



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

ESTUDIO SOBRE LA SECRECIÓN HIPOFISIARIA DE PROLACTINA EN
MODELOS DE OBESIDAD Y DIABETES: PAPEL DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA Y DEL FACTOR DE NECROSIS
TUMORAL ALFA.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
M. EN C. MARÍA DE LOURDES LEMINI ARÁMBURO.

TUTORES PRINCIPALES
DRA. CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L.
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA
DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. CARMEN Y. ACEVES VELASCO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA
DR. ENRIQUE A. PEDERNERA ASTEGIANO
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

JUNIO 2017



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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L. y la Dra. Yazmín Macotela Guzmán contando con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo el número de becario 228328. El trabajo experimental fue financiado por el CONACYT (SALUD-2011-1-161594 y CB-2011-01-144423) y la UNAM (IB200411).

DEDICATORIA

A mis padres Elfege Lemini y Mary Arámburo, y a mi esposo William Pallmann por su incondicional y constante apoyo desde el inicio de este proyecto hasta que llegara a su conclusión.

A mi hijo William y a mis hermanos Eduardo y Alejandro por ser siempre una inspiración y motivación para realizar y concluir con éxito esta etapa de mi vida.

Y a mi tío Carlos Arámburo por ser siempre para mí un ejemplo de perseverancia y entrega a esta apasionante profesión.

Para mi abuelo Carlos Arámburo Hernández que siempre me impulsó a concluir y a obtener este grado. Q.E.P.D.

AGRADECIMIENTOS

Apoyo Académico:

Al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Carmen Clapp por darme la oportunidad, por su dedicación y apoyo al recibirme en su laboratorio e instruirme para desarrollarme en esta área profesional desde hace más de 10 años.

A mis tutoras, la Dra. Yazmín Macotela y la Dra. Carmen Clapp por su constante asesoría y excelente dirección para que se llevara a cabo el desarrollo exitoso de éste proyecto.

A los Doctores Gonzalo Martínez de la Escalera, Yazmín Macotela y Carmen Clapp por su siempre invaluable enseñanza para poder desenvolverme con seguridad y de la mejor manera en esta rama profesional.

A los integrantes del comité tutorial, el Dr. Enrique Pedernera y la Dra. Carmen Aceves, por sus valiosas aportaciones. A los miembros del jurado:

Apoyo Técnico:

- Al Nut. Fernando López Barrera y al M. en C. Gabriel Nava Pinto por su excelente apoyo técnico en desarrollo experimental del trabajo.
- A Antonio Prado Galán y a Daniel Mondragón Huerta por su asistencia como laboratoristas
- Al M.V.Z. Martín García y la Dra. Alejandra Castilla – por su apoyo en el cuidado y manejo de los animales
- A la Quim. Leonor Casanova Rico y a María del Carmen Vázquez por su labor en la coordinación de las actividades y trámites del posgrado
- A la Lic. Lourdes Lara Ayala por su hacer posible el servicio de videoconferencia en los exámenes tutorales

Asistencia y Amistad:

Agradezco a todos mis compañeros y amigos, ausentes y presentes, que fueron de gran apoyo para resolver problemas pequeños o grandes en el trabajo experimental, estadístico, de investigación y trámites académicos, y por haberme hecho pasar de mi estancia dentro y fuera del laboratorio una experiencia de vida: a Xarubet Ruíz, Guadalupe Ledesma, Norma Adán, Nundehui Díaz, David Arredondo, Mayda García, Elva Adán, Juan Pablo Robles, Stephanie Thebault, Lucía Martínez de la Escalera, Miguel Ángel Vázquez, Ericka de los Ríos y a la Dra. Isabel Méndez que a pesar de no pertenecer actualmente al laboratorio, forma parte siempre de nuestro equipo y es una gran persona y amiga.

ÍNDICE	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCION	8
ANTECEDENTES	10
1. Obesidad, diabetes y sus complicaciones	10
2. La PRL y las enfermedades metabólicas	11
2.1 La PRL y sus receptores	11
2.2 Efectos de la PRL en la obesidad, en la diabetes y en sus complicaciones	13
2.2.1 La PRL y la diabetes	14
2.2.2 La PRL y la obesidad	15
3. Regulación de la secreción y síntesis de la PRL hipofisiaria	17
4. TGF β y TNF α en la obesidad, en la diabetes y en sus complicaciones	23
4.1 Factor de crecimiento transformante beta (TGF β)	24
4.2 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)	25
4.3 TGF β y TNF α en la obesidad y la diabetes	26
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
RESULTADOS	34
1. Estudios <i>in vitro</i>	34
2. Estudios <i>in vivo</i>	36
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS	47

RESUMEN

La hormona hipofisiaria prolactina, determinante para la lactancia, participa en la homeostasis metabólica. La disminución de los niveles circulantes de la prolactina en pacientes con diabetes tipo 2 y en pacientes obesos se asocia con la resistencia a la insulina y con el síndrome metabólico. Esto sugiere que factores capaces de alterar la producción de la prolactina por la hipófisis influyen sobre la progresión de las enfermedades metabólicas. Dos de estos factores pueden ser el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y el factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$), ya que ambos contribuyen a la resistencia a la insulina y a las complicaciones clínicas de la diabetes y se conoce que el $TNF\alpha$ y el $TGF\beta$ pueden estimular e inhibir, respectivamente, la secreción hipofisiaria de la prolactina. En este trabajo mostramos que el $TNF\alpha$ y el $TGF\beta$ antagonizan mutuamente sus efectos sobre la síntesis y secreción de prolactina por la línea celular hipofisiaria GH4C1 secretora de prolactina. Además, encontramos que tanto la expresión de prolactina hipofisiaria como sus niveles en el suero disminuyen en ratas obesas sometidas a una dieta alta en grasas y en el modelo de ratas diabéticas inducido por estreptozotocina. La expresión de $TGF\beta$ aumenta en la hipófisis en ambos modelos experimentales, mientras que la expresión de $TNF\alpha$ aumenta y disminuye en la hipófisis de ratas obesas y diabéticas, respectivamente. Las alteraciones en los niveles de $TNF\alpha$ y de $TGF\beta$ observadas en la hipófisis de las ratas tanto obesas como diabéticas y los efectos de estas citocinas sobre la síntesis y secreción de prolactina en las células hipofisiarias en cultivo, apuntan a su posible participación como reguladores locales (autócrinos/ parácrinos) de la secreción de prolactina en las enfermedades metabólicas.

ABSTRACT

Prolactin, the pituitary hormone fundamental for lactation, plays a role in metabolic homeostasis. Serum prolactin levels decrease in type-2 diabetic patients and in association with obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome, suggesting the action of factors able to downregulate pituitary prolactin production in metabolic diseases. Two of such factors may be transforming growth factor beta (TGF β) and tumor necrosis factor alpha (TNF α), which are well known contributors to insulin resistance and systemic complications in diabetes. Also, TGF β inhibits and TNF α stimulates prolactin secretion by the pituitary gland. Here, we show that TNF α and TGF β antagonize the effect of each other on prolactin synthesis and secretion by the pituitary GH4C1 cell line in culture. Pituitary prolactin expression and prolactin serum levels are reduced in diet-induced obese rats and in streptozotocin-induced diabetic rats. Changes in PRL in both models correlate with increased expression of pituitary TGF β whereas TNF α expression decreases and increases in the pituitary of obese and diabetic rats, respectively. The observed alterations of TNF α and TGF β in the pituitary of obese and diabetic rats together with the effects of these factors on pituitary cells in vitro, points to a possible autocrine/paracrine regulatory role of both cytokines on prolactin secretion during metabolic disorders.

ABREVIATURAS

ACTH, hormona adrenocorticotropina
AP, hipófisis anterior
bFGF, factor de crecimiento fibroblástico básico
D2R, receptor de dopamina 2
DA, dopamina
DAG, diacilglicerol
ER α , receptor de estrógeno alfa
Er β , receptor de estrógeno beta
ERE, elemento de respuesta a estrógeno
FEC-GM, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
FS, células folículo estimulantes
GAS, secuencia de activación por interferon gama
GCs, glucocorticoides
GH, hormona de crecimiento
HFD, dieta alta en grasas
IL-6, interleucina 6
IRS-1, sustrato 1 del receptor a insulina
MAPK, MAP cinasas
nGRE, elemento de respuesta negativa de glucocorticoides
PHDA, neuronas dopaminérgicas periventriculares
PI3K, 3-cinasa fosfatidilinositol
PKC, proteína cinasa C
PKA, proteína cinasa A
PL, lactógeno placentario
PREB, proteína de unión al elemento regulador de prolactina
PRL, prolactina
PRLR, receptor de prolactina
PROP-1, proteína profeta de Pit-1
RTGF- β I, receptores para TGF β del tipo I
RTGF- β II, receptores para TGF β del tipo II
STZ, estreptozotocina
TGF β , factor transformante β
THDA, neuronas dopaminérgicas tuberohipofisiales TNF α , factor de necrosis tumoral α
TIDA, neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares
TNF α R, receptor de TNF α
TRH, hormona liberadora de tirotropina
TSH, hormona estimulante de la tiroides o tirotropina
VIP, péptido vasoactivo intestinal

INTRODUCCIÓN

La obesidad y sus trastornos asociados como la diabetes tipo 2, constituyen uno de los más grandes retos para el sector salud en los países desarrollados y subdesarrollados alrededor del mundo. La obesidad y la diabetes se caracterizan principalmente por alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa pero también por cambios en mediadores químicos hormonales e inmunes. La comprensión de cómo surgen estos cambios y de su liga funcional con las enfermedades metabólicas y sus complicaciones, es esencial para la generación de terapias eficaces.

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica secretada principalmente por la hipófisis anterior (AP) y conocida por sus efectos estimuladores de la producción de leche en la lactancia. Sin embargo, la PRL ejerce una amplia variedad de acciones sobre la regulación de diversos procesos en la reproducción, la osmoregulación, la respuesta inmune y la angiogénesis (38, 55). Además, se reconoce que la PRL tiene efectos sobre la regulación de la homeostasis metabólica que pueden impactar sobre el desarrollo y la progresión del síndrome metabólico y la diabetes. Estudios recientes muestran niveles circulantes de PRL mas altos se correlaciona con una reducción en la intolerancia a la glucosa y en la prevalencia de diabetes tipo 2 en adultos (12, 150); y que, en niños obesos, la reducción en los niveles séricos de PRL es factor de riesgo para la progresión del síndrome metabólico (36). Por lo tanto, los mecanismos responsables de regular la secreción hipofisaria de la PRL en la obesidad y la diabetes son de interés como posibles blancos terapéuticos en el tratamiento de estos trastornos metabólicos.

En el presente trabajo, investigamos si la producción de PRL es regulada a la baja en la AP de ratas obesas y de ratas diabéticas y si estos cambios se asocian con alteraciones en los niveles de expresión hipofisarios del TGF β y/o del TNF α . Estas citocinas se incrementan en la circulación de pacientes con obesidad y diabetes (36, 46, 62, 153, 157) e influyen sobre la resistencia a la insulina y en la patofisiología de la diabetes (148, 153). Además, estas citocinas y sus receptores se expresan de manera ubicua en una gran variedad de

tejidos que incluyen a las células productoras de PRL de la AP (lactotropos) (44, 161), donde el TGF β inhibe (52, 129) y el TNF α puede estimular (57, 92), pero también inhibir (65, 145), la síntesis y liberación de PRL. Sin embargo, se sabe poco acerca de las acciones del TNF α o del TGF β sobre la secreción de PRL en el contexto de las enfermedades metabólicas.

ANTECEDENTES

1. Obesidad, diabetes y sus complicaciones clínicas.

El exceso en el peso corporal ocupa el sexto lugar entre las principales causas de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo. En el año 2005, se estimó que mil millones de adultos y el 10% de la población infantil poseen sobrepeso u obesidad (67). La obesidad y sus comorbilidades son reflejo de interacciones genéticas y epigenéticas (ambientales, sociales, etc), estas últimas altamente relacionadas con el nivel de actividad física y con el tipo de dieta que genera un exceso en el consumo de energía que no puede ser contrarrestada por los procesos neurobiológicos que controlan la ingesta de alimentos. El promedio en la expectativa de vida ha disminuido por la obesidad, principalmente a consecuencia de que favorece el desarrollo de diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares, y algunos tipos de cáncer (67).

La obesidad es consecuencia del aumento en el tamaño de los adipocitos a través de una acumulación exagerada de lípidos (hipertrofia), así como del aumento en el número de adipocitos (hiperplasia). Eventualmente, los lípidos no pueden ser almacenados eficientemente en el tejido adiposo y se acumulan en el hígado y en la circulación. La obesidad también está asociada con el reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo, dando lugar a la producción de citocinas proinflamatorias tales como el TNF α y la interleucina 6 (IL-6) que se traduce en la inflamación crónica de éste tejido (112). La hipertrofia e inflamación crónica del tejido adiposo, en particular del visceral, y el aumento en lípidos circulantes conlleva a la manifestación del síndrome metabólico, que se define por la presencia de intolerancia a la glucosa, la hiperinsulinemia (debido a la resistencia a la insulina), las altas concentraciones de triglicéridos y de lipoproteínas en el suero e hipertensión (15). Entre los mecanismos que fundamentan estas observaciones se ha demostrado que un incremento en los niveles séricos de ácidos grasos induce la resistencia a la insulina en el músculo esquelético, lo que resulta en una menor actividad en el transporte de glucosa dependiente de insulina. Los mecanismos moleculares involucran un incremento en la concentración intracelular de metabolitos de ácidos grasos como el

diacilglicerol (DAG), que estimula la actividad de proteínas cinasas C (PKC), las cuales fosforilan al sustrato 1 del receptor a insulina (IRS-1) en residuos de serina, inhibiendo su actividad y por ende la cascada de señal río debajo de la insulina (127, 158).

