



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

Campus Celaya-Salvatierra

División de Ciencias de la Salud e Ingenierías

**LA AUSENCIA DEL RECEPTOR DE PROLACTINA
FAVORECE AL DESARROLLO DE HIGADO GRASO EN
RATONES ALIMENTADOS CON UNA DIETA
OBESOGÉNICA.**

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciada en Nutrición

Presenta:

Viridiana Tinoco Pantoja

Director:

Dra. Yazmín Macotela Guzmán

Codirector:

Dra. Sandra Neli Jiménez García

Celaya, Gto

Noviembre de 2018.



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

Campus Celaya-Salvatierra

División de Ciencias de la Salud e Ingenierías

La ausencia del receptor de prolactina favorece al desarrollo de hígado graso en ratones alimentados con una dieta obesogénica.

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciada en nutrición

Presenta:

Viridiana Tinoco Pantoja

Director:

Dra. Yazmín Macotela Guzmán.

Codirector:

Dra. Sandra Neli Jiménez García

Celaya, Gto. Noviembre de 2018

SINODALES

Dra. Xóchitl Sofía Ramírez Gómez

Presidente

Firma

Dr. Vicente Campos Beltrán

Secretario

Firma

Dra. Silvia del Carmen Delgado Sandoval

Vocal

Firma

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección de la Dra. Yazmín Macotela Guzmán. El trabajo fue financiado por los donativos del programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN209518 e IN203915, que incluyó una beca de licenciatura otorgada para la realización de esta tesis.

i. Dedicatorias

A mi madre, María Elena: mi gratitud hacia ti es infinita, mamá. Te agradezco por acompañarme en todo momento, incluso en distancia, siempre llenándome de tu dulce amor de madre, amiga y compañera.

A mi padre, Leonel: por ser mi guía, mi soporte y aliento; por apoyarme y darme fuerzas para caminar. Por abrigarme con tu protección y cariño.

A mi hermano, Alberto: mi mejor amigo y hermano de otra madre. Por estar ahí cada día, por alegrarme siempre con tu buen humor y tu compañía.

A mis amigas y colegas Cristina, Paulina y Mónica: por su amistad incondicional, por los buenos momentos colmados en risas, regaños y consejos.

A Diana y María: por mostrarme lo sincera que puede llegar a ser una amistad, por darme ánimos, llorar y reír conmigo.

A mi familia: por darme la dicha de crecer rodeada de amor, por apoyarme y alentarme a seguir.

A Dra. Yazmín Macotela: porque esto fue posible gracias a su dedicación y amor por la ciencia.

ii. Agradecimientos

A la Universidad de Guanajuato: por ser mi alma mater, por darme alojamiento en sus aulas, por darme herramientas para crecer y fomentar mi formación profesional y humana.

Dra. Yazmín Macotela Guzmán: le agradezco haberme abierto las puertas y recibirme calurosa, por el apoyo que me brindó desde el inicio, por tenerme fe y confianza, por guiarme en el desarrollo de este proyecto, por su tiempo y paciencia. Por estimularme a crecer mostrándome en usted un ejemplo de dedicación y amor a la ciencia.

Dra. Ericka A. de los Ríos Arellano: por enseñarme siempre paciente y humilde, por tu trato noble y responder siempre comprensiva.

Dra. Xarubet Ruiz Herrera: por todo el apoyo, por ayudarme a aprender y siempre ofrecerme ayuda para resolver mis dudas.

LN. Fernando López Barrera: gracias por darme tu amistad, por los kilos extra gracias al pan de las mañanas, por siempre ofrecerme un oído y apoyo. Gracias.

Dra. Carmen Clapp y miembros de los laboratorios A-14 y A-15: por darme la oportunidad de ser un integrante de su equipo y aprender algo de cada uno de ustedes.

Dra. Sandra Neli Jiménez: por ser mi profesora y ayudarme en el desarrollo de mi carrera como profesional y en este proyecto.

iii. RESUMEN

La obesidad es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades metabólicas, entre las que destaca la Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA). La alimentación materna obesogénica favorece el desarrollo de EHGNA en sus crías y se asocia con la reducción de los niveles de prolactina (PRL) en la leche materna. La hormona PRL es un regulador clave en el proceso de lactancia, ejerce efectos en el metabolismo y favorece la sensibilidad hepática a la insulina en adultos, y estimula la proliferación de hepatocitos en la etapa postnatal. En este estudio se evaluó si la ausencia de las acciones de la PRL favorece el desarrollo de EHGNA en crías de ratones lactantes carentes del receptor de PRL (Prlr^{-/-}) o silvestres (Prlr^{+/+}), alimentados durante la lactancia por madres en dieta control (DC) o dieta obesogénica (DO). Encontramos que al finalizar la lactancia los ratones Prlr^{-/-} con DO presentaron un incremento mayor en el peso del hígado en comparación con los Prlr^{+/+}. Asimismo, los ratones Prlr^{-/-} presentaron mayor acumulación de triglicéridos que los animales Prlr^{+/+} alimentados con DC. Además, se observó una respuesta alterada en la expresión de genes del metabolismo hepático de lípidos en los ratones Prlr^{-/-} en DC y DO en comparación con ratones Prlr^{+/+}. Nuestros resultados demuestran que la falta de la señalización de PRL favorece el desarrollo de alteraciones metabólicas en el hígado de crías lactantes, resaltando la importancia de la PRL en el metabolismo hepático de las crías durante la etapa postnatal.

Palabras clave: hígado graso, prolactina, metabolismo, lactancia, dieta obesogénica, ratones Prlr^{-/-}

SUMMARY

Obesity is a major risk factor for the development of metabolic diseases, including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Maternal high fat diet is associated with reduced prolactin (PRL) levels in the milk of lactating rats, and this decrease favors the development of metabolic alterations in their offspring, including NAFLD. The hormone PRL is a key regulator in the lactation process, exerts effects on metabolism, promotes hepatic insulin sensitivity in adults, and proliferation of hepatocytes in the postnatal stage. In this study was evaluated whether the absence of PRL action favors the development of NAFLD in suckling pups from mothers fed a control or an obesogenic diet. We used lactating C57BL/6 mice lacking PRL receptor (Prlr^{-/-}) or wild type (Prlr^{+/+}) nursed during lactation by mothers that were fed a control diet (CD) or an obesogenic diet (OD). We found that at the end of lactation Prlr^{-/-} mice in DO showed a greater increase in liver weight compared to Prlr^{+/+}. Also, Prlr^{-/-} mice had higher triglyceride accumulation than Prlr^{+/+} animals fed DC. Moreover, Prlr^{-/-} mice in CD and DO showed an altered expression of hepatic lipid metabolism genes compared to Prlr^{+/+} mice. Our results demonstrate that lack of PRL signaling favors the development of metabolic alterations in the liver of lactating mice, and thus highlights that PRL has an important role in hepatic metabolism in nursing offspring.

Key words: Fatty liver, prolactin, metabolism, lactation, obesogenic diet, Prlr^{-/-} mice

iv. ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	3
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
IV. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL	5
4.1 Obesidad: definición y prevalencia.....	5
4.1.1 Diagnóstico de sobrepeso y obesidad	6
4.1.2 Principales comorbilidades de la obesidad.....	7
4.1.3 Disfunción del tejido adiposo como causa de alteraciones metabólicas	8
4.2 Hígado: estructura y función	9
4.2.1 Hígado y metabolismo de lípidos.....	12
4.3 Esteatosis hepática no alcohólica.....	13
4.3.1 Prevalencia y diagnóstico de EHGNA.....	15
4.3.2 Patogénesis de EHGNA	16
4.4 Desarrollo de EHGNA en el embarazo y la lactancia	18
4.5 Prolactina: generalidades	20
4.5.1 Receptor de prolactina y señalización	21
4.5.2 Efectos de la prolactina en el metabolismo.....	21
4.5.3 Acciones de la prolactina en la lactancia: metabolismo del lactante.....	22
V. HIPÓTESIS	23
VI. OBJETIVOS	24
6.1 Objetivo general:	24
6.2 Objetivos específicos:	24
VII. METODOLOGÍA	25
7.1 Tipo de estudio y diseño metodológico:	25
7.2 Animales de experimentación	25
7.3 Material	26
7.3.1 Dietas	26
7.3.2 Reactivos y consumibles:.....	27
7.4 Procedimientos.....	27
7.4.1 Evaluación de la ganancia de peso y peso del hígado	27

7.4.2 Cuantificación de los niveles de TAG en hígado	27
7.4.3 Histología del hígado	28
7.4.4 Hematoxilina-eosina	28
7.4.5 Tinción de faloidina.....	28
7.4.6Extracción de RNA	28
7.4.7 Cuantificación de RNA	28
7.4.8 Síntesis de cDNA	28
7.4.9 Expresión de genes relacionados con el metabolismo hepático de lípidos por RT-PCR.....	28
7.5Instrumentos	30
7.6 Análisis estadístico.....	30
7.8Consideraciones éticas y legales.....	30
VIII. RESULTADOS	31
8.1Evaluación del peso corporal.....	31
8.2 Evaluación del peso del hígado.....	32
8.3 Análisis histológico del hígado.....	34
8.4 Cuantificación de triglicéridos en hígado	36
8.5 Evaluación de la expresión de genes del metabolismo hepático de lípidos	37
8.6 Cuantificación de DNA.....	42
8.7 Tinción con faloidina.....	44
IX. DISCUSIÓN	46
X. CONCLUSIÓN	51
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXOS.....	57

|

v. **ÍNDICE TABLAS**

Tabla 1. Interpretación de IMC	6
Tabla 2. Determinación de ICC	7
Tabla 3. Composición de las dietas	26
Tabla 4. Reactivos y consumibles	27
Tabla 5. Secuencias de oligonucleotidos	29
Tabla 6. Instrumentos	30

|

vi. ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Fórmula para calcular el índice de masa corporal.....	6
Figura 2. Anatomía del hígado	9
Figura 3. Anatomía del hígado: caras anterior e interior	10
Figura 4. Vías del metabolismo de lípidos	13
Figura 5. La resistencia a la insulina como característica principal de EHGNA...	14
Figura 6. Grados de esteatosis hepática.	15
Figura 7. Mecanismos que contribuyen a la esteatosis hepática	16
Figura 8. Primer Hit de EHGNA	17
Figura 9. Segundo Hit de EHGNA	18
Figura 10. Desarrollo de EHGNA en el contexto de la programación del desarrollo	19
Figura 11. Síntesis de prolactina en la glándula pituitaria anterior.	20
Figura 12. Estrategia experimental	26
Figura 13. Los ratones Prlr ^{-/-} presentan un peso corporal menor que los Prlr ^{+/+} en una DC.....	31
Figura 14. Los ratones Prlr ^{-/-} presentan un incremento mayor en el peso del hígado en comparación con los Prlr ^{+/+} en respuesta a una DO.....	32
Figura 15. Peso de hígado normalizado al peso corporal.	33
Figura 16. Los animales Prlr ^{-/-} presentan alteraciones en la histología del hígado en dieta control.	34
Figura 17. Histología de hígado en dieta obesogénica.	35
Figura 18. Los animales Prlr ^{-/-} presentan niveles de TAG elevados en dieta control.....	36
Figura 19. La expresión de genes lipogénicos está disminuida en animales Prlr ^{-/-}	38
Figura 20. La expresión del transportador de ácidos grasos CD36 no cambia entre genotipos.....	39
Figura 21. Cambios en la expresión de genes de la β -oxidación entre ratones Prlr ^{-/-} y Prlr ^{+/+}	41
Figura 22. El contenido de DNA total en hígado no es diferente entre genotipos..	42
Figura 23. Normalización de triglicéridos/DNA.....	43
Figura 24. Histología del hígado. Tinción con faloidina.....	45

I. INTRODUCCIÓN

La obesidad representa un grave problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que en México el 35% de los niños y adolescentes, así como el 72.5% de los adultos padecen sobrepeso u obesidad.¹ Una de las múltiples enfermedades derivadas de la obesidad es el hígado graso no alcohólico con una prevalencia estimada en población general de entre 20 a 30% en adultos y 10% en niños. En México, se estima una prevalencia de 17% en población asintomática.²

Existe la hipótesis de que una expansión adecuada del tejido adiposo en condiciones de obesidad permite acumular el exceso de nutrientes en este tejido, y de esta manera previene la acumulación ectópica de ácidos grasos, por ejemplo en músculo e hígado, lo que contribuye con un perfil metabólico favorable.³ Un factor que favorece la expansión saludable del tejido adiposo en condiciones de obesidad es la hormona prolactina (PRL).⁴ La PRL es una hormona secretada principalmente por la glándula pituitaria anterior que ejerce múltiples funciones, incluyendo la regulación de la lactancia y la reproducción, la respuesta inmune, el crecimiento y el metabolismo.⁵ Interesantemente, los niveles de PRL circulante disminuyen en humanos y en roedores con obesidad y síndrome metabólico, así como en humanos con hígado graso.⁶

En apoyo a que los bajos niveles de PRL participan en dichas alteraciones metabólicas, el tratamiento con PRL favorece la hiperplasia o formación de nuevos adipocitos, y previene la hipertrofia de los mismos, además de favorecer la sensibilidad a la insulina sistémica.⁴ En el hígado, la PRL promueve el crecimiento hepático a través de estimular la proliferación de los hepatocitos y del endotelio vascular.⁷ Además, el receptor de prolactina favorece la sensibilidad hepática a la insulina en animales obesos.⁸ Sin embargo, se desconoce si la PRL puede ejercer algún efecto en la prevención del desarrollo de hígado graso en ratones en condiciones de obesidad durante la etapa postnatal o de lactancia.

