

PROYECTO FINAL DE BIOTECNOLOGÍA

MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD TERMOGÉNICA DEL TEJIDO ADIPOSO PARDO POR LA PROLACTINA: Definiendo blancos terapéuticos en el tratamiento de la obesidad.

Pascual, Florencia Lilian – LU1102815
Licenciatura en Biotecnología

Tutor:
De Winne, Catalina
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Co-Tutor Interno:
Vadillo, Martin Javier
Universidad Argentina de la Empresa (UADE)

Enero 20, 2022

UADE

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

1. Resumen

Modificación de la actividad termogénica del tejido adiposo pardo por la prolactina: Definiendo blancos terapéuticos en el tratamiento de la obesidad.

La prolactina es una hormona altamente versátil secretada principalmente por los lactotrofos de la hipófisis anterior. Su función en la reproducción y fertilidad ha sido muy estudiada, pero poco se sabe de su acción en la regulación del metabolismo. La desregulación de los niveles de esta hormona propone un riesgo potencial para las múltiples funciones que coordina, situación que se evidencia en condiciones de hiperprolactinemia prolongada. Trabajos previos del laboratorio desarrollaron un modelo experimental de hiperprolactinemia crónica, el ratón lacDrd2KO, y demostraron que los altos niveles de prolactina impactan sobre la funcionalidad del tejido adiposo pardo (BAT) disminuyendo su capacidad termogénica y por lo tanto favoreciendo la obesidad.

En este proyecto se desafió a animales salvajes e hiperprolactinémicos (lacDrd2KO) con dos estímulos que activan el tejido adiposo pardo: el frío, y una dieta rica en grasa. Se estudió la respuesta de genes termogénicos y autofágicos, además se comparó el proceso de autofagia en BAT en ratones controles y obesos, intentando develar el efecto de la obesidad sobre este proceso. De esta manera se buscó dilucidar el impacto de la prolactina sobre la funcionalidad no solo basal sino estimulada del tejido.

Nuestros resultados destacan el rol metabólico de la prolactina en el tejido adiposo pardo y demuestran que los altos niveles de prolactina intervienen en la activación de la maquinaria termogénica del tejido, actuando a nivel de la expresión de genes termogénicos y autofágicos y favoreciendo al fenotipo obeso que se observa en los animales hiperprolactinémicos lacDrd2KO en condiciones basales y frente a los desafíos metabólicos estudiados.

2. Abstract

Modification of the thermogenic activity of brown adipose tissue by prolactin: Defining therapeutic targets in the obesity treatment.

Prolactin is a pleiotropic hormone secreted by lactotropes in the anterior pituitary gland. Although its role in reproduction and fertility has been extensively studied, less is known about its action on metabolism and body weight regulation. The dysregulation of prolactin levels proposes a potential risk to the multiple functions it coordinates, a situation that is evident in conditions of prolonged hyperprolactinemia. A previous work of the laboratory developed an experimental model of chronic hyperprolactinemia, the lacDrd2KO mouse, and demonstrated that high prolactin levels impact on the functionality of brown adipose tissue (BAT) decreasing its thermogenic capacity and therefore favoring obesity.

In this project, wild type and hyperprolactinemic (lacDrd2KO) animals were challenged with two stimuli that activate brown adipose tissue: cold exposure and a high fat diet. We studied the response of thermogenic and autophagic genes and, furthermore, compared the autophagy process in BAT between wild type and obese mice, trying to unravel the effect of obesity on this process. In this way, we sought to determine the impact of prolactin not only in basal conditions but also on stimulated tissue functionality.

Our results highlight the metabolic role of prolactin in brown adipose tissue and suggest that high prolactin levels impact in the activation of the thermogenic machinery of the tissue, taking part in the thermogenic and autophagic gene expression and leading to the obese phenotype observed in hyperprolactinemic lacDrd2KO animals under basal conditions and in response to the metabolic challenges studied.

Contenidos

1. Resumen	2
2. Abstract	3
3. Introducción	6
4. Antecedentes	7
4.1 Prolactina	7
4.2 Prolactina como hormona metabólica	9
4.3 Tejido adiposo	10
4.3.1 Tejido adiposo blanco	11
4.3.2 Tejido adiposo pardo.....	11
4.4 Mecanismo de termogénesis.....	13
4.5 Plasticidad del tejido adiposo	15
4.5.1 <i>Beiging</i>	15
4.5.2 <i>Whitening</i>	15
4.6 Rol de la autofagia en la plasticidad del tejido adiposo.....	16
4.7 Hiperprolactinemia en el modelo lacDrd2KO	18
5. Hipótesis	21
6. Materiales y métodos	21
6.1 Animales	21
6.1.1 Ratones lacDrd2KO	21
6.2 Genotipificación de ratones	22
6.2.1 Extracción de ADN genómico	22
6.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
6.3 Experimento de exposición al frío	25
6.4 Protocolo de alimentación con dieta rica en grasas	25
6.5 Procesamiento de muestras.....	27
6.5.1 Inclusión en parafina.....	27
6.5.2 Histología.....	27
6.6 Extracción de ARN de tejido adiposo y síntesis de ADNc	27
6.7 Diseño de primers	28
6.8 PCR en tiempo real.....	29
6.9 Análisis estadísticos.....	30
7. Resultados	30

7.1 Autofagia en el desarrollo tardío de obesidad	30
7.2 Termogénesis en respuesta a una exposición aguda a un ambiente frío.....	33
7.3 Autofagia en respuesta a una exposición aguda a un ambiente frío	36
7.4 Autofagia en respuesta a una dieta rica en grasas.....	37
8. Discusión de resultados.....	40
9. Conclusiones	46
10. Bibliografía	47

3. Introducción

La prolactina es una hormona hipofisaria bien conocida por su acción en la producción de leche. Sin embargo, numerosas otras acciones han cobrado relevancia, la mayoría de ellas favoreciendo la homeostasis metabólica en la preñez y lactancia. Mientras que las altas concentraciones de prolactina son apropiadas durante el embarazo y la lactancia, hay muchas condiciones patológicas de hiperprolactinemia, donde las altas concentraciones de prolactina podrían impactar en aspectos diferentes de la fisiología y conducir a una disfunción metabólica.

La prolactina actúa en muchos tejidos involucrados en el metabolismo y la ingesta de alimentos. El tejido adiposo es uno de ellos siendo un actor fundamental en los procesos energéticos y metabólicos.

Existen tres tipos de adipocitos, blancos, pardos y *beige* (un fenotipo intermedio). Es nuestro principal interés y foco, el estudio del tejido adiposo pardo (que llamaremos BAT por sus siglas en inglés *Brown Adipose Tissue*), que se caracteriza por su función termogénica y hay evidencias que sugieren que la estimulación de la termogénesis en este tejido puede conferir una protección no solo frente a la hipotermia sino también frente a la obesidad.

Por lo tanto, describir el papel de la prolactina sobre la funcionalidad del tejido adiposo pardo alertará sobre posibles desbalances metabólicos en casos de hiperprolactinemia no fisiológica. Además, el conocimiento de las distintas vías involucradas, así como la detección de genes claves en la disfunción del tejido adiposo pardo por acción de la prolactina puede proponer blancos relevantes en la búsqueda de nuevas terapias para manejar el sobrepeso y la obesidad. En este sentido, la activación del tejido adiposo pardo ha cobrado reciente importancia como un nuevo eje para el tratamiento de desbalances metabólicos.

En este contexto, el objetivo principal del presente trabajo es demostrar el impacto de altos niveles de prolactina sobre la función del tejido adiposo pardo en particular sobre su función termogénica y capacidad autofágica. Para ello, se trabajó con un modelo de ratón transgénico generado en nuestro laboratorio, el ratón knockout del receptor dopaminérgico D2 en lactotropos (lacDrd2KO). Este modelo, evidencia hiperprolactinemia crónica, obesidad tardía y niveles de hormona de crecimiento normal.

Los ratones fueron sometidos a dos condiciones experimentales que modifican el tejido adiposo pardo: la exposición al frío y a una dieta rica en grasas y se evaluaron genes específicos del tejido adiposo pardo. Además, se evaluó el desarrollo tardío de obesidad (10 meses de edad en este modelo experimental) sobre la capacidad autofágica del tejido adiposo pardo.

Como objetivos específicos, estudiamos en primer lugar, la morfo-histología de los depósitos de tejido adiposo pardo de hembras lacDrd2KO y salvajes, en respuesta a una exposición corta a un ambiente frío, a una dieta rica en grasas y a la obesidad. En segundo lugar, estudiamos el fenómeno de termogénesis en el tejido adiposo pardo de hembras lacDrd2KO y salvajes luego de una exposición corta a un ambiente frío. Por último, estudiamos el fenómeno de autofagia en tejido adiposo pardo de hembras lacDrd2KO y control, en respuesta a una exposición aguda a un ambiente frío, a una dieta rica en grasas y a la obesidad.

En la siguiente sección se describen los antecedentes y trabajos previos del laboratorio y de otros investigadores sobre los temas relacionados con esta investigación. En primer lugar, se mencionan las características principales de la prolactina y sus efectos como hormona metabólica. En segundo lugar, se describen los distintos tipos de tejido adiposo. En tercer lugar, se brinda una explicación del mecanismo de la termogénesis en el tejido adiposo pardo, la plasticidad metabólica y el rol de la autofagia en la plasticidad de este tejido. Por último, se describe la condición de hiperprolactinemia crónica y el fenotipo del modelo experimental elegido. Posteriormente presentamos la hipótesis que generó nuestro trabajo.

En la sección de metodología se describen los materiales, los protocolos y los procedimientos experimentales empleados. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en función del análisis estadístico realizado, seguido de la discusión de los mismos y las conclusiones.

Finalmente, en la sección bibliografía se citan los trabajos consultados para redactar los antecedentes y la discusión de los resultados de este proyecto.

4. Antecedentes

4.1 Prolactina

La prolactina es una hormona polipeptídica de 197 aminoácidos en rata y ratón, y 199 en humanos, con un peso molecular de 23 kilodaltons (KDa). Presenta múltiples y

diversas funciones biológicas, siendo una de las hormonas más versátiles. Es sintetizada y secretada principalmente por las células lactotropas, las cuales se encuentran presentes en la hipófisis anterior (Freeman *et al*, 2000). En el ser humano esta hormona es también producida por otros tejidos (como ser: tejido adiposo, diferentes regiones del cerebro, miometrio, placenta y decidua, entre otros) donde es regulada de manera específica y actúa como una citoquina autocrina o paracrina (Ben Jonathan *et al*, 1996; Ben Jonathan *et al*, 2008). Sin embargo, generalmente los niveles producidos por tejidos no hipofisarios no modifican las concentraciones séricas de la hormona. Salvo algunas mínimas excepciones, la producción de prolactina por parte de otros animales se encuentra restringida a la hipófisis; tal es el caso de los ratones.

Cuando se evalúa la liberación de prolactina a nivel de células individuales, se observa que el patrón de secreción de prolactina de los lactotropos muestra dimorfismo sexual. En general, los lactotropos de las ratas hembra secretan prolactina en un patrón continuo, mientras que los machos lo hacen en un patrón discontinuo o intermitente (Castano *et al*, 1995). Los estímulos fisiológicos más importantes que modifican la secreción de dicha hormona son, el ritmo circadiano, el estado reproductivo, hormonas esteroideas (el ciclo estral y menstrual, lactancia preñez) y el estrés (Freeman *et al*, 2000).

Los lactotropos, que corresponden al 30-50% de las células hipofisarias, presentan una alta actividad espontánea intrínseca de síntesis y secreción de prolactina, siendo la regulación hipotalámica predominantemente inhibitoria, ejercida principalmente por la dopamina (Ben Jonathan *et al*, 2008). Este neurotransmisor catecolaminérgico llega a la hipófisis a través del sistema porta-hipofisario y se une a receptores dopaminérgicos tipo D2 (RD2s) localizados en el lactotopo, produciendo la inhibición de la síntesis y secreción de la prolactina como así también de la proliferación de las células lactotropas (Lamberts *et al*, 1990; Melmed, 2003). En respuesta a la dopamina, se activan los canales voltaje dependientes de calcio en los lactotropos y por lo tanto se inhibe la liberación de gránulos con prolactina. Luego se inhibe la enzima adenilato ciclasa (AC) que produce la inactivación de la proteína quinasa A (PKA) y como consecuencia se suprime la expresión de genes. De este modo, no solo inhibe la secreción de prolactina, sino también la síntesis de la hormona y la proliferación de lactotropos (Ben Jonathan *et al*, 2001). Por lo tanto, la ausencia del RD2, o su antagonismo producen hiperprolactinemia. A su vez, la prolactina es capaz de regular su propia liberación a través de un mecanismo conocido como bucle corto de regulación por retroalimentación negativa, en el

cual la hormona misma actúa a nivel hipotalámico estimulando la síntesis de dopamina y, por lo tanto, inhibiendo su propia secreción a nivel hipofisario (Grattan *et al*, 2015), creando así un ciclo de retroalimentación negativa para mantener la secreción de prolactina en niveles apropiados.

La activación del receptor de prolactina (PRLR) ocurre a partir de la unión de prolactina (ligando), esta unión induce cambios estructurales en el dominio extracelular del receptor conformando el complejo ligando/receptor. Luego, los cambios estructurales inducidos en este dominio se transmiten al dominio intracelular modulando la actividad del receptor, ya que la porción citosólica controla varias vías de señalización y amplifica la señal (Brooks *et al*, 2012). Existen varias vías de señalización intracelular que son activadas por prolactina y median procesos de diferenciación, proliferación y supervivencia en los diferentes tejidos, por ejemplo, la vía JAK/STAT, vía de la quinasa de Janus (JAK) y el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT, principalmente STAT5) (Bole-Feysot *et al*, 1998).

Estudios sobre la arquitectura del receptor de prolactina (PRLR) humano revelaron múltiples motivos en la porción intracelular del receptor lo que sugiere que es capaz de interactuar con diferentes moléculas de transducción de señal, para inducir múltiples respuestas celulares.

Esto posiciona a la prolactina como una hormona pleiotrópica ya que su receptor está ampliamente distribuido en distintos tejidos y cumple funciones muy diversas en un mismo organismo.

4.2 Prolactina como hormona metabólica

Durante muchos años la prolactina ha sido considerada una hormona encargada de ejercer efectos biológicos limitados a la iniciación, mantenimiento de la reproducción y la lactancia. Sin embargo, los datos de los últimos años permitieron demostrar una gran variedad de funciones, junto con la amplia distribución de su receptor (PRLR) en diferentes tejidos y tipos celulares, incluyendo las glándulas mamarias y los tejidos clave que intervienen en el control del equilibrio energético, como el cerebro, el hígado, el páncreas, el tejido adiposo y el intestino delgado (Halasz *et al*, 2000). Hoy en día, la prolactina es reconocida como una hormona altamente versátil que actúa regulando no solo la reproducción sino también la

osmorregulación, metabolismo energético, funciones cerebrales, respuestas inmunológicas, crecimiento y angiogénesis (Bole-Feysot *et al*, 1998; Freeman *et al*, 2000; Tovar *et al*, 2014).

El hígado tiene una gran cantidad de receptores de prolactina (PRLR). Durante la vida adulta, la prolactina estimula el crecimiento y la regeneración del hígado promoviendo la proliferación de hepatocitos y la angiogénesis (Moreno-Carranza *et al*, 2018). En el tejido adiposo, la prolactina es esencial en la adipogénesis y en la diferenciación de adipocitos tanto blancos como pardos, así como también, en la regulación del metabolismo lipídico. Además, regula la secreción de adipoquinas y estimula la secreción de leptina (Ben Jonathan *et al*, 1980; Carre *et al*, 2014).

Por otra parte, en el páncreas, la prolactina promueve el crecimiento de islotes durante el desarrollo (Freemark *et al*, 2002), aumenta la expresión de insulina y la secreción de insulina estimulada por glucosa. También aumenta los niveles de expresión del transportador de glucosa 2 (GLUT 2) promoviendo la entrada de glucosa en las células β pancreáticas (Sinha *et al*, 1993; Brejje *et al*, 1994; Petryk *et al*, 2000). Esto activa a la glucoquinasa, enzima sensible a la glucosa de rol clave en la regulación de la homeostasis de glucosa en el organismo, cuya expresión también es regulada por prolactina (Petryk *et al*, 2000; Weinhaus *et al*, 2007).