La diabetes es una enfermedad causada por una deficiencia en la secreción de insulina o por una resistencia de los tejidos a la acción de esta hormona. La falta de acción de la insulina trae como consecuencia que la glucosa se acumule de manera excesiva en la sangre lo que a su vez se traduce en alteraciones vasculares que conllevan al deterioro de funciones diversas. Entre las complicaciones clínicas que caracterizan a la progresión de la diabetes se incluyen la nefropatía, la neuropatía, y la retinopatía. Por ejemplo, la hiperglicemia crónica estimula la apoptosis de las células de los capilares sanguíneos en la retina, lo que promueve un aumento en la vasopermeabilidad y en la oclusión vascular, y consecuentemente en una reducción en el flujo sanguíneo (isquemia) y por ende hipoxia (29). La hipoxia induce la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) a través de estimular y de inhibir la producción de factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos, respectivamente. Los nuevos vasos se extienden en la retina e invaden el vítreo formando una membrana fibrovascular que puede retraer y desprender a la retina, ocasionando ceguera (29).

Estudios recientes señalan a la hormona prolactina (PRL) como un factor capaz de contrarrestar alteraciones metabólicas ligadas a la diabetes y a la retinopatía diabética, en particular (7, 12, 56, 150).

2. La PRL y las enfermedades metabólicas.

2.1 La PRL y sus receptores

La PRL es una hormona peptídica que se origina a partir de un solo gen presente en todos los vertebrados y que da origen a una proteína madura de cerca de 200 aminoácidos con una masa molecular de 23 kDa (17, 18). La PRL es secretada principalmente por la AP y su nombre se deriva de su acción sobre la producción de leche durante la lactancia. Sin embargo, además de este efecto, la PRL ejerce una multiplicidad de acciones que se

incluyen dentro de la reproducción, la osmorregulación, el crecimiento, la respuesta inmune, la angiogénesis y el metabolismo (17, 39). La PRL se produce en múltiples sitios además de la hipófisis, de manera que además de ser categorizada como una hormona circulante clásica, actúa a manera de citocina en forma autócrina y parácrina (15). En consecuencia, aun cuando la liberación de PRL por la AP se deteriore gravemente, los seres humanos no están privados de la hormona. A juzgar por los criterios estructurales, bioquímicos y funcionales, la estructura proteica de la PRL extrahipofisiaria e hipofisiaria es idéntica, aunque su regulación transcripcional es diferente (15).

Por otra parte, la PRL comparte similitudes en su estructura y en la de sus receptores con miembros de la familia de las citocinas hematopoyéticas, que incluyen al factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (FEC-GM), a las interleucinas-2, 4 y 5, y a las hormonas lactogénicas, como la hormona de crecimiento (GH) y el lactógeno placentario (PL) (70). Los ligandos de esta familia presentan como motivo estructural característico una organización en cuatro α -hélices antiparalelas unidas por asas flexibles (61). Por otra parte, los receptores de esta familia de citocinas se caracterizan por estar constituidos por una proteína única que atraviesa la membrana una sola vez, que no tiene actividad enzimática intrínseca y que señala a través de formar dímeros al interactuar con una sola molécula de ligando (70).

Con respecto al receptor de PRL, éste proviene de un único gen, si bien se han identificado al menos tres isoformas moleculares que resultan del procesamiento alternativo del ARN mensajero (22, 42). En estos receptores se definen tres dominios estructurales, el extracitoplasmático, el intramembranal y el intracitoplasmático. El dominio extracelular o dominio de unión a ligando es idéntico en las tres isoformas y la diferencia entre los receptores reside en la extensión del dominio intracitoplasmático que se definen como corto (42 kDa), intermedio (65 kDa) y largo (80 kDa). El receptor de PRL se expresa prácticamente en todos los tipos celulares donde se ha investigado; sin embargo, su función es aún poco conocida en muchos tejidos. Además, en algunos de ellos su nivel de expresión es muy bajo y se desconoce si un aumento en su expresión puede ser factor determinante para su función (108).

El receptor de PRL es activado por PRL y por el PL de las diferentes especies y por la GH en la especie humana, exclusivamente. La activación de este receptor ocurre a través de la unión de una molécula de ligando a dos moléculas de receptor (dimerización), y por lo tanto esta interacción involucra dos regiones diferentes de la hormona que interaccionan cada una con una molécula diferente de receptor. El proceso de dimerización inicia una cascada de eventos intracelulares, que esencialmente ocurren mediante su asociación con diferentes cinasas, que a su vez activan a las moléculas efectoras. La vía de señalización clásica activada por el receptor de la PRL es la vía JAK/STAT (por sus siglas en inglés “Janus kinases/ signal transducer and activation of transcription”). La dimerización del receptor de PRL induce la transfosforilación/ activación de las cinasas de tirosina JAK2 que se encuentran en la membrana celular. Las JAK2 así activadas fosforilan residuos de tirosina del receptor lo que origina sitios de anclaje para las proteínas STAT, las cuales al unirse al receptor son fosforiladas a su vez por las JAK2. Una vez fosforiladas, las STAT se disocian del receptor para formar dímeros que se translocan al núcleo, se unen a secuencias consenso en el ADN denominadas GAS (“interferon- γ activation sequence”) y activan la transcripción génica (18). Las principales proteínas STAT activadas por PRL son tres: STAT-1 que en respuesta a PRL estimula la transcripción del gen de IRF-1 (“interferon regulatory factor-1”) y genes que conducen a la proliferación celular en células hematopoiéticas; STAT-3 que es activada en respuesta a PRL y que se asocian genes que codifican a citocinas como la IL-6; y STAT-5, que en el epitelio mamario induce la expresión de los genes de β -caseína, β -lactoglobulina, etc (160).

2.2 Efectos de la PRL en la obesidad, diabetes y en sus complicaciones.

La homeostasis metabólica de un individuo es finamente regulada por el estado nutricional, el gasto de energía, y las señales hormonales. Los órganos periféricos como el páncreas, el hígado y el tejido adiposo, así como diversas estructuras cerebrales, responden a estas condiciones y actúan de manera coordinada para mantener la estabilidad metabólica (15). La hormona PRL parece participar en la regulación del metabolismo energético y en sus alteraciones asociadas a la diabetes y a sus

complicaciones (59, 146). El receptor de la PRL (PRLR) se expresa en órganos que están relacionados con la homeostasis metabólica, como lo son el páncreas (5, 56, 74), el tejido adiposo (32) y el hígado (117, 159). Consistentemente, se ha mostrado que la PRL estimula la proliferación y la sobrevivencia de las células β del páncreas y aumenta la secreción de insulina inducida por el aumento de glucosa (24). También se demostró que el aumento en la expresión del PRLR en el hígado mejora la sensibilidad a la insulina (159).

2.2.1 La PRL y la diabetes

Los primeros estudios que sugirieron efectos de la PRL sobre el páncreas se llevaron a cabo hace más de 30 años. Nielsen reportó que la GH, la PRL y el PL estimulan la síntesis y la producción de insulina por islotes de Langerhans aislados de la rata (111). Años después, se demostró que las células β , que son las células pancreáticas encargadas de la producción de insulina, expresan tanto el receptor de la PRL como el de la GH (106) y que los receptores de la PRL se expresan en las células α y β de los islotes del páncreas pero no en las células δ (24, 138).

Más tarde se mostró que tanto el PL como la PRL estimulan no solo la secreción de insulina sino también la proliferación celular en islotes de Langerhans de rata, ratón y humano (24). Otros estudios demostraron que estos efectos de la PRL ocurren a través de la activación de la vía JAK2/STAT-5 (25, 76). Estudios *in vivo* mostraron que ratones donde se deletó uno de los alelos del gen que codifica para el receptor a PRL muestran intolerancia a la glucosa y una reducción en la densidad de sus islotes pancreáticos durante la gestación (74). Además, ratones nulos para el receptor de la PRL tienen menos células β -pancreáticas y menor expresión de insulina ante un reto con alta glucosa (56).

La acción fisiológica de la PRL sobre la regulación del metabolismo va más allá de sus efectos sobre el páncreas y la secreción de insulina. Recientemente se demostró que la PRL es incluso capaz de regular la sensibilidad a la insulina por el hígado en ratones. Yu y colaboradores reportaron en el 2013 que la sobreexpresión o la inhibición de la expresión del PRLR en el hígado resulta en un aumento o en una disminución en la sensibilidad a la

insulina en este órgano, respectivamente. Además, demostraron que en los ratones *db/db*, que son resistentes a la insulina, la expresión del PRLR está alterada y que el incrementar la expresión del PRLR mejora significativamente la sensibilidad a la insulina (159).

La influencia de la PRL también está presente en la diabetes humana. Estudios recientes mostraron que pacientes diabéticos, no controlados metabólicamente, presentan una disminución en los niveles séricos de la PRL comparados con hombres sanos (82). También se ha propuesto que niveles circulantes bajos de PRL en niños obesos pueden ser tomados como marcadores para predecir el desarrollo de síndrome metabólico y diabetes (36).

En su conjunto estos hallazgos sugieren el valor protector de la PRL contra la diabetes y muy probablemente contra sus complicaciones. A este respecto, recientemente se reportó que los niveles circulantes de la PRL disminuyen en relación con la progresión del síndrome metabólico (12) y de la retinopatía diabética (7). Se ha mostrado que la elevación de los niveles circulantes de PRL en ratas diabéticas reduce el aumento excesivo en la vasopermeabilidad retiniana que caracteriza a la retinopatía diabética experimental (7). Esta protección se explicó a través de que la elevación de la PRL sistémica favorece su incorporación al ojo y con ello su conversión intraocular a sus metabolitos, las vasoinhibinas, una familia de fragmentos de PRL con acciones inhibitorias de la vasopermeabilidad y de la angiogénesis ocular (146). Estos hallazgos indican que alteraciones en los niveles circulantes de la PRL pueden proteger contra alteraciones que conducen a la diabetes pero también contra sus complicaciones clínicas.

2.2.2 La PRL y la obesidad

Como mencionamos anteriormente, la obesidad se caracteriza por el aumento en el tamaño y número de los adipocitos que son las principales células que conforman el tejido adiposo y que son las responsables de almacenar los lípidos. El tejido adiposo es un órgano activo que desempeña un papel fundamental en la homeostasis metabólica y en la fisiología del organismo (2, 3). Este tejido altamente especializado de origen mesenquimal se compone de múltiples tipos de células que se encuentran suspendidas en una matriz de colágeno. Además de los adipocitos, el tejido adiposo contiene células madre

pluripotentes, preadipocitos, células endoteliales, pericitos, mastocitos, fibroblastos, células hematopoyéticas y macrófagos (15).

El tejido adiposo es un importante órgano endócrino cuyas hormonas, las adipocinas, regulan la ingesta de alimentos, el balance de energía, la resistencia a la insulina, la respuesta inflamatoria, y la presión arterial. A su vez, la liberación de adipocinas está influenciada por el estado nutricional, las señales hormonales y el gasto de energía (2, 66, 147). Desde el descubrimiento de la leptina en 1994, una multitud de adipocinas y adipocitocinas han sido identificadas. Algunas de las cuales son producidas exclusivamente por los adipocitos, otras pocas son secretados por las células estromales del tejido adiposo, mientras que algunas también pueden ser producidas en un grado variable por otros órganos.

La producción de PRL en el tejido adiposo humano se descubrió por casualidad al estudiar el papel potencial de la PRL en la carcinogénesis de mama (162). Las muestras quirúrgicas de tejido normal y maligno de mama se separaron de explantes de tejido adiposo y glandular para su cultivo por 10 días. Inesperadamente, los explantes de tejido adiposo de mama, destinados a servir como controles negativos, expresaron y liberaron de 10 a 15 veces más PRL que sus contrapartes glandulares. Al obtener dicho resultado se decidió a analizar cultivos de explantes de tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes mórbidamente obesos y no obesos. Similar al perfil de liberación de PRL a partir de tejido adiposo de mama, la liberación de PRL de ambos tipos de explantes mostró una liberación de PRL dependiente del tiempo (77). La secreción de PRL por explantes de tejido adiposo subcutáneo de pacientes obesos fue significativamente menor que la de los pacientes delgados, sin una aparente diferencia entre hombres y mujeres. Colectivamente, estos datos mostraron que la producción de PRL por el tejido adiposo es marcadamente afectada por la obesidad. El mecanismo por el que la obesidad provoca una reducción en la liberación de PRL proveniente de adipocitos y sus consecuencias funcionales, aún no se han determinado. Los adipocitos son la fuente primaria de PRL en el tejido adiposo, aunque también contribuye la PRL producida por macrófagos (20), cuya infiltración en el tejido adiposo aumenta en la obesidad. En contraste, el tejido adiposo de roedores (ratas y

ratones) o las líneas celulares 3T3-L1 y 3T3-442A de preadipocitos murinos, no expresan PRL, lo que indica de que la PRL derivada de los adipocitos solo ocurre en los seres humanos. La liberación de PRL por el adipocito es varias órdenes de magnitud menor que la de un lactotrofo. Sin embargo, la hipófisis humana pesa 1 g, mientras que el peso de tejido adiposo en los individuos obesos puede exceder de 100 kg. En consecuencia, la producción global de PRL por el tejido adiposo podría aproximarse a la de la pituitaria. Una pregunta relevante es si la PRL liberada por el tejido adiposo afecta los niveles séricos de PRL (15). Sin embargo, se ha observado que niños con obesidad presentan bajos niveles séricos de PRL comparados con niños delgados y en este trabajo proponen a la PRL como un factor de predicción para la progresión del síndrome metabólico (36). Esto es consistente con la menor secreción de PRL por explantes de tejido adiposo de pacientes obesos vs. delgados (77), lo que sugiere que en las enfermedades metabólicas la PRL de origen hipofisario contribuye en mayor grado a los niveles circulantes de la hormona.

De acuerdo a la información presentada, es clara la necesidad de entender mejor la participación de la PRL en las enfermedades metabólicas y, en particular, los mecanismos que regulan la secreción de esta hormona por la AP que es la principal fuente de sus niveles circulantes.

3. Regulación de la secreción y síntesis de la PRL hipofisaria.

La secreción de PRL puede estar afectada por una gran variedad de estímulos que pueden provenir del medio ambiente y/o del propio organismo. Los estímulos fisiológicos más importantes que incrementan la secreción de PRL por la hipófisis son la succión de las crías en la lactancia, el estrés y factores asociados a la reproducción (55). Todos estos estímulos actúan sobre el hipotálamo, el cual elabora una serie de factores inhibidores o liberadores de PRL, pero también directamente sobre las células hipofisarias especializadas en la secreción de PRL, los lactotrofos (55).