Por lo anterior, en el presente proyecto se evaluó, si animales lactantes carentes del receptor de PRL amamantados por madres alimentadas con una dieta obesogénica tienen una mayor susceptibilidad a desarrollar hígado graso.

II. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es un problema de salud pública que se presenta en todas las etapas de la vida. El aumento en la ganancia de peso debido a una dieta energéticamente elevada, la ingesta excesiva de grasas y la carencia de actividad física, ha resultado en el aumento de la prevalencia de obesidad, la cual va de la mano con el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas; entre las cuales se encuentra la Enfermedad de Hígado Graso No Alcohólico (EHGNA). El EHGNA es una enfermedad con alta prevalencia y consecuencias graves para quienes lo padecen, por ello es relevante entender los mecanismos patofisiológicos que promueven el desarrollo de esta enfermedad.

La hormona prolactina (PRL) ejerce efectos benéficos en el metabolismo, específicamente en el hígado actúa promoviendo la sensibilidad a la insulina, mientras que los niveles circulantes de la hormona disminuyen en condiciones de obesidad, síndrome metabólico e hígado graso. Sin embargo, se desconoce si la disminución en la señalización de PRL durante la obesidad favorece el desarrollo de EHGNA, particularmente en la etapa postnatal.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hormona prolactina (PRL) actúa en el hígado promoviendo su crecimiento y regeneración, mientras que los niveles circulantes de la hormona disminuyen en condiciones de obesidad y resistencia a la insulina lo que sugiere que los efectos benéficos de la PRL podrían verse comprometidos en sujetos con obesidad.

Se propone evaluar si la falta de acción de la PRL, en ratones carentes de su receptor, que fueron expuestos a un ambiente obesogénico a través de la alimentación materna, resulta en el desarrollo exacerbado de hígado graso al finalizar la lactancia.

IV. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

4.1 Obesidad: definición y prevalencia

La obesidad es una enfermedad crónico-degenerativa considerada como una epidemia a nivel global por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y definida por la misma como “la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud”.¹⁰ Cada año mueren 2.6 millones de personas a causa de la obesidad y el sobrepeso (OMS, 2010). En México, 7 de cada 10 personas presentan exceso de peso corporal.¹

La causa principal de la obesidad se atribuye al desequilibrio en el consumo y el gasto energético, en el cual existe un balance energético positivo.¹⁰ En esta condición, se consumen más calorías de las que se gastan favoreciendo así a la acumulación de grasa y el consecuente aumento de peso. Además, múltiples factores ambientales, conductuales, genéticos, psicosociales, alteraciones metabólicas y endócrinas, entre otras, contribuyen al desarrollo de obesidad.¹¹

De acuerdo a la ENSANUT 2016, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad, pasó de un 71.2% en 2012, a un 72.5%, siendo mayor en mujeres (76.5%) que en hombres (69.4%). Más aún, la prevalencia de obesidad abdominal fue de 76.6%, observándose un claro dimorfismo sexual, al ser mayor en mujeres (87.7%) en comparación con el género masculino (64.5%).¹

4.1.1 Diagnóstico de sobrepeso y obesidad

En 1871, Adolphe J. Quetelet desarrolló el Índice de Masa Corporal (IMC), definido como el peso en kg dividido entre la altura expresada en metros y elevada al cuadrado.⁹

$$IMC (kg/m^2) = \frac{\text{Peso en kilogramos}}{\text{Talla en } m^2}$$

Figura 1. Fórmula del índice de masa corporal.⁹

Actualmente el IMC representa el índice más utilizado para clasificar la obesidad en adultos. Los valores elevados en rangos del IMC se asocian al riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Un IMC >30kg/m² determina obesidad.¹²

<i>IMC (kg/m²)</i>	<i>Interpretación</i>
>18.50	Bajo peso
18.5-24.9	Normopeso
25.0-29.9	Sobrepeso
30.0-34.9	Obesidad grado 1
35.0-39.9	Obesidad grado 2
>40	Obesidad grado 3

Tabla1. Interpretación de IMC. Clinical Guidelines Identification, Evaluation and Treatment of Overweight and Obesity in Adults, WHO.¹²

La distribución de grasa corporal tiene una estrecha relación con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Se hace uso del ICC (Índice Cintura Cadera) para determinar la distribución de grasa corporal. La siguiente tabla muestra la fórmula para la obtención del ICC, y sus parámetros de evaluación.¹²

ICC (cm) = $\frac{\text{Circunferencia de cintura (cm)}}{\text{Circunferencia de la cadera (cm)}}$		
Distribución de grasa por ICC	Mujer	Varón
Androide	>0.8	>1.0
Ginecoide	<0.8	<1.0

Tabla 2. Determinación de ICC.¹²

Se ha denominado tipo androide en el cual el tejido adiposo se concentra en el área abdominal; y ginecoide, cuando el tejido adiposo se distribuye en glúteos y caderas. El tipo androide se correlaciona con mayor riesgo de incidencia de enfermedades crónico-degenerativas.¹⁴ El IMC y la circunferencia abdominal se consideran predictores de detección de EHGNA.¹⁵ A lo largo de este trabajo se hará uso de “EHGNA” para hacer referencia a la enfermedad hepática grasa no alcohólica.

4.1.2 Principales comorbilidades de la obesidad

La obesidad y el sobrepeso tienen una estrecha correlación con enfermedades como diabetes tipo II, dislipidemias, artritis, hipertensión, cáncer de colon, próstata, hígado, entre otros.¹¹ También, se vincula con la resistencia a la insulina, elemento principal para el desarrollo de EHGNA, en la cual, existe una disminución de la sensibilidad a la insulina en los principales tejidos blanco, como son el tejido adiposo, el músculo, y el hígado.¹⁶

4.1.3 Disfunción del tejido adiposo como causa de alteraciones metabólicas

El tejido adiposo juega un papel importante en la regulación del balance de energía y la homeostasis metabólica. Algunas de las características determinantes del buen o mal funcionamiento del tejido adiposo son su capacidad de lipólisis y lipogénesis, el estado inflamatorio y el tipo de expansión.¹⁷

Durante la obesidad, la incapacidad de tejido adiposo para mantener su funcionalidad en paralelo al almacenamiento exacerbado de nutrientes provoca resistencia a la insulina y múltiples enfermedades metabólicas. Por el contrario, una expansión saludable de tejido adiposo mantiene e incluso puede restaurar la sensibilidad a la insulina en todo el organismo.¹⁸

Los pacientes que presentan resistencia a la insulina y EHGNA, muestran una reducción en la sensibilidad a la insulina no sólo a nivel muscular (principal tejido afectado), también afecta a otros órganos como el tejido adiposo y el hígado. La resistencia hepática a la insulina, conlleva a cambios en el metabolismo en el hígado, favoreciendo la aparición de esteatosis hepática.¹⁹

Siendo el hígado un órgano clave para el funcionamiento del organismo, y el tejido blanco de estudio de la presente tesis, es relevante describir su anatomía y fisiología.

4.2 Hígado: estructura y función

El hígado tiene un papel fundamental en el metabolismo, es un órgano de color rojo pardo, situado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, debajo del diafragma, encima del estómago, el riñón derecho y los intestinos. En humanos, su peso estimado es de 1400 a 1800g, aproximadamente 2% del peso corporal de un adulto, y 5% en un recién nacido; mide 26cm de ancho y 15cm de alto, aproximadamente.²⁰

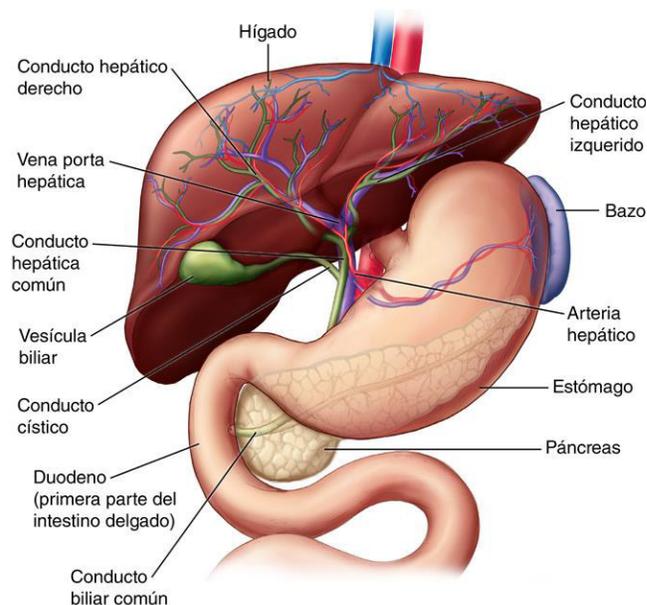


Figura 2. Anatomía del hígado⁶⁰

Está rodeado por una capa de peritoneo visceral, tiene una cara antero-superior convexa, la cual se encuentra en contacto con el diafragma, en ella se puede observar el ligamento falciforme que divide los lóbulos derecho e izquierdo; y una cara postero-inferior. En la base del hígado se aloja la vesícula biliar, ésta mide entre 7 y 10 cm, y se encarga del almacén de la bilis y su liberación hacia el duodeno por medio del colédoco, para favorecer la digestión de lípidos.^{20, 22}

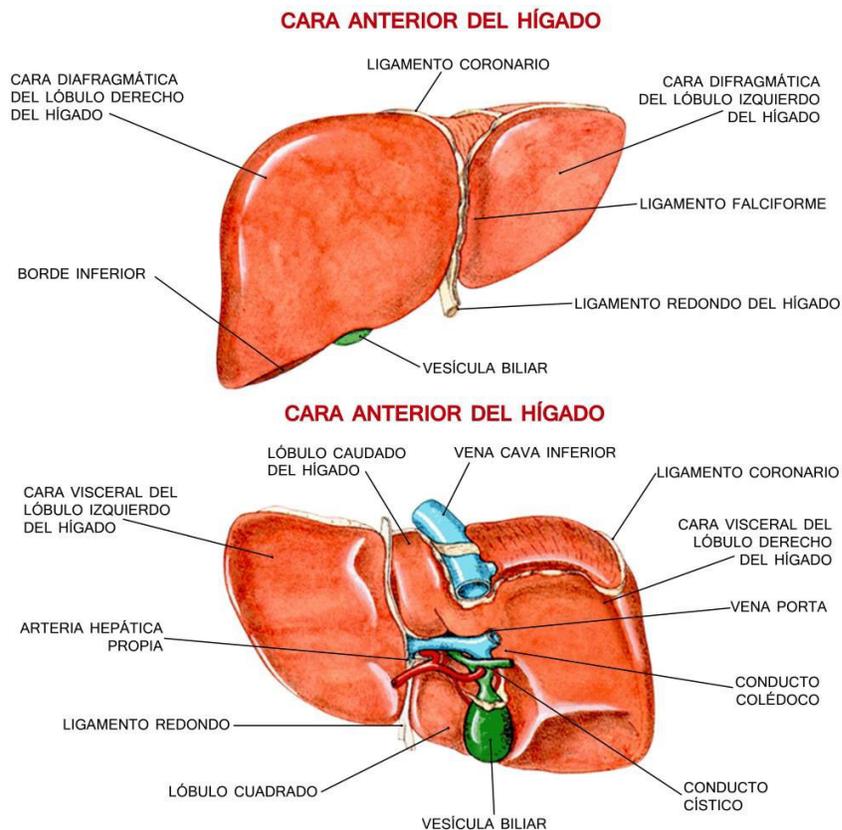


Figura 3. Anatomía del hígado: caras anterior e interior. ⁶¹

Está constituido por cuatro tipos celulares: hepatocitos, células endoteliales, células de Kupffer y células estrelladas o estelares. Cada una de estas desempeña funciones distintas; los hepatocitos son las células más abundantes, conforman aproximadamente el 80% del hígado y miden en promedio 25µm de diámetro.²³ Las células endoteliales revisten los sinusoides, éstos son capilares hepáticos que reciben sangre proveniente de la vena porta, y de la arteria hepática, para desembocarla en la vena hepática. Las células de Kupffer son macrófagos residentes, cuya función es la captación y destrucción de virus, bacterias, etc. Las células estrelladas por su parte almacenan lípidos y vitamina A. ^{21, 24, 25}

El parénquima hepático se encuentra conformado por un conjunto de unidades de forma hexagonal, llamadas lobulillos. Se estima que en el hígado se encuentran alrededor de 50,000 y 100,000 lobulillos. Al centro de cada unidad, se encuentra una vena centrolobulillar, y en los extremos una triada portal, la cual se conforma

por una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conducto biliar.²¹

El hígado recibe sangre rica en nutrientes y oxígeno por medio de la arteria hepática, y sangre pobre en oxígeno a través de la vena porta, proveniente del tracto gastrointestinal.²⁰

El hígado realiza múltiples funciones metabólicas, digestivas, inmunológicas, entre otras, las cuales son de importancia vital,²⁶ por ejemplo:

- Mantenimiento de la glucemia.
- Producción de bilis (sustancia que participa en la digestión de lípidos y transporte de desechos).
- Síntesis de proteínas plasmáticas.
- Eliminación de sustancias nocivas para el organismo.
- Metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.
- Purificación y regulación del volumen sanguíneo.
- Almacén de vitaminas y minerales.
- Producción y almacén de glucógeno.

