of the islet compared to vehicle-injected controls (**Figures 4A, C, D**). However, the changes in density and location of β -cells and α -cells in the diabetic condition were intensified in the absence of the PRLR (**Figures 4A, C, D**). These observations suggested that lack of PRL signaling increases the loss of β -cells and the gain of α -cells which, in turn, worsen STZ-induced diabetes.

Deletion of the PRLR Reduces Serum Insulin Levels in STZ-Induced Diabetes

To further investigate the functional implication of the histological changes in the endocrine pancreas of diabetic *Prlr*^{-/-} mice, we determined the pancreatic expression and circulating levels of insulin and glucagon 11 weeks after inducing diabetes with STZ. Consistent with the loss of β -cells,

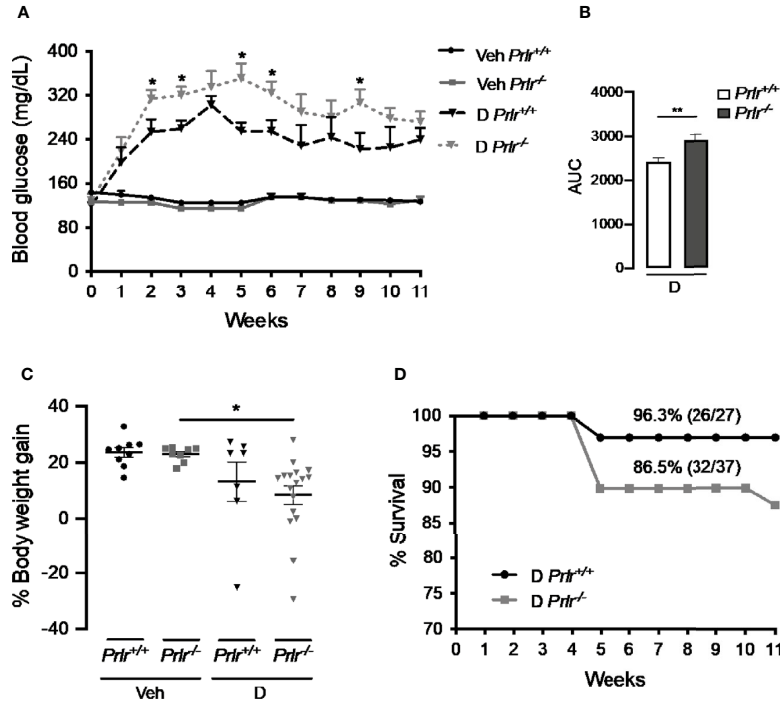


FIGURE 2 | Absence of the prolactin receptor (PRLR) stimulates the severity of streptozotocin (STZ)-induced diabetes. **(A)** Blood glucose levels after 4-h fasting, at the onset of STZ or vehicle injection (week 0) and throughout the 11 weeks post-STZ or vehicle treatment in diabetic (D) or vehicle-injected (Veh) wild-type mice (*Prlr*^{+/+}) and null for the PRL receptor gene mice (*Prlr*^{-/-}). **(B)** Area under the curve (AUC) derived from the blood glucose levels averaged throughout the 11 weeks post-STZ. **(C)** Body weight gain after 11 weeks post-STZ injection (or vehicle) relative to body weight in week 0. Values are means ± SEM. The number of mice per group were: nine for Veh *Prlr*^{+/+}, eight for Veh *Prlr*^{-/-}, six to 13 for D *Prlr*^{+/+}, and 12 to 17 for D *Prlr*^{-/-}. **(D)** Kaplan-Meier survival analysis. Numbers above graphs indicate the percentage and numbers of surviving mice over total mice. Statistical differences were examined using one-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test **(A, C)**, the unpaired two-tailed Student's *t*-test **(B)**, or the Long-Rank test **(D)**. **P*<0.05, ***P*<0.01.

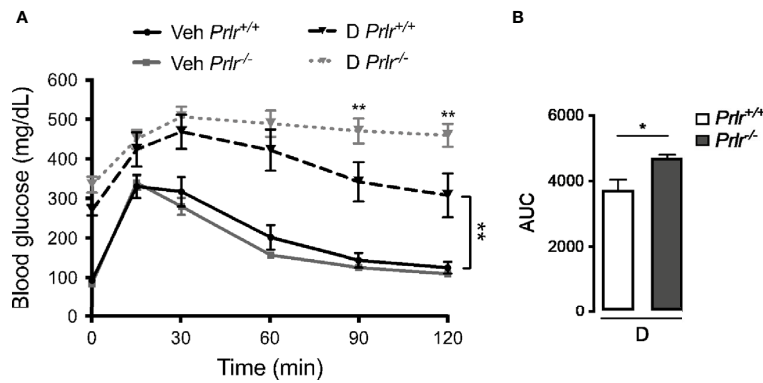


FIGURE 3 | Glucose intolerance is exacerbated in the absence of the prolactin receptor (PRLR) in streptozotocin (STZ)-induced diabetes. **(A)** IP glucose tolerance test at 9 weeks post-STZ (or vehicle), in diabetic (D) or vehicle-treated (Veh) wild-type mice (*Prlr*^{+/+}) and null for the PRL receptor gene mice (*Prlr*^{-/-}). Time 0 shows blood glucose levels after 12-h fasting and immediately before glucose load. **(B)** Area under the curve (AUC) was calculated from the blood glucose levels of the IP glucose tolerance test throughout time. Values are mean ± SEM, *n* = 6 to 10 mice per group. Statistical differences were examined using two-way repeated measures ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test **(A)**, or by the unpaired two-tailed Student's *t*-test **(B)**. **P*<0.05, ***P*<0.01.