Dada la mencionada distribución generalizada de los receptores de prolactina (PRLR) en el organismo, la desregulación de los niveles de esta hormona propone un riesgo potencial para las múltiples funciones que coordina. Ciertas funciones de la prolactina que se consideran adaptativas durante la preñez y la lactancia pueden resultar perjudiciales si los niveles de dicha hormona se elevan por fuera de estas ventanas temporales.

Esta situación se evidencia en condiciones de hiperprolactinemia prolongada como en pacientes con prolactinomas o bajo tratamientos antipsicóticos crónicos, que tienen como blanco el RD2, en los que las altas concentraciones de prolactina pueden impactar en muchos aspectos diferentes de la fisiología y conducir a una disfunción metabólica.

4.3 Tejido adiposo

El tejido adiposo es uno de los tejidos blanco de la prolactina y juega un papel fundamental en la regulación del equilibrio energético a través de sus funciones metabólicas, celulares y endócrinas. Más allá de su capacidad de almacenamiento de grasa, tiene mecanismos de adaptación y plasticidad que le permiten reaccionar frente a desafíos metabólicos a lo largo de la vida.

Está formado por células especializadas, denominadas adipocitos, éstos, así como el tejido adiposo en general, se pueden dividir en tres grupos: adipocitos pardos, blancos y *beige*, que presentan diferencias en sus funciones y regulación molecular.

4.3.1 Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco (WAT por sus siglas en inglés) es el principal tejido de almacenamiento de energía en forma de triglicéridos. En períodos de abundancia calórica, el tejido adiposo blanco acumula ácidos grasos libres en forma de triglicéridos, a través de su esterificación a glicerol, y los libera a circulación en momentos de déficit energético (Galic *et al*, 2010). Los triglicéridos, el componente celular principal del tejido adiposo blanco, son almacenados en una única gota lipídica que ocupa entre el 80-90% del volumen total del adipocito.

Durante muchos años el tejido adiposo blanco fue considerado como un simple reservorio de energía, sin embargo, actualmente es identificado como un órgano endócrino, el más grande y ampliamente distribuido, con capacidad de liberar moléculas adipoquinas como leptina, resistina, adiponectina, entre otras señales endocrinas que participan en la regulación de la ingesta alimentaria y el metabolismo energético.

El tejido adiposo blanco es un órgano extraordinariamente heterogéneo en cuanto a su composición y a su distribución corporal. En los humanos, al igual que en los roedores, el WAT se localiza por todo el organismo, aunque sus principales depósitos son el subcutáneo y el depósito visceral o intraperitoneal, que se localiza dentro de la cavidad peritoneal. El tejido adiposo subcutáneo se encuentra ubicado debajo de la piel, proporcionando un aislamiento térmico contra el calor o el frío (Fig. 1). Este depósito corresponde más o menos a un 80% de la grasa total del cuerpo (Marin *et al*, 1992).

4.3.2 Tejido adiposo pardo

El tejido adiposo pardo (BAT) es un órgano termogénico que está compuesto de adipocitos que contienen una gran cantidad de mitocondrias capaces de oxidar energía química (lípidos y glucosa) para producir calor. Los adipocitos marrones a diferencia de los blancos son células multiloculares, sus núcleos son pequeños, esféricos y están localizados en el centro de la célula, aunque puede ser desplazado a la periferia por la gran cantidad de vacuolas que presentan. El color marrón característico es debido principalmente a la hemoglobina sanguínea

dado que se trata de un tejido sumamente vascularizado. Además, presenta inervación simpática, cuenta con la presencia de numerosas fibras nerviosas amielínicas de pequeño calibre, cuyos axones suelen estar en relación estrecha con la superficie de las células formando un denso plexo en el tejido que afecta tanto a los adipocitos como a los vasos sanguíneos y se encuentran bajo el control del hipotálamo.

Las grandes diferencias entre el tejido adiposo pardo y el blanco radican en que no comparten el mismo origen celular. Aunque, ambos proceden de una célula madre mesenquimal (CMM), éstas producen células progenitoras que pueden o no expresar el factor miogénico 5 (*Myf5*). Las células progenitoras de adipocitos blancos no expresan *Myf5*, a diferencia de las de adipocitos pardos que sí lo expresan. Se ha demostrado que el tejido adiposo pardo tiene el mismo origen que el músculo esquelético, ya que las células precursoras de músculo esquelético pueden también diferenciarse en adipocitos pardos (Timmons *et al*, 2007; Walden *et al*, 2009). La decisión para que este progenitor se diferencie en adipocito pardo o célula muscular está regulada por el factor de transcripción PRDM16, ya que su expresión induce diferenciación a adipocito pardo y su silenciamiento, a célula muscular (Seale *et al*, 2008). Este interlinaje entre miocito y preadipocito pardo confirmaría un diferente origen del WAT y del BAT, que a la vez daría una explicación del por qué los adipocitos pardos se especializan en el catabolismo lipídico más que en su almacenamiento, siendo su perfil más parecido al metabolismo oxidativo del músculo esquelético (Jimenez-Preitner *et al*, 2011).

En roedores, el tejido adiposo pardo se encuentra principalmente en las regiones interescapular y subescapular pero también en las regiones cervical, axilar, perirrenal, pericárdica y en la glándula mamaria (Fig.1) (Gouon-Evans *et al*, 2002; Cannon *et al*, 2004; Giordano *et al*, 2004). En humanos, durante mucho tiempo se consideró que se encontraba en la región interescapular y que desaparecía por completo en la vida adulta. Sin embargo, evidencia reciente obtenida con tomografía de emisión de positrones (PET) demostró que existe grasa parda distribuida típicamente en capas de tejido conectivo que rodean grupos musculares, órganos, y huesos de la porción superior del tórax (Leitner *et al*, 2017). De esta manera, el tejido adiposo pardo aparece estratégicamente situado permitiendo el calentamiento de la medula espinal, los ganglios simpáticos, el corazón y los riñones; protegiendo este núcleo de estructuras vitales frente a posibles fluctuaciones térmicas.

Se han identificado dos tipos de adipocitos pardos, los adipocitos marrones clásicos, que se originan a partir de progenitores mesenquimáticos *Myf5* positivos (Carre *et al*,

2014) y los adipocitos *beige* distribuidos discretamente en depósitos de tejido adiposo blanco (Wu *et al*, 2012). Estas células presentan características de adipocitos pardos (abundantes mitocondrias, pequeñas gotas de lípidos en citoplasma y capacidad termogénica), pero comparten progenitor con los adipocitos blancos (*Myf5* negativos) (Seale *et al*, 2008). Las células *beige* se caracterizan, principalmente, por metabolizar los triglicéridos almacenados como reservorio energético para liberar energía en forma de calor. Por lo tanto, la inducción de la proliferación de estos adipocitos *beige* dentro del WAT es considerada una potencial estrategia frente a la obesidad, ya que al igual que los adipocitos pardos, tienen capacidad termogénica.

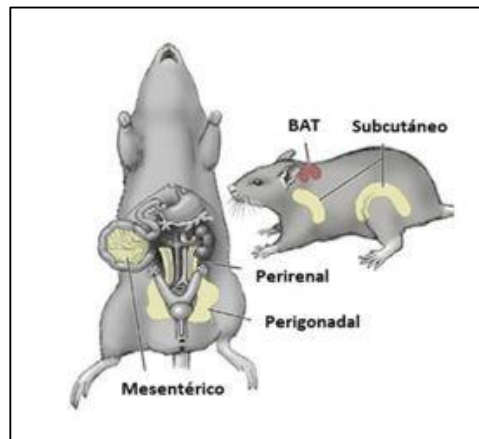


Figura 1: Esquema de la distribución regional de los depósitos de tejido adiposo en ratón.
Tomado y modificado de (Bartness *et al*, 2014).

4.4 Mecanismo de termogénesis

El tejido adiposo pardo, es metabólicamente muy activo, y sus adipocitos tienen mecanismos intracelulares especializados en la generación de calor, lo que les confiere características especiales. Participa en procesos termorreguladores, incluida la termogénesis inducida por el frío sin temblor, la termogénesis inducida por la dieta y como parte de la respuesta febril (Perkins *et al*, 1992; Cannon *et al*, 1998; Nakamura *et al*, 2011). En este mecanismo los adipocitos pardos utilizan ácidos grasos liberados por lipólisis intracelular y en consecuencia, producen calor (Townsend *et al*, 2014). Este proceso depende principalmente de la presencia de la proteína desacopladora de protones UCP1 (Carre *et al*, 2014), también conocida como termogenina, que está altamente expresada en las membranas mitocondriales

internas de los adipocitos pardos, y es la protagonista de un mecanismo de desacoplamiento regulado entre la cadena respiratoria mitocondrial y la fosforilación oxidativa.

Los estudios en roedores revelan además la participación de CIDEA (Cell Death Inducing DFFA Like Effector A), PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), CBPA (CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha), PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), Prdm16 (PR/SET Domain 16) y otros genes expresados en adipocitos pardos y *beige* que son reguladores críticos de la actividad del tejido adiposo pardo en respuesta a estímulos ambientales (Townsend *et al*, 2014; Sharma *et al*, 2014).

La presencia de tejido adiposo pardo en neonatos humanos evidencia que el BAT evolucionó principalmente como un sistema termogénico para proteger la temperatura del cuerpo (Kozak, 2010). Pero, además, se planteó este mecanismo como el responsable del gasto del exceso de calorías en un estado de balance energético positivo para mantener la homeostasis energética como una función fisiológica principal. Este concepto surgió de experimentos en la década de 1970 cuando Rothwell y Stock observaron que las ratas alimentadas con una dieta con alto contenido de grasas y azúcares ganaron menos peso de lo esperado por la ingesta calórica y propusieron que el exceso de calorías no contabilizadas se estaba quemando por la inducción de termogénesis del BAT (Rothwell *et al*, 1997). En consecuencia, la termogénesis se propuso como un mecanismo no solo para proteger la temperatura corporal, activándose durante la exposición al frío, sino también en respuesta al estrés agudo o por dieta rica en grasas como protección contra la obesidad.

A partir de estos datos, se comprende el interés que en los últimos años ha despertado el estudio del tejido adiposo pardo, el único tejido de los mamíferos cuya función principal es la producción primaria de calor, cuando para los demás tejidos éste es un subproducto metabólico.

Varias hormonas homeostáticas afectan el mecanismo de termogénesis en el tejido adiposo pardo, actuando directamente sobre el tejido o modulando los sistemas y vías regulatorias que intervienen en el proceso (principalmente la vía nerviosa simpática). Entre los moduladores de la actividad del BAT proponemos a la prolactina como un factor importante.

4.5 Plasticidad del tejido adiposo

La plasticidad metabólica en respuesta a señales ambientales u hormonales, como dietas altas en grasas, temperatura, hormonas y envejecimiento, se ha identificado como una característica distintiva de los adipocitos. Los adipocitos se reponen a lo largo de la vida y se regulan dinámicamente en términos de número, tamaño y características metabólicas. Los progenitores de adipocitos se activan durante el recambio homeostático y la expansión hiperplásica, y también participan en la respuesta plástica del *beiging* en el tejido adiposo blanco y el *whitening* o blanqueamiento del tejido adiposo pardo. En particular, el *whitening* del BAT se asocia a una disminución de la capacidad termogénica y al deterioro del equilibrio energético de este tejido, mientras que el *beiging* del WAT aumenta la termogénesis.

4.5.1 Beiging

El proceso de transdiferenciación por el cual adipocitos blancos adoptan fenotipo y funcionalidad del tejido adiposo pardo se conoce como *beiging*, fenómeno característico del tejido adiposo blanco en ratones. La aparición de adipocitos marrones dentro de los depósitos subcutáneos ocurre en respuesta a estímulos principalmente por la exposición al frío, la estimulación beta-adrenérgica y las dietas ricas en grasa. La cantidad de células con capacidad termogénica puede ser indetectable en roedores expuestos a temperatura termoneutral, pero puede llegar a ser mayoritaria cuando son expuestos a ambientes fríos, siendo esta una herramienta interesante para inducir el *beiging* (Wu *et al*, 2012; Garcia-Ruiz *et al*, 2015; Kurylowicz *et al*, 2020). Este mecanismo destaca al tejido adiposo, no solo como un tejido heterogéneo, sino también plástico despertando un interés particular en los estudios de obesidad por su potencial termogénico inducible.

4.5.2 Whitening

A diferencia del *beiging* que ocurre en los depósitos de tejido adiposo blanco, el *whitening* es un fenómeno que se evidencia principalmente en el tejido adiposo pardo, aunque también puede ocurrir en adipocitos *beige*. Este mecanismo se caracteriza por disminución de la señalización beta-adrenérgica, pérdida y disfunción mitocondrial y recibe el nombre de *whitening* porque los depósitos del tejido adiposo pardo adoptan un fenotipo similar al del tejido adiposo blanco como consecuencia de la acumulación de gotas lipídicas de gran tamaño en el

citoplasma de los adipocitos pardos. La inactivación fisiológica de los tejidos adiposos pardo y *beige* por el proceso de *whitening* se observa durante la obesidad, el envejecimiento, la lactancia o el aumento de la temperatura ambiental, desempeñando la autofagia un papel central en este proceso como describimos más adelante (Gospodarska *et al*, 2015; Altshuler-Keylin *et al*, 2016; Cairo *et al*, 2019; Darcy *et al*, 2019; Bartke *et al*, 2021).

Estudios demuestran que los roedores luego de una exposición al frío, cuando vuelven a la termoneutralidad (situación en la cual la producción de calor por parte de la grasa parda no es necesaria) o en condiciones de dieta hipocalórica, sufren la atrofia de dicho depósito de tejido (Desautels *et al*, 1980; Villarroya *et al*, 1986; Patel *et al*, 1987). Esto, permite relacionar el *whitening* con el desbalance energético, dado que se asocia a una disminución de la capacidad termogénica del tejido adiposo pardo.

4.6 Rol de la autofagia en la plasticidad del tejido adiposo

La autofagia es un proceso catabólico evolutivamente conservado a través del cual una célula degrada sustratos citoplasmáticos (proteínas mal plegadas o agregadas, organelas dañadas y patógenos intracelulares) entregándolos dentro de lisosomas. Las pequeñas moléculas resultantes luego se exportan al citoplasma y se utilizan como fuente de energía o precursores para la síntesis de nuevas macromoléculas (Mizushima *et al*, 2008; Levine *et al*, 2008).

Los adipocitos evidencian tres tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperona, los cuales, promueven la degradación proteolítica de los componentes citosólicos en el lisosoma (Choi *et al*, 2013). La macroautofagia, en lo sucesivo denominada “autofagia”, se basa en la formación *de novo* de vesículas citosólicas de doble membrana que secuestran material celular como organelas dañadas o disfuncionales para su degradación. Esta estructura se la conoce como autofagosoma. Mientras que la microautofagia se refiere al proceso por el cual el contenido citoplasmático a degradar ingresa al lisosoma a través de una invaginación o deformación de la membrana lisosomal.

En el proceso de autofagia se distingue la fase de nucleación regulada por el complejo mTORC1, un complejo formado por 5 proteínas que a su vez se regulan por fosforilación o desfosforilación y activan las proteínas encargadas de la iniciación del proceso

vía activación de Ulk. La iniciación de la formación del autofagosoma está mediada por la proteína quinasa Ulk1. La forma activa de Ulk1 fosforila directamente a Beclin1, el componente central del primer complejo proteico de autofagia, promoviendo el inicio del proceso (Nazarko & Zhong, 2013). Gran parte del proceso es mediado por las proteínas de la familia ATG, proteínas iniciadoras de autofagia, entre ellas las proteínas Beclin1 y Atg7 las cuales se unen a las proteínas u organelas dañadas marcándolas para la formación de vesículas de doble membrana que contienen el material a reciclar. Algunos miembros de la familia se unen a estas vesículas promoviendo su maduración y posteriormente se requiere la unión de la proteína LC3-II para el cierre de la vesícula luego de la captación de los sustratos a procesar y así dar origen al autofagosoma. Cuando éste se fusiona con los lisosomas por acción de las proteínas Lamp1, Lamp2, entre otras, se forma el autofagolisosoma. Esta fusión permite que las enzimas lisosomales se ocupen de la degradación enzimática de los sustratos. Este proceso ha sido ampliamente revisado (Fig. 2) (Bento *et al*, 2016).

La autofagia puede participar en la plasticidad del tejido adiposo pardo activándose o desactivándose dinámicamente, dependiendo del estado termogénico de los adipocitos, para responder a diferentes señales y adaptando no solo los procesos intracelulares (es decir, biogénesis / degradación mitocondrial) sino también la remodelación tisular (es decir, hipertrofia / hiperplasia) (Gospodarska *et al*, 2015).