Ya que el hígado desempeña un papel indispensable en el funcionamiento del cuerpo, es importante hacer mención de las enfermedades hepáticas más prevalentes,²⁷ entre las cuales se encuentran:

- Hepatitis B y C
- Cirrosis
- Hepatocarcinoma
- Esteatohepatitis alcohólica
- Enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA)

La EHGNA es la segunda causa de enfermedad crónica del hígado, después de la hepatitis viral C.²⁸

4.2.1 Hígado y metabolismo de lípidos

La actividad del hígado en el metabolismo es crucial para suministrar la energía necesaria al cerebro, músculo y otros órganos para su adecuado funcionamiento. Tras la ingestión de alimento, este se digiere y absorbe en el tracto gastrointestinal. La glucosa, aminoácidos y ácidos grasos resultantes de la degradación de carbohidratos, proteínas y lípidos, respectivamente, son transportados hacia la circulación para ser utilizados como energía o destinarse para almacén.²⁹

Los lípidos son compuestos orgánicos insolubles en medio acuoso, tienen un papel importante en la formación de hormonas, absorción y transporte de vitaminas liposolubles, así como en el suministro y reserva energética. Las vías que integran el metabolismo de lípidos son las siguientes:

- Lipólisis: involucra la degradación de triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres para la obtención de energía. Se lleva a cabo en el tejido adiposo.
- Lipogénesis: se sintetizan ácidos grasos a través de Acetyl-CoA proveniente de la glucólisis. Se realiza en el tejido adiposo y en el hígado.
- Beta oxidación (β -oxidación): en el citosol de las células hepáticas se oxidan ácidos grasos para la formación de Acetyl-CoA, posteriormente este sustrato entra a la mitocondria para ser transformado en energía por medio del ciclo de Krebs.
- Captura y transporte: los ácidos grasos ingresan a la célula y son almacenados o son transportados en la circulación hacia tejidos específicos.³⁰

Se considera el componente hepático del síndrome metabólico, el cual incluye hiperglucemia, dislipidemias, obesidad abdominal e hipertensión arterial sistémica.^{32,33}

Desde 1952, Zelman S, Westwater JO, Thaler H, Ludwig y cols., en sus investigaciones, comenzaron con el desarrollo del concepto de EHGNA y esteatohepatitis no alcohólica, (EHNA) al describir la existencia de grasa excesiva, inflamación y necrosis en el hígado de personas sin consumo de alcohol.³⁴La EHGNA abarca un espectro evolutivo que va desde la esteatosis simple, a esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma.³⁵

Se ha identificado a la resistencia a la insulina como característica principal de EHGNA. La obesidad, diabetes mellitus tipo II, hipertensión, dislipidemias, entre otras, son factores primarios de riesgo para el desarrollo de EHGNA. Como causas secundarias para el desarrollo de dicha enfermedad, se encuentra el consumo de drogas, cirugías y nutrición parenteral total.^{32,36}

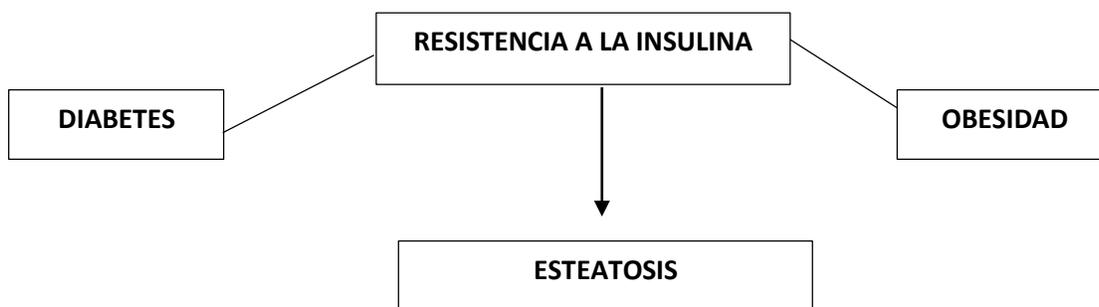


Figura 5. La resistencia a la insulina como característica principal de EHGNA.³⁶

La genética, el ambiente social, la edad, el género, las disfunciones endócrinas tales como hipotiroidismo y ovario poliquístico, son factores que influyen en el aumento de la prevalencia de EHGNA. El grupo étnico de procedencia es también un factor de riesgo, de acuerdo a un estudio realizado por Jeffrey D. y cols. 2004, los hispanos y asiáticos presentan mayor riesgo que la población afroamericana.^{32,37}

4.3.1 Prevalencia y diagnóstico de EHGNA

La prevalencia de EHGNA es variable de acuerdo a la población. En general, a nivel mundial se ha determinado una prevalencia entre 6% y 33% con una mediana de 20%. Afecta al 30%-40% de los hombres y 15%-20% de las mujeres. En México se ha estimado una prevalencia cercana al 26%.²

El diagnóstico de EHGNA requiere la exclusión del consumo diario de alcohol, >30 g/día para hombres, y >20 g/día para mujeres.³⁸ Existen estudios de imagen para realizar el diagnóstico de EHGNA, como son el ultrasonido, la imagen por resonancia magnética, la tomografía axial computarizada; sin embargo, el estándar de oro para diagnóstico de EHGNA es la biopsia hepática ya que permite evaluar la severidad del daño hepático, el grado de esteatosis, inflamación y la presencia de fibrosis.³⁵ Histológicamente, el HGNA se clasifica de acuerdo al grado de esteatosis. La siguiente figura muestra un ejemplo de estos.

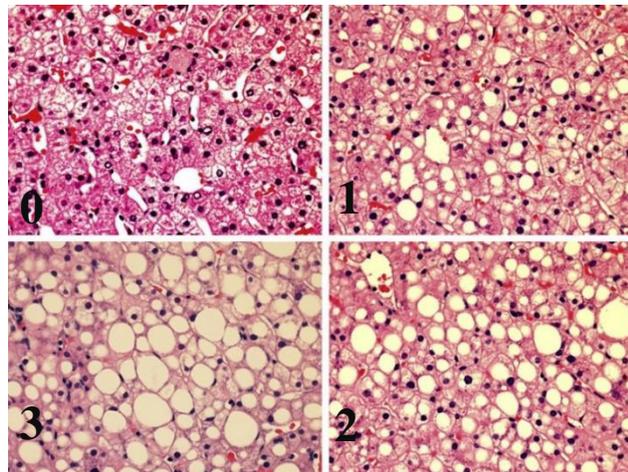


Figura 6. Grados de esteatosis hepática. La EHGNA se clasifica de acuerdo a los grados de esteatosis. **Grado 0:** <5%, **grado 1:** 5-33% **Grado 2:** >33%-66%. **Grado 3:** >66%.²⁰ Imagen tomada de Goodman, 2014.³⁹

El hígado graso no alcohólico puede ocurrir como a) esteatosis simple, b) esteatosis con inflamación lobular o portal, sin balonización en hepatocitos, o c) esteatosis con balonización pero sin inflamación.⁴⁰

Se estima que para el año 2030, la EHGNA será la causa principal de trasplante de hígado.⁴¹ La obesidad es uno de los principales factores para el desarrollo de EHGNA. Los países que presentan mayor prevalencia de obesidad, están predispuestos a tener mayor incidencia de EHGNA.⁴² En las últimas tres décadas su prevalencia ha aumentado y su velocidad de incremento ha sido una de las más altas a nivel mundial,¹ por ello la importancia de conocer los mecanismos relacionados con el desarrollo de dicha enfermedad.

4.3.2 Patogénesis de EHGNA

Como se describió anteriormente, la EHGNA se caracteriza por la acumulación de lípidos en los hepatocitos. Esta puede ocurrir a través de cuatro mecanismos: 1) aumento en la captación de ácidos grasos libres, 2) incremento en la lipogénesis de novo, 3) disminución de la oxidación de lípidos, y 4) disminución en la secreción de proteínas de muy baja densidad.⁴³

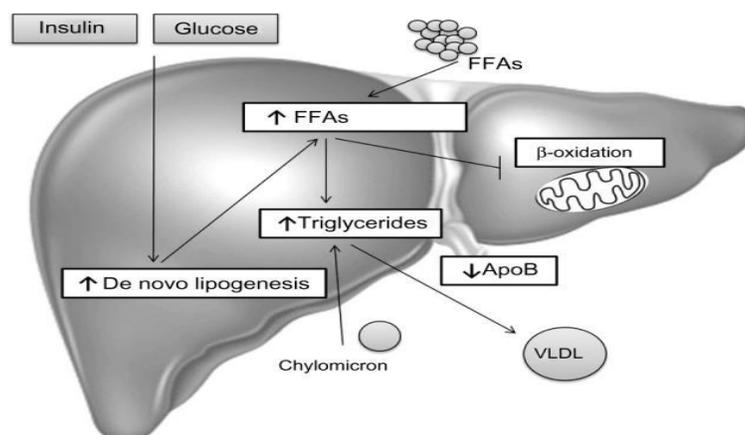


Figura 7. Mecanismos que contribuyen a la esteatosis hepática. Imagen tomada de Berlanga A. 2014.⁴⁴

Para explicar los mecanismos que contribuyen a la acumulación hepática de triglicéridos se ha desarrollado la hipótesis de “Two-Hit” o doble impacto. El primer “hit” se refiere a la acumulación de grasa en el hígado a causa de la resistencia a la insulina (RI); la RI es un factor de suma importancia en la patogenia de EHGNA.¹⁶



Figura 8. Primer Hit de EHGNA. ¹⁶

En esta condición, la lipólisis excesiva en el tejido adiposo aumenta la circulación de ácidos grasos en el plasma, incrementando así la síntesis de novo y la captación de AGL en el hígado; esto favorece el desarrollo de esteatosis hepática. Adicionalmente, la disminución de la sensibilidad a la insulina produce hiperinsulinemia, la cual en el hepatocitoaumenta la gluconeogénesis y la captación de AGL.^{16,36}

El segundo “hit” se refiere al exceso de AGL y su consecuente contribución a la generación de Radicales Libres de Oxígeno (RLO), causando peroxidación lipídica.