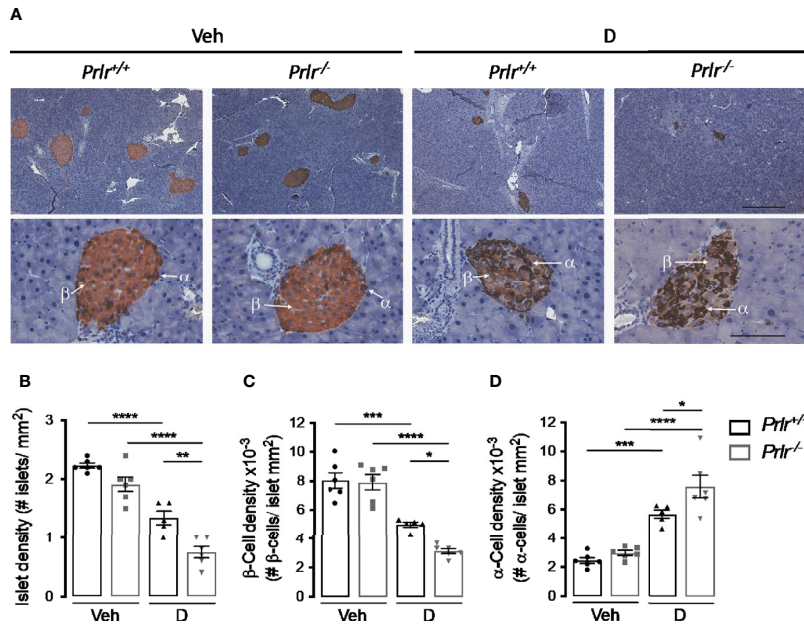


FIGURE 4 | Absence of the prolactin receptor (PRLR) reduces islet and β -cell densities and increases α -cell density in streptozotocin (STZ)-induced diabetes. **(A)** Representative sections of pancreatic tissue from diabetic **(D)** and vehicle-treated (Veh) wild-type mice (*Prlr*^{+/+}) and null for the PRLR gene mice (*Prlr*^{-/-}) at 11 weeks post-STZ or vehicle. β -Cells (light brown) and α -cells (dark brown) were immunostained for insulin and glucagon, respectively, and counterstained with hematoxylin. Scale bar is 200 μ m and 50 μ m in upper and bottom panels, respectively. **(B)** Number of islets, **(C)** β -cells, and **(D)** α -cells per mm² of pancreatic tissue. Values are means \pm SEM, $n = 5$ to 6 mice per group. Statistical differences were examined by one-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test **(B–D)**. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

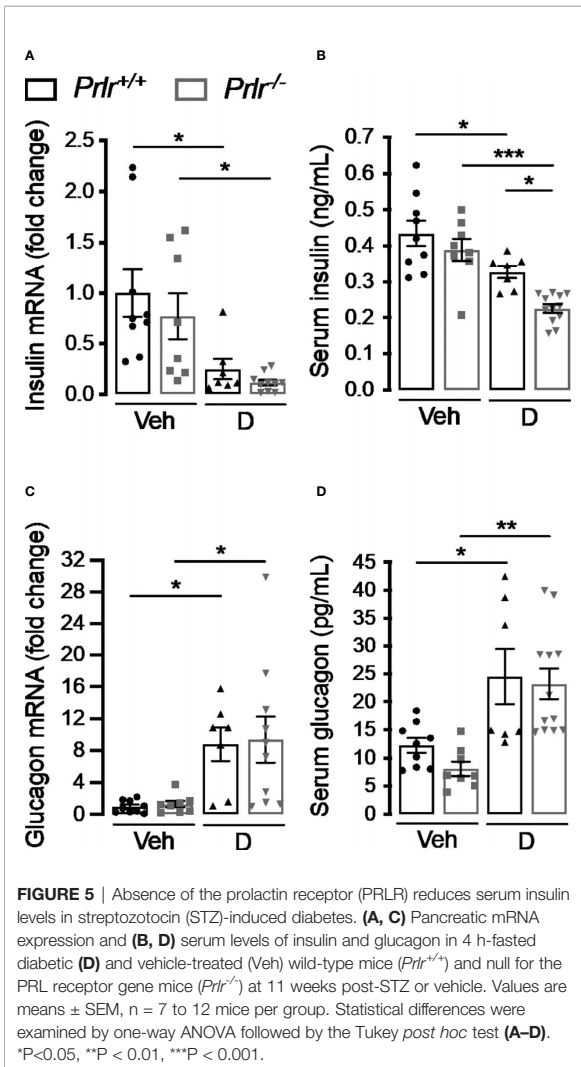
insulin mRNA and circulating levels decreased in the diabetic groups compared with the vehicle-injected counterparts (**Figure 5A**). Insulin expression appeared lower in diabetic *Prlr*^{-/-} mice than in diabetic *Prlr*^{+/+} mice, although the difference was not statistically significant. However, the diabetes-induced reduction in circulating insulin levels was significantly higher in mice null for the PRLR (**Figure 5B**).

The increase in α -cell density found in the diabetic condition was mirrored by enhanced pancreatic glucagon mRNA expression and circulating levels in diabetic animals compared with the vehicle-treated groups (**Figures 5C, D**). The increases were of similar magnitude in both genotypes, in spite of *Prlr*^{-/-} mice having higher numbers of α -cells per islet area (**Figures 4A, D**). This apparent contradiction may be explained by the lower islet density that occurs in *Prlr*^{-/-} mice which could have counteracted the increase in glucagon production and release due to the higher number of α -cells per islet.