La relación entre el metabolismo del tejido adiposo y la autofagia se ha vuelto un área que despierta mucho interés desde la caracterización de dos procesos de autofagia selectiva exclusivos del tejido adiposo: lipofagia y mitofagia. Por un lado, la lipofagia es la eliminación selectiva de lípidos por lisosomas. Se trata de un proceso vital en el metabolismo lipídico ya que participa en la regulación del balance entre la lipogénesis y la lipólisis en el tejido adiposo blanco y pardo (Singh *et al*, 2012; Martinez-Lopez *et al*, 2016; Zechner *et al*, 2017). Y, por otro lado, la mitofagia es el proceso de autofagia selectiva por el cual se remueven activamente mitocondrias. La activación de dicho proceso celular permite eliminar mitocondrias que han sido dañadas por estrés oxidativo (Ashrafi *et al*, 2013; Li *et al*, 2015; Taylor *et al*, 2017) y contribuye al *whitening* de adipocitos. En este último caso, los convierte en adipocitos blancos al remover las mitocondrias frente a la desaparición del estímulo frío.

Se observa que, durante la activación termogénica, la actividad autofágica disminuye en los adipocitos pardos (Altshuler-Keylin *et al*, 2016; Cairo *et al*, 2016; Cairo *et al*, 2019). Ambos procesos están regulados por la proteína quinasa A (PKA), que activa el

programa termogénico e inhibe la autofagia (Altshuler-Keylin *et al*, 2016; Cairo *et al*, 2016). Aunque todavía no está claro, la represión transcripcional de los genes de la autofagia por PKA podría estar mediada por mTOR, que controla el crecimiento y el metabolismo celular en respuesta a diversos factores ambientales y se considera el principal represor de la autofagia (Mavrakis *et al*, 2007) pero además, se ha demostrado que la PKA puede inhibir la autofagia directamente mediante la fosforilación de la proteína de autofagia LC3 (Cherra, III *et al*, 2010).

En resumen, la autofagia tiene un papel clave en la termogénesis del tejido adiposo pardo, ya que se potencia la termogénesis cuando se inhibe la autofagia permitiendo el aumento neto de la masa mitocondrial y la consecuente mejora de la beta oxidación.

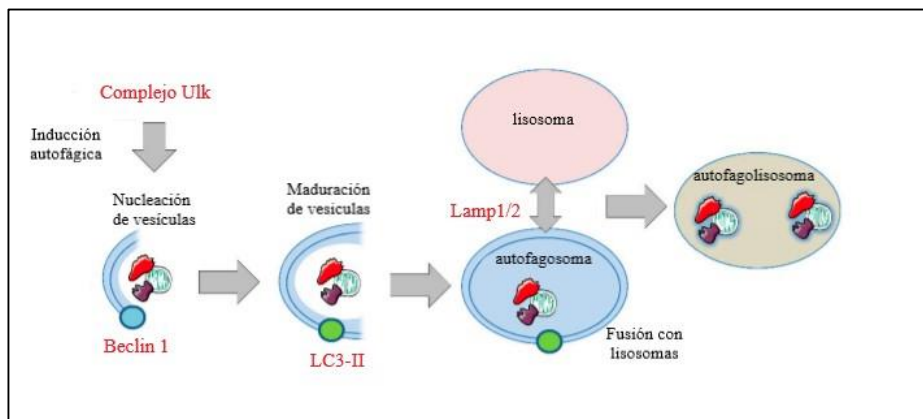


Figura 2: Esquema resumido del proceso de autofagia en mamíferos.

Tomado y modificado de https://www.researchgate.net/figure/Molecular-basis-of-mammalian-autophagy-Autophagy-is-a-multistep-process-involving_fig1_336935260

4.7 Hiperprolactinemia en el modelo lacDrd2KO

La hiperprolactinemia patológica es definida como una elevación constante de los niveles de prolactina sérica por encima de 20 ng/ml en individuos no lactantes y no gestantes.

Las causas de hiperprolactinemia pueden dividirse en fisiológicas, como el embarazo y la lactancia; farmacológicas, por fármacos que incluyen antipsicóticos (fenotiazinas, butirofenonas), antidepresivos (tricíclicos, inhibidores de la enzima mono amino oxidasa e inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina), opioides, antihipertensivos (verapamilo, metildopa y reserpina) y estrógenos, entre otros; y patológicas, vinculadas a la presencia de un adenoma hipofisario secretor de prolactina (prolactinoma).

Con el objetivo de dilucidar los efectos metabólicos que causan los altos niveles de prolactina, nuestro laboratorio desarrolló un modelo experimental de hiperprolactinemia crónica: el ratón *lacDrd2KO*. Se trata de un knockout tejido específico generado mediante la tecnología Cre/loxP, que carece de RD2s funcionales solamente en lactotropos. En ausencia del tono inhibitorio que la dopamina ejerce sobre la síntesis y secreción de prolactina, en las hembras *lacDrd2KO* se observan niveles de prolactina significativamente aumentados desde el primer mes de edad y desarrollan una hiperprolactinemia franca desde el tercer mes de edad (Perez-Millan *et al*, 2014).

A los 5 meses de edad, la hiperprolactinemia está bien establecida y es crónica. Los niveles de ingesta se encuentran aumentados, aunque, la obesidad no es evidente ya que el peso corporal aumenta solo marginalmente. Este ligero aumento de peso podría explicarse por los depósitos de tejido adiposo blanco gonadal y pardo significativamente más pesados (Fig. 3). Sin embargo, trabajos previos demostraron que, a esta edad, los mecanismos homeostáticos de control de la ingesta se encuentran conservados, y que gradualmente se van perdiendo. Además, el hecho de que los niveles séricos de GH estaban conservados en hembras *lacDrd2KO* de 5 meses de edad, permite descartar a dicha hormona como responsable de los cambios en el peso corporal.

Por otra parte, a los 10 meses de edad, la hiperprolactinemia se mantiene, pero además los animales desarrollan hiperleptinemia y un fenotipo de obesidad mórbida (Perez-Millan *et al*, 2014; Luque *et al*, 2016). A esta edad, se observa una alteración en el perfil lipídico de nuestro modelo experimental y se da en un contexto de aumento significativo del peso de los depósitos de tejido adiposo y un consecuente gradual aumento del peso corporal producto de dicho incremento de la adiposidad. En el caso de los depósitos de tejido adiposo blanco gonadal, subcutáneo y pardo, se observó un aumento de adiposidad con la edad en ambos genotipos, pero significativamente superior en las *lacDrd2KO* (Fig. 3).

Como mencionamos anteriormente, estos efectos demuestran que el papel de la prolactina es esencial en la adipogénesis y la diferenciación de adipocitos (Fleenor *et al*, 2006; Grattan *et al*, 2015), así como en la regulación del metabolismo lipídico.

Además, trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la hiperprolactinemia crónica impacta sobre la funcionalidad del tejido adiposo pardo, produciendo una disminución de *Ucp1*, la proteína maestra que activa la termogénesis y por lo tanto se induce un *whitening* masivo. (Lopez-Vicchi *et al*, 2020a).

Estos datos en su conjunto apuntan a la acción de esta hormona sobre la plasticidad de este tejido.

En este contexto, teniendo en cuenta la alteración en el metabolismo energético de lenta aparición que presentan los ratones hembra lacDrd2KO se planteó la necesidad de estudiar, en principio, la capacidad autofágica del tejido adiposo pardo en el desarrollo tardío de la obesidad (10 meses de edad) y si un doble desafío como agregar el estímulo de frío o una dieta grasa al estado hiperprolactinéxico podía acelerar la aparición del fenotipo observado; en relación a la capacidad termogénica del tejido adiposo pardo. Este planteo nos condujo a analizar cómo se regula el proceso autofágico en respuesta a los desafíos propuestos.

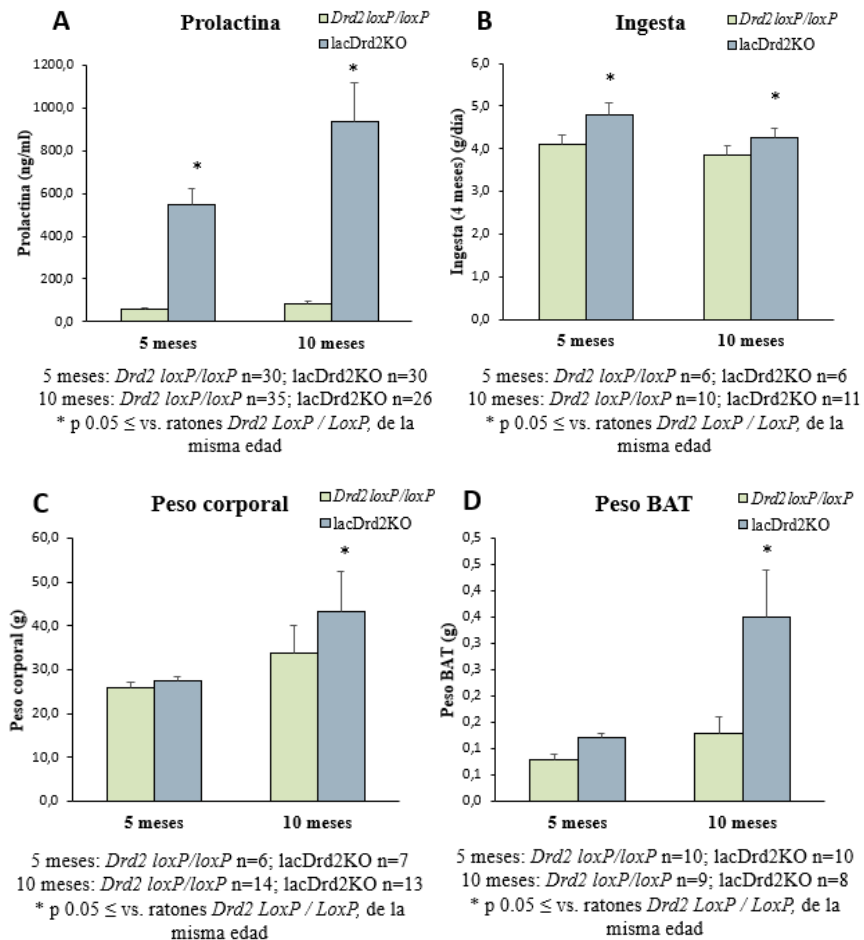


Figura 3: Datos de hembras *Drd2^{LoxP/LoxP}* y *lacDrd2KO* de 5 y 10 meses de edad. A) Nivel de prolactina sérico. B) Nivel de ingesta. C) Peso corporal. D) Peso de los depósitos de tejido adiposo pardo. Tomado y modificado de (Lopez-Vicchi *et al*, 2020a).

5. Hipótesis

Trabajos previos del laboratorio demostraron que la hiperprolactinemia crónica impacta sobre la funcionalidad del tejido adiposo pardo disminuyendo su capacidad termogénica y por lo tanto favoreciendo la obesidad.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, nuestra hipótesis para esta tesis de licenciatura propone que la hiperprolactinemia en los ratones lacDrd2KO genera alteraciones en el BAT (como es el *whitening*) frente a distintos desafíos. El contexto hiperprolactinéxico evitaría la activación de la termogénesis como consecuencia de la exposición al frío, o a dietas ricas en grasas y la autofagia, además, podría contribuir en este proceso.

6. Materiales y métodos

6.1 Animales

6.1.1 Ratones lacDrd2KO

Los ratones lacDrd2KO se generaron cruzando ratones $Drd2^{loxP/loxP}$ (los cuales poseen el exón 2 flanqueado por secuencias loxP) (Noain *et al*, 2013) con ratones transgénicos que expresan la enzima recombinasa Cre bajo el promotor de prolactina de ratón, Tg (Prl-cre)^{IMrub}. La expresión tejido específica de la recombinasa Cre en los ratones transgénicos (Tg (Prl-cre)^{IMrub} se analizó mediante PCR en tiempo real. Se observó expresión de recombinasa Cre en hipófisis y muy bajos niveles en hipotálamo, hígado, riñón, ovario y pulmón (Perez-Millan *et al*, 2014). Se evaluó funcionalidad de recombinasa Cre en hipófisis, y se encontró actividad en el 96% de células productoras de prolactina de la hipófisis anterior, de manera altamente selectiva (Noain *et al*, 2013). Los ratones lacDrd2KO tienen conservado el eje GHRH-GH, presentan hiperprolactinemia y las hembras desarrollan un prolactinoma.

Se utilizaron parejas reproductoras de ratones $Drd2^{loxP/loxP}$ Drd2 hembra y Drd2 loxP / loxP.Tg (Prl-cre) machos para generar las camadas de $Drd2^{loxP/loxP}$ (control) y Drd2 loxP / loxP.Tg (Prl-cre) (lacDrd2KO), que se incluyeron en cada experimento. Los ratones lacDrd2KO y sus controles ($Drd2^{loxP/loxP}$) son congénitos con la cepa C57BL/6J.

Debido a que en los ratones macho no se observó un aumento significativo en los niveles de prolactina, (Perez-Millan *et al*, 2014) se utilizaron únicamente ratones hembra.

Los ratones se alojaron en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET) en grupos 6 por jaula, en una sala con temperatura controlada (22°C), un fotoperíodo de 12 horas (7.00 a.m. a 7.00 p.m.) y ventilación permanente. Se les proporcionó alimento balanceado (Gepsa) y agua de grifo ad libitum. Tuvieron acceso libre a agua del grifo y comida del laboratorio, excepto cuando indicado.

Los protocolos de este trabajo de tesis fueron aprobados por el CICUAL del IBYME (Protocolo n°031 del 2019).

6.2 Genotipificación de ratones

6.2.1 Extracción de ADN genómico

Las crías de ratones se destetaron a los 21 días de su nacimiento y se separaron por sexo hasta que su genotipo fue determinado. Éstas se identificaron con una marcación según un código de perforaciones en las orejas. Para determinar los genotipos de las crías de ratones, se realizaron biopsias de la porción terminal de la cola con un bisturí. Los segmentos de cola obtenidos se incubaron a 55°C en buffer de digestión (TrisHCl 50mM, pH8, EDTA 100mM, SDS 0,5%; 0,5mg/ml de proteinasa K) durante 12 horas. Se precipitó el ADN en frío (4 horas a -20°C) y se centrifugó a 12000g por 40 minutos a 4°C.

La presencia del transgén se detectó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores (primers) específicos de las secuencias transgénicas.

6.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la genotipificación de los ratones lacDrd2KO y sus pares *Drd2^{loxP/loxP}* se realizaron dos PCRs diferentes:

En primer lugar, se realizó una PCR para determinar la presencia de sitios loxP. Para la misma, se utilizó un par de primers sentido y antisentido complementarios al intrón 2 del gen RD2 (Invitrogen Life Technologies), cuyas secuencias se muestran en la Tabla I. Si existe un alelo mutado el par de primers del intrón 2 amplifica un producto de 452 pares de bases (pb) y en caso de haber un alelo normal amplifican fragmento de 354 pb (Fig. 4). Las condiciones de esta PCR se detallan en la Tabla II.

TABLA I: Primers utilizados para las reacciones de PCR realizadas para la genotipificación de los animales.

Gen		Secuencia (5' - 3')
<i>LoxP</i>	Sentido	GCTTCACAGTGTGCTGCCTA
	Antisentido	CCATTGCTGCCTCTACCAAG
<i>Prl-Cre</i>	Sentido	CCTTCATTTCTGGCCAATG
	Antisentido	AGGCAATTTTGGGTGTACGG

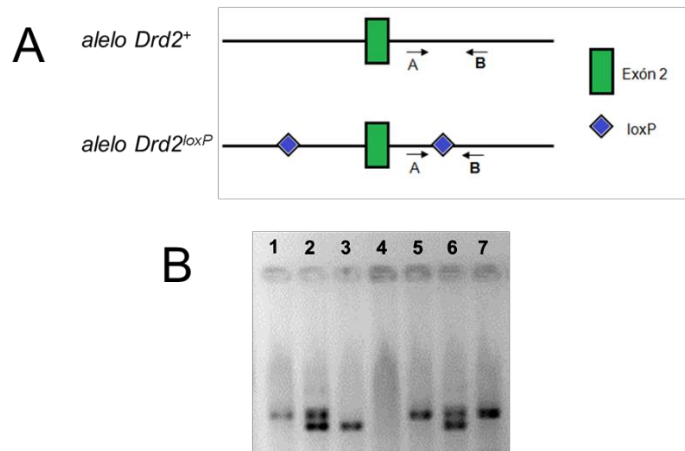


Figura 4: A) Fragmentos amplificados por la reacción de PCR para la genotipificación de los animales con un alelo normal: $Drd2^{+}$ (fragmento de 354 pb) y otro alelo mutado: $Drd2^{loxP}$ (fragmento de 452 pb). La letra A representa el primer sentido del intrón 2, y la letra B el primer antisentido del intrón 2. Los rombos azules corresponden a los sitios loxP, mientras que el rectángulo verde representa el exón 2 del gen del RD2. B) Gel de agarosa con productos de reacción de PCR de genotipificación para determinar presencia de sitios loxP.