Los RLO inducen la liberación de citosinas proinflamatorias por las células de Kupffer, como TNF- α , TGF- β 1 (participa en la síntesis de colágeno), e IL-8. El HNE (4-hidroxinonenal) y MDA (malonildialdehído) son productos finales de la peroxidación lipídica, y están implicados en la lesión hepática. El conjunto de los

mecanismos mencionados favorecen a la evolución de la simple esteatosis hacia fibrosis y cirrosis hepática.³⁶

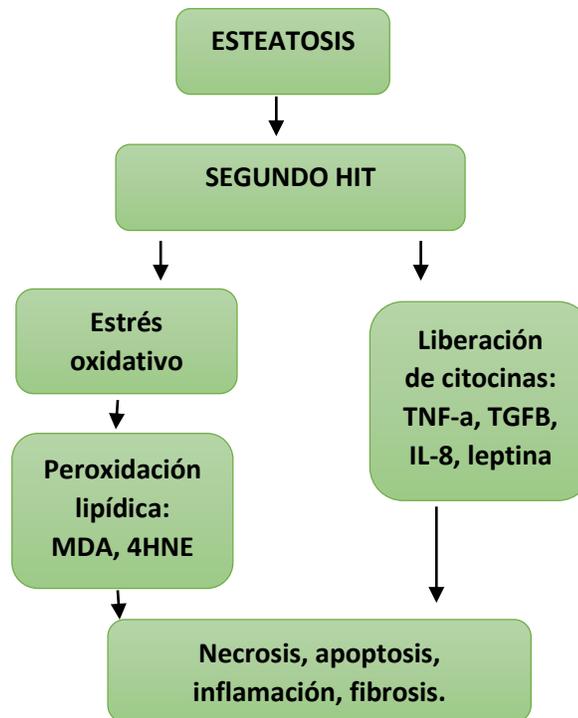


Figura 9. Segundo Hit de EHGNA. Se caracteriza por inflamación, necrosis y fibrosis.^{16,36}

4.4 Desarrollo de EHGNA en el embarazo y la lactancia

La EHGNA puede originarse desde etapas tempranas de desarrollo, como por ejemplo, la lactancia. El ambiente nutricional durante la gestación, la lactancia y la infancia, son periodos críticos para el desarrollo del neonato. Diversos estudios han demostrado que la obesidad materna durante la lactancia y el embarazo, induce resistencia a la insulina, obesidad y EHGNA en las crías.^{45, 46,47}

La alimentación materna durante la gestación y el periodo de lactancia, puede predisponer a las crías al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en la vida adulta. Esto se traduce como “programación del desarrollo”, donde factores como obesidad, edad, genética y la exposición a un

ambiente inadecuado antes del nacimiento o en la infancia temprana, contribuyen a la susceptibilidad del desarrollo de EHGNA.⁴⁸

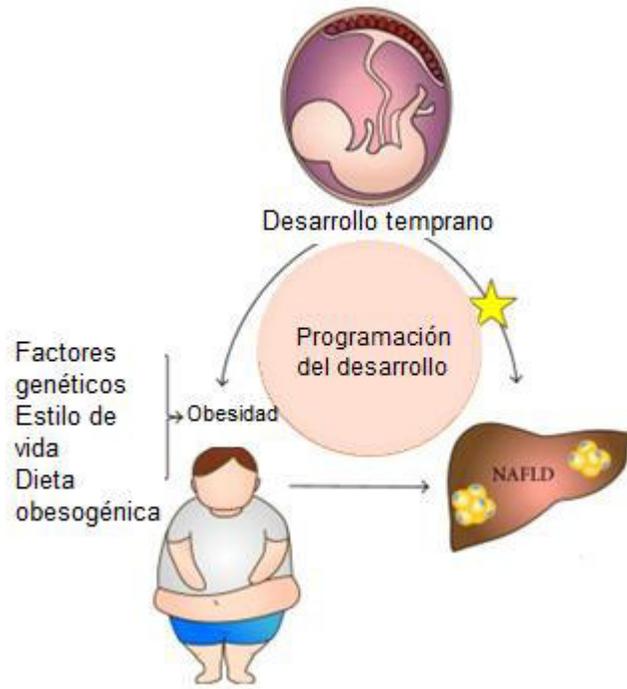


Figura 10. Desarrollo de EHGNA en el contexto de la programación del desarrollo. Imagen tomada y modificada de Minglan Li, 2015.⁴⁸

La ingesta excesiva de grasas por las madres durante el embarazo y la lactancia tiene efectos adversos en el metabolismo de las crías; los cuales pueden observarse desde edad temprana; por ejemplo a las 3 semanas de edad. Al respecto, Huang Y. y cols., 2017, en un modelo animal reportaron que las crías que fueron alimentadas por madres en dieta alta en grasas durante el embarazo y la lactancia, presentan mayores niveles de triglicéridos en hígado al finalizar la lactancia.⁴⁶

En especial en la lactancia, De los Ríos. y cols., 2018, reportó que la alimentación materna alta en grasas aumenta los niveles de TAG hepáticos en las crías. Este estudio también demostró que el tratamiento de las madres o de las crías con prolactina previene la acumulación de TAG en el hígado de las crías.⁴⁹

Esto sugiere que la prolactina puede tener un efecto en el metabolismo hepático de las crías, y específicamente en la prevención de la acumulación de TAG inducida por una dieta materna alta en grasas durante la lactancia. A continuación se describen brevemente algunos aspectos de la prolactina.

4.5 Prolactina: generalidades

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica de 23 kDa conformada por 199 aminoácidos, secretada principalmente por los lactótrofos de la glándula pituitaria anterior.⁵⁰

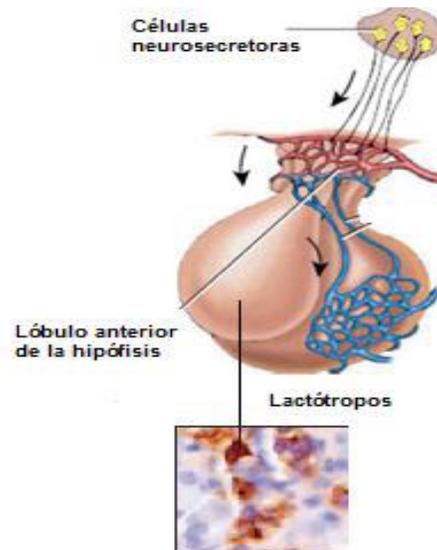


Figura 11. Síntesis de prolactina en la glándula pituitaria anterior. Imagen tomada y modificada de Tortora, 2013.⁵⁰

Esta hormona tiene un papel fundamental en la lactancia y la reproducción, participa en el crecimiento y desarrollo, en el mantenimiento del balance electrolítico, en el metabolismo y en la regulación del sistema inmune. Además de su síntesis en la glándula pituitaria anterior, existen otros órganos, células y tejidos en los que la prolactina se secreta y expresa, como son la glándula mamaria,

testículos, ovarios, entre otros. Además, los receptores para esta hormona (PRLR) se expresan en prácticamente todos los órganos y tejidos del organismo.⁵¹

4.5.1 Receptor de prolactina y señalización

Los receptores de prolactina forman parte de la familia de receptores de citocinas tipo I. En humanos el gen codificante del receptor de PRL (PRLR) se sitúa en el cromosoma 5, sus isoformas son extracelular, intracelular y transmembranal. La interacción prolactina-receptor ocurre en dos pasos: la prolactina inicia la dimerización del receptor mediante la unión con su primer dominio, conocido como complejo H1:R1, el cuál induce la interacción del sitio de unión 2 con un segundo receptor de PRL, formando el complejo hormona-receptor H1:R2 activo.^{52,54}

Al ocurrir la unión de la prolactina con su receptor, consecuentemente se activan JAK2 y SRC, proteínas tirosinascinasas, las cuales al ser activadas desencadenan una serie de señales intracelulares, como la fosforilación de los factores de transcripción STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription).⁵¹

4.5.2 Efectos de la prolactina en el metabolismo

Mientras que la acción primaria de la PRL es en la glándula mamaria, esta hormona a niveles fisiológicos, estimula la proliferación y supervivencia de las células beta y la secreción de insulina, y promueve la sensibilidad a la insulina en el hígado.⁵⁵ Interesantemente, los niveles de PRL circulante se encuentran disminuidos en pacientes con obesidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2, e hígado graso, lo que sugiere que la disminución en la señalización de PRL está involucrada en dichas alteraciones metabólicas. En apoyo a esta idea, el tratamiento con PRL en ratas obesas, que además presentan bajos niveles de PRL sérica, aminora la resistencia a la insulina y promueve la expansión saludable del tejido adiposo.⁴

Los receptores de PRL (PRLR) se expresan en células adiposas de humanos, ratas y ratones así como en el hígado, órgano que presenta la mayor expresión de PRLR.⁵³ La PRL favorece la regeneración del hígado tras una lesión o cirugía hepática, además de estimular la sensibilidad a la insulina hepática.^{7,8}

Los ratones carentes del receptor de PRL (Prlr^{-/-}) en condiciones de obesidad desarrollan alteraciones metabólicas exacerbadas en la etapa adulta, tales como intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina e hipertrofia de los adipocitos.⁴ Además, los ratones Prlr^{-/-} presentan la apariencia de mayor hígado graso (Ruiz-Herrera et al., resultados no publicados), sin embargo este fenotipo se ve enmascarado por el hecho de que estos ratones son más obesos que sus contrapartes silvestres (Prlr^{+/+}) cuando son alimentados por una dieta obesogénica, lo que hace difícil disociar si el hígado graso se debe a la falta de los receptores de PRL o si este fenotipo es secundario al desarrollo de mayor obesidad. Por lo anterior, decidimos investigar el efecto de la falta del receptor de PRL en ratones postnatales, al terminar la lactancia, esperando que en esa etapa no hubiera diferencias en el peso corporal.

4.5.3 Acciones de la prolactina en la lactancia: metabolismo del lactante

Se ha demostrado que el tratamiento con prolactina previene la acumulación de TAG en el hígado de crías alimentadas por madres en dieta alta en grasas durante la lactancia. En este estudio, se alimentó a las madres con una dieta obesogénica y se las trató con prolactina, por medio de bombas osmóticas liberadoras de la hormona, o a las crías de manera oral, durante la lactancia; ambos tratamientos redujeron los niveles de TAG en el hígado de las crías, así como la acumulación de grasa visceral, además de incrementar la sensibilidad a la insulina en las crías.⁴⁹

Esto sugiere que la prolactina regula el metabolismo hepático de los lípidos en condiciones de obesidad inducida por una dieta materna alta en grasas durante la lactancia, lo cual da lugar a nuestra hipótesis.

V. HIPÓTESIS

Los ratones lactantes carentes del receptor de prolactina (Prlr^{-/-}) son más susceptibles a desarrollar hígado graso que los ratones silvestres (Prlr^{+/+}), en respuesta a una alimentación materna obesogénica.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

Evaluar si la ausencia de la acción de la prolactina favorece el desarrollo de hígado graso en crías lactantes, alimentadas por madres en dieta control y obesogénica durante la lactancia.

6.2 Objetivos específicos:

Evaluar en ratones Prlr^{-/-} y Prlr^{+/+} al día postnatal 21 (fin de la lactancia), provenientes de madres alimentadas durante la lactancia con una dieta control u obesogénica:

- 1) El peso corporal y el peso del hígado
- 2) La morfología hepática
- 3) La concentración de triglicéridos en hígado
- 4) La expresión de genes involucrados en la función metabólica del hígado mediante qPCR (lipogénesis, captación de ácidos grasos, β -oxidación, inflamación).

VII. METODOLOGÍA

7.1 Tipo de estudio y diseño metodológico:

Se realizó un estudio de tipo experimental, longitudinal y prolectivo, el cuál consistió en un modelo *in vivo*, realizado durante la etapa de lactancia y bajo condiciones obesogénicas a través del consumo materno de una dieta alta en grasas durante todo el periodo, con la finalidad de evaluar si la carencia del receptor de PRL podría tener implicaciones sobre el fenotipo de las crías provenientes de madres bajo la alimentación alta en grasa.

7.2 Animales de experimentación

Se utilizaron 20 ratones hembra heterocigotas (Prlr+/-) de la cepa C57BL/6, las cuales fueron apareadas con ratones macho de la misma cepa carentes del receptor de PRL (Prlr-/-) o silvestres (Prlr+/+), para la obtención de crías con ambos genotipos. Posteriormente al iniciar la lactancia (día postnatal 1), las madres fueron alimentadas con dieta control (DC) o con dieta alta en grasa (DO) durante todo el periodo de la lactancia que dura 21 días (Fig.12). En todo momento estos animales se mantuvieron con agua y comida ad libitum, temperatura controlada 21-23°C, en grupos de 2-5 animales por caja, y con ciclo luz-oscuridad normal de 12-12 horas. El grupo de animales DO se sometió a una dieta con 60% de grasas (Research Diets D12492) durante los 21 días de lactancia, al concluir esta etapa fueron sacrificados.