Deletion of the PRLR Reduces β -Cell Proliferation in STZ-Induced Diabetes

STZ causes a partial destruction of β -cells (31, 32), and the proliferation of residual β -cells promotes disease recovery (33). Because reversal of diabetes slows down in diabetic *Prlr*^{-/-} mice (**Figure 1**), we investigated whether β -cell proliferation was reduced

in the absence of PRL signaling 11 weeks after STZ-induced diabetes. First, we measured the mRNA expression of genes *Ccna2*, *Ccnb1*, *Ccnb2*, *Ccnd1*, and *Ccnd2* (respectively encoding for cyclins A2, B1, B2, D1, and D2) implicated in β -cell proliferation (34). Pancreatic mRNA expression of *Ccna2*, *Ccnb1*, *Ccnd1*, and *Ccnd2* were downregulated in the diabetic *Prlr*^{-/-} mice compared to diabetic *Prlr*^{+/+} mice (**Figure 6A**). Moreover, the mRNA expression of the gene (*Tgfb*) encoding transforming growth factor β , an inhibitor of β -cell proliferation and differentiation (35), was higher in the pancreas of diabetic *Prlr*^{-/-} mice relative to diabetic *Prlr*^{+/+} mice (**Figure 6B**). Gene expression was similar between vehicle-treated groups. These findings suggested that β -cell proliferation decreases in PRLR-null mice. We confirmed this possibility by evaluating β -cell proliferation with double-label immunofluorescence using antibodies against the proliferation marker Ki-67 and anti-insulin antibodies. Consistent with the low turnover of β -cells in the adult (36), few Ki-67 proliferating β -cells were detected in all conditions (**Figure 6C**). The quantitation of Ki-67- and insulin-positive cells relative to all insulin-positive cells showed that β -cell proliferation was 68.7% lower in diabetic *Prlr* null mice than in their wild type diabetic counterparts ($P = 0.003$) (**Figure 6D**). We conclude that reduced β -cell proliferation contributed to the β -cell loss that leads to a slower recovery from STZ-induced diabetes in *Prlr* null mice.



Deletion of the PRLR Increases Apoptosis of β -Cells and Pancreatic Inflammation Soon After STZ Treatment

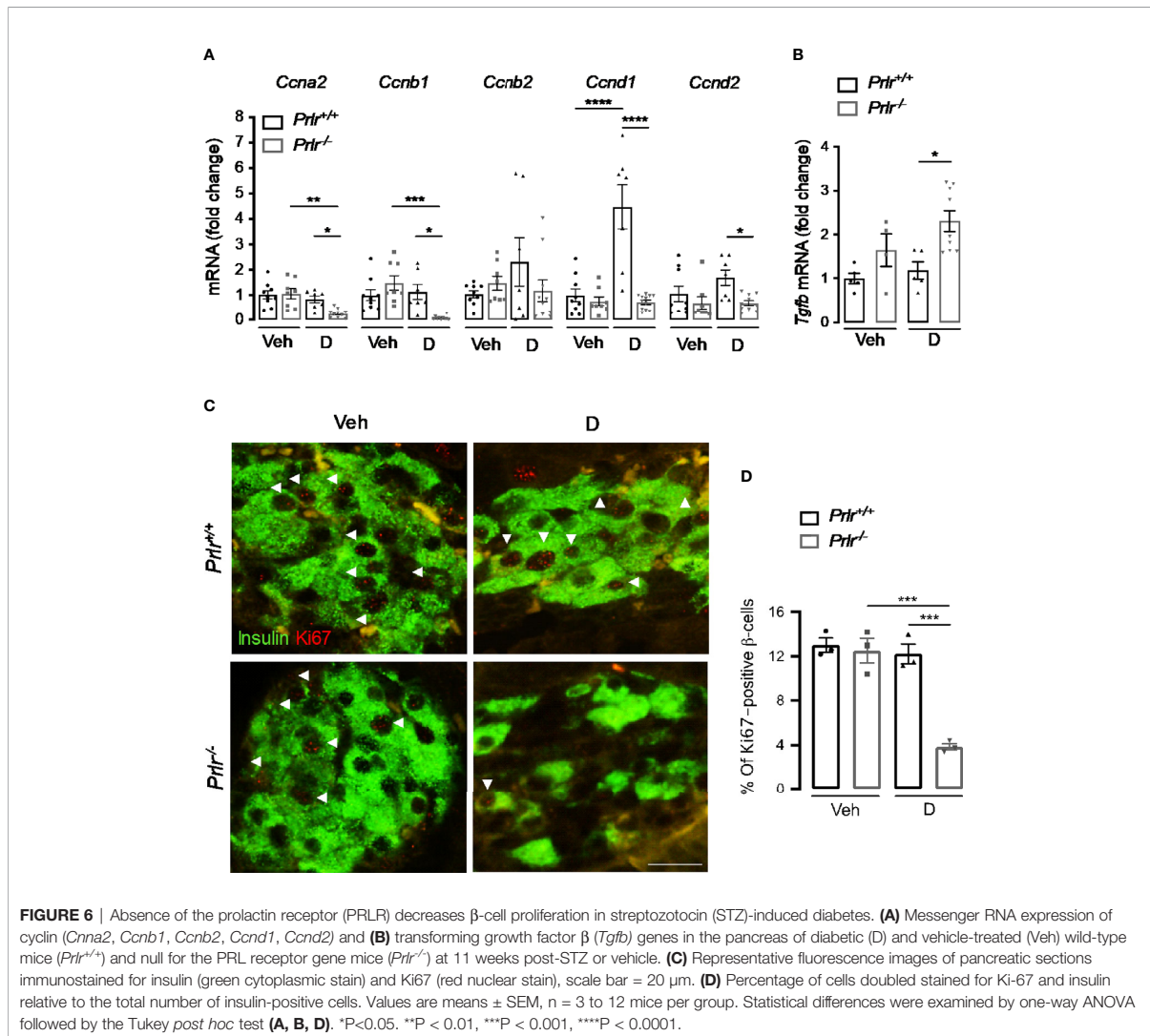
Finally, we aimed to evaluate whether the higher number of diabetic cases in *Prlr*^{-/-} mice (**Figure 1**) involved an increase in β -cell apoptosis and inflammation due to the early cytotoxic effect of STZ (37). To this end, we evaluated apoptosis in the pancreas of mice 2 weeks after inducing diabetes with STZ. Apoptosis, determined by DNA fragmentation measured by ELISA, was 45% higher in diabetic *Prlr* null mice than in their wild type diabetic counterparts ($P = 0.04$) (**Figure 7A**). Enhanced apoptosis of β -cells was confirmed by the increase in cells colocalizing TUNEL and insulin staining in diabetic *Prlr*^{-/-} mice relative to diabetic *Prlr*^{+/+} mice (**Figures 7B, C**). Therefore, loss of the PRLR enhanced the early apoptosis of β -cells in response to STZ that leads to the diabetogenic effect of the drug.