Alrededor del 20 al 50% de las células hipofisarias está conformado por lactotrofos (16, 114). Éstas células representan una población dinámica con una importante habilidad de

adaptación a los cambios tanto por el ambiente interno como el externo. La cantidad de lactotopos varía en las hembras y va a depender del ciclo reproductivo en el que se encuentren (17, 114). La regulación de la síntesis y secreción de la PRL involucra distintos mecanismos que actúan tanto a nivel de la transcripción y traducción, así como también sobre su proceso de secreción. Los lactotopos tienen una gran capacidad de almacenamiento de la PRL en gránulos de secreción. La liberación de PRL se lleva a cabo por la exocitosis de dichos gránulos que es dependiente de calcio, siendo los niveles de dicho catión otro nivel de regulación adicional a la de la expresión génica hormonal (16). Los reguladores de la liberación de PRL pueden clasificarse en: endocrinos y locales (parácrinos y autócrinos) (16). Sobre estos estímulos ejercen su influencia factores ambientales, hormonales, hipotalámicos, ováricos y derivados de la glándula suprarrenal que actúan de manera orquestada para controlar los niveles y efectos de la PRL (18).

Tanto la función como la proliferación de los lactotopos son reguladas principalmente por la inhibición tónica del sistema dopaminérgico (78). La síntesis y secreción de PRL en la hipófisis está bajo una inhibición tónica por parte de la dopamina (DA) hipotalámica. Los tres sistemas hipotalámicos que regulan esta inhibición son las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA), tuberohipofisiales (THDA) y periventriculares (PHDA) (16). La DA hipotalámica es capaz de inhibir tanto la secreción como la síntesis de PRL. La DA se une a su receptor 2 (D2R), que está acoplado a una proteína G y que se encuentra en abundancia en la membrana de los lactotopos. Dicha unión incrementa la conductancia del potasio e inactiva la sensibilidad de los canales de calcio, lo que resulta en hiperpolarización, menores niveles de calcio intracelular y, por lo tanto, en la inhibición de la secreción de PRL. La DA también suprime el metabolismo de la adenil-ciclasa y del fosfato de inositol, conduciendo a la regulación negativa de la transcripción del gen de la PRL. Finalmente, la DA mantiene inhibida la proliferación de los lactotopos (16, 49, 103, 149).

En contraste con la DA, otros factores hipotalámicos regulan la secreción de la PRL a través de acciones estimulatorias. Entre estos factores estimulatorios se incluye la hormona hipotalámica liberadora de la tirotropina (TRH), los estrógenos, el péptido intestinal

vasoactivo (VIP), la serotonina, la histamina, los opioides endógenos y la sustancia P entre otros (18).

Neuronas del núcleo paraventricular con terminales en la eminencia media secretan TRH hacia el sistema porta sanguíneo. La TRH se une a los receptores a TRH del tipo 1 que se expresan en los lactotrofos. La TRH estimula la secreción de PRL especialmente cuando los niveles de DA son bajos o ausentes e induce un incremento rápido y bifásico de los niveles intracelulares de calcio, permitiendo un incremento en la liberación de PRL, además induce la expresión del gen de la PRL a través de la activación de las MAP cinasas (MAPK) dependientes de calcio y de la PKC (16). En el caso de los estrógenos, se sabe que estimulan la expresión de la PRL y su liberación, además incrementan la capacidad de almacenaje y la proliferación de los lactotrofos (16). Durante el embarazo, el aumento en los niveles de estradiol juegan un papel importante en el crecimiento de la población de los lactotrofos (114). El tratamiento con estradiol en ratas hembra ovariectomizadas resulta en un incremento muy marcado de la síntesis de PRL y este efecto puede ejercerse directamente sobre la hipófisis ya que el estradiol estimula la síntesis de PRL en cultivos primarios de células hipofisarias y en cultivos de líneas celulares inmortalizadas de células tumorales hipofisarias (102). Además, los estrógenos pueden afectar el crecimiento como la producción y secreción de PRL por los lactotrofos a través de alterar el control dopaminérgico. Es bien sabido que el estradiol reduce la producción de DA hipotalámica y suprime la actividad del D2R en los lactotrofos, inhibiendo la capacidad de acoplamiento de la proteínas G del receptor (114).

El VIP es un péptido con 28 aminoácidos que está presente en altas concentraciones en el sistema portal sanguíneo hipotálamo-hipófisis pero también es producido por los lactotrofos, lo que permite regular en forma sistémica y autócrina la liberación de la PRL. El VIP actúa incrementando los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), lo que conduce a la activación de la proteína cinasa A (PKA). El VIP es un secretagogo de la PRL menos potente que la TRH (16).

La PRL también puede regular su propia liberación a través de inhibir a las neuronas dopaminérgicas mediante una retroalimentación negativa corta. Estas neuronas

dopaminérgicas son activadas tanto por la elevación aguda como crónica de PRL, y esta retroalimentación se bloquea durante la etapa tardía del embarazo, durante la lactancia o bien cuando se presenta un prolactinoma, facilitando que se mantengan los niveles altos de PRL (16).

Con respecto al gen de la PRL en la AP, se sabe que mide 10 kb (102) y que su expresión está regulada por un promotor que se encuentra corriente arriba del gen y que comprende dos regiones potenciadoras, una proximal, que en los humanos se localiza entre los 250 y 35 pb río arriba del inicio de la transcripción, y una región potenciadora distal localizada alrededor de las -2 y -1.2 kb (43, 64, 89, 110, 115). Las regiones tanto distal como proximal del promotor de PRL poseen sitios de unión para la proteína Pit-1 que es un factor de transcripción específico de este tejido (81, 109), es esencial para la transcripción del gen de la PRL así como para el desarrollo de los lactotopos (6). Una influencia positiva de importancia para los efectos de Pit-1 es la TRH que actúa promoviendo su unión y la de la proteína de unión al elemento regulador de PRL (PREB) al promotor de PRL (114, 156) (Esquema 1). Por su parte, la DA regula de manera negativa la transcripción en respuesta a Pit-1 para inhibir la transcripción de PRL (49). De hecho los ratones que presentan mutaciones en la proteína profeta de Pit-1 (PROP-1), que es la proteína que induce la expresión de Pit-1, o directamente en Pit-1 (ratones Ames y Snell Dwarf, respectivamente) presentan una disminución tanto en el número como en la producción de DA por las neuronas TIDA por lo que carecen de GH, tirotropina (TSH), pero también de PRL, y si se inicia un tratamiento de reemplazo con PRL antes de los 21 días de vida la PRL es capaz de restaurar las neuronas TIDA en estos ratones, indicando que la PRL sirve como un factor neurotrófico en estas neuronas durante el desarrollo (16).

Como ya mencionamos, los estrógenos se consideran como un importante activador fisiológico de la síntesis de PRL, así como de la proliferación de los lactotopos, y han sido implicados en la patofisiología de la hiperprolactinemia y los prolactinomas (55, 86). El 17β -estradiol (E2) estimula la proliferación y activa la expresión del gen de PRL, y ratas tratadas con altas dosis de estrógeno desarrollan hiperplasia en los lactotopos. El E2 ejerce su acción genómica a través de la unión a sus receptores ($ER\alpha$ y $ER\beta$), los cuales

activan factores de transcripción que residen en el citosol y son translocados al núcleo una vez que se lleva la unión de la hormona a su receptor. Los estrógenos, como tales, también se unen a las regiones reguladoras del gen de PRL denominadas elementos de respuesta a estrógeno (EREs) (1). Tanto en los humanos como en las ratas, los EREs se localizan en la región potenciadora distal, en los humanos están localizadas alrededor de los 1.2 kb río arriba del inicio de transcripción (1, 114) y regulan la transcripción de la PRL cuando Pit-1 se une a la región distal del promotor de la PRL (131) (Esquema 1). Como muchos otros receptores de hormonas esteroideas, los ERs pueden unirse directamente a sus secuencias blanco en el ADN o bien interactuar con co-activadores o co-represores nucleares, por lo que pueden activar o inhibir la expresión del gen. Estudios en ratones KO para el ER mostraron que la pérdida del ER β no parece tener efecto sobre los niveles de ARNm de la PRL en la AP, mientras que la carencia del ER α conduce a la pérdida de expresión de la PRL (1, 132).

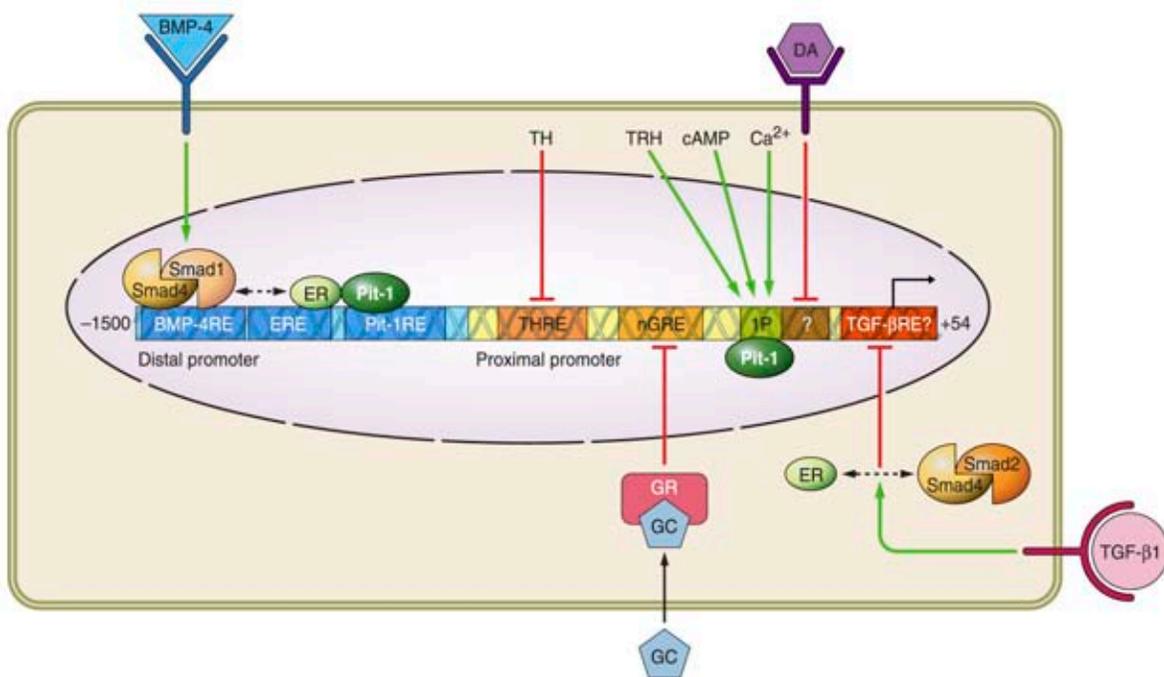
Al inicio de este subtema mencionamos que uno de los principales estímulos fisiológicos que incrementa la secreción de PRL es el estrés, éste efecto se ha observado en distintos animales. Se ha visto que los niveles de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) y de la PRL se incrementan de manera sincronizada en respuesta al estrés, y este efecto es bloqueado en presencia de dexametasona, lo que llevó a suponer que la liberación de ambas hormonas debían tener un mecanismo en común (124). Este incremento en los niveles de PRL ha generado interés debido a su relación con la activación del sistema inmunológico, liberando citocinas proinflamatorias como el TNF α y la IL-12 (23). Sin embargo, el estrés también induce el incremento en los niveles de glucocorticoides (GCs) los cuales son capaces de suprimir al sistema inmune, así como la expresión de PRL y la diferenciación de los lactotropos tanto en ratas como en humanos (114). Estos efectos supresores de los GCs son mediados a través de un sitio que se encuentra en el promotor de PRL conocido como elemento de respuesta negativa a glucocorticoides (nGRE) y este mismo elemento es capaz de incrementar la expresión de PRL en ausencia de GCs, esto se observó de manera particular en células GH3 transfectadas con el promotor de PRL humano, donde en ausencia de GCs la expresión de PRL se vio incrementada y sugieren que Pit-1 se une a nGRE y la represión de los GCs es mediada por el receptor a GCs que es capaz

de desplazar o bloquear su unión a éste sitio (114) (Esquema 1). Sin embargo, el mecanismo preciso de los GCs en las células pituitarias necesita ser más estudiado.

Se dice que la PRL, también considerada como citocina, es un mediador bidireccional de comunicación entre el sistema neuroendócrino y el inmunológico. Participa en diferentes actividades inmunomoduladoras, afecta tanto la maduración como la diferenciación de los linfocitos B y T, e incrementa las respuestas inflamatorias y la producción de inmunoglobulinas (33, 37) Además, citocinas como el factor transformante β (TGF β) (69) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (57), son importantes reguladores de las funciones de los lactotrofos (1). La familia de los TGF β son reguladores están involucrados en la fisiología de los lactotrofos (45, 69). La inhibición en la producción de PRL causada por el TGF β 1 se lleva a cabo, principalmente, a través de la regulación de la transcripción del gen de PRL. Una región entre las -116 y 54 pb 5' en el promotor de PRL de rata, ha demostrado ser responsable de los mecanismos de transcripción inhibitorios del TGF β 1 (52). Sin embargo, el análisis de la secuencia de esta región no muestra ninguna homología en la secuencia clásica inhibitoria del elemento de respuesta al TGF β , lo que sugiere que el TGF β 1 puede actuar a través de una vía de señalización compleja la cual involucra múltiples elementos en el promotor de la PRL (52), si bien Aun cuando se ha demostrado que la activina regula de manera negativa la expresión de PRL a través de reprimir la transcripción y la expresión de Pit-1 (95), el TGF β actúa sin modificar la expresión de Pit-1 (45, 52).