La calle 1 corresponde al control positivo $Drd2^{loxP/loxP}$, la calle 2 es el control positivo $Drd2^{loxP/+}$, la calle 3 es el control positivo $Drd2^{+/+}$, y la calle 4 es el blanco (control negativo, sin ADN). El patrón de bandas de las calles 5 y 7 corresponden a animales $Drd2^{loxP/loxP}$, mientras que la calle 6 representa un patrón de bandas de un animal heterocigoto $Drd2^{loxP/+}$.

TABLA II: Reacción de PCR para la genotipificación de los animales transgénicos control

MIX PCR	Concentración	Programa	
		Temperatura (°C)	Tiempo
Primers sentido y antisentido	2 μ M		
MgCl ₂	1,5 mM	95	5'
ADN	200 ng		
dntp's	0,2 mM	95	30''
Buffer	TrisHCl 20mM; KCl 50mM	62	20''
		72	20''
		72	5'
Taq polimerasa	1 UE		
H ₂ O	Vf = 30 μ l		

En segundo lugar, se llevó a cabo una PCR para la detección del transgén *Prl-Cre*, en la cual se utilizó un par de *primers* conformado por una secuencia complementaria a una porción del promotor de prolactina (*primer* sentido), y una secuencia complementaria a la recombinasa Cre (*primer* antisentido). Las secuencias se muestran en la Tabla I (Invitrogen Life Technologies) y las condiciones de esta PCR se detallan en la Tabla III. En este caso se evidencia simplemente presencia o ausencia del transgén, es decir, presencia o ausencia de producto amplificado.

TABLA III: Reacción de PCR para la genotipificación de los animales transgénicos *Prl-Cre*.

MIX PCR	Concentración	Programa	
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Primers sentido y antisentido	1 μ M		
MgCl ₂	1,5 mM	95	3
ADN	200 ng		
dntp's	0.2 mM	94	1
Buffer	TrisHCl 20mM; KCl 50mM	56	1
		72	1
		72	5
Taq polimerasa	1 UE		
H ₂ O	Vf = 30 μ l		

En todos los casos, los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron en un transiluminador (Fig. 4B y Fig. 5). Se sembró un volumen final de 15 μ l por calle conteniendo 11 μ l del producto de PCR, 2 μ l de buffer de siembra (conteniendo azul de bromofenol y glicerol) y 2 μ l de SYBR-Green (Invitrogen Life Technologies) diluido 1:1000 en DMSO, a partir de la concentración del stock comercial.

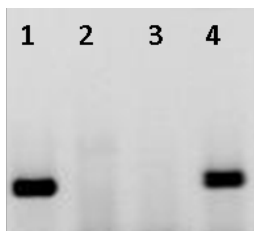


Figura 5: Gel de agarosa con productos obtenidos en una reacción de PCR realizada para la determinación del transgén *Prl-Cre*. La calle 1 corresponde al control positivo para la banda *Prl-Cre* y la calle 2 es el blanco (control negativo, sin ADN). En la calle 3 se puede identificar un ratón *Prl-Cre* negativo, mientras que la calle 4 presenta el producto de PCR de un ratón que posee el transgén *Prl-Cre* (*Prl-Cre* positivo).

6.3 Experimento de exposición al frío

Hembras lacDrd2KO y hembras control *Drd2^{loxP/loxP}* de 10 meses de edad se colocaron en jaulas individuales (solo con viruta y sin alimento) y se expusieron a un ambiente frío (4-6 °C) durante 4 horas, y otro grupo fue mantenido en el bioterio con viruta y sin alimento a 24 °C. Al finalizar el protocolo, los animales fueron sacrificados por decapitación para la obtención de tejidos, en particular tejido adiposo pardo. Una porción de este tejido se colocó en formaldehído al 4% para su posterior inclusión en parafina. La otra porción, se congeló en nitrógeno líquido para luego realizar una extracción de ARN.

6.4 Protocolo de alimentación con dieta rica en grasas

En trabajos previos del laboratorio, se evaluó el impacto de dos meses de exposición a una dieta rica en grasa sobre el metabolismo de hembras lacDrd2KO y hembras control *Drd2^{loxP/loxP}* de 3 meses de edad alojadas en jaulas individuales. Un grupo de hembras recibió una dieta rica en grasa comercial, (D124521, 45 kcal% fat; RESEARCH DIETS, INC. 20 Jules Lane, New Brunswick, USA) mientras que un segundo grupo recibió alimento balanceado regular (D12450H, 10 kcal% fat D12451 Match 17% Sucrose; RESEARCH DIETS, INC. 20 Jules Lane, New Brunswick, USA). Los pellets de dieta regular proporcionaban: 3.85 kcal / g de energía y su composición era: carbohidratos 70%, proteínas 20%, grasa 5%, fibras, minerales y humedad 5%. Por otro lado, los pellets de dieta grasa proporcionaban 4.73 kcal / g de energía y su composición era la siguiente: carbohidratos 41%, proteínas 23%, grasa 24%, fibras, minerales y humedad 12%. Al cabo de cada semana, se evaluó la cantidad de alimento consumido y el peso corporal y se completó con más alimento.

En la figura 6A se muestra la evolución del peso corporal para todos los grupos experimentales. Las hembras lacDrd2KO alimentadas con dieta rica en grasa (DG lacDrd2KO) presentaron un aumento significativo del peso corporal a partir de la tercera semana respecto de hembras del mismo genotipo alimentadas con dieta regular (C lacDrd2KO) y sorprendentemente, desde la semana 2, tuvieron un peso corporal significativamente mayor que las hembras control *Drd2^{loxP/loxP}* que recibieron el mismo tipo de dieta. Esta diferencia de peso entre genotipos aumentó conforme transcurrieron las semanas. Al finalizar el experimento las hembras lacDrd2KO aumentaron un 30% su peso corporal tras dos meses de alimentación rica en grasa, mientras que las hembras control un 14%. En hembras control *Drd2^{loxP/loxP}* se observó el efecto de la dieta en forma tardía, ya que el aumento de peso se hizo evidente recién en la semana 8.

Por otro lado, se evaluó el peso de los depósitos de grasa parda (Fig. 6B). No se observaron diferencias significativas en el peso, aunque se destacó una tendencia marcada que parecía indicar que el tejido adiposo pardo es más pesado en el modelo hiperprolactinéxico.

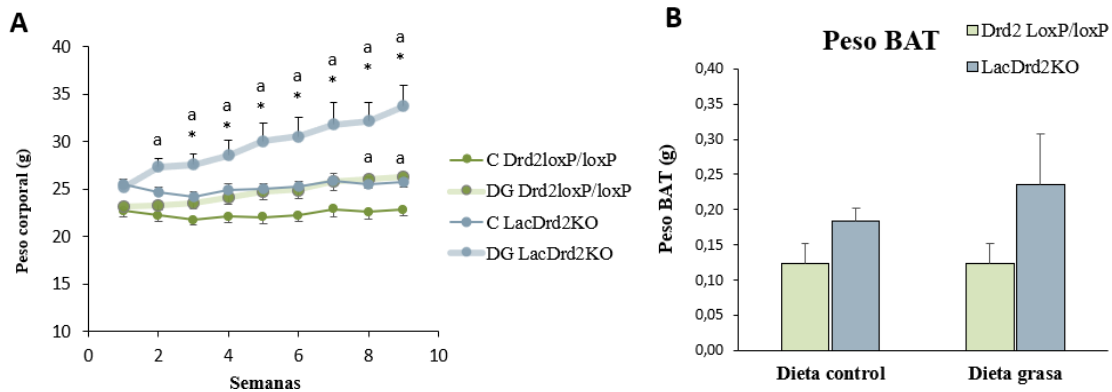


Figura 6: A) Curvas de peso corporal semanal promedio. Hembras *Drd2^{loxP/loxP}* dieta control (C *Drd2^{loxP/loxP}*; 3.9 kcal/g 5% grasa; N=6), hembras *Drd2^{loxP/loxP}*, dieta grasa (DG *Drd2^{loxP/loxP}*; 4.7 kcal/g 24% grasa; N=6), hembras lacDrd2KO con dieta control (C lacDrd2KO; N=5), hembras lacDrd2KO con dieta grasa (DG lacDrd2KO; N= 5). Se realizó un análisis de varianza en tres sentidos para medidas repetidas “a” = $p \leq 0.05$ indica diferencias significativas entre dietas para, respectivo genotipo y tiempo (efecto dieta); * $p \leq 0.05$ indica diferencias significativas entre genotipos misma dieta y tiempo respectivo (efecto genotipo). B) Peso en gramos del tejido adiposo pardo de ratones hembra *Drd2^{loxP/loxP}* y lacDrd2KO de 5 meses alimentados ad libitum con dieta control o dieta rica Research Diets durante 9 semanas; (N= 6, 6, 5, 5). Tomado y modificado de (Lopez-Vicchi & De Winne, 2021).

6.5 Procesamiento de muestras

6.5.1 Inclusión en parafina

Una vez obtenidas las muestras de tejido adiposo pardo, se procedió con el protocolo que se muestra en la Tabla IV. Se cortaron secciones de 7µm del taco de parafina y se montaron en portaobjetos de vidrio.

TABLA IV: protocolo básico de inclusión de muestras de tejido adiposo pardo en parafina.

Pasos	Tiempo
Formaldehído 4%	24hs
Lavado con agua destilada	-
Etanol 50%	2hs
Etanol 70%	24hs
Etanol 90%	2hs
Etanol 96%	24hs
Etanol 100%	2 pasajes de 1 hora cada uno
Xileno	2 pasajes de 30 min cada uno
Mezcla parafina y xileno 50:50	2hs
Parafina	3 pasajes de 2 hs cada uno

6.5.2 Histología

Para los cortes de tejido adiposo pardo de hembras lacDrd2KO y control *Drd2^{loxP/loxP}* de 5 y 10 meses de edad, se contrató un servicio de procesamiento de muestras y coloración brindado por la Universidad Maimónides.

6.6 Extracción de ARN de tejido adiposo y síntesis de ADNc

Se obtuvo tejido adiposo pardo de hembras *Drd2^{loxP/loxP}* y lacDrd2KO y se extrajo ARN total utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen). La concentración de ARN se determinó sobre la base de su absorbancia a 260 nm, su pureza se evaluó mediante la relación de absorbancia 260/280 nm (> 1,8) y su integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. El ARN se mantuvo congelado a -80 ° C hasta ser utilizado. El ARN del tejido adiposo pardo (1 µg) se retrotranscribió en un volumen final de 20 µl en presencia de deoxi-NTP 0,5

mM, 0,25 µg oligo (dT) 15 (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) utilizando 1 U MMLV transcriptasa reversa (Promega Co., Madison, USA).

En todos los casos, se realizaron dos controles. En el control 1 se omitió la transcriptasa reversa y se colocó muestra de ARN, mientras que el control 2 no se colocó muestras de ARN, pero sí transcriptasa reversa. La ausencia de fragmentos amplificados por PCR en el control 1 indica una extracción de ARN libre de genómico.

El ADNc se almacenó a -20 ° C hasta su uso para PCR en tiempo real. Los resultados de los ensayos se normalizaron al gen de referencia Ciclofilina o RPL38 para eliminar posibles variaciones entre muestras que se debieran a diferencias en la calidad y cantidad de ARN de partida y la eficiencia de la RT. Los niveles de Ciclofilina y RPL38 se analizaron de forma independiente y no variaron en ninguno de los grupos experimentales.

6.7 Diseño de primers

Los *primers* específicos para cada protocolo de amplificación empleado en este proyecto fueron diseñados con el software “Primer-BLAST” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), utilizando registros de secuencias de referencia como templatado del análisis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>). En el diseño se tuvo en cuenta que éstos amplificaran fragmentos que contuviesen al menos un intrón entre dos exones. De esta manera, se puede determinar la amplificación específica del transcripto y distinguir, en caso de que la hubiese, contaminación con ADN genómico, ya que, en dicho caso, el fragmento amplificado es de mayor tamaño dado que incluye la secuencia intrónica.

Para el análisis de las características de los *primers* diseñados se empleó el programa “OligoAnalyzer3.1” . Se tuvo en cuenta que los *primers* no formen dímeros ni estructuras secundarias de alta estabilidad, y que no presenten repeticiones invertidas ni repeticiones de un mismo nucleótido. Se eligieron *primers* cuya temperatura de "annealing" estuviera entre 58 y 60°C. El tamaño de los fragmentos amplificados por el par de *primers* diseñados para la PCR en tiempo real no superó los 180 pb. En la Tabla V se detallan los *primers* utilizados.

TABLA V: Secuencias de primers sentido y antisentido utilizadas

Gen	Primer	Secuencia (5' - 3')	Fuente
<i>Adiponectina</i>	Sentido	ATCCTGGCCACAATGGCACA	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	CAAGAAGACCTGCATCTCCT	
<i>Beclin</i>	Sentido	GGCCAATAAGATGGGTCTGA	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	CACTGCCTCCAGTGTCTTCA	
<i>Ciclofilina</i>	Sentido	TTCTCATAACCACAGTCAAGACC	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	ACCTTCCGTACCACATCCAT	
<i>Cidea</i>	Sentido	AACCATGACCGAAGTAGCCG	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	CCAGGCCAGTTGTGATGACT	
<i>Lamp</i>	Sentido	GGTGCTGGTCTTTTCAGGCTTGATT	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	ACCACCCAATCTAAGAGCAGGACT	
<i>Lpl</i>	Sentido	CCCTACAAAGTGTTCCATTACCAA	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	TTGTGTTGCTTGCCATCCTCA	
<i>Pgcl1a</i>	Sentido	TCTCAGTAAGGGGCTGGTTG	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	TTCCGATTGGTCGCTACACC	
<i>Prlr</i>	Sentido	CACAGTAAATGCCACGAACG	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	GGCAACCATTTTACCCACAG	
<i>Ucp1</i>	Sentido	AGTACCCAAGCGTACCAAGC	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	GACCCGAGTCGCAGAAAAGA	
<i>Ulk1</i>	Sentido	CGTCCTCCAAGACGCTGTAT	Diseñado con Primer Blast
	Antisentido	CCTGTTGCTTTCCTCCAAAG	

6.8 PCR en tiempo real

La expresión de marcadores autofágicos y termogénicos, se evaluó en tejido adiposo pardo utilizando una mix de qPCR, con el agregado de los correspondientes *primers* en una concentración de 0.24 μ M o 0.48 μ M, según conveniente para cada gen a medir, 100 ng de ADNc de cada muestra y agua en un volumen final de 10.4 μ l. Después de la desnaturalización a 95 ° C durante 15 minutos, el ADNc se amplificó 40 ciclos. El programa de amplificación estándar utilizado involucró los siguientes pasos: 1) Activación: 95°C por 15 minutos; 2) Desnaturalización: 95°C por 30 segundos; 3) Hibridación: 58°C por 30 segundos; 4) Extensión: 72°C por 30 segundos; 5) Lectura de datos: 88°C por 33 segundos. Los pasos 2 a 5 se repiten 40 veces. (Para todos los genes medidos la temperatura de hibridación utilizada fue 58°C, excepto para el gen *Pgcl1a* cuya temperatura utilizada fue 63°C). La amplificación y detección se realizó utilizando un termociclador marca Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, U.S.A), y los datos se almacenaron de forma continua durante la reacción.