STZ elicits the apoptosis of β -cells through cytotoxic free radical generation (38), but also by promoting cytokine-mediated inflammatory responses in the pancreas (37, 39, 40). The pancreatic mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (interleukin-6 and interferon- γ) was upregulated (**Figure 7D**), and that of an anti-inflammatory cytokine (interleukin-10) and the β -cell mitogen osteoprotegerin (encoded by the tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B gene or *Tnfrsf11b*) downregulated (**Figure 7E**) in diabetic *Prlr*^{-/-} mice compared with diabetic *Prlr*^{+/+} mice. These findings suggested that loss of PRLR increases local inflammation in the pancreas, thereby contributing to β -cell loss and islet dysfunction in STZ-induced diabetes.

DISCUSSION

Lactogens (PRL and placental lactogen) are elevated in pregnancy, and studies have shown that these hormones contribute to the increase in insulin secretion and β -cell growth needed to accommodate the metabolic demand placed on the mother. Lactogens signal through the PRLR to stimulate pancreatic β -cell proliferation and insulin levels *in vitro* (41) and *in vivo* (42), and the specific deletion of the PRLR in pancreatic tissue (8) and in β -cells leads to failure to expand β -cell mass during pregnancy and to gestational diabetes (9). Yet it is unclear whether the action of endogenous PRL on glucose homeostasis protects against diabetes outside pregnancy. Two preclinical studies have addressed the effect of PRL administration on diabetes outside pregnancy (20, 43). One of them was carried out 21 years ago and showed that PRL administration reduced hyperglycemia in male mice treated with STZ but that the use of bromocriptine to reduce endogenous PRL levels had no effect (19). The study did not measure PRL levels nor provided support for a physiological action beyond a pharmacological effect. More recently, treatment with high and low doses of PRL were shown to have no effect and to improve insulin secretory activity in 90% pancreatectomized diabetic male rats, respectively, whereas the high but not the low PRL dose induced β -cell apoptosis in this model (20). These findings indicated that the dose of PRL can have opposite effects on glucose homeostasis and generated uncertainty regarding the role of endogenous PRL. In contrast to studying the effect of exogenous PRL, here we have evaluated the action of the endogenous hormone by using *Prlr* null mice. We found that lack of PRLR signaling increases the prevalence and severity of STZ-induced diabetes by enhancing β -cell dysfunction (reduced proliferation, survival, and insulin production). To the best of our knowledge, our report shows for the first time that endogenous PRL ameliorates diabetes beyond pregnancy.

Type 1 and type 2 diabetes occur when β -cells are unable to meet the increased demand for insulin due to insulin deficiency and insulin resistance, respectively. The STZ-induced diabetes model in rodents allows for the study of potential interventions based on using β -cell growth factors to enhance functional β -cell mass and insulin secretion. STZ is toxic to β -cells, as it is taken up *via* the cell membrane glucose transporter 2 and causes DNA