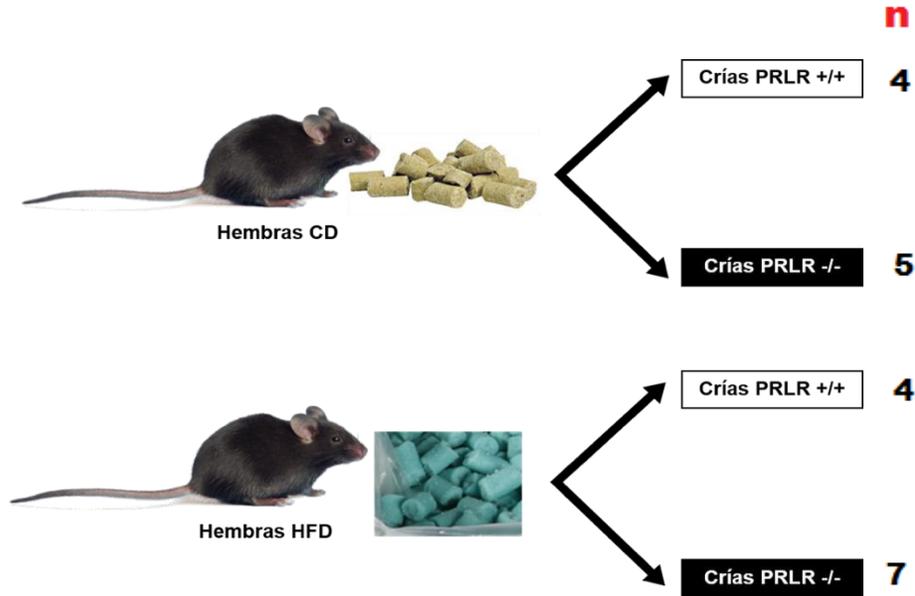


Figura 12. Estrategia experimental

7.3 Material

7.3.1 Dietas

Se utilizaron las siguientes dietas durante el periodo de lactancia:

	Dieta control	Dieta alta en grasas
Ingrediente	Kcal %	Kcal%
Proteínas	28	20
Lípidos	13	60
Carbohidratos	58	20
Total Kcal/g	4.9	5.24

Tabla 3. Composición de las dietas

7.3.2 Reactivos y consumibles:

Reactivo/Consumible	No. de catálogo	Marca
Dieta control (CD)	5001	Labdiet
Dieta alta en grasa (HFD)	12492	Researchdiets
SYBR Green/Rox qPCR Master Mix	K0221	Thermo Fisher
Trizol Reagent	15596018	Invitrogen
Vectashield con DAPI	H-1200	Vector Laboratories
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814	Applied Biosystems
Triglyceride Colorimetric Assay Kit	10010303	Cayman Chemical

Tabla 4. Reactivos y consumibles

7.4 Procedimientos

7.4.1 Evaluación de la ganancia de peso y peso del hígado

Se determinó la ganancia de peso corporal de las crías mediante la diferencia entre la medición de su peso corporal en el día 4 y el día 20 de la lactancia. En el día 21 de la lactancia, las crías fueron sacrificadas por inhalación con CO₂, para posteriormente obtener una muestra de sangre por decapitación, la cual fue centrifugada para la obtención de suero, mismo que se almacenó a -70°C para las determinaciones bioquímicas posteriores. Así mismo, se extrajo el hígado de las crías e inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a una temperatura de -70° para posteriores determinaciones de su morfología y funcionalidad.

7.4.2 Cuantificación de los niveles de TAG en hígado

Para la cuantificación de TAG en hígado, se pesaron 200mg de tejido congelado de cada animal a los 21 días de la lactancia, y se procedió con el protocolo del fabricante Triglyceride Colorimetric Assay Kit No. 10010303, Cayman (Anexo 1).

7.4.3 Histología del hígado

El hígado extraído de las crías fue fijado en formalina al 10%, para después ser deshidratado y fijado en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 3 μm en microtomo, se colocaron en portaobjetos (Anexo 2) y posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina, o con faloidina.

7.4.4 Hematoxilina-eosina

Una vez que se fijaron los cortes de hígado en los portaobjetos, se tiñeron con hematoxilina-eosina para posteriormente observarse al microscopio (Anexo 3).

7.4.5 Tinción de faloidina

Una vez que se fijaron los cortes de hígado en portaobjetos, se tiñeron con faloidina para posteriormente observarse al microscopio (Anexo 4).

7.4.6 Extracción de RNA

Se extrajo el RNA del hígado de las crías por método de Trizol (Anexo 5).

7.4.7 Cuantificación de RNA

Posterior a la extracción de RNase realizó la lectura de las absorbancias a las longitudes de onda 260 y 280nm en espectrofotómetro Nanodrop No (Anexo 6).

7.4.8 Síntesis de cDNA

Se realizó la síntesis de DNA complementario por medio de un kit de retrotranscripción, Applied Biosystems No (Anexo7).

7.4.9 Expresión de genes relacionados con el metabolismo hepático de lípidos por RT-PCR

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) se determinó la expresión de genes relacionados con la función metabólica del hígado de las crías al día 21, como de lipogénesis, captura de ácidos grasos y de β -oxidación. Los productos fueron detectados y cuantificados con la reacción de Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix en una reacción final de 10 μL conteniendo el templado y los oligos de cada uno de los genes evaluados a una concentración de 0.5 μM : *CypA*, *Pparg1a*, *Sirt1*, *Ppara*, *Cd36*, *Cpt1a*, *Fasn*, *Scd1*,

G6pc, *Mlxipl*. La amplificación se realizó en un RT-PCR usando un protocolo de 10 min de desnaturalización a 95°C, seguido de 35 ciclos de amplificación (10 seg a 95°C, 30 seg a la temperatura de alineación de los oligos, y 30 seg a 72°C). La expresión de los genes relacionados con la función metabólica del hígado fueron normalizados con el gen casero *CypA* (Anexo 8).

Nombre	Secuencias de los oligos		Temperatura de alineación °C
	Sentido	Antisentido	
<i>CypA</i>	TGGGGAGAAAGGATT TGGCT	TTTGCCATGGACA AGATGCC	60.2
<i>Ppargc1a</i>	GCATGGTGCCTTCGC TGA	TGGCATCTCTGTGT CAACCATG	53.5
<i>Sirt1</i>	CAGTGTCATGGTTCC TTTGC	CACCGAGGAACTA CCTGAT	60.3
<i>Ppara</i>	TCGCGTACGGCAATG GCTTTAT	ATCCCCTCCTGCAA CTTCTCAA	63.7
<i>Cd36</i>	GAATGGGCTGTGATC GGAAC	ACGTCATCTGGGTT TTGCAC	60.3
<i>Cpt1a</i>	ATCCCTAAGCAGTGC CAGTT	CATCATGGCCAGC ACAAAGT	60.0
<i>Fasn</i>	TCTGTGCCCGTCGTCT ATAC	GGAGGTATGCTCG CTTCTCT	60.0
<i>Scd1</i>	ACTGAACACGGTCAT CCCAT	TGGTGGTGGTCGT GTAAGAA	60.0
<i>G6pc</i>	TGACTGTCTCTCACA CCACC	AGAATCCTGGGTC TCCTTGC	57.6
<i>ChREBP1c</i>	CTCAACGCTGCCATC AACTT	ATGAGGATGCTGA ACACCCA	60.3

Tabla5. Secuencias de oligonucleotidos

7.5 Instrumentos

Equipo	Modelo	Marca
RT-PCR	CFX96	Bio-Rad Laboratories
Espectrofotómetro (Varioskan)	5250030	Thermo Scientific
Micropipetas	SL-1000XLS+, SL-200XLS+, SL20XLS+, SL-10XLS+	Rainin
Polytron	D1000	Benchmark scientific
Navajas perfil alto y bajo	818, 819	Leica
Porta objetos	48311-703	VWR
Microtomo	RM212SRT	Leica
Baño de flotación	HI1210	Leica
Plancha (cortes)	MH6616X1	Thermoscientific
Balanza	BP121S	Sartorius
Centrífuga	Allegra6R	BeckmanCoulter
Microcentrifuga	S415R	Eppendorf
Microscopio	BX60	Olympus

Tabla 6. Instrumentos

7.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (EE) de cada factor en los grupos experimentales. Asimismo, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) correspondiente, con el fin de determinar los cambios estadísticamente significativos, y se realizó un análisis de comparación de medias aplicando la prueba de Tukey utilizando un intervalo de confianza del 95%.

7.8 Consideraciones éticas y legales

Todos los procedimientos en los animales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Protocolo 075) y cumplieron con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Institutes of Health (NIH). (Anexo 10)

VIII. RESULTADOS

8.1 Evaluación del peso corporal

Al terminar los veintiún días de la lactancia, se evaluó el peso corporal de los animales. Las crías de ratones *Prlr*^{-/-} presentaron un peso corporal menor en comparación con los ratones silvestres cuando fueron alimentados por madres que consumieron una dieta control, mientras que esta diferencia de pesos no fue estadísticamente diferente entre los grupos de animales que fueron alimentados por madres que consumieron una dieta obesogénica (Figura 13).

Se observó que los animales *Prlr*^{+/+} fueron 26% más pesados en DO (HFD) que sus contrapartes en DC, mientras que en los *Prlr*^{-/-} esta diferencia fue del 33% (Figura 13). Es decir que el incremento en el peso corporal en respuesta a la dieta obesogénica fue similar para ambos genotipos.

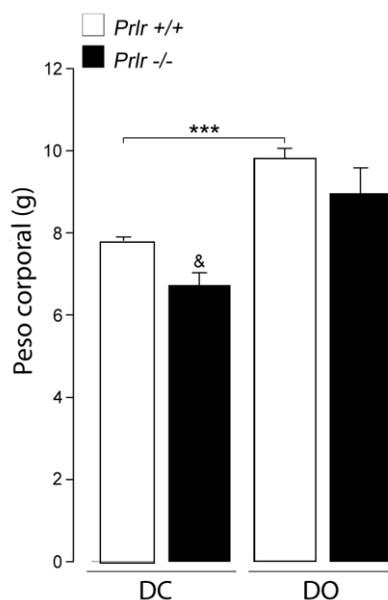


Figura 13. Los ratones *Prlr*^{-/-} presentan un peso corporal menor que los *Prlr*^{+/+} en una DC. Evaluación del peso corporal al término de la lactancia (Día 21), *Prlr*^{+/+} DC y DO n=4, *Prlr*^{-/-} DC n=5, DO n=7. n= 4-9. Promedios +/- E.E. P* < 0.05, p** < 0.01, p*** < 0.001.

8.2 Evaluación del peso del hígado

Se observó que los ratones *Prlr*^{-/-} presentaron un peso del hígado 26.4% menor en comparación con los ratones silvestres, cuando fueron alimentados por madres en dieta control. Sin embargo, esta diferencia se perdió cuando los animales fueron alimentados por madres en dieta obesogénica, ya que el hígado presentó un peso idéntico al de los animales *Prlr*^{+/+} en la misma dieta (Figura 14). Este resultado indica que comparados con los ratones *Prlr*^{+/+}, los animales *Prlr*^{-/-} tuvieron una respuesta mayor a la dieta obesogénica, en cuanto al crecimiento del hígado. Ante la dieta obesogénica, los ratones silvestres presentaron un peso del hígado 23% mayor que sus contrapartes en dieta control, mientras que los ratones *Prlr*^{-/-} en una dieta obesogénica tuvieron un hígado 67% más pesado que sus pares en dieta control (Figura 14).

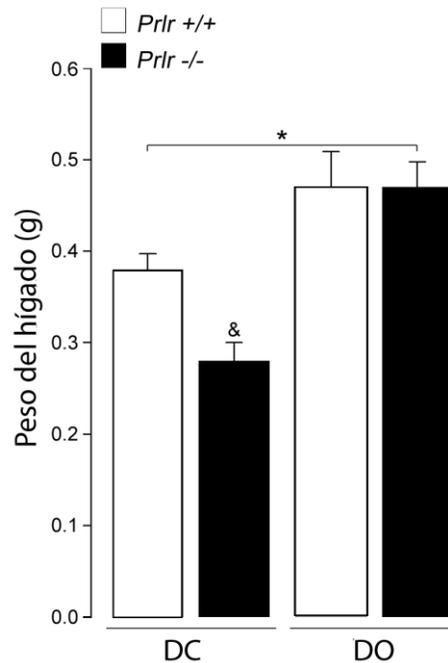


Figura 14. Los ratones *Prlr*^{-/-} presentan un incremento mayor en el peso del hígado en comparación con los *Prlr*^{+/+} en respuesta a una DO. Evaluación del peso del hígado al término de la lactancia (Día 21), *Prlr*^{+/+} DC y DO n=4, *Prlr*^{-/-} DC n=5, DO n=7. Promedios +/- E.E. P* < 0.05.

Esto se aprecia con mayor claridad al normalizar el peso del hígado respecto al peso corporal. En animales silvestres, en ambas dietas la proporción del peso del hígado entre el peso corporal es similar, de alrededor del 4.9%, es decir que no hay un incremento en esta proporción en respuesta a una dieta obesogénica. En contraste, en los animales *Prlr*^{-/-} se observa que la proporción peso del hígado entre peso corporal es menor que en los animales silvestres, siendo del 4.1% cuando los animales son alimentados con una dieta control, mientras que en los animales en dieta obesogénica la proporción es del 5.2%, es decir se incrementa en un 26.8% en respuesta a una dieta obesogénica (Figura 15). Lo que quiere decir que el hígado de los ratones *Prlr*^{-/-} es más sensible a la dieta obesogénica, ya que crece más que el de los ratones silvestres.

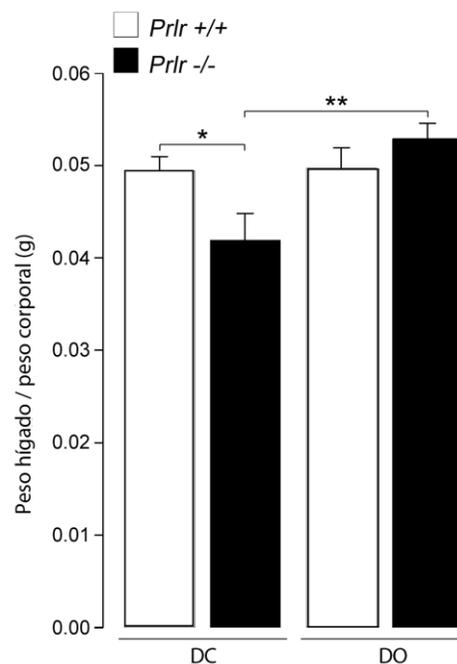


Figura 15. Peso del hígado normalizado con el peso corporal. Normalización peso hígado/peso corporal al término de la lactancia (Día 21), *Prlr*^{+/+} DC y DO n=4, *Prlr*^{-/-} DC n=5, DO n=7. Promedios +/- E.E. P* < 0.05, p** < 0.01.