Se ha observado que los estrógenos pueden regular la proliferación de los lactotrofos a través de reducir la producción intrapituitaria de TGF β 1 y de estimular la síntesis de TGF β 3 (114). Estos factores tienen efectos opuestos, el TGF β 1 inhibe y el TGF β 3 estimula, tanto sobre la proliferación de los lactotrofos como la producción de PRL. De manera interesante, estos efectos del estradiol son dependientes de la presencia de las células folículo estelares (FS) hipofisarias. Las células FS son blanco de los estrógenos y concentran la mayor producción de los factores de crecimiento hipofisarios (TGF β 1, TGF β 3, bFGF, IL-6, entre otros). El TGF β 3, inducido por el efecto del estradiol, promueve la producción de bFGF por las células FS, el cual se sabe es un potente estimulador de la producción de PRL, así como de la proliferación de los lactotrofos a través de efectos parácrinos (114).

De la misma manera se sabe que el estradiol es capaz de activar la vía apoptótica Fas/FasL en los lactotropos a través de incrementar la producción de TNF α en la hipófisis, el cual actúa a través de su receptor TNF 1 (TNFR1) que se expresa en los lactotropos (30). Se ha observado que el TNF α puede jugar un papel relevante en la regulación de la síntesis y secreción de PRL por la AP. El TNF α incrementa la secreción de PRL por cultivos primarios de células hipofisarias (91, 92, 154) y aumenta la síntesis y secreción de PRL por la línea celular GH3 (57). Aún cuando todavía no está claro el mecanismo por el cual el TNF α activa la transcripción de PRL, Friedrichsen y colaboradores postularon que induce la expresión de PRL a partir de activar la vía de NF κ B. En células GH3 transfectadas con el promotor de PRL humana acoplado a luciferasa, encontraron que el TNF α estimula en forma dosis-dependiente la degradación del inhibidor de NF κ B, I κ B α , y la consecuente translocación de NF κ B al núcleo (57).



Esquema 1. Promotor de PRL. Tomado de la referencia (114).

2. TGF β y TNF α en la obesidad, en la diabetes y en sus complicaciones.

Citocinas es un término que inicialmente definió a mediadores químicos de la

comunicación local entre células del sistema inmune, pero que en la actualidad se asocia también con mediadores locales y sistémicos de la comunicación entre otros tipos celulares. La mayoría de las citocinas están involucradas en diversos procesos biológicos, incluyendo la proliferación, la activación, la diferenciación y la supervivencia celular asociadas a funciones integrativas como la hematopoyesis, la embriogénesis, la fibrosis, la inflamación y la inmunidad en general. Por lo que no sorprende que citocinas como el TNF α y el TGF β tengan un papel importante en enfermedades como la artritis reumatoide, la obesidad y la diabetes, en las cuales ocurre inflamación crónica, fibrosis y la destrucción eventual de tejidos específicos (53).

2.1 Factor de crecimiento transformante beta (TGF β).

Los factores de crecimiento transformantes fueron nombrados bajo ese nombre en base a sus habilidades para inducir un fenotipo transformado en los fibroblastos del riñón de la rata no neoplásicos (123). Los factores de crecimiento transformante beta (TGF β s) pertenecen a un grupo de proteínas que también incluye a los factores morfogénicos óseos, a la hormona antimülleriana, a las activinas y a las inhibinas (27). Estas proteínas comparten alguna homología estructural, pero es claro que sus receptores son independientes y participan en distintas funciones. Los TGF β s tienen funciones pleiotrópicas en varios órganos. Regulan el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de diferentes tipos de células (97), por lo que se les considera factores de crecimiento. También influyen en distintas células del sistema inmune, por lo que también se les considera como citocinas (40). En los mamíferos los TGF β s se presentan en tres isoformas (TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3). Aún cuando cada subtipo de TGF β s se encuentra codificado por genes diferentes, todos muestran homología en su secuencia y tienen mecanismos similares para el procesamiento y para la activación de genes (122).

Los TGF β s se producen a partir del procesamiento de una proteína precursora (pro-TGF β s) la cual está conformada por dímeros. Ambas proteínas se cortan dentro del aparato de Golgi y se mantienen asociadas de manera no-covalente dentro del llamado complejo de asociación de TGF β s, a su vez covalentemente unido a proteínas de unión al TGF β latente

(LTBPs) presentes en el espacio extracelular, lo que a su vez conforma al gran complejo de TGF β latente o inactivo (133). Para la obtención del TGF β activo es necesario que se lleve a cabo su liberación de este gran complejo. Existen varias formas para inducir la liberación de los TGF β s *in vitro* que incluyen la acidosis y el corte proteolítico (88). Sin embargo, todavía no se conoce con exactitud los mecanismos fisiológicos por los que se lleva a cabo esta liberación. Los TGF β s son producidos por una gran variedad de tejidos, y una vez liberados pueden viajar como dímeros hasta llegar a sus receptores que se encuentran en la superficie extracelular de las células blanco. Los TGF β s se unen a sus receptores con una alta afinidad ($K_d = 1$ a 60 pM) (139). Los receptores a TGF β s están compuestos por un complejo heterodimérico conformado por el receptor a TGF β del tipo I y el del tipo II, los cuales pertenecen a la familia de receptores serina/treonina cinasa (93) (152). La vía de señalización de los TGF β s que predomina es la activación de las SMADS (63), aunque también puede participar en otras cascadas de señalización (101).

Los TGF β s inhiben el crecimiento y las funciones normales de las células epiteliales y estimulan el crecimiento de tumores (100). En la hipófisis normal y en los prolactinomas, se ha observado que el TGF β 1 inhibe la proliferación de los lactotropos (41, 118, 129), mientras que el TGF β 3 estimula su proliferación (68).

2.2 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)

El TNF α es una potente citocina pro-inflamatoria producida por muchos tipos celulares, incluyendo los macrófagos, los monocitos, los linfocitos, los queratinocitos y los fibroblastos, ya sea en respuesta a una infección, a una herida o algún otro reto ambiental. El TNF α produce un amplio espectro de respuestas a nivel celular que se traducen en acciones sobre el organismo completo y que incluyen la activación, migración proliferación, diferenciación y apoptosis celular que, en el caso de la fase aguda de la respuesta inflamatoria, resultan en fiebre, inflamación, autoinmunidad, etc (13). Una de las acciones más conocidas del TNF α es la citotoxicidad mediada por los macrófagos y que es debida a los efectos pro-apoptóticos del TNF α (60).

En los mamíferos, se sabe que el TNF α afecta funciones fisiológicas de diversos tipos celulares, incluyendo a las células que no pertenecen al sistema inmunológico, donde afecta procesos asociados al metabolismo y la reproducción. Al respecto, el TNF α es altamente reconocido como regulador del metabolismo de los lípidos en el tejido adiposo y el catabolismo de proteínas en el músculo que afectan enfermedades tales como la resistencia a la insulina en la obesidad y la diabetes (60).

El TNF α se expresa en dos diferentes formas moleculares: una forma soluble y madura de 17 kDa y una forma insoluble, transmembranal de 26 kDa. La gran mayoría de las acciones descritas para el TNF α en las células corresponden a la forma madura y soluble, la cuál es producida a través del corte proteolítico de la porción extracelular de la forma transmembranal denominada pro-TNF α (60). El TNF α ejerce sus efectos a través de dos receptores de superficie celular distintos: el TNFR1 (p55) y el TNFR2 (p75). Ambos receptores son glicoproteínas transmembranales con un alto grado de homología estructural y, aparentemente, se expresan en todos los tipos celulares. Es bien conocido que el TNF α se une a ambos receptores con una alta afinidad y, aunque generalmente se había propuesto que el TNFR1 media la mayoría de las acciones celulares del TNF α , ahora se conoce que el TNFR2 también media muchas de las acciones biológicas del TNF α , incluso se ha observado que el TNFR2 se une a la forma transmembranal de 26 kDa de TNF α con una alta afinidad y transduce efectos celulares de dicha forma insoluble (60).

La exposición de TNF α a las células puede dar como resultado la activación de una cascada de caspasas que conduce a la apoptosis (13). Sin embargo, también es común que la unión de TNF α a sus receptores provoque la activación de dos factores de transcripción principales, AP-1 y NF-kappa B, que a su vez inducen genes implicados en otros procesos celulares asociados a las respuestas inflamatorias crónicas y agudas (13).

2.3 TGF β y TNF α en la Obesidad y la Diabetes

En las últimas dos décadas, ha surgido abundante evidencia que demuestra un lazo muy cercano entre el metabolismo y la inmunidad. Se sabe bien que la obesidad está asociada con un estado crónico leve de inflamación (151) y se ha propuesto que este

mecanismo de inflamación crónica puede desencadenar la diabetes a través de incrementar la resistencia a la insulina. Efectivamente, en la obesidad el incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias y de ácidos grasos libres (FFAs) impiden que se active la vía de señalización de la insulina y por ende la translocación de los transportadores de glucosa a las membranas de las células blanco responsables de la internalización de la glucosa en los diversos tejidos, lo que conduce al incremento en los niveles de glucosa en la circulación.

Muchas hormonas, citocinas, factores de crecimiento, hormonas y lípidos bioactivos pueden funcionar modificando el metabolismo como la respuesta inmune. Además de usar parte de la misma maquinaria celular, los sistemas metabólicos e inmunológicos son capaces de regularse mutuamente (151). Una de las primeras relaciones moleculares que se observaron entre la obesidad y la inflamación fue el que el TNF α se veía sobre-expresado en el tejidos adiposo de modelos de obesidad en roedores (73). Ahora se conoce que en el modelo de obesidad y diabetes tipo 2 inducido a través de una dieta alta en grasas (HFD) se encuentran incrementados tanto el TNF α como el TGF β (19, 126) en el tejido adiposo y en el músculo. De hecho, los niveles de TGF β se incrementan en el suero de ratones alimentados con HFD (153), los cuales presentan altos niveles de glucosa en sangre, un incremento en su masa corporal y esteatosis hepática, entre otras alteraciones, y estos síntomas mejoran cuando se inmunosequestra al TGF β . Por su parte, se ha propuesto que el TNF α , producido por el tejido adiposo, contribuye muy importantemente a la resistencia a la insulina que desencadena la diabetes en estos modelos de animales obesos (71). Por ejemplo, el TNF α induce resistencia a la insulina en adipocitos, músculo esquelético e hígado (72); y la depleción genética del TNF α o de su receptor, protegen contra la resistencia a la insulina que ocurre bajo la HFD (73, 148). Además, el TNF α se sobre-expresa tanto en el tejido adiposo como en el músculo de pacientes con obesidad (71, 125) y existen evidencias de que tanto el TGF β como el TNF α aumentan en la circulación de pacientes diabéticos (34, 46, 62).

Dado que el TGF β y el TNF α se asocian con la patofisiología de la diabetes y con el síndrome metabólico, que ambas citosinas se expresan en la hipófisis anterior (54, 107,

114), y que el $\text{TNF}\alpha$ estimula y el $\text{TGF}\beta$ inhibe la secreción de la PRL en cultivos primarios de células hipofisarias (92, 105, 129, 130, 154) y de lactotrofos (células hipofisarias secretoras de PRL) transformados (52, 57), proponemos que dichas citocinas pudieran ser parte de los mecanismos capaces de afectar la secreción de esta hormona bajo padecimientos metabólicos como la obesidad y la diabetes.

HIPÓTESIS

La secreción de la PRL hipofisiaria se altera en la obesidad y en la diabetes experimental y el TNF α y el TGF β están involucrados en dicha alteración.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el perfil de síntesis y secreción de PRL adenohipofisiaria durante la obesidad y la diabetes experimental, y el posible papel que tanto el TNF α como el TGF β podrían desempeñar en este proceso.

OBJETIVO PARTICULARES

Analizar la interacción entre el TNF α , el TGF β y la PRL en estudios in vitro e in vivo.

1. *Estudios in vitro:*

Determinar los efectos aislados y combinados del TNF α y del TGF β sobre la síntesis y secreción de la PRL por lactotropos en cultivo.

2. *Estudios in vivo:*

Estudiar los niveles circulantes de la PRL y la expresión de de la PRL, del TNF α y del TGF β en la hipófisis de ratas sanas y bajo los modelos experimentales de obesidad y de diabetes inducidas por dieta alta en grasa (HFD) y estreptozotocina, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular GH4C1.

Utilizamos la línea celular GH4C1 derivada de las células GH3 que fueron aisladas en 1966 a partir de un tumor hipofisiario inducido por rayos X en la rata y que produce tanto hormona de crecimiento como PRL (143). Las células GH4C1 producen principalmente PRL y han sido utilizadas ampliamente para estudiar la regulación de su síntesis y secreción (92). Las GH4C1 se mantuvieron entre los pasajes 3 y 10 y se cultivaron a 37°C en presencia de 5% CO₂-95% de aire en medio F10 (Sigma Chemicals, St. Lois, MO) conteniendo 15% de suero de caballo inactivado (GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), 2.5% de suero de ternera inactivado (CALF; GIBCO), y 1% de penicilina-estreptomicina. Las GH4C1 se sembraron en cajas de 24 pozos a una densidad de 5x10⁴ células por pozo o en cajas de 12 pozos a una densidad de 5x10⁵ y se incubaron por 48 h. Posteriormente se cambió el medio a DMEM alto en glucosa (25 mM) adicionado con una baja concentración de suero fetal bovino (0.5% SFB) y permanecieron en incubación por 24 h con el propósito de sincronizar su ciclo celular. Al cabo de este tiempo, las células fueron tratadas con las distintas concentraciones de TGFβ y/o TNFα por 48 h. El TGFβ y el TNFα recombinantes humanos fueron obtenidos de R&D Systems (Minneapolis, MN). Las concentraciones de ambas citocinas fueron comparables a aquellas usadas previamente en estudios in vitro similares (45, 57). Al final de la incubación la células fueron contadas y su viabilidad fue evaluada por el método de exclusión por tinción con azul de tripano.

Modelos animales de obesidad y diabetes.

Uno de los modelos de obesidad y síndrome metabólico más utilizados está ligado a la diabetes. En este modelo se reproducen altos niveles de glucosa (>120 mg/dl en ayuno) y la resistencia a la insulina característicos de pre-diabetes y diabetes tipo 2 (79).