El equipo de PCR en tiempo real mide el aumento de los niveles de fluorescencia en cada ciclo de PCR causados por la unión del SYBR Green al ADN doble cadena. El equipo determina un nivel de fluorescencia umbral dentro de la fase exponencial de la reacción. El número de ciclos que requiere cada muestra para alcanzar dicho umbral se conoce como Ct (Cycle threshold), el cual está directamente relacionado con la cantidad inicial de molde presente en la PCR. Dado que se obtiene una señal siempre que haya moléculas de ADN doble cadena, a posteriori del ensayo de PCR se realizaron curvas de disociación (Curva de Melting). La expresión relativa de los transcritos evaluados se calculó usando Ciclofilina o RPL38 como control endógeno. La expresión matemática utilizada para calcular estas relaciones fue:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Dónde:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ referencia.}$$

$$\Delta Ct \text{ muestra} = Ct \text{ gen en estudio} - Ct \text{ gen endógeno.}$$

$$\Delta Ct \text{ referencia} = \text{promedio } \Delta Ct \text{ de las muestras control.}$$

Para todos los genes evaluados se realizaron previamente ensayos de estandarización de los protocolos empleados.

6.9 Análisis estadísticos

Los resultados son presentados como el promedio \pm error estándar. Las diferencias fueron analizadas utilizando Test T de Student (para solo dos grupos) o Análisis de la Varianza (ANOVA) de uno o dos factores para muestras independientes. Los resultados fueron analizados utilizando las pruebas a posteriori de Tukey HSD para N desiguales o de Newman-Keuls para N iguales. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1 Autofagia en el desarrollo tardío de obesidad

Se evaluaron marcadores autofágicos en el tejido adiposo pardo de hembras lacDrd2KO con desarrollo tardío de obesidad (10 meses de edad), en comparación con hembras lacDrd2KO jóvenes de 5 meses de edad y hembras control *Drd2^{LoxP/LoxP}* de ambas edades que no presentan obesidad.

Como se describió previamente, las hembras lacDrd2KO y no las hembras controles (*Drd2^{LoxP/LoxP}*), desarrollan un fenotipo obeso entre los 5 y 10 meses de edad. Los datos provenientes de estudios previos del laboratorio indican que el organismo, exigido por los niveles altos de prolactina, pierde mecanismos de control metabólico. Esto nos condujo a evaluar cómo el desarrollo tardío de obesidad (10 meses de edad) impacta sobre la capacidad autofágica del tejido adiposo pardo, un órgano clave en el balance metabólico.

A los 5 meses de edad, cuando ambos genotipos tiene peso normal, se puede observar que, en el tejido adiposo pardo, los genes autofágicos *Ulk1* y *Beclin* están disminuidos en los animales hiperprolactinémicos (Fig. 7A y 7B) ($P=0.013$ y 0.077 vs controles, respectivamente) sin cambios en la expresión de *Lamp* (Fig. 7C). Estos resultados sugieren que los altos niveles de prolactina en etapas tempranas intervienen en la expresión de genes autofágicos, quizás intentando mantener la homeostasis metabólica en una etapa en que la ingesta está aumentada, sin aumento en el peso corporal de los animales.

En cambio, a los 10 meses de edad, se observó que los genes ya no están disminuidos en las hembras lacDrd2KO, e incluso el gen autofágico *Beclin* muestra una tendencia a estar aumentado, si bien las diferencias no son significativas ($P= 0.18$) (Fig. 7B). A su vez, *Ulk1* muestra una tendencia similar (Fig. 7A). Esto iría en línea con la bibliografía que indica que, la autofagia del BAT se correlaciona inversamente con la termogénesis de este tejido, y el proceso de *whitening* del BAT que se da en la obesidad se acompaña de un aumento de la autofagia. Por otra parte, la expresión de *Lamp* no se vio modificada por el genotipo a las edades estudiadas (Fig. 7C).

Dada la alteración observada en el peso de los depósitos de tejido adiposo pardo, la disminución en la expresión de genes característicos de la grasa parda por hiperprolactinemia que fue descripta en trabajos previos del laboratorio (Lopez-Vicchi & De Winne, 2021) y el hecho de que el fenotipo de las hembras lacDrd2KO se acentúa con la edad, decidimos analizar histológicamente los cambios en el BAT, para intentar dilucidar si el proceso de *whitening* se acentúa con la edad en los ratones hiperprolactinémicos. Para ello utilizamos la tinción de hematoxilina-eosina en cortes de tejido adiposo pardo incluidos en parafina de hembras lacDrd2KO y control *Drd2^{LoxP/LoxP}* de 5 y 10 meses de edad.

En primer lugar, en cortes del tejido adiposo pardo de hembras lacDrd2KO y control de 5 meses, identificamos la presencia de numerosos adipocitos marrones de citoplasma granulado, cargado de gotas lipídicas de distinto tamaño que, tras el procesamiento histológico

estándar, pierden su contenido y se visualizan como espacios vacíos dándole al adipocito su aspecto multilocular. Observamos que en las hembras lacDrd2KO de 5 meses de edad los adipocitos parecen tener un mayor tamaño y por lo tanto un mayor número de gotas lipídicas. En línea con lo expuesto anteriormente, encontramos que en las hembras lacDrd2KO de 10 meses, se observa una alteración en la morfología de los depósitos de grasa parda. Particularmente se desataca un mayor contenido de lípidos en el tejido, que se evidencia por la aparición de abundantes gotas lipídicas de mayor tamaño rodeando a los adipocitos multiloculares, sugiriendo la acentuación del fenotipo de *whitening* a esa edad (Fig. 8).

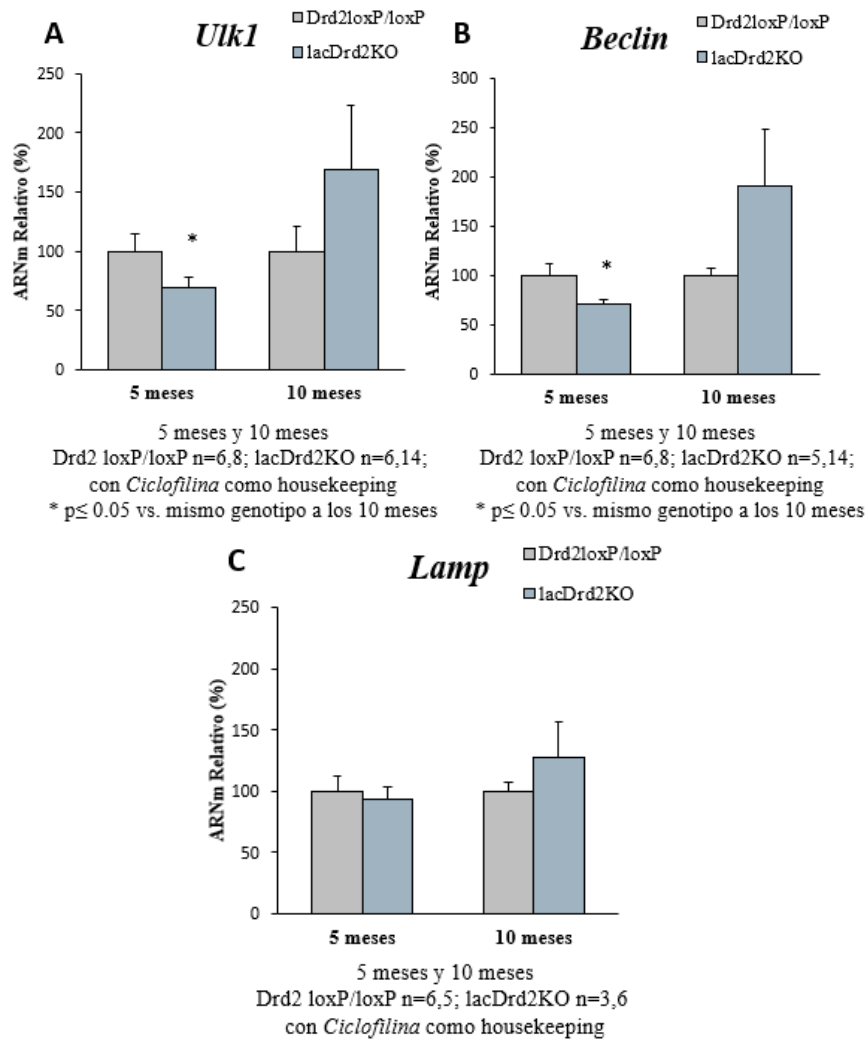


Figura 7: Niveles de ARNm de indicadores autofágicos A) *Ulk*; B) *Beclin*; C) *Lamp*; en ratones hembra *Drd2^{loxP/loxP}* y lacDrd2KO de 5 y 10 meses de edad.

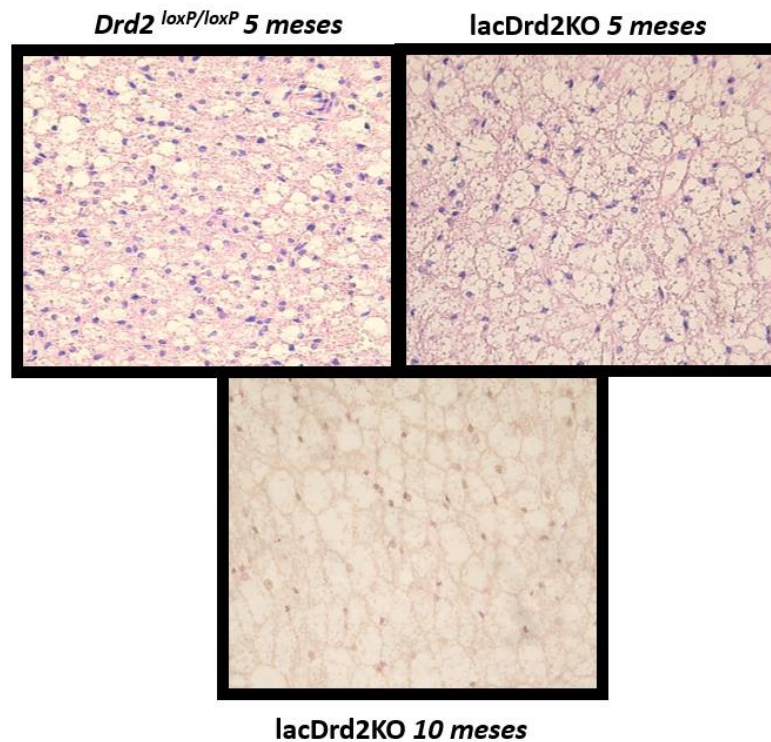


Figura 8: Histología del tejido adiposo pardo. Imágenes representativas tomadas al microscopio óptico con un objetivo de aumento 40X de la coloración hematoxilina-eosina realizada en secciones de tejido adiposo pardo provenientes de ratones hembra *Drd2^{loxP/loxP}* y *lacDrd2KO* de 5 y 10 meses de edad.

7.2 Termogénesis en respuesta a una exposición aguda a un ambiente frío

El estrés por frío es un conocido estímulo para la termogénesis. En este contexto, evaluamos los niveles de expresión de genes termogénicos característicos de la grasa parda, *Ucp1*, *Pgc1a* y *Cidea* en hembras *lacDrd2KO* y controles *Drd2^{loxP/loxP}* a los 10 meses de edad, intentando dilucidar si la hiperprolactinemia crónica altera la termogénesis inducida por un estrés agudo al frío. Dichos genes se encuentran en constante diálogo para regular la termogénesis observada en el tejido, en particular, *Pgc1a* induce la expresión de *Ucp1* y *Cidea* la inhibe.

Primero, observamos que un estrés agudo por frío en ratones controles, indujo la expresión de *Ucp1* y *Pgc1a*, e inhibió la expresión de *Cidea*, demostrando la activación del programa termogénico en nuestro esquema experimental (Fig. 9). También se observó que la expresión de *Ucp1* está disminuida casi significativamente en las hembras *lacDrd2KO* en

comparación con las hembras control *Drd2^{loxP/loxP}* tanto a los 5 como a los 24 grados (interacción genotipo X temperatura $P=0.90$, efecto simple de genotipo $P=0.06$) (Fig. 9A). Esto, apoyaría la idea desarrollada en estudios previos que señalaban que, en condiciones basales, el modelo hiperprolactinéxico tendría un tejido adiposo pardo con capacidad termogénica reducida, posiblemente asociado al fenotipo de *whitening* del tejido.

Por otro lado, observamos que el efecto frío indujo la expresión de *Ucp1* en forma similar para ambos genotipos (efecto simple de temperatura $P=0.045$)(Fig. 9A).

En cuanto a *Pgc1a*, se observó que frente al estímulo agudo de frío su expresión aumentó de manera significativa en ratones de ambos genotipos (interacción genotipo X temperatura $P=0.045$; *Drd2^{loxP/loxP}* 24 grados vs. *Drd2^{loxP/loxP}* 5 grados $P= 0.000002$, lacDrd2KO 24 grados vs. lacDrd2KO 5 grados, $P= 0.0013$). Pero de forma interesante, la respuesta fue mucho mayor en los animales controles, y las diferencias de expresión entre ambos genotipos a 5 grados fue altamente significativa (*Drd2^{loxP/loxP}* 5 grados vs. LacDrd2KO 5 grados $P=0.0068$) (Fig.9B). Para este gen no se observó efecto genotipo entre las hembras lacDrd2KO y controles *Drd2^{loxP/loxP}* en termoneutralidad. Estos resultados sugieren que en condiciones de doble desafío, hiperprolactinemia y frío la respuesta termogénica del tejido adiposo pardo está disminuida.

En cuanto a los niveles de expresión de *Cidea*, no se observó un efecto genotipo significativo (efecto simple de genotipo, $P=0.17$) con una tendencia a la disminución en animales hiperprolactinéxicos como habíamos demostrado en el laboratorio. Sin embargo, se observó que el estrés por frío disminuyó los niveles de expresión del ARNm de *Cidea* en ambos genotipos (interacción genotipo X temperatura $P=0.82$, efecto simple de temperatura $P= 0.026$). Este efecto de disminución de *Cidea* podría estar relacionado a la activación de la lipólisis en BAT estimulada por el frío (Fig. 9C).

Evaluamos también, los niveles de expresión del *Prlr* y marcadores adipogénicos. El *Prlr* entre otras funciones, promueve la adipogénesis en el tejido adiposo. Si bien no se observan diferencias significativas en los niveles de expresión de dicho gen entre los grupos experimentales como consecuencia de la exposición al frío, se observaron niveles aumentados de ARNm de *Prlr* en hembras lacDrd2KO en comparación con las controles (interacción genotipo X temperatura $P=0.30$, efecto simple de genotipo $P=0.0093$, efecto simple de temperatura $P= 0.74$) (Fig.10A).

Por último, teniendo en cuenta evidencia previa que indica que niveles elevados de prolactina sérica disminuyen la expresión de *Lpl* y adiponectina *in vivo* e *in vitro*, favoreciendo un fenotipo obeso (Pala *et al*, 2016), decidimos evaluar los niveles de expresión de estos marcadores adipogénicos en BAT en respuesta a ambos desafíos. Observamos que los niveles de adiponectina y *Lpl* no presentan diferencias significativas para genotipo o temperatura (Fig.10B y 10C).

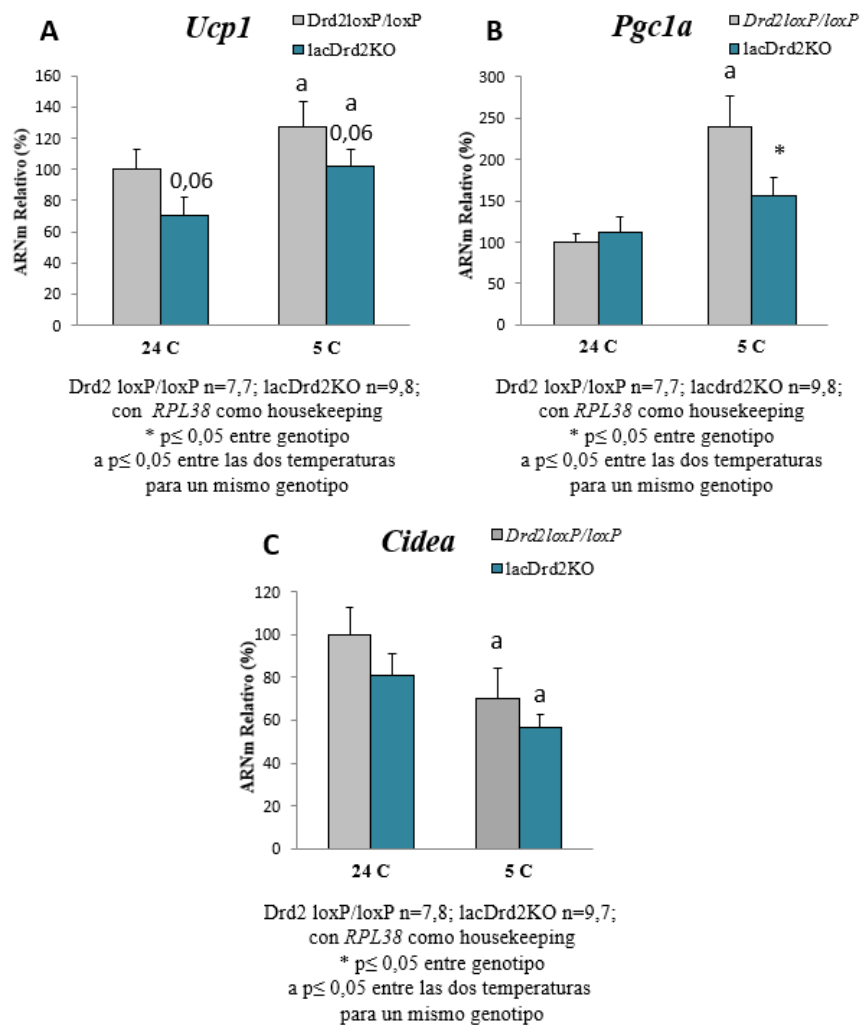


Figura 9: Niveles de ARNm de indicadores termogénicos A) *Ucp1*; B) *Pgc1a*; C) *Cidea*; en ratones hembra *Drd2^{loxP/loxP}* y *lacDrd2KO* de 10 meses de edad expuestos a 24 °C y 5 °C.