8.3 Análisis histológico del hígado

Para analizar la morfología del hígado se realizaron procesos histológicos de acuerdo a protocolos correspondientes (Anexo 2). Se hizo uso de la tinción de hematoxilina-eosina, la cuál al teñir los núcleos de azul-violeta y el citoplasma rosa, favorece a la distinción de la morfología celular.

En el análisis histológico se observó que en una dieta control los ratones *Prlr*^{-/-} presentaron hepatocitos con citoplasma blanquecino, especialmente en áreas peri-vasculares, característica no visible en los animales silvestres (Figura 16).

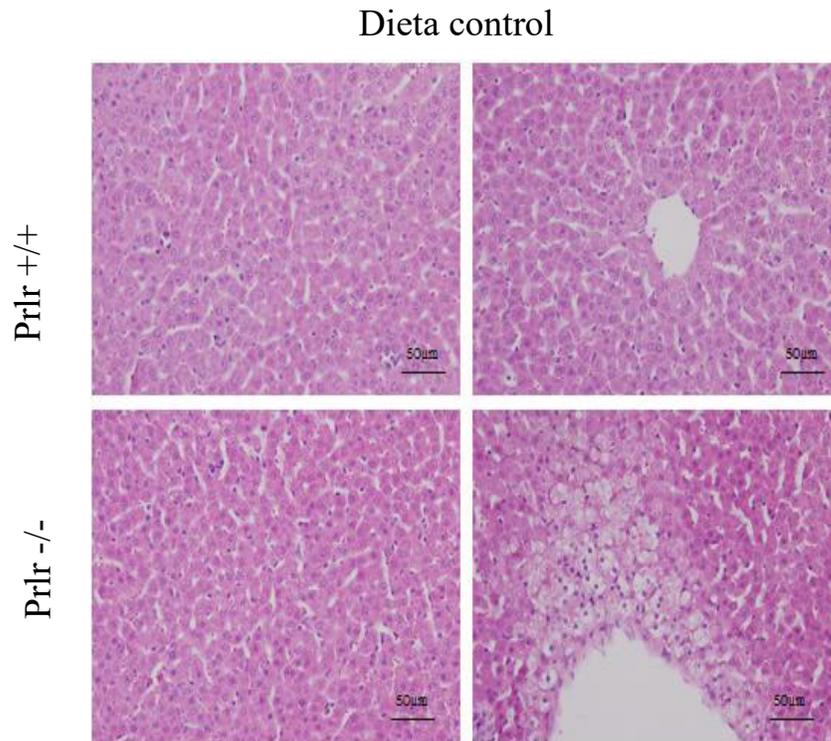


Figura 16. Los animales *Prlr*^{-/-} presentan alteraciones en la histología del hígado en dieta control. Al término de la lactancia (día postnatal 21), el hígado de los ratones *Prlr*^{+/+} (paneles superiores) o *Prlr*^{-/-} (paneles inferiores) alimentados por madres en una dieta control, fue procesado en cortes histológicos de 3µm de grosor, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

En una dieta obesogénica, se observaron áreas blanquecinas en los hepatocitos en ambos grupos, aparentemente con mayor proporción en los animales *Prlr*^{-/-} (Figura 17). En los animales silvestres se observaron hepatocitos con mayor homogeneidad en el citoplasma, mientras que en los animales *Prlr*^{-/-}, aparentemente la mayoría de los hepatocitos presentan áreas blancas en su citoplasma. Dicha característica podría corresponder a la acumulación de gotas lipídicas dentro de los hepatocitos.

Dieta obesogénica

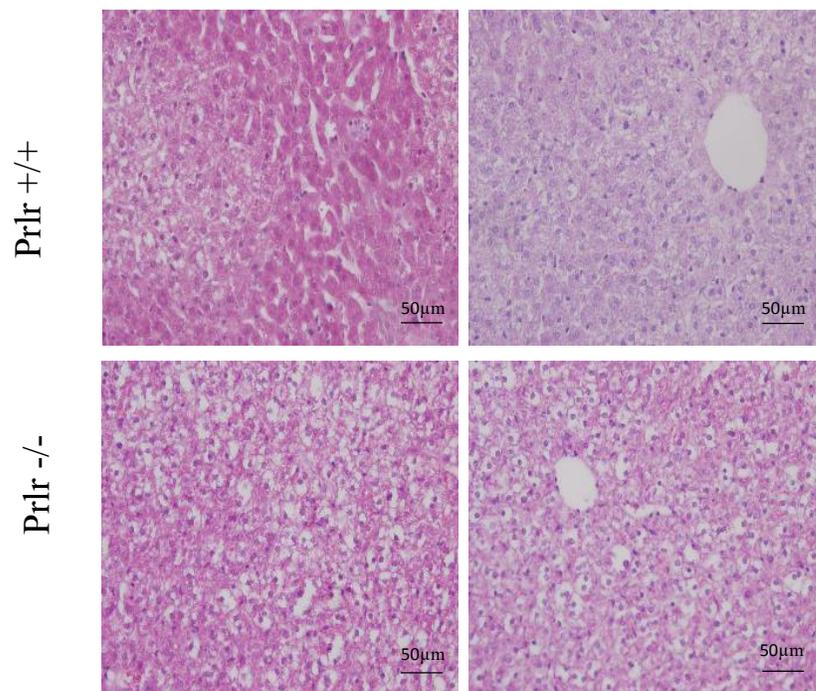


Figura 17. Histología de hígado en dieta obesogénica. Al término de la lactancia (día postnatal 21), el hígado de los ratones *Prlr*^{+/+} (paneles superiores) o *Prlr*^{-/-} (paneles inferiores) alimentados por madres en una dieta alta en grasas o obesogénica, fue procesado en cortes histológicos de 3µm de grosor, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

8.4 Cuantificación de triglicéridos en hígado

Para evaluar si efectivamente las áreas blanquecinas correspondían a una mayor acumulación de grasa en el hígado, se realizó la cuantificación de triglicéridos conforme al protocolo correspondiente (Anexo 1). Se observó que los animales *Prlr*^{-/-} presentaron niveles más elevados de triglicéridos en el hígado en comparación con los animales silvestres en una dieta control, lo que concuerda con lo observado en las histologías (Figura 18).

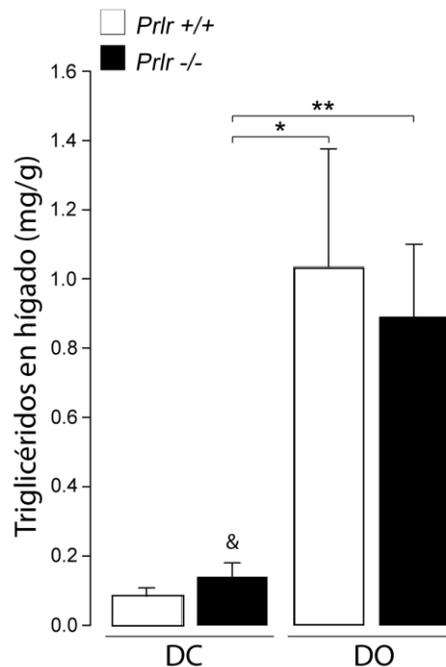


Figura 18. Los animales *Prlr*^{-/-} presentan niveles más elevados de TAG que los *Prlr*^{+/+}, en dieta control. Evaluación de los niveles de triglicéridos en hígado al término de la lactancia (día 21), *Prlr*^{+/+} DC y DO n=4, *Prlr*^{-/-} DC n=5, DO n=7. Promedios +/- E.E. P* < 0.05, p** < 0.01.

En una dieta obesogénica se incrementan dramáticamente los niveles de triglicéridos en ambos genotipos. En animales *Prlr*^{-/-} se esperaba observar niveles de TAG más elevados en comparación con animales silvestres, pero no fue el caso. Pensamos que se debe a que el reto de la dieta obesogénica es máximo, es decir, que no es posible tener mayor acumulación de TAG (Figura 18).

8.5 Evaluación de la expresión de genes del metabolismo hepático de lípidos

Evaluamos si las alteraciones observadas en el peso, histología, y acumulación de triglicéridos en el hígado, van de la mano con cambios en la expresión de genes del metabolismo hepático por medio de qPCR (Reacción de la cadena de polimerasa) en tiempo real, de acuerdo al protocolo correspondiente.

Como se mencionó anteriormente, la acumulación hepática de lípidos puede llevarse a cabo por distintos mecanismos: lipogénesis de novo, captación de ácidos grasos libres y disminución de la oxidación de lípidos.

Analizamos la expresión de genes involucrados en la vía de lipogénesis de novo: Fasn (fatty acid synthase), Chrebp (Carbohydrate receptor bindin gprotein), Scd1 (Stearoyl-CoA desaturase-1), y gluconeogénesis: G6pc (Glucose 6phosphatase). Se observó que el hígado de los animales Prlr^{-/-} muestra menor expresión de Fasn en dieta control en comparación con los animales silvestres. En los animales Prlr^{+/+} se reduce la expresión de Fasn en respuesta a la dieta obesogénica, mientras que en los animales Prlr^{-/-} no se observa esta reducción (Figura 19), probablemente porque la expresión ya se encuentra reducida debido a la dieta obesogénica.

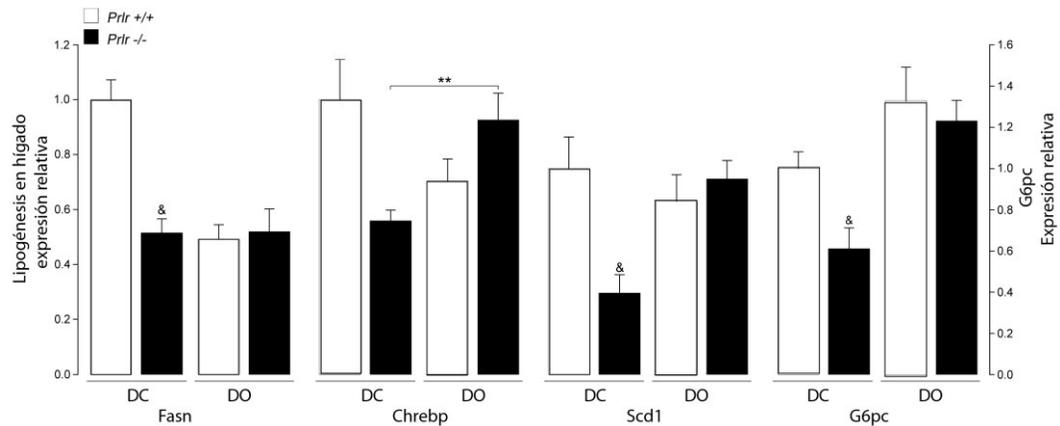


Figura 19. La expresión de genes lipogénicos está disminuida en animales Prlr-/-. Expresión relativa de fatty acid synthase, Chrebp: Carbohydrate responsive element binding protein, Scd1: stearyl-Coenzyme A desaturase1, G6pc: glucosa 6 fosfatasa, al término de la lactancia (día 21), Prlr+/+ DC y DO n=4, Prlr-/- DC n=5, DO n=7 Promedios +/- E.E. P* < 0.05, p < 0.01.**

En la expresión de Chrebp (Carbohydrate responsive element binding protein) involucrado en la síntesis hepática de ácidos grasos, no se observaron diferencias entre genotipos. Sin embargo, en los animales Prlr-/-, la expresión de Chrebp aumenta en respuesta a una dieta obesogénica, lo que no se observa en los animales Prlr+/+.

En la expresión de Scd1 (Stearoyl-CoA desaturase-1) una enzima limitante en la formación de ácidos grasos, observamos que los animales Prlr-/- presentan una menor expresión en comparación con los animales silvestres en una dieta control, mientras que en una dieta obesogénica la expresión de Scd1 aumenta en los animales Prlr-/- pero no cambia en los Prlr+/+.

Se analizó la expresión de G6pase (Glucose-6-phosphatase), enzima que participa en la gluconeogénesis, observamos que en los animales Prlr -/- se reduce su expresión en dieta control, en comparación con los ratones silvestres. En una dieta obesogénica, se observó un incremento en la expresión de esta enzima en los animales Prlr-/-, mientras que en los animales Prlr+/+ la expresión no cambió.

En el análisis de los genes de la vía de lipogénesis se observa que en una dieta control, la expresión de genes de esta vía se encuentra disminuida en los animales *Prlr*^{-/-}. Por lo que la mayor acumulación de ácidos grasos en el hígado de los animales *Prlr*^{-/-} en dieta control, no se explica por un incremento en la expresión de los genes de la vía de lipogénesis. Estos resultados sugieren que en animales *Prlr*^{-/-} el metabolismo de ácidos grasos se encuentra alterado, y que la prolactina es necesaria para regular esta función.