Se usaron ratas Wistar macho a las que se les mantuvo bajo condiciones de laboratorio estandarizadas (22°C, bajo ciclos de luz oscuridad de 12 h y acceso al agua y al alimento *ad libitum*). Para inducir la obesidad a los animales se les alimentó con una dieta alta en grasas

(HFD) (Open Source Diet D12492; Research Diets, Inc.) a partir de las cuatro semanas de edad y a los animales control se les continuó alimentando con una dieta normal (CD). En la HFD el 60% de las calorías proviene de lípidos, mientras que en la CD solamente el 13%. Los animales se mantuvieron en las dietas respectivas durante 10 semanas. El peso corporal de los animales se monitoreó cada semana. Al cabo de nueve semanas con la HFD o la CD se evaluaron los niveles circulantes de glucosa en condiciones de ayuno (ocho horas) o de posprandio (que se miden al cabo de dos horas de ayuno). Durante esta misma semana se les determinó la resistencia a la insulina por medio de un ensayo de tolerancia a la insulina. Para inducir diabetes se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) ratas Wistar macho (250-350 g) con una dosis de estreptozotocina (STZ; 60 mg/kg, en un amortiguador de citratos 10 mM, pH 4.5) o el vehículo (amortiguador de citratos) para las ratas control, después del ayuno de toda una noche (12 a 18 horas). La STZ destruye selectivamente a las células beta-pancreáticas generando hiperglicemia (141). Pasadas 48 horas se determinaron los niveles de glucosa y aquellas ratas que mostraron un valor mayor a 250 mg/dl de glucosa en sangre fueron consideradas diabéticas. Este modelo es muy utilizado para valorar complicaciones de la diabetes debidas a hiperglicemia, i.e., retinopatía (119) y nefropatía (80). Es importante mencionar que la STZ puede actuar a través de dos vías: por el efecto citotóxico directo y por un efecto indirecto el cuál da lugar a un proceso inflamatorio causado por la destrucción del tejido pancreático. En este segundo proceso hay un incremento de citocinas inflamatorias entre las que se encuentra el $TNF\alpha$ (75).

Después de 10 semanas con la HFD o 6 semanas posteriores a la inyección de STZ, los animales fueron sacrificados, anestesiados por medio de la inhalación de CO_2 seguida de la decapitación entre las 10:00 y 14:00 horas, y se determinaron los niveles de expresión del ARN mensajero en la HA, así como los niveles circulantes proteicos de PRL, $TGF\beta$ y $TNF\alpha$.

También fueron evaluados los niveles de proteína de $TGF\beta$ y $TNF\alpha$ en las HA ratas controles y diabéticas después de 6 semanas posteriores a la inyección de STZ. Para evitar la liberación de PRL inducida por estrés, los animales fueron manipulados diariamente durante los 7 días previos al sacrificio.

Ensayo de tolerancia a la insulina (ITT):

A los animales se les retiró el alimento a las 9:00 am y al cabo de dos horas de ayuno (11:00 am) se les registró sus niveles de glucosa en sangre (tiempo 0). Posteriormente se les administró intraperitonealmente una dosis de 0.75 U/kg de insulina (Humulin R, Eli Lilly & Co., Indianapolis, IN) y al cabo de 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la i.p. de insulina se les midió los niveles de glucosa en sangre, los cuales se determinaron mediante el uso de un glucómetro, las muestras de sangre fueron tomadas de la punta de la cola de las ratas mediante el uso de una lanceta.

RT-PCR cuantitativo en tiempo real.

El ARN mensajero total de PRL, de TNF α y de TGF β se extrajo de las AP o de las células GH4C1, ambas previamente congeladas (-70°C), mediante el uso del método del isotiocianato de guanidina. El cDNA fue sintetizado a partir de 1 μ g del ARNm total, mediante el uso de un estuche comercial (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied biosystems). Los productos del PCR fueron detectados y cuantificados con Máxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Auburn, AL) en un volumen de reacción final de 10 μ l que contiene 5 μ l del cDNA y 0.5 μ M de cada uno de los pares de cebadores específicos para la PRL de rata (sentido 5'-TGG CAG AAC AGA AGG TTT GA-3' y antisentido 5'-CCA TGA ACA GCC AAG TGT CA-3'), para el TNF α de rata (sentido 5'-GGG CTT GTC ACT CGA GTT TT-3' y antisentido 5'-TGC CTC AGC CTC TTC TCA TT-3') o para el TGF β de rata (sentido 5'-CAC GAT CAT GTT GGA CAA CTG CTCC-3' y antisentido 5'-CTT CAG CTC CAC AGA GAA GAA CTGC-3'). La amplificación realizada por el sistema de detección CFX96TM PCR en tiempo real (Bio-Rad) incluyó un paso de desnaturalización de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación (10 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de templado específico de cada uno de los pares de oligonucleótidos y 30 segundos a 72°C). Los datos de PCR fueron analizados por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, y los umbrales de ciclo se normalizaron a los genes caseros GAPDH (en las APs) o 18S (en las células GH4C1) para calcular los niveles de expresión de los genes de interés. Se utilizaron diferentes genes caseros porque la expresión de GAPDH fue muy estable en las AP de los diferentes grupos de ratas, pero no en las células GH4C1, donde su expresión varió entre tratamientos.

Mientras que el 18S fue un buen gen de expresión constitutiva para la línea celular.

Niveles de PRL, TGF β y TNF α .

Los niveles de PRL en los medios de las células GH4C1 así como en los sueros de las ratas alimentadas con dieta control (CD) o HFD se determinaron por el radioinmunoanálisis convencional (RIA) usando los procedimientos estandarizados y los reactivos proporcionados por el programa National Hormone and Pituitary Program y por el Dr. A. F. Parlow (Habor University of California, Los Angeles Medical Center). En las ratas control y diabéticas inducidas por STZ se analizaron los niveles de PRL por medio del bioensayo con células Nb2, que es un procedimiento estandarizado basado en la respuesta proliferativa a la PRL de las células de linfoma Nb2 (142). Los niveles circulantes de TGF β y de TNF α fueron cuantificados por medio de los ELISAs de R&D Systems (Minneapolis, MN) y de BD Biosciences (San Diego, CA), respectivamente. Los niveles de TGF β y TNF α en las hipófisis se evaluaron por los ELISAs de Cloud-Clone Corp. (Houston, TX) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), respectivamente, que están diseñados para cuantificar los niveles de ambas citocinas en lisados tisulares.

Análisis estadístico.

Todos los resultados se repitieron tres veces o más en experimentos independientes. Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante la prueba t de Student (entre dos grupos) o por medio de análisis de varianza (ANOVA) en más de dos grupos. Para determinar las diferencias estadísticas cuando había la combinación de dos factores (TGF β o TNF α) se utilizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba post-hoc de Bonferroni. Y para realizar el análisis estadístico entre el efecto sólo de las diferentes dosis de TGF β se usó un ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni. Cuando los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos se realizaron con el Sigma Stat 7.0 (Sigma Stat 7.0, Systat Software Inc, San Jose, CA) y el GraphPad Prism[®] (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

RESULTADOS

1. Estudios *in vitro*.

Efectos opuestos del TGF β y del TNF α sobre la expresión y la secreción de PRL por las células GH4C1.

Estudios realizados sobre cultivos primarios de AP (92, 129), habían mostrado que el TGF β inhibe (45, 52) y el TNF α estimula (57) la expresión de PRL por las líneas celulares de lactotropos GH3 y GH4. En este trabajo, confirmamos estos hallazgos en las células GH4C1, una línea celular derivada de las células somatomamotrópicas GH4 y que, por ende, contrastan con las GH3 que producen primariamente PRL (143). Mostramos que el tratamiento con diferentes concentraciones de TGF β reduce los niveles del ARN mensajero de PRL en los lisados celulares (**Figura 1A y B**) y los niveles de PRL en el medio condicionado de las células (**Figura 1E y F**). La co-administración de TGF β con una concentración alta de TNF α (50 ng/ml) no solo bloqueó la inhibición debida al TGF β sino, en algunos casos, transformó la inhibición en estimulación (**Figura 1B y F**). Por otra parte, la estimulación por la concentración alta de TNF α se redujo en la presencia de altas concentraciones de TGF β (**Figura 1B y F**). De manera similar, encontramos que diversas concentraciones de TNF α estimulan la expresión del ARN mensajero de PRL así la secreción de la hormona y que esta estimulación se bloquea por la co-incubación con una concentración máxima inhibitoria de TGF β (10 ng/ml) (**Figura 1C y G**). El antagonismo funcional entre las dos citocinas se ilustra mejor cuando las células se trataron simultáneamente con altas concentraciones de ambas citocinas, en cada caso los niveles de expresión y secreción de PRL fueron significativamente distintos a aquellos que se observaron cuando las células fueron tratadas con cada una de las citocinas solas y fueron similares a los valores obtenidos en el control, donde las células no recibieron ningún tratamiento, mostrando esencialmente que son capaces de cancelar los efectos de una y otra (**Figura 1D y H**). Cabe mencionar que ni el TGF β , ni el TNF α en sus concentraciones más altas de inhibición (10 ng/ml) y estimulación (50 ng/ml), respectivamente, modificaron la viabilidad o el número total de células (**Figura 2A y B**).

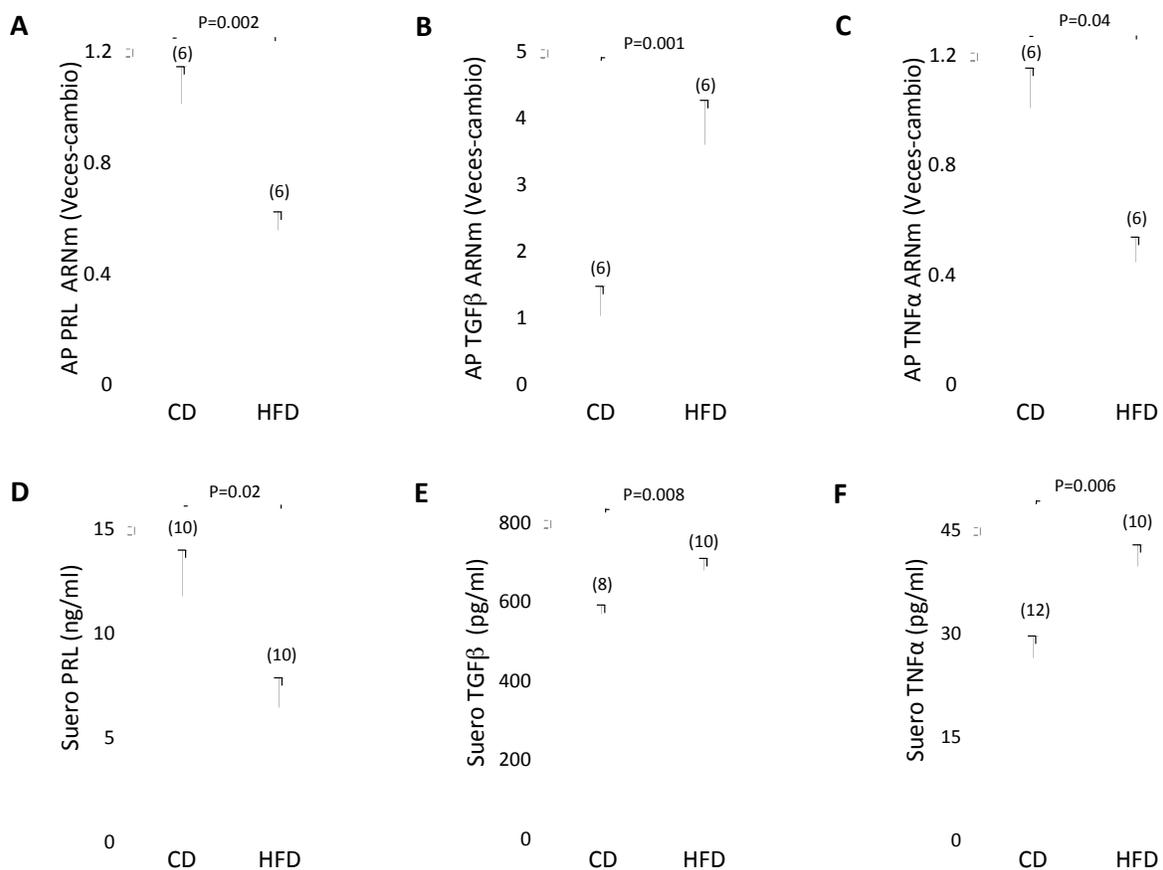


Figura 4. La expresión hipofisiaria y los niveles séricos de PRL, TGFβ, y TNFα de ratas obesas alimentadas con HFD. La expresión en la hipófisis anterior de PRL (A), TGFβ (B) o TNFα (C) fue medida por qRT-PCR; los niveles séricos de PRL (D) se evaluaron por RIA, los de TGFβ (E) y TNFα (F) se analizaron por ELISA en ratas alimentadas con una dieta control (CD) o una dieta alta en grasas (HFD) por 10 semanas. Los valores son el promedio ± el error estándar. Los números dentro del paréntesis indican los valores de n. *p < 0.05 vs. CD de acuerdo a la prueba t de Student.

Peso corporal y niveles de glucosa en el modelo de diabetes inducido por estreptozotocina (STZ) en la rata

El modelo de diabetes en ratas inducido por la administración de STZ es un modelo bien caracterizado y muy utilizado de diabetes tipo 1 (85). Seis semanas después de la administración i.p. de STZ, estas ratas mostraron una reducción en el peso corporal del 21% y una marcada hiperglicemia, comparadas con las ratas control (**Figura 5A y B**).

DISCUSIÓN

La PRL es una hormona con acciones metabólicas. La PRL participa en la homeostasis metabólica a través de promover la proliferación, la supervivencia y la producción de insulina por las células beta pancreáticas (56, 144) y a través de estimular la ingesta de alimentos (28), la sensibilidad a la insulina (159) y el crecimiento y la función del tejido adiposo (16). Estudios clínicos en grupos grandes de pacientes mostraron que niveles circulantes bajos de PRL, si bien dentro del rango fisiológico normal, se asocian con la resistencia a la insulina y la presencia de diabetes tipo 2 (12). Además, los bajos niveles de PRL en la circulación de niños obesos se correlacionan con un incremento en la resistencia a la insulina, la inflamación y el índice de masa corporal (36). Asimismo, en consistencia con los estudios clínicos, los niveles circulantes de PRL se reducen en las ratas diabéticas inducidas por STZ (21, 140), en ratones donde la obesidad se induce por medios químicos (135), y en los modelos transgénicos de diabetes y obesidad db/db (134) y ob/ob (96), respectivamente. Finalmente, se conoce que los niveles circulantes de PRL medidos a lo largo del día se modifica en ratas macho alimentadas con HFD (31) y que los niveles de PRL se reducen en el suero de ratones hembra alimentados con HFD (136).