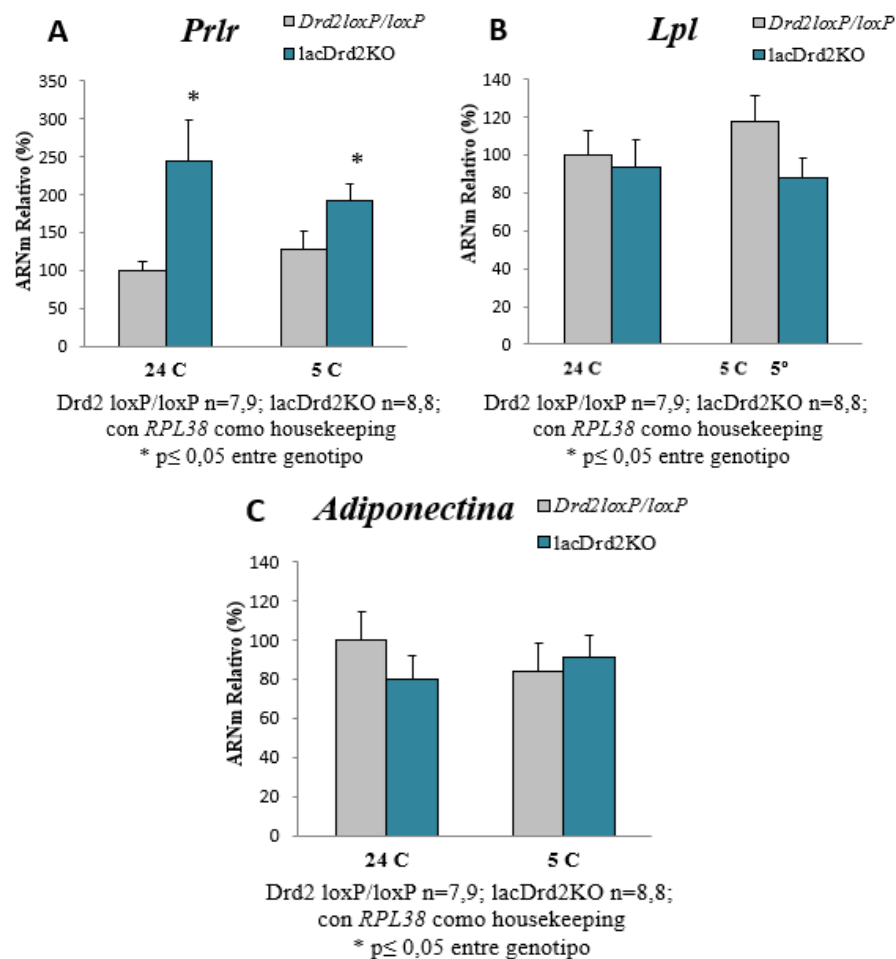


Figura 10: Niveles de ARNm de indicadores adipogénicos A) *Prlr*; B) *Lpl*; C) Adiponectina; en ratones hembra *Drd2*^{loxP/loxP} y lacDrd2KO de 10 meses de edad expuestos a 24 °C y 5 °C.

7.3 Autofagia en respuesta a una exposición aguda a un ambiente frío

A partir de los efectos observados en los marcadores de termogénesis en hembras lacDrd2KO y controles *Drd2*^{loxP/loxP} en tejido adiposo pardo frente a la exposición al frío, decidimos evaluar los niveles de expresión de indicadores de actividad autofágica en el mismo. En la bibliografía se indica que existe una relación inversa entre la capacidad termogénica y la autofagia (Cairo *et al*, 2019). Como demostramos en la Figura 9, en condición de hiperprolactinemia los marcadores de termogénesis se ven disminuidos, sin presentar diferencias significativas en los marcadores de autofagia a los 10 meses.

Por otro lado, el estrés por frío no produjo diferencias significativas en la expresión de los genes autofágicos analizados a diferencia de lo esperado (Fig. 11).

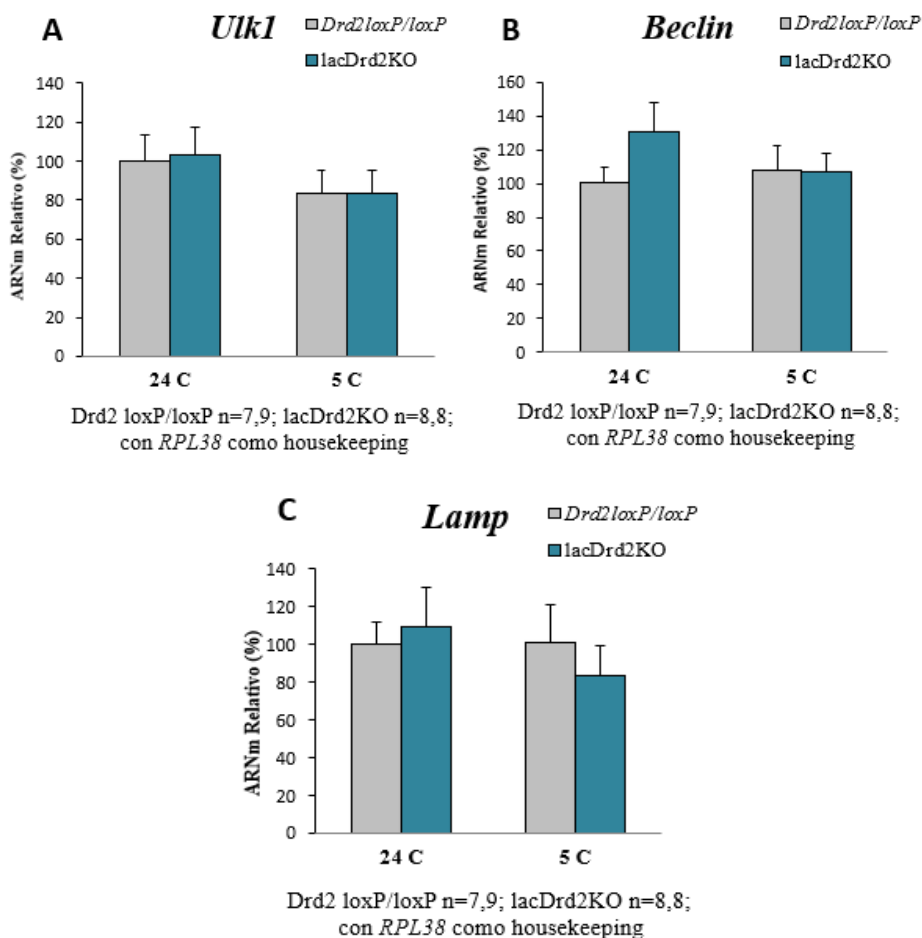


Figura 11: Niveles de ARNm de indicadores autofágicos en BAT A) *Ulk1*; B) *Beclin*; C) *Lamp*; en ratones hembra *Drd2*^{loxP/loxP} y lacDrd2KO de 10 meses de edad expuestos a 24 °C y 5 °C.

7.4 Autofagia en respuesta a una dieta rica en grasas.

Finalmente abordamos el estudio de la expresión de genes autofágicos en tejido adiposo pardo en respuesta a una dieta rica en grasa, también en presencia de normo o hiperprolactinemia de hembras lacDrd2KO y controles *Drd2*^{loxP/loxP}. Estudios previos del laboratorio demostraron que la combinación de los desafíos metabólicos (prolactina y dieta grasa) tuvo gran impacto en el tejido adiposo pardo donde se observó una pérdida de la

capacidad termogénica indicada por un descenso pronunciado de los biomarcadores termogénicos *Ucp1* y *Pgc1α* (Lopez-Vicchi & De Winne, 2021). A partir de muestras de tejido adiposo pardo de animales hembras lacDrd2KO y hembras control *Drd2^{loxP/loxP}* de 5 meses de edad desafiadas a una dieta rica en grasa durante dos meses, decidimos evaluar los niveles de expresión de marcadores autofágicos.

Tanto en el caso de los animales con dieta control como en los alimentados con una dieta grasa se vio que la expresión de *Beclin* como de *Ulk1* esta disminuida en los lacDrd2KO respecto de los *Drd2^{loxP/loxP}*. En respuesta al estímulo de dieta crónica alta en grasas, pudimos observar que *Ulk1* evidenció en ambos genotipos una disminución de su expresión (interacción genotipo X dieta $P=0.73$, efecto simple dieta $P=0.014$). Además, esta disminución fue mayor para las hembras lacDrd2KO que para las *Drd2^{loxP/loxP}* (efecto simple genotipo $P=0.010$) (Fig. 12A). Para *Beclin* la tendencia fue similar, pero no significativa (interacción genotipo X dieta $P=0.42$, efecto simple genotipo $P=0.04$, efecto simple dieta $P=0.10$) (Fig. 12B). La expresión de *Lamp* no se vio modificada ni por dieta ni por genotipo (Fig. 12C).

Decidimos, a continuación, analizar el tejido adiposo pardo histológicamente en forma análoga a lo procedido en el experimento de obesidad. Para ello utilizamos la tinción de hematoxilina-eosina en cortes de tejido adiposo pardo incluido en parafina de hembras lacDrd2KO y *Drd2^{loxP/loxP}* de 5 meses de edad que completaron el protocolo de ingesta de dieta grasa y control.

En cortes de tejido adiposo pardo de hembras control *Drd2^{loxP/loxP}* alimentadas con dieta regular, identificamos la presencia de numerosos adipocitos marrones de citoplasma granulado, cargado de gotas lipídicas de distinto tamaño. Sorprendentemente, encontramos que la exposición a una dieta rica en grasa comercial durante dos meses alteraba la morfología de los depósitos de grasa parda. Particularmente observamos un mayor contenido de lípidos en el tejido, que se evidenciaba por la aparición de abundantes gotas lipídicas de mayor tamaño y por la presencia de adipocitos más grandes. Los adipocitos pardos comienzan a asemejarse más a los adipocitos blancos, sugiriendo un proceso de *whitening* en el tejido.

Asimismo, encontramos que los cortes histológicos de hembras control expuestas a alimentación grasa durante dos meses, tenían un aspecto similar al microscopio óptico que aquellos obtenidos para la grasa parda de hembras lacDrd2KO con alimentación regular evidenciando un efecto del contexto de la alimentación sobre la fisiología del tejido, en presencia de alta prolactina. Más aún, el impacto de la dieta grasa sobre la morfología de la

grasa parda de hembras hiperprolactinémicas profundizó aún más las diferencias observadas respecto de las condiciones control. Los adipocitos parecen ser aun mas grandes al igual que las gotas lipidicas que contienen (Fig. 13)

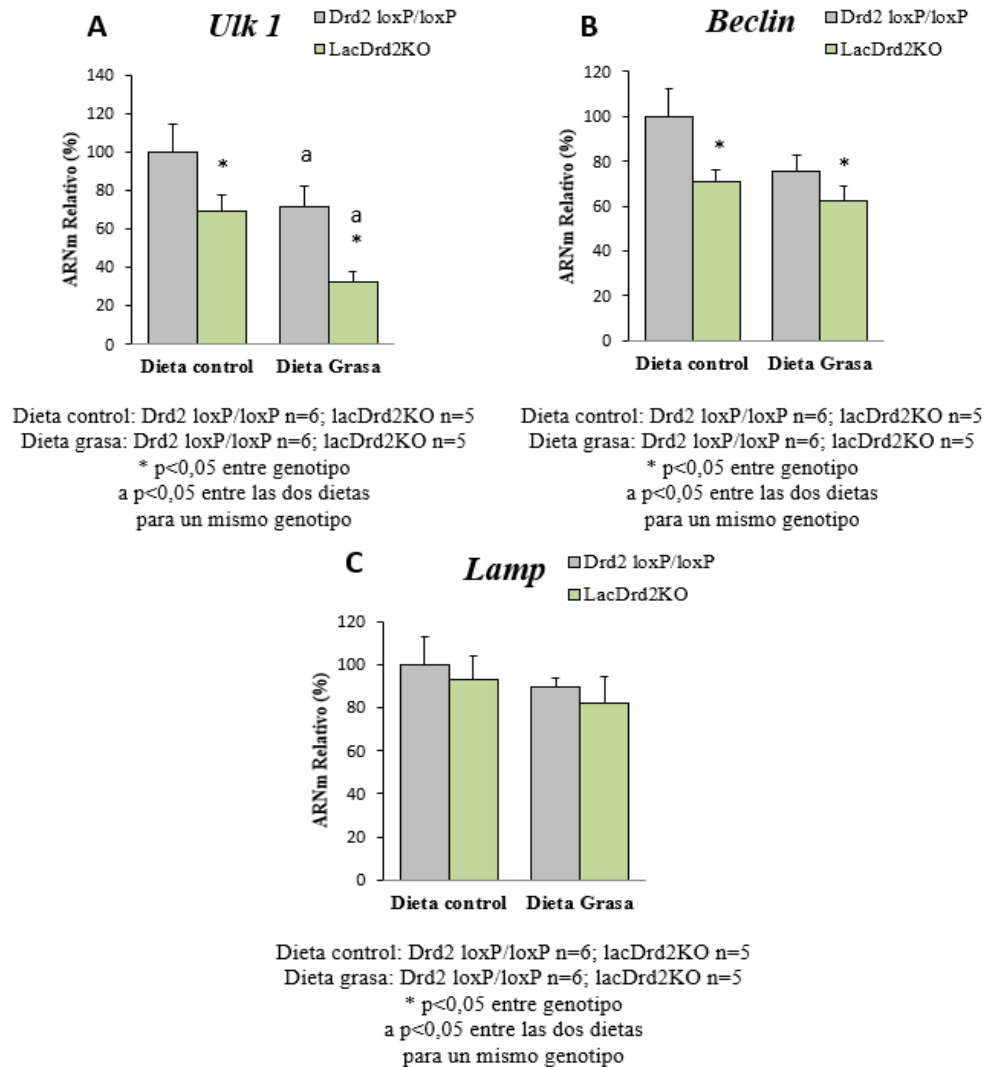


Figura 12: Niveles de ARNm de indicadores autofágicos A) *Ulk1*; B) *Beclin*; C) *Lamp*; en ratones hembra *Drd2^{loxP/loxP}* y *lacDrd2KO* de 5 meses de edad con libre acceso a una dieta regular o dieta rica en grasa (*ad libitum*).