Posteriormente, se analizó la expresión de CD36 (cluster of differentiation 36), un transportador clave en la captación hepática de ácidos grasos. Si bien se observó un incremento significativo en la expresión de Cd36 ante la dieta obesogénica en ambos genotipos, no se observaron diferencias significativas entre genotipos, ya que el cambio en la expresión fue igual en ambos grupos en dieta control y dieta obesogénica (Figura 20).

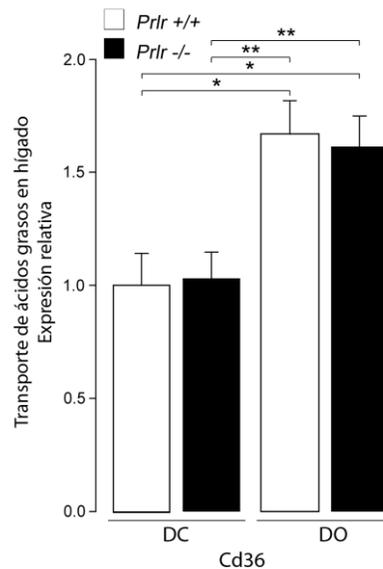


Figura 20. La expresión del transportador de ácidos grasos CD36 no cambia entre genotipos. Expresión relativa al término de la lactancia (día 21), *Prlr*^{+/+} DC y DO n=4, *Prlr*^{-/-} DC n=5, DO n=7. Promedios +/- E.E. P* < 0.05, p** < 0.01.

También se analizó la expresión de genes involucrados en la vía de β -oxidación: Pgc1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), Sirt1 (Sirtuin-1 deacetylase), Ppara (peroxisome proliferator activated receptor-alpha), Cpt1a (Carnitine Palmitoyltransferase-1a) (Figura 21).

En el análisis de Pgc1a, no observamos diferencias en dieta control entre genotipos. Sin embargo, los animales Prlr^{-/-} mostraron una menor expresión de Pgc1a en dieta obesogénica en comparación con los animales en dieta control, mientras que en los animales silvestres no se observan diferencias entre dietas.

En la expresión de Sirt1 no se observaron diferencias entre genotipos en ambas dietas. Sin embargo, los animales Prlr^{-/-} mostraron un incremento en la expresión de este gen en respuesta a la dieta obesogénica, cambio que no se observó en los animales Prlr^{+/+}.

En cuanto a la expresión de Ppara; no se observaron diferencias entre genotipos en ambas dietas, pero los animales Prlr^{-/-} mostraron un incremento significativo en la expresión de Ppara al ser alimentados con la dieta obesogénica, mientras que en los animales Prlr^{+/+} a pesar de que se ve la misma tendencia a incrementarse, este cambio no fue estadísticamente significativo. (Figura 21)

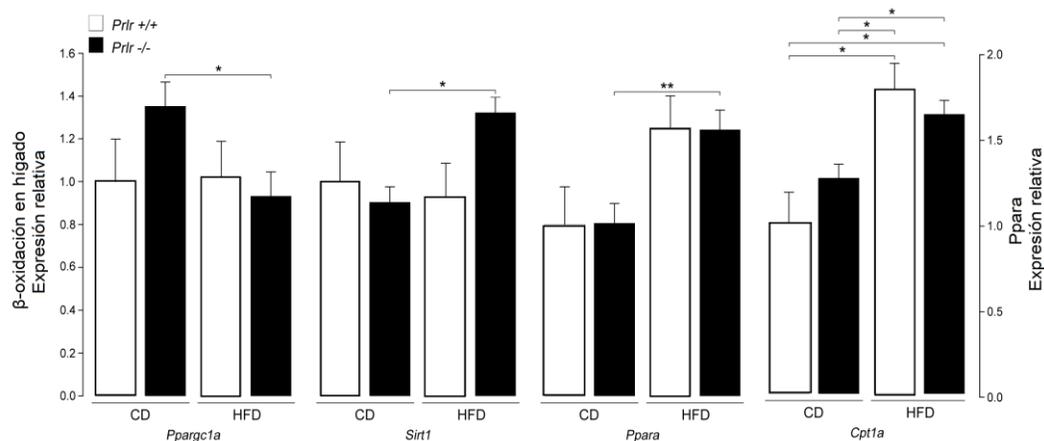


Figura 21. Cambios en la expresión de genes de la β -oxidación entre ratones Prlr^{-/-} y Prlr^{+/+}. Expresión relativa al término de la lactancia (día 21). Pgc1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), Sirt1 (Sirtuin-1 deacetylase), Ppara (peroxisome proliferator activated receptor-alpha), Cpt1a (Carnitine Palmitoyltransferase-1a). Prlr^{+/+} DC y DO n=4, Prlr^{-/-} DC n=5, DO n=7. Promedios +/- E.E. P* < 0.05, p** < 0.01.

CPT1a es una enzima limitante en la vía de oxidación de ácidos grasos. No se observaron diferencias entre genotipos en dieta control y dieta obesogénica, pero si un aumento en la expresión de este gen en respuesta a la dieta obesogénica.

Además del análisis en los genes descritos, se analizó la expresión de otros involucrados en el metabolismo hepático de lípidos e inflamación: Srebp-1, Lxra, Acc, Pepck, Il1b, Tnfa, en los cuales no se observaron diferencias significativas. Al no observar diferencias significativas en la expresión de marcadores clave de inflamación, se sugiere que las alteraciones observadas en las histologías no son mediadas por inflamación.

8.6 Cuantificación de DNA

Como se mencionó anteriormente, se observó un incremento desproporcional en el peso del hígado en los animales *Prlr*^{-/-} en respuesta a la DO, se comprobó que dicho incremento no se debe a una mayor acumulación de triglicéridos. Nos preguntamos qué podría explicar este fenómeno si no es debido a una mayor acumulación de triglicéridos. Sugerimos que podría haber menor cantidad de hepatocitos, cada uno con mayor cantidad de triglicéridos, es decir hepatocitos hipertróficos. Para analizar esta posibilidad, se realizó la cuantificación de DNA al día 21 de la lactancia con el fin de normalizar la cantidad de triglicéridos en el hígado entre la concentración de DNA (como un parámetro de número de células) (Anexo 9).

Observamos que la cantidad de DNA total en hígado es similar entre genotipos en ambas dietas (Figura 22). Esto ocurre de igual manera al normalizar la cantidad de TAG por DNA total en hígado (Figura 23). Esto sugiere que no hay menor cantidad de células en el hígado de los animales *Prlr*^{-/-}.

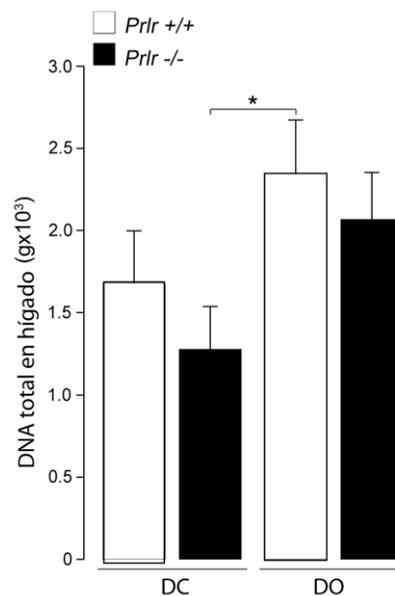


Figura 22. El total de DNA en hígado no es diferente entre genotipos. La determinación se realizó al término de la lactancia (día 21), *Prlr*^{+/+} DC y DO n=4, *Prlr*^{-/-} DC n=5, DO n=7. Promedios +/- E.E. P* < 0.05, p** < 0.01. Promedios +/- E.E. P* < 0.05, p** < 0.01.

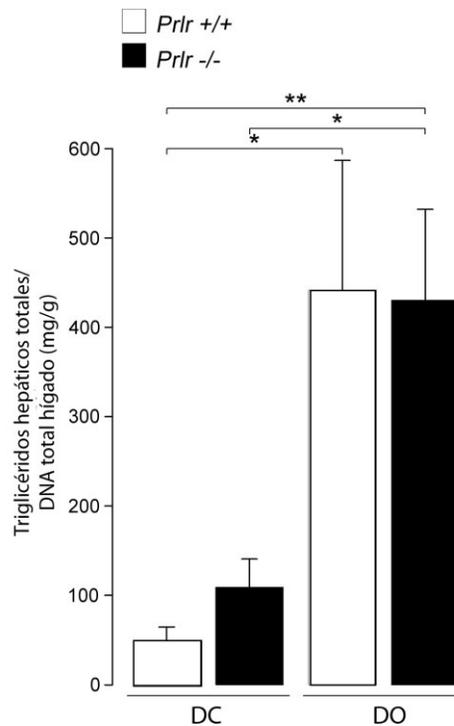


Figura 23. Normalización de triglicéridos/DNA en hígado. La determinación se realizó al término de la lactancia (día 21), Prlr+/+ DC y DO n=4, Prlr-/- DC n=5, DO n=7. Promedios +/- E.E. P* < 0.05, p** < 0.01. Promedios +/- E.E. P* < 0.05, p** < 0.01.

Haciendo énfasis en que los animales Prlr-/- en DC presentaron un peso menor en hígado respecto a los silvestres, al hacer este análisis obtuvimos que la cantidad de DNA es igual al de los Prlr+/+.

No obstante, se debe tomar en cuenta que se cuantificó el DNA total que corresponde a todos los tipos celulares del hígado, entre los cuales se incluyen además de hepatocitos, células endoteliales, inmunes, entre otras, por lo que no podría concluirse que no hay menor cantidad de hepatocitos en este grupo.

8.7 Tinción con faloidina

Por medio de la cuantificación de DNA obtuvimos que la cantidad de DNA total en el hígado de los animales Prlr^{-/-} y Prlr^{+/+} es similar, lo cual no explica que el menor tamaño del hígado de los animales Prlr^{-/-} se deba a un número menor de células, sin embargo podría deberse a proporciones distintas entre los diversos tipos celulares.

Se sabe que la prolactina estimula la proliferación de los hepatocitos, lo que sugiere que el menor peso del hígado de los animales Prlr^{-/-} en DC podría ser debido a una menor proliferación de hepatocitos. Ante el reto de la dieta obesogénica y la falta de señalización de prolactina, los ratones Prlr^{-/-} podrían tener menos hepatocitos y de mayor tamaño, alcanzando los mismos niveles de TAG que los animales silvestres pero en una menor cantidad de células.

Para tratar de analizar esta hipótesis se realizó la tinción con faloidina. La faloidina se utiliza para teñir filamentos de actina que conforman el citoesqueleto, el cual se extiende en el citoplasma celular, permitiendo distinguir a las células. Este procedimiento se realizó con el propósito de medir el tamaño de los hepatocitos y, posteriormente hacer una normalización de la cantidad de TAG entre el tamaño de los hepatocitos, para determinar qué cantidad de TAG existen por célula.

En los animales silvestres en DC, observamos homogeneidad en los hepatocitos y membranas delimitadas, lo cual difiere de los animales Prlr^{-/-} en ambas dietas, donde observamos hepatocitos cuyas membranas no es posible delimitar.

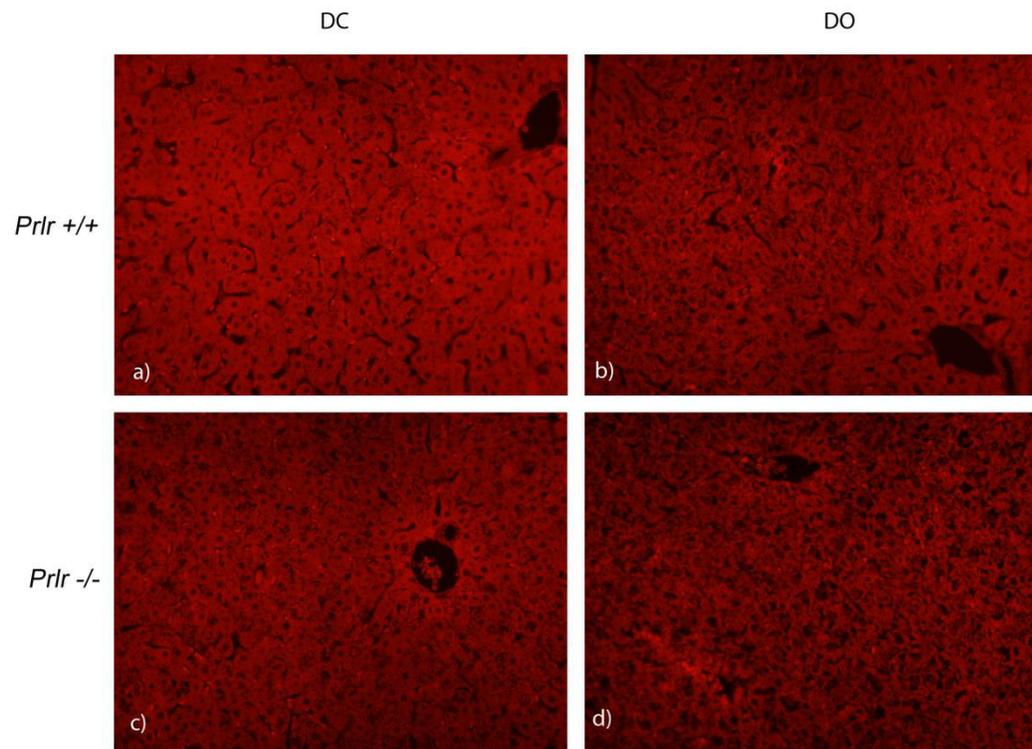


Figura 24. Secciones representativas de cortes de hígado a 3µm_ teñidos con faloidina 20x. Al término de la lactancia (día postnatal 21), el hígado de los ratones *Prlr*^{+/+} (paneles superiores) o *Prlr*^{-/-} (paneles inferiores) alimentados por madres en una dieta control, fue procesado en cortes histológicos de 3µm de grosor, que fueron teñidos con faloidina. a) animales silvestres en dieta control (DC), b) animales silvestres dieta obesogénica (DO). c) animales *Prlr*^{-/-} dieta control (DC), d) animales *Prlr*^{-/-} dieta obesogénica (DO).