En este trabajo corroboramos la reducción en los niveles circulantes de PRL observado en los modelos de ratas obesas y diabéticas inducidos con HFD y con STZ, respectivamente. Además, mostramos que los niveles del ARNm de la PRL se reducen en la AP bajo dichas condiciones experimentales, sugiriendo que ésta disminución en la regulación de la síntesis de PRL contribuye a la reducción en los niveles sistémicos de la hormona. El decremento en los niveles del ARNm de PRL puede también reflejar una disminución en el número de lactotropos. A este respecto, se conoce que la cantidad de PRL, así como el número de lactotropos y de gránulos secretores de PRL, se reduce, al tiempo que aumenta la apoptosis de los lactotropos, en las AP de ratas con diabetes inducida con STZ (9, 10, 155).

La dopamina (DA) es el principal inhibidor de la síntesis y de la secreción de PRL (14), y existen varios factores tanto dependientes como independientes de DA que actúan de

manera central y local para regular la síntesis y secreción de PRL hipofisiaria en las enfermedades metabólicas (94, 114). El incremento en la masa del tejido graso, la hiperinsulinemia y la hiperleptinemia pueden modificar la secreción de PRL en la obesidad y la diabetes (94). Sin embargo, en este estudio mostramos que en ambos modelos, tanto las ratas con obesidad inducida por una HFD como en las ratas con diabetes inducida por STZ, tiene lugar la disminución en los niveles de síntesis y secreción de PRL hipofisiaria, a pesar de los cambios opuestos tanto en el peso (4, 85) (resultados en este estudio), como en los niveles de leptina (11, 137) y de insulina (85, 116) reportados bajo estas condiciones experimentales, sugiriendo que otros factores además del incremento en la masa del tejido graso y de los niveles altos de leptina y de insulina en sangre podrían ser responsables de la alteración observada en los niveles de PRL. En la búsqueda de factores capaces de regular a la PRL comunes a ambos modelos, evaluamos al TGF β y al TNF α .

Tanto el TGF β como el TNF α aumentan en la circulación de pacientes con obesidad y diabetes (36, 46, 62, 153, 157), en roedores alimentados con HFD (47, 153) y en ratas diabéticas inducida por STZ (48, 50). El TGF β promueve la adiposidad y la enfermedad glomerular durante la obesidad y/o la diabetes, y ambos tejidos tanto el adiposo como el renal son las principales fuentes del TGF β sérico (35, 50, 51, 153). También, el TNF α es producido y liberado por adipocitos estresados a partir de los depósitos de grasa y por la activación de macrófagos provenientes de tejidos como el graso, el músculo, y el hígado para mediar efectos locales y sistémicos del TNF α sobre el metabolismo, la inflamación y la función vascular (62, 83). Cabe señalar, que ambas citocinas tienen efectos sobre la secreción de PRL. El TGF β inhibe y el TNF α estimula la síntesis y secreción por lactotopos en cultivo (45, 52, 57, 92, 129). Debido a que ambas citocinas se incrementa durante la obesidad y la diabetes, investigamos el resultado de tratar a las células GH4C1 con la combinación de las dos citocinas sobre la síntesis y secreción de PRL. Observamos que el TGF β inhibe y el TNF α estimula la síntesis y la liberación de PRL de manera dependiente de la dosis y que estos efectos no parecen involucrar una alteración de la viabilidad o de la proliferación celular. Interesantemente, las dos citocinas fueron capaces de antagonizar el efecto de la otra, sugiriendo que la regulación a la alta o a la baja de la síntesis de PRL puede ser determinada por sus concentraciones relativas. Propusimos como hipótesis que

si estas citocinas influyen sobre la regulación a la baja de PRL observada en la obesidad y en la diabetes que los efectos inhibitorios del TGF β prevalecerían sobre la acción estimuladora del TNF α .

De acuerdo con estudios previos, encontramos que las concentraciones de ambas citocinas se encuentran elevadas en la circulación de las ratas alimentadas con una HFD y que el TGF β también se incrementa en el suero de ratas diabéticas inducidas por STZ. Sin embargo, en contraste con un trabajo previo (50), los niveles sistémicos del TGF β se reducen en las ratas diabéticas inducidas con STZ. Se desconoce la razón de esta discrepancia. El TGF β en el suero de estas ratas podría provenir del riñón debido a la nefropatía generada en estos animales (35). Es posible que un estado temprano de nefropatía asociado a la exposición más corta de hiperglicemia de nuestro estudio (6 versus 10 semanas) haya influenciado los niveles séricos de TGF β . Sin embargo, las concentraciones de TGF β y de TNF α que se encuentran en la hipófisis y que afectarían la secreción de PRL no necesariamente tendrían que provenir de la circulación. Se sabe que ambas citocinas se expresan en la hipófisis anterior. La producción de TGF β parece estar restringida a las células folículo estelares (84) y a los lactotrofos (26). En éste último tipo celular, la síntesis de TGF β es regulada a la alta por la dopamina y a la baja por los estrógenos para modular la secreción de PRL y la proliferación de los lactotrofos (26, 120, 128). El TNF α se produce en la hipófisis anterior por los macrófagos y por las células somatotrópicas (8). Debido a esto, es importante conocer si los niveles de TNF α y de TGF β se modifican en la hipófisis anterior durante la obesidad y la diabetes.

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que muestra que la expresión de TGF β se eleva y que la de TNF α se reduce en la hipófisis anterior de ratas obesas inducidas por la HFD, que además son cambios que coinciden con las acciones observadas de ambas citocinas sobre PRL in vitro y que podrían explicar la disminución en la síntesis y secreción de PRL. También mostramos que los niveles de expresión del ARNm y de proteína de ambas citocinas aumentan en las hipófisis anteriores de ratas diabéticas inducidas por STZ. El aumento en la expresión de TNF α es consistente con un reporte previo que muestra que los niveles proteicos de TNF α en la hipófisis se elevan este modelo de ratas diabéticas,

donde es propuesto como un mecanismo por el cual se induce la apoptosis que media la pérdida de los lactotropos que tiene lugar en la diabetes (10).

El aumento en la expresión de TGF β y de TNF α en las AP de las ratas diabéticas, la reducción de los niveles séricos de TGF β en la diabetes, y el aumento del TNF α sistémico en la obesidad y en la diabetes, son difíciles de conciliar con la reducción en la expresión y en los niveles circulantes de PRL.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos con la línea de las GH4C1 , donde el incremento en la concentración de TNF α es capaz de bloquear el efecto inhibitorio del TGF β , podemos proponer que la prevalencia del efecto inhibitorio del TGF β sobre la regulación a la alta de la PRL por el TNF α en nuestro modelos in vivo puede deberse no solamente a las concentraciones endógenas de ambas citocinas sino también a la afinidad por la unión a sus receptores. En las ratas diabéticas la concentración de ambas citocinas en la hipófisis es similar (122 vs. 72 pg/ml de proteína de TGF β y TNF α , respectivamente), pero el valor de la Kd del receptor 2 de TGF β (TGF β R2) es 20 y 7 veces menor que los valores de la Kd de los receptores 1 (TNF α R1) (1.23 nM) y 2 (TNF α R2) (0.36 nM) de TNF α , respectivamente (99, 121). Además, los niveles circulantes de TGF β medidos en las ratas diabéticas (316 pg/ml, i.e., 25.3 pM) y en las alimentadas con HFD (674 pg/ml, i.e., 53.9 pM) son similares la concentración de Kd del TGF β R2, mientras que los niveles sistémicos de TNF α tanto en las ratas diabéticas (47 pg/ml, i.e., 2.8 pM) como en las alimentadas con HFD (39 pg/ml, i.e., 2.3 pM) son más de 400 y 100 veces menores que los valodes de la Kd de los recetores TNF α R1 y TNF α R2, respectivamente. De manera, que podría ser posible que los niveles endógenos del TGF β puedan ser mas efectivos que los del TNF α . Alternativamente, es importante hacer notar que el efecto del TNF α puede no ocurrir o convertirse en inhibición, dependiendo de complejas interacciones in vivo. Concentraciones de TNF α similares a las que encontramos que pueden estimular a la PRL en nuestros estudio in vitro, pueden no tener ningún efecto (104), inhibir la liberación de PRL (65, 145), o promover la apoptosis de los lactotropos (30), dependiendo de la duración a la exposición al TNF α , del sexo de los animales, de la influencia de los esteroides gonadales y de la edad de los animales. Además, la apoptosis de los lactotropos ocurre en

el modelo de ratas diabéticas inducido por STZ (10), por lo que es posible que el aumento en el TNF α hipofisiario observado en este modelo reduzca la PRL hipofisiaria de una manera indirecta a través de promover la apoptosis de los lactotopos.

Los cambios en los niveles de expresión en la hipófisis y circulantes de TGF β y de TNF α encontrados en la obesidad y la diabetes, en conjunto con los efectos recíprocos directos de ambas citocinas sobre la síntesis y secreción de PRL en la hipófisis, sugieren que el TGF β y el TNF α juegan un papel importante en la regulación local y sistémica de la inhibición de la secreción de PRL en las enfermedades metabólicas. El análisis de esta posibilidad requiere de estudios futuros que permitan analizar si el bloqueo selectivo de una u otra citocina en el microambiente hipofisiario modifica los niveles de la PRL.

La interacción funcional entre el TGF β y el TNF α plantea la pregunta de qué controla su producción hipofisiaria en la obesidad y la diabetes. El TGF β es regulado positivamente por la DA en los lactotopos (120, 128) y su producción puede estar relacionada con la sobre-activación de la DA hipotalámica que ocurre en la obesidad (135, 136) y en la diabetes (140). La producción de TNF α en la hipófisis anterior podría ser en respuesta al estrés (87). El TNF α afecta la secreción de ACTH por las células hipofisarias (58) y se ha observado que el TNF α es regulado a la alta por el estrés relativamente débil debido a una inflamación sistémica (87) como la que ocurre en la obesidad (98) y en la diabetes tipo 1 (113). Un control metabólico deficiente también puede desencadenar la expresión del TNF α (48) y la hipoglucemia estimula la secreción de PRL en pacientes diabéticos con bajo control (90). Estudios futuros deberán evaluar si los cambios en la expresión de TGF β y de TNF α en la hipófisis tienen impacto sobre los trastornos metabólicos no mediados a través de su acción sobre la PRL.

CONCLUSIONES

El presente estudio demuestra que la reducción de la secreción de PRL en las hipófisis de ratas obesas y diabéticas se correlaciona con cambios en la expresión hipofisiaria de dos citocinas metabólicamente relevantes, el TGF β y el TNF α . Se postula que un desequilibrio en la hipófisis anterior entre las dos citocinas, derivado de la alteración de sus niveles locales y sistémicos, favorece la regulación a la baja de la PRL en los trastornos metabólicos. Estos resultados ayudan a establecer el contexto de la regulación de la PRL por el TGF β y el TNF α , una hormona con reconocida influencia sobre la homeostasis metabólica que, cuando es regulada negativamente, puede agravar las alteraciones metabólicas debidas a la obesidad y a la diabetes. Sin embargo, se necesitan más estudios para probar estas hipótesis.

REFERENCIAS

1. **Adamson AD, Friedrichsen S, Semprini S, Harper CV, Mullins JJ, White MR and Davis JR.** Human prolactin gene promoter regulation by estrogen: convergence with tumor necrosis factor- α signaling. *Endocrinology* 149: 687-694, 2008.
2. **Ahima RS.** Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5: 242S-249S, 2006.
3. **Ailhaud G.** Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *Comptes rendus biologies* 329: 570-577; discussion 653-575, 2006.
4. **Akbay E, Uлуу NN, Toroner F, Ayvaz G, Taneri F, Akturk M, Arslan M and Karasu C.** Effects of rosiglitazone treatment on the pentose phosphate pathway and glutathione-dependent enzymes in liver and kidney of rats fed a high-fat diet. *Curr Ther Res Clin Exp* 65: 79-89, 2004.
5. **Amaral ME, Cunha DA, Anhe GF, Ueno M, Carneiro EM, Velloso LA, Bordin S and Boschero AC.** Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J Endocrinol* 183: 469-476, 2004.
6. **Andersen B and Rosenfeld MG.** POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocr Rev* 22: 2-35, 2001.
7. **Arnold E, Rivera JC, Thebault S, Moreno-Paramo D, Quiroz-Mercado H, Quintanar-Stephano A, Binart N, Martinez de la Escalera G and Clapp C.** High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes* 59: 3192-3197, 2010.
8. **Arras M, Hoche A, Bohle R, Eckert P, Riedel W and Schaper J.** Tumor necrosis factor- α in macrophages of heart, liver, kidney, and in the pituitary gland. *Cell Tissue Res* 285: 39-49, 1996.
9. **Arroba AI, Frago LM, Paneda C, Argente J and Chowen JA.** The number of lactotrophs is reduced in the anterior pituitary of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 46: 634-638, 2003.
10. **Arroba AI, Lechuga-Sancho AM, Frago LM, Argente J and Chowen JA.** Increased apoptosis of lactotrophs in streptozotocin-induced diabetic rats is followed by increased proliferation. *J Endocrinol* 191: 55-63, 2006.
11. **Bahceci M, Tuzcu A, Akkus M, Yaldiz M and Ozbay A.** The effect of high-fat diet on the development of obesity and serum leptin level in rats. *Eat Weight Disord* 4: 128-132, 1999.
12. **Balbach L, Wallaschofski H, Volzke H, Nauck M, Dorr M and Haring R.** Serum prolactin concentrations as risk factor of metabolic syndrome or type 2 diabetes? *BMC Endocr Disord* 13: 12, 2013.
13. **Baud V and Karin M.** Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in cell biology* 11: 372-377, 2001.
14. **Ben-Jonathan N and Hnasko R.** Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22: 724-763, 2001.
15. **Ben-Jonathan N and Hugo E.** Prolactin (PRL) in adipose tissue: regulation and functions. *Advances in experimental medicine and biology* 846: 1-35, 2015.
16. **Ben-Jonathan N, LaPensee CR and LaPensee EW.** What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 29: 1-41, 2008.
17. **Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL and Steinmetz RW.** Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17: 639-669, 1996.
18. **Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N and Kelly PA.** Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19: 225-268, 1998.