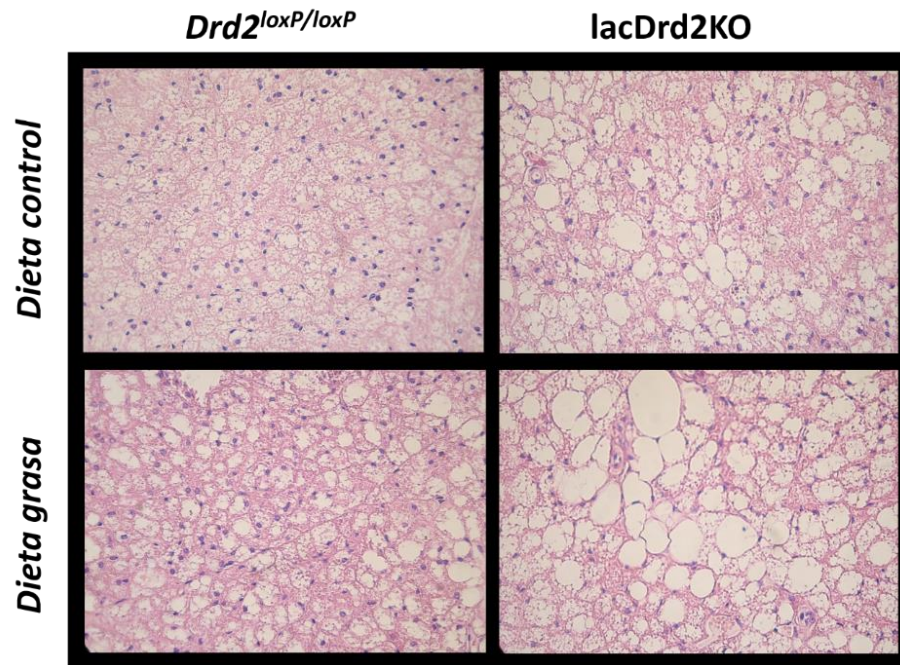


Figura 13: Imágenes representativas tomadas por microscopio óptico de las hematoxilinas eosinas realizadas en cortes de tejido adiposo pardo de la región interescapular de ratones hembra lacDrd2KO y control $Drd2^{loxP/loxP}$ de 5 meses de edad con libre acceso a una dieta regular o dieta rica en grasa comercial (*ad libitum*). En todos los casos, las imágenes fueron obtenidas con un objetivo 40X.

8. Discusión de resultados

La prolactina es una hormona con propiedades únicas. Es inhibida y no estimulada por el hipotálamo, siendo la dopamina, un neurotransmisor y no un péptido, la que ejerce una acción inhibitoria sobre los lactotrofos. Otra característica saliente es la expresión de sus receptores en prácticamente todos los tejidos, lo que sugiere una acción pleiotrópica ejerciendo múltiples funciones complementarias que tienden a regular el metabolismo actuando simultáneamente en distintos órganos. Desde un punto de vista metabólico, el rol orexigénico de la prolactina es crítico durante la preñez y la lactancia, favoreciendo la ingesta y el almacenamiento de lípidos indispensable para cumplir con las necesidades energéticas durante estos dos períodos fisiológicos principales (Grattan *et al*, 2015). Todas estas funciones que resultan adaptativas cuando los niveles de prolactina son los adecuados, pueden alterarse en estados de hiperprolactinemia donde las funciones que son moduladoras o reguladoras, pueden alterar el metabolismo.

En este sentido, la hiperprolactinemia patológica predispone a la obesidad en humanos y podría generar aumento de peso y alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Estudios en hombres y mujeres, demostraron que la presencia de prolactinomas se asocia a una prevalencia más alta a la obesidad y alteraciones metabólicas tales como dislipidemia, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina. Por el contrario, muchas de estas alteraciones se normalizan al bajar los niveles de prolactina con agonistas dopaminérgicos (Ben-Jonathan *et al*, 2006; Berinder *et al*, 2011; Ciresi *et al*, 2013; Doknic *et al*, 2002; Dos Santos Silva *et al*, 2011; Greenman *et al*, 1998; Pala *et al*, 2015; Peric *et al*, 2016).

El tejido adiposo juega un papel fundamental en la regulación del metabolismo energético. La identificación del tejido adiposo como órgano metabólico ha cobrado importancia en los últimos años pues la obesidad se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más graves de este siglo y la disfunción del tejido adiposo es considerada uno de los eventos centrales que inician su desarrollo. En los mamíferos, el tejido adiposo está compuesto esencialmente por el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo que tienen diferente morfología, distribución, perfil de expresión génica y función. El desarrollo de la obesidad depende no solo del equilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético, sino también del equilibrio entre el tejido adiposo blanco, como el principal reservorio de energía, y el tejido adiposo pardo, especializado en el gasto energético gracias a su capacidad termogénica. Puntualmente, el tejido adiposo pardo es uno de los tejidos blanco de la prolactina, entre otras hormonas homeostáticas, que afectan a la termogénesis de BAT actuando directamente sobre el tejido o modulando los sistemas y vías regulatorias que intervienen en el proceso. La actividad del tejido adiposo pardo en modelos de roedores no solo asegura una adaptación adecuada al ambiente frío, sino que la capacidad termogénica de BAT se activa también en respuesta al estrés o dietas ricas en energía.

En este contexto nuestro interés se centró en la desregulación del tejido adiposo pardo cuando la prolactina está crónicamente elevada. Aunque son pocos los modelos experimentales utilizados en la literatura, un modelo de hiperprolactinemia crónica es el ratón lacDrd2KO, desarrollado por nuestro laboratorio, basado en un knockout condicionado con delección del RD2 únicamente en lactotropos. Evidencia previa obtenida en nuestro laboratorio muestra que los ratones hembra lacDrd2KO presentan niveles basales de prolactina superiores a los de las hembras controles *Drd2^{loxP/loxP}* desde el primer mes de vida hasta los 11 meses de edad (Perez-Millan *et al*, 2014).

Con esta herramienta, nuestros objetivos fueron estudiar las acciones metabólicas de la prolactina sobre la función termogénica y autofágica del tejido adiposo pardo frente a estímulos que activan la termogénesis como es una exposición corta a un ambiente frío y una dieta rica en grasas.

En primer lugar, analizamos la capacidad autofágica del BAT de nuestro modelo experimental. La autofagia puede participar en la plasticidad del tejido adiposo pardo activándose o desactivándose dinámicamente, dependiendo del estado termogénico de los adipocitos. Observamos que, a los 5 meses, edad en la cual la ingesta está aumentada pero el ratón no tiene un aumento significativo del peso corporal, los genes autofágicos se encuentran disminuidos en los animales hiperprolactinémicos *lacDrd2KO*, en cambio, a los 10 meses de edad, cuando las hembras *lacDrd2KO* son obesas, los genes autofágicos pierden esta disminución e incluso muestran una tendencia, aunque no significativa, a estar aumentados. Estos resultados sugieren que la prolactina a edades tempranas estimula la expresión de estos genes autofágicos para mantener un metabolismo activo y una adecuada homeostasis metabólica en respuesta al incremento de ingesta. Sin embargo, a los 10 meses de edad, este mecanismo de control de autofagia falla y se perpetúa el fenotipo obeso.

Se ha demostrado que la obesidad está asociada a una reducción de la capacidad termogénica del tejido adiposo pardo (Shimizu *et al*, 2014) y según la bibliografía, la autofagia contribuye a la inactivación de la termogénesis en los depósitos de tejido adiposo, es así que numerosos estudios experimentales en modelos animales demuestran que existe una relación inversa entre la capacidad termogénica y la autofagia (Cairo & Villarroya, 2019). Este efecto podría conducir a una disfunción del tejido adiposo pardo frente al fenotipo obeso, asociado a la pérdida de mitocondrias por mitofagia y, por lo tanto, a un aumento de la acumulación de grandes gotas lipídicas que le otorgan al tejido un fenotipo similar al de los depósitos de tejido adiposo blanco. Este fenómeno conocido como blanqueamiento o *whitening* se observa en la descripción de nuestros cortes histológicos de grasa parda que mostró claras diferencias entre genotipo en lo referido al contenido lipídico. Observamos que la acumulación de lípidos era mayor en las hembras hiperprolactinémicas *lacDrd2KO* que en las hembras control *Drd2^{loxP/loxP}* y que esta diferencia se profundizaba con la edad y el desarrollo de la obesidad.

Habiendo determinado una alteración en el metabolismo energético de lenta aparición en los ratones hembra *lacDrd2KO* y teniendo en cuenta los resultados anteriores que evidencian una relación inversa entre la autofagia y termogénesis, decidimos someter nuestro

modelo animal a un desafío adicional a los niveles altos de prolactina. En este contexto, expusimos a las hembras hiperprolactinémicas de 10 meses de edad a un ambiente frío (4-6 °C) durante 4 horas, y otro grupo fue mantenido en el bioterio a 24 °C. Nuestro objetivo era evaluar si los altos niveles de prolactina interferían con la respuesta termogénica o autofágica del BAT frente a la exposición al estímulo de frío.

Se sabe que la prolactina estimula la expresión de su propio receptor, por lo que la hiperprolactinemia previamente demostrada en hembras *lacDrd2KO* concuerda con el aumento que se observó en los niveles de expresión de su receptor *Prlr*, lo que podría indicar una acción aumentada de la prolactina sobre el BAT. Por este motivo, decidimos evaluar la expresión de los genes característicos de la grasa parda, que se encuentran en constante diálogo para regular la capacidad termogénica. Nuestra decisión se basó en la evidencia previa que muestra que existe una estrecha asociación entre la prolactina y la regulación del balance energético. Se han identificado *Prlr* funcionales en tejido adiposo tanto blanco como pardo, que son esenciales en la adipogénesis y en la termogénesis adaptativa (Viengchareun *et al*, 2008). Se ha observado que durante la lactancia, cuando los niveles de prolactina son elevados, disminuyen los niveles de expresión de genes termogénicos en el tejido adiposo pardo (*Krol et al*, 2011) indicando una asociación negativa entre la prolactina y la capacidad termogénica de este tejido. En concordancia con lo que se ha descrito en bibliografía sobre el rol de la prolactina en la grasa parda encontramos que el efecto del doble desafío: hiperprolactinemia y frío, resultó en una evidente disminución en la expresión *Pgc1α*, mientras que no se observaron cambios significativos en la expresión de *Ucp1*. El coactivador transcripcional *Pgc1α* juega un papel crucial en la regulación de la termogénesis inducida por frío en el tejido adiposo pardo (Puigserver *et al*, 1998). Frente a la exposición a bajas temperaturas, se une y coactiva a numerosos factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo de ácidos grasos, entre ellos el *Ucp1* (Chang *et al*, 2018). Esto podría explicar en parte por qué el efecto fue claro para *Pgc1α*, pero no llegó a evidenciarse en *Ucp1*. Este resultado demuestra que, si bien, frente al estrés por frío se activa la maquinaria termogénica, la prolactina interfiere en este mecanismo. Esto conllevaría a que la capacidad termogénica del BAT se vea disminuida y, por lo tanto, en línea con evidencia previa, se demuestra que altos niveles de prolactina favorecerían al desarrollo de obesidad. (Lopez-Vicchi *et al*, 2020b).

Por otro lado, *Cidea* es la primera proteína caracterizada en el tejido adiposo pardo capaz de modular la actividad de *Ucp1* y potencialmente ser responsable de contribuir al desarrollo de la obesidad y diabetes (Zhou *et al*, 2003). Cuando evaluamos los niveles de expresión de *Cidea*, encontramos que el estrés por frío disminuyó los niveles de expresión de ARNm de *Cidea* en ambos genotipos. Como mencionamos anteriormente, dado que se ha demostrado que la deficiencia de *Cidea* aumenta la lipólisis en BAT (Zhou *et al*, 2003), se podría especular que la reducción de *Cidea* también contribuye al aumento de la lipólisis en el BAT estimulado por el frío. Estos resultados coinciden con lo observado en el estudio de Jia, R. *et al*. donde se aislaron gotas lipídicas del tejido adiposo pardo de ratones expuestos a un estímulo de frío durante 4, 24, 48 y 72 h. Paradójicamente, algunos, pero no todos (Jia, R. *et al*, 2016) los estudios han informado un aumento de la expresión de *Cidea* en BAT después de la exposición al frío (Barbatelli *et al*, 2010, Wang *et al*, 2013) y otros estudios no han observado cambios en la expresión de *Cidea* frente al estímulo, pero sí han observado aumento en la expresión proteica de la misma dejando en evidencia que en los depósitos de grasa parda, los niveles de expresión de *Cidea* no se correlacionaron con el estado de reclutamiento termogénicos de los adipocitos pardos (Yu J. *et al*, 2015; Alexander W *et al*, 2017). Aunque las razones de estas observaciones discordantes siguen sin estar claras, es probable que se atribuyan a diferencias en el protocolo de estimulación con frío o a los diferentes géneros y cepas de ratones utilizados.

Por otra parte, observamos que los marcadores adipogénicos *Lpl* y adiponectina no presentaron diferencias en su expresión frente al estímulo de frío. La lipoproteína lipasa (*Lpl*) es la enzima limitante de la velocidad para la absorción y el almacenamiento de ácidos grasos libres en el tejido adiposo. Los ácidos grasos necesarios pueden provenir de fuentes externas, como ácidos grasos libres en circulación o triglicéridos transportados por lipoproteínas (quilomicrones, VLDL o LDL) que, en este caso, deben ser previamente hidrolizados por la enzima *Lpl* presente en el adipocito para poder ser incorporados (Proenca *et al*, 2014). Por su parte, la adiponectina es una hormona sintetizada por el tejido adiposo y liberada a circulación, que regula la homeostasis energética actuando como mensajero importante en el diálogo entre el tejido adiposo y otros tejidos u órganos metabólicos. Es importante destacar que los niveles de expresión y séricos de adiponectina se encuentran disminuidos en pacientes, cerdos y roedores obesos, y se demostró que esto se asocia a mecanismos de regulación de la homeostasis energética alterados (Fang & Judd, 2018). Toda

esta evidencia sugiere que la adiponectina puede actuar como un factor endocrino / paracrino / autocrino que previene la progresión hacia un fenotipo obeso (Nigro *et al*, 2014). Al igual que en estudios previos, (Puerta M. *et al*, 2002) se observa un efecto muy modesto sobre los niveles de ARNm lo que podría sugerir que estas hormonas no estarían implicadas en las extensas adaptaciones metabólicas al frío, al menos en términos de las primeras respuestas o alternativamente, el estímulo de frío aplicado en este experimento no fue suficiente para alterar la expresión de estos genes.

En el contexto de los resultados obtenidos de la expresión de genes termogénicos, evaluamos los niveles de expresión de indicadores de actividad autofágica. Cairo *et al*. informaron por primera vez que la represión de la autofagia es un componente de la respuesta celular de los adipocitos pardos a la activación termogénica. Este efecto represivo de los estímulos noradrenérgicos está mediado por AMPc y la activación de quinasas intracelulares posteriores, principalmente PKA. Esto indica que la represión de la autofagia está estrecha y recíprocamente relacionada con la activación termogénica de los adipocitos pardos, ya que ambos procesos comparten vías de regulación intracelulares similares (Cairo *et al*, 2016). Sin embargo, observamos que la expresión de los genes autofágicos analizados no se vió afectada por el estímulo de frío demostrando que, a tiempos cortos de estímulo, la autofagia no participaría en la respuesta a ambos desafíos.

Se ha observado que estímulos tales como una dieta hipercalórica en forma aguda promueven la aparición de tejido adiposo pardo termogénicamente activo (Rothwell & Stock, 1997). Por el contrario, en ratas la ausencia de alimentación hipercalórica conduce a la atrofia de los depósitos de tejido con capacidad termogénica (Villarroya *et al*, 1986). Sin embargo, en trabajos previos de nuestro laboratorio se desafiaron hembras hiperprolactinémicas de 5 meses de edad a un estímulo de dieta rica en grasa en forma crónica y se observó una capacidad termogénica reducida en presencia de hiperprolactinemia (Lopez-Vicchi & De Winne, 2021). En el análisis histológico de tejidos de hembras lacDrd2KO y controles *Drd2^{loxP/loxP}* observamos a que la exposición a una dieta rica en grasa comercial durante dos meses altera la morfología de los depósitos de grasa parda, observando un marcado *whitening* del tejido. A partir de lo encontrado, era de nuestro interés evaluar la capacidad autofágica frente a estas condiciones.

Si bien no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de los indicadores de actividad autofágica *Beclin* y *Lamp* entre los grupos experimentales,

observamos diferencias en el patrón de expresión de *Ulk1*, proteína que media la iniciación de la formación del autofagosoma. La dieta grasa tendía a disminuir la expresión de *Ulk1* en ambos genotipos, lo que sugiere un posible impacto negativo de la dieta sobre la inducción del proceso autofágico. Este efecto podría significar que el tejido adiposo pardo frente a un estímulo de dos meses de dieta rica en grasa no pierde aún su función, sino que se encontraría activo y tratando de compensar la sobrecarga calórica inducida por la dieta.