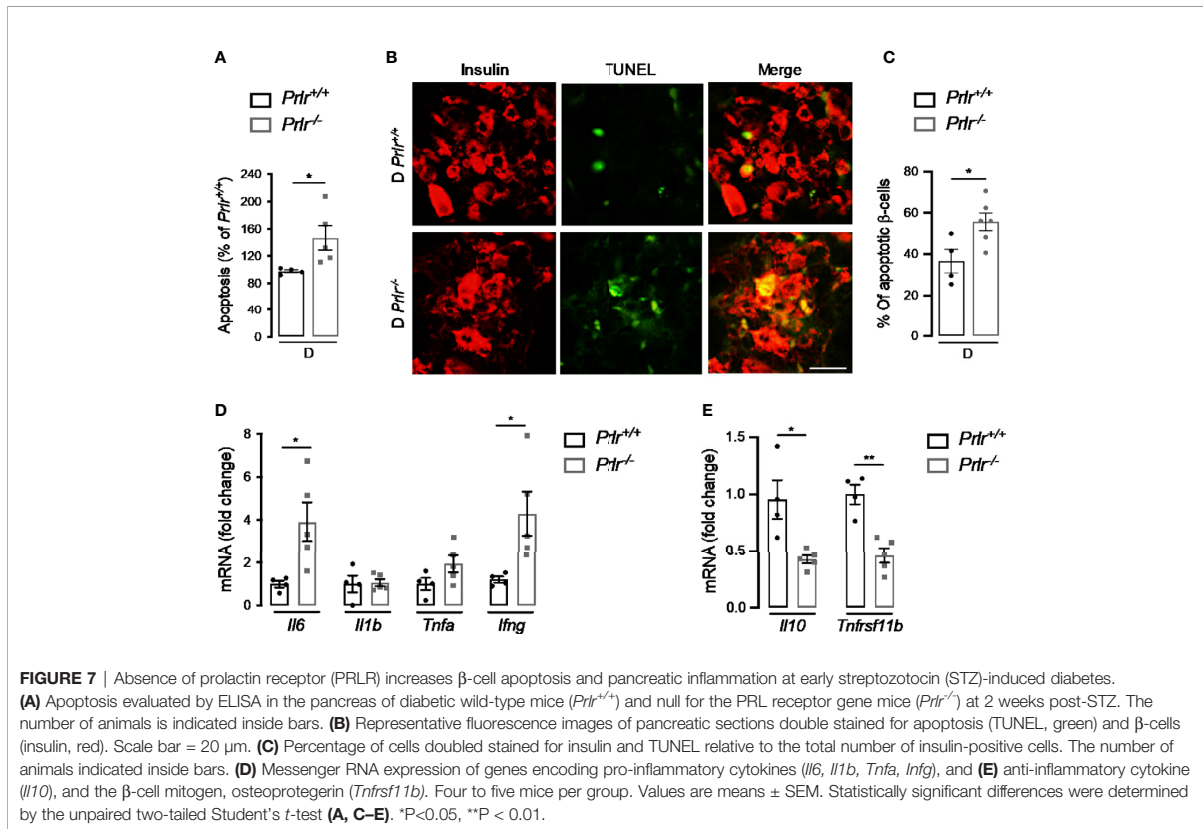


and protein alkylation leading to β -cell apoptosis, hyperglycemia, and inflammation (32, 37, 44). Because PRL stimulates β -cell mass and function, we sought to evaluate whether STZ-induced diabetes is aggravated in mice null for the PRLR.

We used *Prlr* null mice on the C57BL/6 genetic background, a strain suitable for studies of glucose homeostasis (45) that is highly sensitive to STZ (21, 22). These mice showed no alterations in glucose metabolism under control conditions as revealed by normal glucose tolerance, islet and β -cell densities, pancreatic insulin expression, and circulating insulin levels. These findings are similar to those reported in the global heterozygous- (46) or β -cell-specific (9) *Prlr* null mice on a C57BL/6 background, but contrast with those on a 129/Svj background, where global deletion of the PRLR associated with glucose intolerance, reduced islet density and β -cell mass, and lower pancreatic insulin

expression and release (7), and also in mice on a mixed C57BL/6-129/Svj background with deletion of the PRLR in the pancreas that show reduced islet number and β -cell mass, but normal glucose levels and tolerance (8). These contrasting findings are consistent with reported differences in glucose metabolism between both mouse strains (45) and indicate that the genetic background influences the metabolic outcome of PRL action. However, in spite of having no metabolic alterations under normal conditions, when challenged by pregnancy (9, 46) or STZ-induced diabetes (present findings), C57BL/6 *Prlr* null mice were unable to maintain whole body glucose homeostasis and β -cell mass and function, indicating that PRL signaling plays a fundamental role in glucose homeostasis regardless of the genetics.

In type 1 diabetes, β -cell death due to autoimmune destruction occurs at the early stages of the disease and leads to a rapid



reduction in insulin levels and reciprocal hyperglycemia (47). Interestingly, a spontaneous partial recovery phase, in which β -cell function and insulin levels increase, occurs in some patients (48). The STZ mouse model mimics some of these basic aspects of the disease in humans. Islet apoptosis starts early, 2 days post STZ, and peaks 2 to 3 weeks later in association with maximal hyperglycemia (33, 37); also, some animals are able to return to normoglycemic levels (33, 49). Our study confirmed these dynamics and showed that both the number of cases and the recovery from STZ-induced diabetes are worsened in the absence of the PRLR. Furthermore, lack of PRL signaling was associated with enhanced β -cell apoptosis, pancreatic upregulation of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and INF γ , and downregulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 shortly after STZ treatment. Because, STZ elicits the apoptosis of β -cells through the generation of cytotoxic free radicals (38) and the promotion of pancreatic inflammatory responses (37), our findings suggest that PRL counteracts diabetes by blocking oxidative stress and pancreatic inflammation early after STZ treatment. Supporting this notion, PRL has anti-oxidant (50) and anti-inflammatory (51) properties in different tissues including β -cells, where it protects against nitric oxide donor-, H₂O₂-, and cytokine-induced apoptosis *in vitro* (52).

Consistent with the reduced survival of β -cells, diabetes was exacerbated 11 weeks after STZ treatment in the absence of PRL signaling. *Prlr* null mice showed higher glucose circulating levels,

reduced BW gain, decreased animal survival, and increased glucose intolerance. These observations complement the findings of previous studies showing that PRL treatment (19) and long-term pancreatic-induced expression of mouse placental lactogen-1 (42) counteract STZ-induced hyperglycemia, but where the underlying physiology resulting in lowered glucose levels was not defined. Exacerbation of STZ-induced diabetes in *Prlr* null mice was associated with reduced islet density, number of β -cells, insulin expression, and circulating insulin levels. The loss of β -cells not only reflected reduced survival but also lowered the ability to proliferate. Diabetic *Prlr* null mice showed less Ki67-positive proliferating β -cells and impaired pancreatic expression of the genes encoding for G1/S cyclins (*Ccna2*, *Ccnd1* and *Ccnd2*) and G2/M cyclins (*Ccnb1*) that are downregulated in the β -cell-specific *Prlr* null mice (9) or upregulated in response to lactogens (34).