19. **Borst SE and Conover CF.** High-fat diet induces increased tissue expression of TNF-alpha. *Life sciences* 77: 2156-2165, 2005.
20. **Bouckennooghe T, Sisino G, Aurientis S, Chinetti-Gbaguidi G, Kerr-Conte J, Staels B, Fontaine P, Storme L, Pattou F and Vambergue A.** Adipose tissue macrophages (ATM) of obese patients are releasing increased levels of prolactin during an inflammatory challenge: a role for prolactin in diabetes? *Biochimica et biophysica acta* 1842: 584-593, 2014.
21. **Boujon CE, Bestetti GE, Abramo F, Locatelli V and Rossi GL.** The reduction of circulating growth hormone and prolactin in streptozocin-induced diabetic male rats is possibly caused by hypothalamic rather than pituitary changes. *J Endocrinol* 145: 19-26, 1995.
22. **Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J and Kelly PA.** Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 53: 69-77, 1988.
23. **Brand JM, Frohn C, Cziupka K, Brockmann C, Kirchner H and Luhm J.** Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. *European cytokine network* 15: 99-104, 2004.
24. **Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG and Sorenson RL.** 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: 879-887, 1993.
25. **Brelje TC and Sorenson RL.** Role of prolactin versus growth hormone on islet B-cell proliferation in vitro: implications for pregnancy. *Endocrinology* 128: 45-57, 1991.
26. **Burns G and Sarkar DK.** Transforming growth factor beta 1-like immunoreactivity in the pituitary gland of the rat: effect of estrogen. *Endocrinology* 133: 1444-1449, 1993.
27. **Burt DW and Law AS.** Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Progress in growth factor research* 5: 99-118, 1994.
28. **Byatt JC, Staten NR, Salsgiver WJ, Kostelc JG and Collier RJ.** Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. *Am J Physiol* 264: E986-992, 1993.
29. **Cai J and Boulton M.** The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye* 16: 242-260, 2002.
30. **Candolfi M, Zaldivar V, De Laurentiis A, Jaita G, Pisera D and Seilicovich A.** TNF-alpha induces apoptosis of lactotropes from female rats. *Endocrinology* 143: 3611-3617, 2002.
31. **Cano P, Jimenez-Ortega V, Larrad A, Reyes Toso CF, Cardinali DP and Esquifino AI.** Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine* 33: 118-125, 2008.
32. **Carre N and Binart N.** Prolactin and adipose tissue. *Biochimie* 97: 16-21, 2014.
33. **Cejkova P, Fojtikova M and Cerna M.** Immunomodulatory role of prolactin in diabetes development. *Autoimmunity reviews* 9: 23-27, 2009.
34. **Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Abrahamian H, Fuller JH, Stehouwer CD and Group EPCS.** Circulating and urinary transforming growth factor beta1, Amadori albumin, and complications of type 1 diabetes: the EURODIAB prospective complications study. *Diabetes Care* 25: 2320-2327, 2002.
35. **Chen S, Jim B and Ziyadeh FN.** Diabetic nephropathy and transforming growth factor-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up. *Semin Nephrol* 23: 532-543, 2003.
36. **Chirico V, Cannavo S, Lacquaniti A, Salpietro V, Mandolino M, Romeo PD, Cotta O, Munafò C, Giorgianni G, Salpietro C and Arrigo T.** Prolactin in obese children: a bridge between inflammation and metabolic-endocrine dysfunction. *Clin Endocrinol (Oxf)* 79: 537-544, 2013.

37. **Clapp C, Adan N, Ledesma-Colunga MG, Solis-Gutierrez M, Triebel J and Martinez de la Escalera G.** The role of the prolactin/vasoinhibin axis in rheumatoid arthritis: an integrative overview. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73: 2929-2948, 2016.
38. **Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC and Martinez De La Escalera G.** Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 89: 1177-1215, 2009.
39. **Clapp C, Thebault S and Martinez de la Escalera G.** Hormones and postpartum cardiomyopathy. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 18: 329-330, 2007.
40. **Clark DA and Coker R.** Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *The international journal of biochemistry & cell biology* 30: 293-298, 1998.
41. **Coya R, Alvarez CV, Perez F, Gianzo C and Dieguez C.** Effects of TGF-beta1 on prolactin synthesis and secretion: an in-vitro study. *J Neuroendocrinol* 11: 351-360, 1999.
42. **Davis JA and Linzer DI.** Expression of multiple forms of the prolactin receptor in mouse liver. *Mol Endocrinol* 3: 674-680, 1989.
43. **Day RN and Maurer RA.** The distal enhancer region of the rat prolactin gene contains elements conferring response to multiple hormones. *Mol Endocrinol* 3: 3-9, 1989.
44. **De A, Morgan TE, Speth RC, Boyadjieva N and Sarkar DK.** Pituitary lactotrope expresses transforming growth factor beta (TGF beta) type II receptor mRNA and protein and contains 125I-TGF beta 1 binding sites. *J Endocrinol* 149: 19-27, 1996.
45. **Delidow BC, Billis WM, Agarwal P and White BA.** Inhibition of prolactin gene transcription by transforming growth factor-beta in GH3 cells. *Mol Endocrinol* 5: 1716-1722, 1991.
46. **Doganay S, Evereklioglu C, Er H, Turkoz Y, Sevinc A, Mehmet N and Savli H.** Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye (Lond)* 16: 163-170, 2002.
47. **El-Moselhy MA, Taye A, Sharkawi SS, El-Sisi SF and Ahmed AF.** The antihyperglycemic effect of curcumin in high fat diet fed rats. Role of TNF-alpha and free fatty acids. *Food Chem Toxicol* 49: 1129-1140, 2011.
48. **El-seweidy MM, El-Sweify SE, Ameen RS and Hashem RM.** Effect of age receptor blocker and/or anti-inflammatory coadministration in relation to glycation, oxidative stress and cytokine production in stz diabetic rats. *Pharmacol Res* 45: 391-398, 2002.
49. **Elsholtz HP, Lew AM, Albert PR and Sundmark VC.** Inhibitory control of prolactin and Pit-1 gene promoters by dopamine. Dual signaling pathways required for D2 receptor-regulated expression of the prolactin gene. *The Journal of biological chemistry* 266: 22919-22925, 1991.
50. **Eрман A, Veksler S, Gafter U, Boner G, Wittenberg C and van Dijk DJ.** Renin-angiotensin system blockade prevents the increase in plasma transforming growth factor beta 1, and reduces proteinuria and kidney hypertrophy in the streptozotocin-diabetic rat. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 5: 146-151, 2004.
51. **Fain JN, Tichansky DS and Madan AK.** Transforming growth factor beta1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity. *Metabolism* 54: 1546-1551, 2005.
52. **Farrow KN and Gutierrez-Hartmann A.** Transforming growth factor-beta1 inhibits rat prolactin promoter activity in GH4 neuroendocrine cells. *DNA Cell Biol* 18: 863-873, 1999.
53. **Feldmann M.** The cytokine network in rheumatoid arthritis: definition of TNF alpha as a therapeutic target. *Journal of the Royal College of Physicians of London* 30: 560-570, 1996.
54. **Fortin ME, Pelletier RM, Meilleur MA and Vitale ML.** Modulation of GJA1 turnover and intercellular communication by proinflammatory cytokines in the anterior pituitary folliculostellate cell line TtT/GF. *Biology of reproduction* 74: 2-12, 2006.
55. **Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A and Nagy G.** Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80: 1523-1631, 2000.

56. **Freemark M, Avril I, Fleenor D, Driscoll P, Petro A, Opara E, Kendall W, Oden J, Bridges S, Binart N, Breant B and Kelly PA.** Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. *Endocrinology* 143: 1378-1385, 2002.
57. **Friedrichsen S, Harper CV, Semprini S, Wilding M, Adamson AD, Spiller DG, Nelson G, Mullins JJ, White MR and Davis JR.** Tumor necrosis factor-alpha activates the human prolactin gene promoter via nuclear factor-kappaB signaling. *Endocrinology* 147: 773-781, 2006.
58. **Gaillard RC, Turnill D, Sappino P and Muller AF.** Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinology* 127: 101-106, 1990.
59. **Garcia C, Aranda J, Arnold E, Thebault S, Macotela Y, Lopez-Casillas F, Mendoza V, Quiroz-Mercado H, Hernandez-Montiel HL, Lin SH, de la Escalera GM and Clapp C.** Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest* 118: 2291-2300, 2008.
60. **Goetz FW, Planas JV and MacKenzie S.** Tumor necrosis factors. *Developmental and comparative immunology* 28: 487-497, 2004.
61. **Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA and Martial JA.** Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocr Rev* 17: 385-410, 1996.
62. **Goldberg RB.** Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 3171-3182, 2009.
63. **Gumienny T and Padgett RW.** The other side of TGF-beta superfamily signal regulation: thinking outside the cell. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13: 295-299, 2002.
64. **Gutierrez-Hartmann A, Siddiqui S and Loukin S.** Selective transcription and DNase I protection of the rat prolactin gene by GH3 pituitary cell-free extracts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 5211-5215, 1987.
65. **Harel G, Shamoun DS, Kane JP, Magner JA and Szabo M.** Prolonged effects of tumor necrosis factor-alpha on anterior pituitary hormone release. *Peptides* 16: 641-645, 1995.
66. **Harwood HJ, Jr.** The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* 63: 57-75, 2012.
67. **Haslam DW and James WP.** Obesity. *Lancet* 366: 1197-1209, 2005.
68. **Hentges S, Pastorcic M, De A, Boyadjieva N and Sarkar DK.** Opposing actions of two transforming growth factor-beta isoforms on pituitary lactotropic cell proliferation. *Endocrinology* 141: 1528-1535, 2000.
69. **Hentges S and Sarkar DK.** Transforming growth factor-beta regulation of estradiol-induced prolactinomas. *Frontiers in neuroendocrinology* 22: 340-363, 2001.
70. **Horseman ND and Yu-Lee LY.** Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocr Rev* 15: 627-649, 1994.
71. **Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL and Spiegelman BM.** Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95: 2409-2415, 1995.
72. **Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN and Spiegelman BM.** Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 4854-4858, 1994.
73. **Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM.** Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91, 1993.
74. **Huang C, Snider F and Cross JC.** Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology* 150: 1618-1626, 2009.

75. **Huang X, Hultgren B, Dybdal N and Stewart TA.** Islet expression of interferon-alpha precedes diabetes in both the BB rat and streptozotocin-treated mice. *Immunity* 1: 469-478, 1994.
76. **Hugl SR and Merger M.** Prolactin stimulates proliferation of the glucose-dependent beta-cell line INS-1 via different IRS-proteins. *JOP : Journal of the pancreas* 8: 739-752, 2007.
77. **Hugo ER, Borcharding DC, Gersin KS, Loftus J and Ben-Jonathan N.** Prolactin release by adipose explants, primary adipocytes, and LS14 adipocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93: 4006-4012, 2008.
78. **Iaccarino C, Samad TA, Mathis C, Kercret H, Picetti R and Borrelli E.** Control of lactotrop proliferation by dopamine: essential role of signaling through D2 receptors and ERKs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 14530-14535, 2002.
79. **Iffiu-Soltesz Z, Wanecq E, Lomba A, Portillo MP, Pellati F, Szoko E, Bour S, Woodley J, Milagro FI, Alfredo Martinez J, Valet P and Carpene C.** Chronic benzylamine administration in the drinking water improves glucose tolerance, reduces body weight gain and circulating cholesterol in high-fat diet-fed mice. *Pharmacol Res* 61: 355-363, 2010.
80. **Inada A, Kanamori H, Arai H, Akashi T, Araki M, Weir GC and Fukatsu A.** A model for diabetic nephropathy: advantages of the inducible cAMP early repressor transgenic mouse over the streptozotocin-induced diabetic mouse. *Journal of cellular physiology* 215: 383-391, 2008.
81. **Ingraham HA, Albert VR, Chen RP, Crenshaw 3d EB, Elsholtz HP, He X, Kapiloff MS, Mangalam HJ, Swanson LW, Treacy MN and et al.** A family of POU-domain and Pit-1 tissue-specific transcription factors in pituitary and neuroendocrine development. *Annual review of physiology* 52: 773-791, 1990.
82. **Iranmanesh A, Veldhuis JD, Carlsen EC, Vaccaro VA, Booth RA, Jr., Lizarralde G, Asplin CM and Evans WS.** Attenuated pulsatile release of prolactin in men with insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 71: 73-78, 1990.
83. **Jiang Q, Wu BY and Chen XD.** [Effect of oleic acid on the proliferation and secretion of pro-inflammatory mediators of human normal fibroblasts and scar fibroblasts]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 28: 444-450, 2012.
84. **Jin L, Tsumanuma I, Ruebel KH, Bayliss JM and Lloyd RV.** Analysis of homogeneous populations of anterior pituitary folliculostellate cells by laser capture microdissection and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology* 142: 1703-1709, 2001.
85. **Junod A, Lambert AE, Stauffacher W and Renold AE.** Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 48: 2129-2139, 1969.
86. **Kansra S, Yamagata S, Sneade L, Foster L and Ben-Jonathan N.** Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release. *Molecular and cellular endocrinology* 239: 27-36, 2005.
87. **Kariagina A, Romanenko D, Ren SG and Chesnokova V.** Hypothalamic-pituitary cytokine network. *Endocrinology* 145: 104-112, 2004.
88. **Khalil N.** TGF-beta: from latent to active. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 1: 1255-1263, 1999.
89. **Kim KE, Day RN and Maurer RA.** Functional analysis of the interaction of a tissue-specific factor with an upstream enhancer element of the rat prolactin gene. *Mol Endocrinol* 2: 1374-1381, 1988.
90. **Kinsley BT, Levy CJ and Simonson DC.** Prolactin and beta-endorphin responses to hypoglycemia are reduced in well-controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 45: 1434-1440, 1996.
91. **Koike K, Hirota K, Ohmichi M, Kadowaki K, Ikegami H, Yamaguchi M, Miyake A and Tanizawa O.** Tumor necrosis factor-alpha increases release of arachidonate and prolactin from rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 128: 2791-2798, 1991.