9. Conclusiones

Los resultados obtenidos nos permiten comprobar la hipótesis planteada ya que pudimos observar que la combinación de los desafíos metabólicos prolactina y exposición aguda a un ambiente frío, tuvo un gran impacto en el tejido adiposo pardo. Por un lado, el contexto hiperprolactinéxico interfiere en la activación de la maquinaria termogénica frente al estímulo de frío. Además, demostramos que los altos niveles de prolactina, en etapas tempranas modula la expresión de genes autofágicos manteniendo la homeostasis del BAT en una etapa en que la ingesta está aumentada, pero luego, esta regulación disminuye a medida que el animal hiperprolactinéxico desarrolla un fenotipo obeso a los 10 meses de edad. Por otro lado, demostramos que el tejido adiposo pardo frente a un estímulo de dos meses de dieta rica en grasa no pierde totalmente su función y regulación debido que se observa una disminución en marcadores autofágicos lo que permitiría proteger contra la obesidad inducida por dieta.

Nuestros resultados no solo destacan el rol metabólico de la prolactina en el tejido adiposo pardo, sino que demuestran que los altos niveles de prolactina intervienen en la activación de la maquinaria termogénica del tejido actuando a nivel de la expresión de genes termogénicos y autofágicos, favoreciendo al fenotipo obeso que se observa en los animales hiperprolactinéxicos *lacDrd2KO* en condiciones basales y estimuladas del tejido.

10. Bibliografía

Alexander W. Fischer, Irina G. Shabalina, Charlotte L. Mattsson, Gustavo Abreu-Vieira, Barbara Cannon, Jan Nedergaard, Natasa Petrovic 2017 UCP1 inhibition in Cidea-overexpressing mice is physiologically counteracted by brown adipose tissue hyperrecruitment. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 312 1, E72-E87

Altshuler-Keylin S, Shinoda K, Hasegawa Y, Ikeda K, Hong H, Kang Q, Yang Y, Perera R M, Debnath J & Kajimura S 2016 Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metabolism* 24 402-419.

Ashrafi G & Schwarz T L 2013 The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* 20 31-42.

Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J.P., De Matteis, R. & Cinti, S. 2010 The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E1244–E1253

Bartke A, Hascup E, Hascup K & Masternak M M 2021 Growth Hormone and Aging: New Findings. *World J Mens Health*.

Bartness T J, Liu Y, Shrestha Y B & Ryu V 2014 Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. *Front Neuroendocrinol* 35 473-493.

Ben Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD & LaPensee CR 2006 Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 17 110-116.

Ben Jonathan N & Hnasko R 2001 Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine reviews* 22 724-763.

Ben Jonathan N, LaPensee C R & LaPensee E W 2008 What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine reviews* 29 1-41.

Ben Jonathan N, Mershon J L, Allen D L & Steinmetz R W 1996 Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine reviews* 17 639-669.

Ben Jonathan N, Neill M A, Arbogast L A, Peters L L & Hofer M T 1980 Dopamine in hypophysial portal blood: relationship to circulating prolactin in pregnant and lactating rats. *Endocrinology* 106 690-696.

Bento C F, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, Menzies F M & Rubinsztein D C 2016 Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu Rev Biochem* 85 685-713.

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

Brelje T C, Parsons J A & Sorenson R L 1994 Regulation of islet beta-cell proliferation by prolactin in rat islets. *Diabetes* 43 263-273.

Brooks C L 2012 Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocrine reviews* 33 504-525.

Cairo M, Campderros L, Gavalda-Navarro A, Cereijo R, Delgado-Angles A, Quesada-Lopez T, Giralt M, Villarroya J & Villarroya F 2019 Parkin controls brown adipose tissue plasticity in response to adaptive thermogenesis. *EMBO Rep* 20.

Cairo M, Villarroya J, Cereijo R, Campderros L, Giralt M & Villarroya F 2016 Thermogenic activation represses autophagy in brown adipose tissue. *International Journal of Obesity (London)* 40 1591-1599.

Cannon B, Houstek J & Nedergaard J 1998 Brown adipose tissue. More than an effector of thermogenesis? *Annals New York Academy of Sciences* 856 171-187.

Cannon B & Nedergaard J 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84 277-359.

Carre N & Binart N 2014 Prolactin and adipose tissue. *Biochimie* 97 16-21.

Castano J P & Frawley L S 1995 Individual lactotropes release prolactin in a temporally divergent and sexually dimorphic pattern. *Am J Physiol* 269 E814-E819.

Chang JS, Ghosh S, Newman S & Salbaum JM 2018 A map of the PGC-1alpha- and NT-PGC-1alpha-regulated transcriptional network in brown adipose tissue. *Sci.Rep.* 8 7876.

Cherra S J, III, Kulich S M, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day B W & Chu C T 2010 Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *Journal of Cell Biology* 190 533-539.

Choi A M, Ryter S W & Levine B 2013 Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 368 651-662.

Darcy J & Tseng Y H 2019 ComBATing aging-does increased brown adipose tissue activity confer longevity? *Geroscience* 41 285-296.

Desautels M & Himms-Hagen J 1980 Parallel regression of cold-induced changes in ultrastructure, composition, and properties of brown adipose tissue mitochondria during recovery of rats from acclimation to cold. *Can J Biochem* 58 1057-1068.

Diaz-Torga G, Feierstein C, Libertun C, Gelman D, Kelly M A, Low M J, Rubinstein M & Becu-Villalobos D 2002 Disruption of the D2 dopamine receptor alters GH and IGF-I secretion and causes dwarfism in male mice. *Endocrinology* 143 1270-1279.

Doknic M, Pekic S, Zarkovic M, Medic-Stojanoska M, Dieguez C, Casanueva F & Popovic V 2002a Dopaminergic tone and obesity: an insight from prolactinomas treated with bromocriptine. *European Journal of Endocrinology* 147 77-84.

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

Fang H & Judd RL 2018 Adiponectin Regulation and Function. *Compr. Physiol* 8 1031-1063.

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

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

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

Galic S, Oakhill J S & Steinberg G R 2010 Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology* 316 129-139.

Garcia-Ruiz E, Reynes B, Diaz-Rua R, Ceresi E, Oliver P & Palou A 2015 The intake of high-fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in white adipose tissue. *International Journal of Obesity (London)* 39 1619-1629.

Giordano A, Frontini A, Castellucci M & Cinti S 2004 Presence and distribution of cholinergic nerves in rat mediastinal brown adipose tissue. *J Histochem Cytochem* 52 923-930.

Gospodarska E, Nowialis P & Kozak L P 2015 Mitochondrial turnover: a phenotype distinguishing brown adipocytes from interscapular brown adipose tissue and white adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry* 290 8243-8255.

Gouon-Evans V & Pollard J W 2002 Unexpected deposition of brown fat in mammary gland during postnatal development. *Molecular Endocrinology* 16 2618-2627.

Grattan D R 2015 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *Journal of Endocrinology* 226 T101-T122.

Greenman Y, Tordjman K & Stern N 1998 Increased body weight associated with prolactin secreting pituitary adenomas: weight loss with normalization of prolactin levels. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 48 547-553.

Halasz B 2000 The Hypothalamus as an Endocrine Organ: The Science of Neuroendocrinology. In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, edn 1, pp 3-21. Eds M Conn & ME Freeman. Totowa, New Jersey: Humana Press.

Jia, R., Luo, X. Q., Wang, G., Lin, C. X., Qiao, H., Wang, N., Yao, T., Barclay, J. L., Whitehead, J. P., Luo, X., & Yan, J. Q. 2016 Characterization of cold-induced remodelling reveals depot-specific differences across and within brown and white adipose tissues in mice. *Acta physiologica* 217(4) 311-324.

Jimenez-Preitner M, Berney X, Uldry M, Vitali A, Cinti S, Ledford J G & Thorens B 2011 Plac8 is an inducer of C/EBPbeta required for brown fat differentiation, thermoregulation, and control of body weight. *Cell Metabolism* 14 658-670.

Kelly, M. A., Rubinstein, M., Asa, S. L., Zhang, G., Saez, C., Bunzow, J. R., Allen, R. G., Hnasko, R., Ben-Jonathan, N., Grandy, D. K., & Low, M. J. 1997 Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron* 19(1), 103–113.

Kozak L P 2010 Brown fat and the myth of diet-induced thermogenesis. *Cell Metabolism* 11 263-267.

Krol E, Martin SA, Huhtaniemi IT, Douglas A & Speakman JR 2011 Negative correlation between milk production and brown adipose tissue gene expression in lactating mice. *J.Exp.Biol.* 214 4160-4170.

Kurylowicz A & Puzianowska-Kuznicka M 2020 Induction of Adipose Tissue Browning as a Strategy to Combat Obesity. *International Journal of Molecular Sciences* 21 6241.

Lamberts S W J & MacLeod R M 1990 Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* 70 279-318.

Leitner B P, Huang S, Brychta R J, Duckworth C J, Baskin A S, McGehee S, Tal I, Dieckmann W, Gupta G, Kolodny G M et al. 2017 Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proceedings of the National Academy of Science* 114 8649-8654.

Levine B & Kroemer G 2008 Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132 27-42.

Li L, Tan J, Miao Y, Lei P & Zhang Q 2015 ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cell Mol Neurobiol* 35 615-621

Lopez-Vicchi F*, De Winne C*, Ornstein A M, Sorianello E, Toneatto J, Becu-Villalobos D. 2021 Hyperprolactinemia aggravates high fat diet-induced weight gain, brown adipose tissue whitening, and glucose intolerance. En revisión

Lopez-Vicchi F, Ladyman S R, Ornstein A M, Gustafson P, Knowles P, Luque G M, Grattan D R & Becu-Villalobos D 2020a Chronic high prolactin levels impact on gene expression at discrete hypothalamic nuclei involved in food intake. *The FASEB Journal* 34 3902-3914.

Lopez-Vicchi, F., De Winne, C., Brie, B., Sorianello, E., Ladyman, S. R., & Becu-Villalobos, D. 2020b Metabolic functions of prolactin: Physiological and pathological aspects. *Journal of neuroendocrinology* 3211 e12888.

Luque G M, Lopez-Vicchi F, Ornstein A M, Brie B, De Winne C, Fiore E, Perez-Millan M I, Mazzolini G, Rubinstein M & Becu-Villalobos D 2016 Chronic hyperprolactinemia evoked by disruption of lactotrope dopamine D2 receptors impacts on liver and adipocyte genes related to glucose and insulin balance. *American Journal of Physiology (Endocrinology and Metabolism)* 311 E974-E988.

Marin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, Holm G, Sjostrom L & Bjorntorp P 1992 The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism* 41 1242-1248.

Martinez-Lopez N, Garcia-Macia M, Sahu S, Athonvarangkul D, Liebling E, Merlo P, Cecconi F, Schwartz G J & Singh R 2016 Autophagy in the CNS and Periphery Coordinate Lipophagy and Lipolysis in the Brown Adipose Tissue and Liver. *Cell Metabolism* 23 113-127.

Mavrakis M, Lippincott-Schwartz J, Stratakis C A & Bossis I 2007 mTOR kinase and the regulatory subunit of protein kinase A (PRKAR1A) spatially and functionally interact during autophagosome maturation. *Autophagy* 3 151-153.

Melmed S 2003 Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *Journal of Clinical Investigation* 112 1603-1618.

Mizushima N, Levine B, Cuervo A M & Klionsky D J 2008 Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451 1069-1075.

Moreno-Carranza B, Bravo-Manriquez M, Baez A, Ledesma-Colunga M G, Ruiz-Herrera X, Reyes-Ortega P, Los Rios E A, Macotela Y, Martinez d l E & Clapp C 2018 Prolactin regulates liver growth during postnatal development in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 314 R902-R908.

Nakamura K & Morrison S F 2011 Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. *J Physiol* 589 3641-3658.

Nazarko VY & Zhong Q 2013 ULK1 targets Beclin-1 in autophagy. *Nat. Cell Biol.* 15 727-728.

Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, Bianco A & Daniele A 2014 New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *Biomed.Res.Int.* 658913.

Noain D, Perez-Millan M I, Bello E P, Luque G M, Casas C R, Gelman D M, Peper M, Tornadu I G, Low M J, Becu-Villalobos D et al. 2013 Central dopamine D2 receptors regulate growth-hormone-dependent body growth and pheromone signaling to conspecific males. *Journal of Neurosciences* 33 5834-5842.

Pala NA, Laway BA, Misgar RA & Dar RA 2015 Metabolic abnormalities in patients with prolactinoma: response to treatment with cabergoline. *Diabetol.Metab Syndr.* 7 99.

Pala NA, Laway BA, Misgar RA, Shah ZA, Gojwari TA & Dar TA 2016 Profile of leptin, adiponectin, and body fat in patients with hyperprolactinemia: Response to treatment with cabergoline. *Indian J.Endocrinol.Metab* 20 177-181.

Patel H V, Freeman K B & Desautels M 1987 Selective loss of uncoupling protein mRNA in brown adipose tissue on deacclimation of cold-acclimated mice. *Biochem Cell Biol* 65 955-959.

Perez-Millan M I, Luque G M, Ramirez M C, Noain D, Ornstein A M, Rubinstein M & Becu-Villalobos D 2014 Selective disruption of dopamine d2 receptors in pituitary lactotropes increases body weight and adiposity in female mice. *Endocrinology* 155 829-839.

Perkins A, Fitzgerald J A & Price E O 1992 Luteinizing hormone and testosterone response of sexually active and inactive rams. *J Anim Sci* 70 2086-2093.

Petryk A, Fleenor D, Driscoll P & Freemark M 2000 Prolactin induction of insulin gene expression: the roles of glucose and glucose transporter-2. *Journal of Endocrinology* 164 277-286.

Proenca AR, Sertie RA, Oliveira AC, Campana AB, Caminhotto RO, Chimin P & Lima FB 2014 New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 47 192-205.

Puerta M, Abelenda M, Rocha M, Trayhurn P. Effect of acute cold exposure on the expression of the Adiponectin, Resistin and Leptine genes in rat white and brown adipose tissues 2002. *Horm Metab Res.* 34 629-634

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M & Spiegelman BM 1998 A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92 829-839.

Rothwell N J & Stock M J 1997 A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Obesity Research* 5 650-656.

Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Conroe H M, Erdjument-Bromage H et al. 2008 PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454 961-967.

Sharma B K, Patil M & Satyanarayana A 2014 Negative regulators of brown adipose tissue (BAT)-mediated thermogenesis. *J Cell Physiol* 229 1901-1907.

Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, Maruyama S & Walsh K 2014 Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J.Clin.Invest* 124 2099-2112.

Singh R & Cuervo A M 2012 Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Int J Cell Biol* 2012 282041.

Sinha Y N & Sorenson R L 1993 Differential effects of glycosylated and nonglycosylated prolactin on islet cell division and insulin secretion. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 203 123-126.

Taylor D & Gottlieb R A 2017 Parkin-mediated mitophagy is downregulated in browning of white adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 25 704-712.

Timmons J A, Wennmalm K, Larsson O, Walden T B, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton D L, Gimeno R E, Wahlestedt C, Baar K et al. 2007 Myogenic gene expression signature

establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Science* 104 4401-4406.

Tovar S & Dieguez C 2014 Prolactin and energy homeostasis: pathophysiological mechanisms and therapeutic considerations. *Endocrinology* 155 659-662.

Townsend K L & Tseng Y H 2014 Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends of Endocrinology and Metabolism* 25 168-177.

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

Villarroya F, Felipe A & Mampel T 1986 Brown adipose tissue activity in hypocaloric-diet fed lactating rats. *Bioscience Reports* 6 669-675.

Walden T B, Timmons J A, Keller P, Nedergaard J & Cannon B 2009 Distinct expression of muscle-specific microRNAs (myomirs) in brown adipocytes. *J Cell Physiol* 218 444-449.

Wang, Q.A., Tao, C., Gupta, R.K. & Scherer, P.E. 2013 Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* 10 1338– 1344.

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

Wu J, Bostrom P, Sparks L M, Ye L, Choi J H, Giang A H, Khandekar M, Virtanen K A, Nuutila P, Schaart G et al. 2012 Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150 366-376.

Yu, J., Zhang, S., Cui, L., Wang, W., Na, H., Zhu, X., ... Liu, P. 2015 Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(5) 918–928.

Zechner R, Madeo F & Kratky D 2017 Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 671-684.

Zhou, Zhihong & Toh, Shen & Chen, Zhengming & Guo, Ke & Ng, Chee & Ponniah, Sathivel & Lin, Sheng-Cai & Hong, Wanjin & Li, Peng 2003 Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nature genetics*. 35 49-56.