The mechanism by which PRL stimulates β -cell replication involves the expression of osteoprotegerin (OPG), a bone-related decoy receptor that acts as a β -cell mitogen by binding and neutralizing the action of receptor activator of nuclear factor KB ligand (RANKL), a brake in β -cell proliferation (53). In support of this mechanism, we found that OPG is downregulated in the pancreas of diabetic *Prlr* null mice, and have reported that deletion of the PRLR promotes the upregulation of the RANKL/RANK/OPG system that leads to bone loss in inflammatory

arthritis (54). In addition, TGF β may be a contributing mechanism since its pancreatic expression increased in diabetic *Prlr* null mice, and the upregulation and downregulation of TGF β /SMAD signaling inhibits and stimulates β -cell replication, respectively (35, 55). Whether PRL-mediated inhibition of TGF β is a direct or indirect mechanism warrants further investigation.

Our work confirmed the expansion and central distribution of α -cells within the islet of STZ-induced diabetic mice (30) and showed that these changes are exacerbated in *Prlr* null mice. However, increased α -cell density in the absence of PRL signaling was not associated with higher pancreatic expression and circulating levels of glucagon. This apparent contradiction may relate to fact that the increase in α -cells per islet is counteracted by the reduced number of pancreatic islets in *Prlr* null mice. Expansion of α -cells in the diabetic state may result from the dedifferentiation of intra-islet β -cells to α -cells and a regeneration of α -cells (56). The expression and effect of the PRLR on alpha cells have not been described and further research is needed to elucidate whether α -cells are direct targets of PRL in diabetes.

The finding that the PRL receptor ameliorates diabetes severity is in line with the role of this hormone as a guardian of metabolic homeostasis (13). It was recently recognized that the beneficial outcome of PRL on metabolism depends on its circulating levels being kept within a range (between 7 and 100 ng/mL) defined as “homeostatic functionally increased transient prolactinemia” or HomeoFIT-PRL levels (13). This definition is based on multiple experimental and clinical studies showing that PRL values that are not only below (13–17) but also above this level are associated with metabolic disease. Indeed, circulating PRL levels higher than 100 ng/mL found in patients with prolactinomas or after treatment with hyperprolactinemia-inducing drugs, and in animal hyperprolactinemic models, result in metabolic alterations such as obesity, insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease, and glucose intolerance (57–60). Based on these observations and those of our current findings, we conclude that drugs elevating PRL levels within the HomeoFIT-PRL range may prove to be a promising therapy for diabetes.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

REFERENCES

1. Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. Pancreatic beta Cell Regeneration as a Possible Therapy for Diabetes. *Cell Metab* (2018) 27(1):57–67. doi: 10.1016/j.cmet.2017.08.007
2. Sorenson RL, Stout LE. Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an immunohistochemical analysis. *Endocrinology* (1995) 136(9):4092–8. doi: 10.1210/endo.136.9.7649117
3. Stout LE, Svensson AM, Sorenson RL. Prolactin regulation of islet-derived INS-1 cells: characteristics and immunocytochemical analysis of STAT5 translocation. *Endocrinology* (1997) 138(4):1592–603. doi: 10.1210/endo.138.4.5089

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the National University of Mexico (UNAM).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GR-H, YM, and CC designed the research. GR-H, EA-C, ND-L, and, XR-H performed the research. GR-H, YM, and CC analyzed the data. GM discussed data, provided scientific expertise and contributed to writing the manuscript. YM and CC directed the study and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by grants 247164 and 289568 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and by the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) grant 405PC to CC. GR-H is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received CONACYT fellowship 589293.

ACKNOWLEDGMENTS

YM and CC contributed equally to this article. We thank Fernando López-Barrera, Maarten Werdler, Ericka A. De los Rios, Daniel Mondragon, Martín García-Servín, Alejandra Castilla, and Antonio Prado for excellent technical assistance, and Jessica González Norris for editing the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.619696/full#supplementary-material>

4. Petryk A, Fleenor D, Driscoll P, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene expression: the roles of glucose and glucose transporter-2. *J Endocrinol* (2000) 164(3):277–86. doi: 10.1677/joe.0.1640277
5. Weinhaus AJ, Stout LE, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *J Endocrinol* (2007) 193(3):367–81. doi: 10.1677/JOE-07-0043
6. Fujinaka Y, Takane K, Yamashita H, Vasavada RC. Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *J Biol Chem* (2007) 282(42):30707–17. doi: 10.1074/jbc.M702607200
7. Freemark M, Avril I, Fleenor D, Driscoll P, Petro A, Opara E, et al. Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production,