92. **Koike K, Masumoto N, Kasahara K, Yamaguchi M, Tasaka K, Hirota K, Miyake A and Tanizawa O.** Tumor necrosis factor-alpha stimulates prolactin release from anterior pituitary cells: a possible involvement of intracellular calcium mobilization. *Endocrinology* 128: 2785-2790, 1991.
93. **Konig HG, Kogel D, Rami A and Prehn JH.** TGF- β 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- κ B signaling. *J Cell Biol* 168: 1077-1086, 2005.
94. **Kopelman PG.** Physiopathology of prolactin secretion in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2: S104-108, 2000.
95. **Lacerte A, Lee EH, Reynaud R, Canaff L, De Guise C, Devost D, Ali S, Hendy GN and Lebrun JJ.** Activin inhibits pituitary prolactin expression and cell growth through Smads, Pit-1 and menin. *Mol Endocrinol* 18: 1558-1569, 2004.
96. **Larson BA, Sinha YN and Vanderlaan WP.** Serum growth hormone and prolactin during and after the development of the obese-hyperglycemic syndrome in mice. *Endocrinology* 98: 139-145, 1976.
97. **Lawrence DA.** Transforming growth factor-beta: a general review. *European cytokine network* 7: 363-374, 1996.
98. **Lee YH and Pratley RE.** The evolving role of inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 5: 70-75, 2005.
99. **Lin HY, Moustakas A, Knaus P, Wells RG, Henis YI and Lodish HF.** The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF-beta ligands. *The Journal of biological chemistry* 270: 2747-2754, 1995.
100. **Massague J.** How cells read TGF-beta signals. *Nature reviews Molecular cell biology* 1: 169-178, 2000.
101. **Massague J, Blain SW and Lo RS.** TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295-309, 2000.
102. **Maurer RA.** Estradiol regulates the transcription of the prolactin gene. *The Journal of biological chemistry* 257: 2133-2136, 1982.
103. **Maurer RA.** Transcriptional regulation of the prolactin gene by ergocryptine and cyclic AMP. *Nature* 294: 94-97, 1981.
104. **Milenkovic L, Rettori V, Snyder GD, Beutler B and McCann SM.** Cachectin alters anterior pituitary hormone release by a direct action in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 2418-2422, 1989.
105. **Minami S and Sarkar DK.** Transforming growth factor-beta 1 inhibits prolactin secretion and lactotropic cell proliferation in the pituitary of oestrogen-treated Fischer 344 rats. *Neurochemistry international* 30: 499-506, 1997.
106. **Moldrup A, Billestrup N and Nielsen JH.** Rat insulinoma cells express both a 115-kDa growth hormone receptor and a 95-kDa prolactin receptor structurally related to the hepatic receptors. *The Journal of biological chemistry* 265: 8686-8690, 1990.
107. **Nadeau S and Rivest S.** Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the rat brain and pituitary in response in different models of systemic immune challenge. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58: 61-77, 1999.
108. **Nagano M and Kelly PA.** Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *The Journal of biological chemistry* 269: 13337-13345, 1994.
109. **Nelson C, Albert VR, Elsholtz HP, Lu LI and Rosenfeld MG.** Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science* 239: 1400-1405, 1988.

110. **Nelson C, Crenshaw EB, 3rd, Franco R, Lira SA, Albert VR, Evans RM and Rosenfeld MG.** Discrete cis-active genomic sequences dictate the pituitary cell type-specific expression of rat prolactin and growth hormone genes. *Nature* 322: 557-562, 1986.
111. **Nielsen JH.** Effects of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on insulin content and release, and deoxyribonucleic acid synthesis in cultured pancreatic islets. *Endocrinology* 110: 600-606, 1982.
112. **Ortega FJ and Fernandez-Real JM.** Inflammation in adipose tissue and fatty acid anabolism: when enough is enough! *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 45: 1009-1019, 2013.
113. **Ozer G, Teker Z, Cetiner S, Yilmaz M, Topaloglu AK, Onenli-Mungan N and Yuksel B.** Serum IL-1, IL-2, TNFalpha and INFgamma levels of patients with type 1 diabetes mellitus and their siblings. *J Pediatr Endocrinol Metab* 16: 203-210, 2003.
114. **Perez-Castro C, Renner U, Haedo MR, Stalla GK and Arzt E.** Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol Rev* 92: 1-38, 2012.
115. **Pernasetti F, Caccavelli L, Van de Weerd C, Martial JA and Muller M.** Thyroid hormone inhibits the human prolactin gene promoter by interfering with activating protein-1 and estrogen stimulations. *Mol Endocrinol* 11: 986-996, 1997.
116. **Peters WH, Gottschling D, Ziegler M and Haude W.** Basal hyperinsulinemia in Wistar-rats rendered obese by a high-fat diet. *Acta Biol Med Ger* 36: 1343-1346, 1977.
117. **Posner BI, Kelly PA and Friesen HG.** Prolactin receptors in rat liver: possible induction by prolactin. *Science* 188: 57-59, 1975.
118. **Ramsdell JS.** Transforming growth factor-alpha and -beta are potent and effective inhibitors of GH4 pituitary tumor cell proliferation. *Endocrinology* 128: 1981-1990, 1991.
119. **Rao VR, Prescott E, Shelke NB, Trivedi R, Thomas P, Struble C, Gadek T, O'Neill CA and Kompella UB.** Delivery of SAR 1118 to the retina via ophthalmic drops and its effectiveness in a rat streptozotocin (STZ) model of diabetic retinopathy (DR). *Investigative ophthalmology & visual science* 51: 5198-5204, 2010.
120. **Recouvreux MV, Guida MC, Rifkin DB, Becu-Villalobos D and Diaz-Torga G.** Active and total transforming growth factor-beta1 are differentially regulated by dopamine and estradiol in the pituitary. *Endocrinology* 152: 2722-2730, 2011.
121. **Reed C, Fu ZQ, Wu J, Xue YN, Harrison RW, Chen MJ and Weber IT.** Crystal structure of TNF-alpha mutant R31D with greater affinity for receptor R1 compared with R2. *Protein engineering* 10: 1101-1107, 1997.
122. **Roberts AB.** Molecular and cell biology of TGF-beta. *Mineral and electrolyte metabolism* 24: 111-119, 1998.
123. **Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM and Sporn MB.** New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 5339-5343, 1981.
124. **Rossier J, French E, Rivier C, Shibasaki T, Guillemin R and Bloom FE.** Stress-induced release of prolactin: blockade by dexamethasone and naloxone may indicate beta-endorphin mediation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 666-669, 1980.
125. **Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR and Kern PA.** The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97: 1111-1116, 1996.
126. **Samad F, Yamamoto K, Pandey M and Loskutoff DJ.** Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. *Molecular medicine* 3: 37-48, 1997.
127. **Samuel VT, Petersen KF and Shulman GI.** Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375: 2267-2277, 2010.

128. **Sarkar DK, Chaturvedi K, Oomizu S, Boyadjieva NI and Chen CP.** Dopamine, dopamine D2 receptor short isoform, transforming growth factor (TGF)-beta1, and TGF-beta type II receptor interact to inhibit the growth of pituitary lactotropes. *Endocrinology* 146: 4179-4188, 2005.
129. **Sarkar DK, Kim KH and Minami S.** Transforming growth factor-beta 1 messenger RNA and protein expression in the pituitary gland: its action on prolactin secretion and lactotropic growth. *Mol Endocrinol* 6: 1825-1833, 1992.
130. **Sarkar DK, Pastorcic M, De A, Engel M, Moses H and Ghasemzadeh MB.** Role of transforming growth factor (TGF)-beta Type I and TGF-beta type II receptors in the TGF-beta1-regulated gene expression in pituitary prolactin-secreting lactotropes. *Endocrinology* 139: 3620-3628, 1998.
131. **Schaufele F.** Regulation of estrogen receptor activation of the prolactin enhancer/promoter by antagonistic activation function-2-interacting proteins. *Mol Endocrinol* 13: 935-945, 1999.
132. **Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn DB, Korach KS and Rosenfeld MG.** Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol* 11: 674-681, 1997.
133. **Sinha S, Nevett C, Shuttleworth CA and Kielty CM.** Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-beta binding proteins. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 17: 529-545, 1998.
134. **Sinha YN, Baxter SR, Larson BA and Vanderlaan WP.** Levels of prolactin, growth hormone and insulin in genetically diabetic (db/db) mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 161: 78-81, 1979.
135. **Sinha YN, Salocks CB and Vanderlaan WP.** Prolactin and growth hormone secretion in chemically induced and genetically obese mice. *Endocrinology* 97: 1386-1393, 1975.
136. **Sinha YN, Thomas JW, Salocks CB, Wickes MA and VanderLaan WP.** Prolactin and growth hormone secretion in diet-induced obesity in mice. *Horm Metab Res* 9: 277-282, 1977.
137. **Sivitz WI, Walsh S, Morgan D, Donohue P, Haynes W and Leibel RL.** Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats. *Metabolism* 47: 584-591, 1998.
138. **Sorenson RL and Stout LE.** Prolactin receptors and JAK2 in islets of Langerhans: an immunohistochemical analysis. *Endocrinology* 136: 4092-4098, 1995.
139. **Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM and Assoian RK.** Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* 233: 532-534, 1986.
140. **Steger RW, Amador A, Lam E, Rathert J, Weis J and Smith MS.** Streptozotocin-induced deficits in sex behavior and neuroendocrine function in male rats. *Endocrinology* 124: 1737-1743, 1989.
141. **Szkudelski T.** The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 50: 537-546, 2001.
142. **Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL and Friesen HG.** A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 51: 1058-1063, 1980.
143. **Tashjian AH, Jr., Bancroft FC and Levine L.** Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts. *J Cell Biol* 47: 61-70, 1970.
144. **Terra LF, Garay-Malpartida MH, Wailemann RA, Sogayar MC and Labriola L.** Recombinant human prolactin promotes human beta cell survival via inhibition of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Diabetologia* 54: 1388-1397, 2011.
145. **Theas S, Pisera D, Duvilanski B, De Laurentiis A, Pampillo M, Lasaga M and Seilicovich A.** Estrogens modulate the inhibitory effect of tumor necrosis factor-alpha on anterior pituitary cell proliferation and prolactin release. *Endocrine* 12: 249-255, 2000.
146. **Triebel J, Macotela Y, de la Escalera GM and Clapp C.** Prolactin and vasoinhibins: Endogenous players in diabetic retinopathy. *IUBMB life* 63: 806-810, 2011.

147. **Trujillo ME and Scherer PE.** Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 27: 762-778, 2006.
148. **Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW and Hotamisligil GS.** Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389: 610-614, 1997.
149. **Vallar L, Vicentini LM and Meldolesi J.** Inhibition of inositol phosphate production is a late, Ca²⁺-dependent effect of D2 dopaminergic receptor activation in rat lactotroph cells. *The Journal of biological chemistry* 263: 10127-10134, 1988.
150. **Wang T, Lu J, Xu Y, Li M, Sun J, Zhang J, Xu B, Xu M, Chen Y, Bi Y, Wang W and Ning G.** Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation: a population-based study. *Diabetes care* 36: 1974-1980, 2013.
151. **Wellen KE and Hotamisligil GS.** Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119, 2005.
152. **Wieser R, Wrana JL and Massague J.** GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *The EMBO journal* 14: 2199-2208, 1995.
153. **Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, Gavrilova O, Malek R, Chen W, Zervas P, Zhigang D, Wright EC, Stuelten C, Sun P, Lonning S, Skarulis M, Sumner AE, Finkel T and Rane SG.** Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF-beta/Smad3 signaling. *Cell Metab* 14: 67-79, 2011.
154. **Yamaguchi M, Koike K, Yoshimoto Y, Ikegami H, Miyake A and Tanizawa O.** Effect of TNF-alpha on prolactin secretion from rat anterior pituitary and dopamine release from the hypothalamus: comparison with the effect of interleukin-1 beta. *Endocrinol Jpn* 38: 357-361, 1991.
155. **Yamauchi K and Shiino M.** Pituitary prolactin cells in diabetic rats induced by the injection of streptozotocin. *Exp Clin Endocrinol* 88: 81-88, 1986.
156. **Yan GZ and Bancroft C.** Mediation by calcium of thyrotropin--releasing hormone action on the prolactin promoter via transcription factor pit-1. *Mol Endocrinol* 5: 1488-1497, 1991.
157. **Yener S, Comlekci A, Akinci B, Akan P, Demir T, Bayraktar F and Yesil S.** Serum transforming growth factor-beta 1 levels in normoalbuminuric and normotensive patients with type 2 diabetes. Effect of metformin and rosiglitazone. *Hormones (Athens)* 7: 70-76, 2008.
158. **Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW and Shulman GI.** Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *The Journal of biological chemistry* 277: 50230-50236, 2002.
159. **Yu J, Xiao F, Zhang Q, Liu B, Guo Y, Lv Z, Xia T, Chen S, Li K, Du Y and Guo F.** PRLR regulates hepatic insulin sensitivity in mice via STAT5. *Diabetes* 62: 3103-3113, 2013.
160. **Yu-Lee LY.** Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 215: 35-52, 1997.
161. **Zaldivar V, Magri ML, Zarate S, Jaita G, Eijo G, Radl D, Ferraris J, Pisera D and Seilicovich A.** Estradiol increases the expression of TNF-alpha and TNF receptor 1 in lactotropes. *Neuroendocrinology* 93: 106-113, 2011.
162. **Zinger M, McFarland M and Ben-Jonathan N.** Prolactin expression and secretion by human breast glandular and adipose tissue explants. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88: 689-696, 2003.