- and glucose tolerance. *Endocrinology* (2002) 143(4):1378–85. doi: 10.1210/endo.143.4.8722
8. Nteeba J, Kubota K, Wang W, Zhu H, Vivian J, Dai G, et al. Pancreatic prolactin receptor signaling regulates maternal glucose homeostasis. *J Endocrinol* (2019) 241(1):71–83. doi: 10.1530/JOE-18-0518
 9. Banerjee RR, Cyphert HA, Walker EM, Chakravarthy H, Peiris H, Gu X, et al. Gestational Diabetes Mellitus From Inactivation of Prolactin Receptor and MafB in Islet beta-Cells. *Diabetes* (2016) 65(8):2331–41. doi: 10.2337/db15-1527
 10. Boujon CE, Bestetti GE, Abramo F, Locatelli V, Rossi GL. The reduction of circulating growth hormone and prolactin in streptozotocin-induced diabetic male rats is possibly caused by hypothalamic rather than pituitary changes. *J Endocrinol* (1995) 145(1):19–26. doi: 10.1677/joe.0.1450019
 11. Lemini M, Ruiz-Herrera X, Ledesma-Colunga MG, Diaz-Lezama N, De Los Rios EA, Lopez-Barrera F, et al. Prolactin anterior pituitary expression and circulating levels are reduced in obese and diabetic rats: role of TGF-beta and TNF-alpha. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2015) 308(9):R792–9. doi: 10.1152/ajpregu.00327.2014
 12. Ruiz-Herrera X, de Los Rios EA, Diaz JM, Lerma-Alvarado RM, Martinez de la Escalera L, Lopez-Barrera F, et al. Prolactin Promotes Adipose Tissue Fitness and Insulin Sensitivity in Obese Males. *Endocrinology* (2017) 158(1):56–68. doi: 10.1210/en.2016-1444
 13. Macotela Y, Triebel J, Clapp C. Time for a New Perspective on Prolactin in Metabolism. *Trends Endocrinol Metab* (2020) 31(4):276–86. doi: 10.1016/j.tem.2020.01.004
 14. Balbach L, Wallaschofski H, Volzke H, Nauck M, Dorr M, Haring R. Serum prolactin concentrations as risk factor of metabolic syndrome or type 2 diabetes? *BMC Endocr Disord* (2013) 13:12. doi: 10.1186/1472-6823-13-12
 15. Wang T, Lu J, Xu Y, Li M, Sun J, Zhang J, et al. Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation: a population-based study. *Diabetes Care* (2013) 36(7):1974–80. doi: 10.2337/dc12-1893
 16. Wagner R, Heni M, Linder K, Ketterer C, Peter A, Bohm A, et al. Age-dependent association of serum prolactin with glycaemia and insulin sensitivity in humans. *Acta Diabetol* (2014) 51(1):71–8. doi: 10.1007/s00592-013-0493-7
 17. Li J, Rice MS, Huang T, Hankinson SE, Clevenger CV, Hu FB, et al. Circulating prolactin concentrations and risk of type 2 diabetes in US women. *Diabetologia* (2018) 61(12):2549–60. doi: 10.1007/s00125-018-4733-9
 18. Zhang P, Ge Z, Wang H, Feng W, Sun X, Chu X, et al. Prolactin improves hepatic steatosis via CD36 pathway. *J Hepatol* (2018) 68(6):1247–55. doi: 10.1016/j.jhep.2018.01.035
 19. Holstad M, Sandler S. Prolactin protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *J Endocrinol* (1999) 163(2):229–34. doi: 10.1677/joe.0.1630229
 20. Park S, Kim DS, Daily JW, Kim SH. Serum prolactin concentrations determine whether they improve or impair beta-cell function and insulin sensitivity in diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev* (2011) 27(6):564–74. doi: 10.1002/dmrr.1215
 21. Gurley SB, Clare SE, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* (2006) 290(1):F214–22. doi: 10.1152/ajprenal.00204.2005
 22. Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim* (2011) 45(3):131–40. doi: 10.1258/la.2010.010090
 23. Leiter EH. Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1982) 79(2):630–4. doi: 10.1073/pnas.79.2.630
 24. Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrol (Carlton)* (2007) 12(3):261–6. doi: 10.1111/j.1440-1797.2007.00796.x
 25. Chaudhry ZZ, Morris DL, Moss DR, Sims EK, Chiong Y, Kono T, et al. Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice. *Lab Anim* (2013) 47(4):257–65. doi: 10.1177/0023677213489548
 26. Novelli M, Bonamassa B, Masini M, Funel N, Canistro D, De Tata V, et al. Persistent correction of hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mice by a non-conventional radical scavenger. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* (2010) 382(2):127–37. doi: 10.1007/s00210-010-0524-7
 27. Grant CW, Duclos SK, Moran-Paul CM, Yahalom B, Tirabassi RS, Arreaza-Rubin G, et al. Development of standardized insulin treatment protocols for spontaneous rodent models of type 1 diabetes. *Comp Med* (2012) 62(5):381–90.
 28. Campbell-Thompson ML, Montgomery EL, Foss RM, Kolheffer KM, Phipps G, Schneider L, et al. Collection protocol for human pancreas. *J Vis Exp* (2012) 63:e4039. doi: 10.3791/4039
 29. Dolensek J, Rupnik MS, Stozar A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* (2015) 7(1):e1024405. doi: 10.1080/19382014.2015.1024405
 30. Li Z, Karlsson FA, Sandler S. Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice. *J Endocrinol* (2000) 165(1):93–9. doi: 10.1677/joe.0.1650093
 31. Yin D, Tao J, Lee DD, Shen J, Hara M, Lopez J, et al. Recovery of islet beta-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice: an indirect role for the spleen. *Diabetes* (2006) 55(12):3256–63. doi: 10.2337/db05-1275
 32. Wu J, Yan LJ. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic beta cell glucotoxicity. *Diabetes Metab Syndr Obes* (2015) 8:181–8. doi: 10.2147/DMSO.S82272
 33. Kataoka M, Kawamuro Y, Shiraki N, Miki R, Sakano D, Yoshida T, et al. Recovery from diabetes in neonatal mice after a low-dose streptozotocin treatment. *Biochem Biophys Res Commun* (2013) 430(3):1103–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.030
 34. Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, et al. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med* (2010) 16(7):804–8. doi: 10.1038/nm.2173
 35. Wang P, Karakose E, Liu H, Swartz E, Ackeifi C, Zlatanic V, et al. Combined Inhibition of DYRK1A, SMAD, and Trithorax Pathways Synergizes to Induce Robust Replication in Adult Human Beta Cells. *Cell Metab* (2019) 29(3):638–652 e5. doi: 10.1016/j.cmet.2018.12.005
 36. Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA. Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* (2005) 54(9):2557–67. doi: 10.2337/diabetes.54.9.2557
 37. O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol* (1996) 178(2):176–81. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199602)178:2<176::AID-PATH433>3.0.CO;2-8
 38. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord* (2013) 12(1):60. doi: 10.1186/2251-6581-12-60
 39. Lukic ML, Stosic-Grujicic S, Shahin A. Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunol* (1998) 6(1-2):119–28. doi: 10.1155/1998/92198
 40. Androulidaki A, Wachsmuth L, Polykratis A, Pasparakis M. Differential role of MyD88 and TRIF signaling in myeloid cells in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *PLoS One* (2018) 13(3):e0194048. doi: 10.1371/journal.pone.0194048
 41. Brejle TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, et al. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology* (1993) 132(2):879–87. doi: 10.1210/endo.132.2.8425500
 42. Vasavada RC, Garcia-Ocana A, Zawalich WS, Sorenson RL, Dann P, Syed M, et al. Targeted expression of placental lactogen in the beta cells of transgenic mice results in beta cell proliferation, islet mass augmentation, and hypoglycemia. *J Biol Chem* (2000) 275(20):15399–406. doi: 10.1074/jbc.275.20.15399
 43. Hyslop CM, Tsai S, Shrivastava V, Santamaria P, Huang C. Prolactin as an Adjunct for Type 1 Diabetes Immunotherapy. *Endocrinology* (2016) 157(1):150–65. doi: 10.1210/en.2015-1549
 44. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* (2008) 51(2):216–26. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7
 45. Berglund ED, Li CY, Poffenberger G, Ayala JE, Fueger PT, Willis SE, et al. Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains. *Diabetes* (2008) 57(7):1790–9. doi: 10.2337/db07-1615
 46. Huang C, Snider F, Cross JC. Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology* (2009) 150(4):1618–26. doi: 10.1210/en.2008-1003
 47. Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes* (2005) 54 Suppl 2:S25–31. doi: 10.2337/diabetes.54.suppl_2.s25
 48. Akirav E, Kushner JA, Herold KC. Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone? *Diabetes* (2008) 57(11):2883–8. doi: 10.2337/db07-1817

49. Hartmann K, Besch W, Zuhlke H. Spontaneous recovery of streptozotocin diabetes in mice. *Exp Clin Endocrinol* (1989) 93(2-3):225–30. doi: 10.1055/s-0029-1210861
50. Melendez Garcia R, Arredondo Zamarripa D, Arnold E, Ruiz-Herrera X, Noguez Imm R, Baeza Cruz G, et al. Prolactin protects retinal pigment epithelium by inhibiting sirtuin 2-dependent cell death. *EBioMedicine* (2016) 7:35–49. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.03.048
51. Clapp C, Adan N, Ledesma-Colunga MG, Solis-Gutierrez M, Triebel J, Martinez de la Escalera G. The role of the prolactin/vasoinhibin axis in rheumatoid arthritis: an integrative overview. *Cell Mol Life Sci* (2016) 73(15):2929–48. doi: 10.1007/s00018-016-2187-0
52. Yamamoto T, Mita A, Ricordi C, Messinger S, Miki A, Sakuma Y, et al. Prolactin supplementation to culture medium improves beta-cell survival. *Transplantation* (2010) 89(11):1328–35. doi: 10.1097/TP.0b013e3181d98af1
53. Kondegowda NG, Fenutria R, Pollack IR, Orthofer M, Garcia-Ocana A, Penninger JM, et al. Osteoprotegerin and Denosumab Stimulate Human Beta Cell Proliferation through Inhibition of the Receptor Activator of NF-kappaB Ligand Pathway. *Cell Metab* (2015) 22(1):77–85. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.021
54. Ledesma-Colunga MG, Adan N, Ortiz G, Solis-Gutierrez M, Lopez-Barrera F, Martinez de la Escalera G, et al. Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther* (2017) 19(1):93. doi: 10.1186/s13075-017-1290-4
55. Dhawan S, Dirice E, Kulkarni RN, Bhushan A. Inhibition of TGF-beta Signaling Promotes Human Pancreatic beta-Cell Replication. *Diabetes* (2016) 65(5):1208–18. doi: 10.2337/db15-1331
56. Gromada J, Chabosseau P, Rutter GA. The alpha-cell in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* (2018) 14(12):694–704. doi: 10.1038/s41574-018-0097-y
57. Perez Millan MII, Luque GM, Ramirez MC, Noain D, Ornstein AM, Rubinstein M, et al. Selective disruption of dopamine D2 receptors in pituitary lactotroves increases body weight and adiposity in female mice. *Endocrinology* (2014) 155(3):829–39. doi: 10.1210/en.2013-1707
58. Ratner LD, Stevens G, Bonaventura MM, Lux-Lantos VA, Poutanen M, Calandra RS, et al. Hyperprolactinemia induced by hCG leads to metabolic disturbances in female mice. *J Endocrinol* (2016) 230(1):157–69. doi: 10.1530/JOE-15-0528
59. Luque GM, Lopez-Vicchi F, Ornstein AM, Brie B, De Winne C, Fiore E, et al. Chronic hyperprolactinemia evoked by disruption of lactotrope dopamine D2 receptors impacts on liver and adipocyte genes related to glucose and insulin balance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2016) 311(6):E974–88. doi: 10.1152/ajpendo.00200.2016
60. Lopez-Vicchi F, Ladyman SR, Ornstein AM, Gustafson P, Knowles P, Luque GM, et al. Chronic high prolactin levels impact on gene expression at discrete hypothalamic nuclei involved in food intake. *FASEB J* (2020) 34(3):3902–14. doi: 10.1096/fj.201902357R

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Ramirez-Hernandez, Adan-Castro, Diaz-Lezama, Ruiz-Herrera, Martinez de la Escalera, Macotela and Clapp. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.