Dadas las alteraciones morfológicas observadas en el hígado derivadas de la dieta obesogénica o del genotipo, no fue posible delimitar las membranas celulares en la totalidad de los hepatocitos, lo cual no permitió una cuantificación adecuada (Figura 24).

IX. DISCUSIÓN

La nutrición que reciben las crías durante la lactancia proveniente de madres en dieta alta en grasas, y el efecto que esta ejerce en el metabolismo del lactante, específicamente en el desarrollo de EHGNA, es un tema que se ha estudiado con anterioridad.^{44, 45,46} Sin embargo, la contribución de la prolactina en el metabolismo hepático y el desarrollo de EHGNA durante la lactancia se desconocen.

En el presente estudio evaluamos si la ausencia de señalización de prolactina, en animales carentes de su receptor (Prlr^{-/-}) favorece la susceptibilidad al desarrollo de EHGNA en crías alimentadas por madres en dieta control o alta en grasas durante la lactancia. Nuestros resultados muestran que la prolactina es necesaria para el metabolismo normal de los lípidos en el hígado postnatal; ya que la falta de acción de esta hormona por ausencia de su receptor, se traduce en una acumulación exacerbada de lípidos en el hígado en los animales lactantes alimentados con una dieta control.

Al finalizar la lactancia, los animales Prlr^{-/-} presentaron menor peso corporal en comparación con los animales silvestres, Se ha reportado en la literatura que los animales Prlr^{-/-} adultos alimentados con dieta obesogénica, a las ocho semanas de edad presentan mayor peso corporal y masa grasa, es decir, se vuelven más obesos.⁴ En nuestro modelo, fue posible evaluar el desarrollo de esteatosis independientemente de la obesidad, ya que estos animales, a los veintiún días postnatales no se vuelven más obesos en comparación con los animales silvestres.

Se sabe que crías alimentadas por madres en dieta alta en grasas antes del embarazo (ocho semanas), durante el periodo de gestación y lactancia, mostraron un peso menor al nacimiento, y al destete presentaron un peso corporal mayor.⁴⁶ En nuestro modelo, de manera similar a lo reportado por este estudio, los animales Prlr^{-/-} alimentados por madres en dieta obesogénica durante la lactancia, presentaron mayor peso corporal al destete.

Referente al hígado, los ratones Prlr^{-/-} presentaron un peso menor en comparación con los animales silvestres al ser alimentados con una dieta control. Este resultado concuerda con lo reportado por Moreno-Carranza, 2013, y 2018 en ratones adultos y neonatales.^{7,55} Interesantemente, los animales Prlr^{-/-} mostraron mayor sensibilidad a la dieta obesogénica, ya que el incremento en el peso del hígado fue de 67% en comparación con 23% de los animales Prlr^{+/+}, sugiriendo que la prolactina es necesaria para el metabolismo hepático normal de los lípidos; en ausencia de la acción de la prolactina existe una alteración en el crecimiento normal del hígado y en su respuesta ante un reto de dieta obesogénica.

En conjunto con anomalías del peso corporal e hígado, se observaron alteraciones en la morfología hepática en los animales Prlr^{-/-} en dieta control, las cuales se hipotetizaba se debían a una mayor acumulación de TAG. Por medio de la cuantificación de TAG se comprobó que los animales Prlr^{-/-} en dieta control presentaron mayor acumulación de TAG que los animales Prlr^{+/+}, lo cual concuerda con lo observado en las histologías. Esto sugiere que la señalización de prolactina es necesaria para el mantenimiento del metabolismo de los lípidos; en ausencia de ésta, se observa una mayor acumulación de triglicéridos en hígado en dieta control. En dieta obesogénica se esperaba observar mayor acumulación de TAG en los animales Prlr^{-/-}, sin embargo, no observamos diferencias entre genotipos. Se hipotetizó que esto se debe a que el reto de la dieta obesogénica es máximo, es decir, que no es posible tener una mayor acumulación de TAG. Al respecto, el crecimiento exacerbado del hígado de los animales Prlr^{-/-} en respuesta a la dieta obesogénica no puede ser explicado por una mayor acumulación de grasa total, pero sí por una mayor acumulación de grasa por hepatocito.

Teniendo en cuenta la mayor acumulación de TAG en el hígado de los ratones Prlr^{-/-} en dieta control en comparación con los animales silvestres, se especulaba que la lipogénesis y la captura de AG se encontraran incrementadas, o que la β -oxidación se encontrara disminuida. Se analizó la expresión de genes de la vía de lipogénesis. Uno de ellos Fasn (sintasa de ácidos grasos) se sabe que su expresión

se incrementa en EHGNA.⁵⁶ En nuestro estudio, la expresión de Fasn se redujo en los animales Prlr-/- en dieta control, en comparación con los animales silvestres. Además, en una dieta obesogénica los animales silvestres mostraron una reducción en su expresión, mientras que en los animales Prlr-/- no se observa esta tendencia. En otros estudios realizados en ratas han reportado diferencias no significativas en la expresión de Fasn en crías alimentadas por madres en dieta_control y dieta obesogénica_durante el embarazo y la lactancia, implicando que la síntesis de lípidos de_novo no es alterada en la vida temprana de las crías (Yamaguchi et al. 2010).⁵⁷

Se observó la misma tendencia de disminución en la expresión de Chrebp1 y Scd1 en los animales Prlr-/- en dieta control, en comparación con los animales silvestres. Se sabe que el incremento en la expresión de estos genes induce la acumulación incrementada de lípidos en el hígado, por lo que podemos concluir que la expresión de los genes involucrados en la lipogénesis no explica el aumento en la acumulación de triglicéridos de los animales Prlr-/-.^{58,46}

Se analizó la expresión de CD36, un transportador clave en la captación hepática de ácidos grasos. Se ha reportado que la expresión hepática de CD36 se correlaciona negativamente con los niveles de prolactina circulante en humanos, y que en hepatocitos en cultivo la prolactina inhibe la expresión de CD36.⁶ Por lo anterior, se esperaba observar un aumento en la expresión de este factor en los animales Prlr-/-, sin embargo, en nuestro modelo no se observaron diferencias entre genotipos, descartando así que la acumulación de triglicéridos en los animales Prlr-/- se vea favorecida por una mayor captación de ácidos grasos en el hígado, al menos mediada por CD36.

Pcg1a, Sirt1, Ppara y Cpt1a son factores involucrados en la vía de β -oxidación. En ratones alimentados por madres en dieta obesogénica durante el embarazo y la lactancia, se ha reportado que el incremento en la expresión en estos genes se relaciona con mayor acumulación de TAG al finalizar la lactancia.⁴⁶ En nuestro modelo no se observaron diferencias entre genotipos en la expresión de estos

genes, en ninguna de las dietas. Sugiriendo que la vía de β -oxidación no favorece a la acumulación de ácidos grasos en el hígado. La expresión de los genes involucrados en las vías del metabolismo de lípidos no explica cuál es el mecanismo por el cual los animales Prlr^{-/-} acumulan mayor cantidad de TAG en hígado que los animales Prlr^{+/+} en dieta control. La determinación de la expresión de los genes se realizó al día 21 de la lactancia, se sugiere que la acumulación de TAG pudo haber ocurrido en días anteriores al día 21, es decir, que las vías enzimáticas productoras del incremento de la acumulación de lípidos en el hígado, aparentemente en esta etapa (día 21) se encuentren deprimidas. Otra alternativa es que los cambios ocurran a nivel de la actividad de las proteínas y no a nivel de su expresión.

Se comprobó que el incremento anormal en el peso del hígado de los animales Prlr^{-/-} en respuesta a la dieta obesogénica no es debido a una mayor acumulación de TAG, siendo así se hipotetizó que podría deberse a una mayor cantidad de células. Los resultados en la cuantificación de DNA indicaron que no hay diferencias entre genotipos, sugiriendo que no hay un cambio en la cantidad de células, lo cual no podría explicar que el aumento en el peso del hígado de los animales Prlr^{-/-} se deba a una mayor proliferación celular. No obstante, se cuantificó la cantidad total de células, en las cuales se incluyen además de hepatocitos, células endoteliales, inmunes, entre otras, por lo que no podría concluirse que no hay menor cantidad de hepatocitos en este grupo. Respecto a esto, ya que la prolactina favorece a la proliferación de los hepatocitos, se sugirió que los animales Prlr^{-/-} presentan menor cantidad de hepatocitos, los cuales se sugiere son hipertróficos, cada uno con mayor cantidad de TAG, lo que podría explicar las anomalías en el peso del hígado de los animales Prlr^{-/-}. Se realizó la tinción de faloína en las histologías de hígado con el propósito de comprobar dicha hipótesis; sin embargo, no fue posible comprobar dicha hipótesis ya que la morfología no se encontraba en condiciones que permitiesen observar membranas celulares delimitadas. En prospectiva, para comprobar que los hepatocitos de los

animales *Prlr*^{-/-} son hipertróficos, se podrían realizar tinciones con marcadores de membrana, como por ejemplo e-cadherina, sumado a la determinación de la expresión de genes de las vías del metabolismo de lípidos en días previos al día 21 de la lactancia.

X. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se observó que los animales carentes del receptor de prolactina presentan una mayor acumulación de triglicéridos en hígado en comparación con los animales silvestres al ser alimentados con una dieta control, y son más sensibles ante el reto de la dieta obesogénica, en cuanto al crecimiento del hígado. Al día 21 la expresión en general de los marcadores de las distintas vías del metabolismo hepático de los lípidos en los animales carentes del receptor de prolactina, muestra ir en sentido en el que se encuentran deprimidas.

En base a los resultados obtenidos, concluimos que el metabolismo hepático de los lípidos se encuentra alterado en los ratones carentes del receptor de prolactina durante la lactancia y que esto contribuye a la mayor acumulación de triglicéridos hepáticos en condiciones de dieta control, así como a una respuesta exacerbada en la expansión hepática ante una dieta obesogénica. Nuestros resultados demuestran que la prolactina regula el metabolismo hepático de los lípidos.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de medio camino. [Internet] México; 2016. [Consultado febrero 2017] Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>
2. Méndez N, Gutiérrez Y, Chávez N, Kobashi R, Uribe M. Hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica: conceptos actuales. *GastroenterolMex*. 2010; 2(75):143-148
3. Kim J. et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007; 117(9):2621-378
4. Ruiz-Herrera X, et al. Prolactin Promotes Adipose Tissue Fitness and Insulin Sensitivity in Obese Males. *Endocrinol*. 2017; 158 (1):56-68.
5. Freeman ME. Et al. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiological Reviews*. 2000. (4):1523-631.
6. Zhang P. et al. Prolactin improves hepatic steatosis via CD36 pathway. *Journ of Hepatol*. 2018.68(6): 1247-1255.
7. Moreno-Carranza B. et al. Prolactin promotes normal liver growth, survival, and regeneration in rodents: effects on hepatic IL-6, suppressor of cytokine signaling-3, and angiogenesis. *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol*. 2013;305(7): R720-6
8. Yu J. Et al. PRLR Regulates Hepatic Insulin Sensitivity in Mice via STAT5. *Diabetes*. 2013; 62(9): 3103-3113.
9. Secretaría de Salud. Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Obesidad Exógena. [Internet]. México. Actualización 2012. [consultado febrero 2017] Disponible en: http://www.saludbc.gob.mx/wp-content/uploads/2011/02/IMSS_046_08_EyR.pdf
10. Organización Mundial de la Salud. Obesidad y sobrepeso. [Internet]. 2018, [Consultado marzo 2018] Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
11. WHO Consultation on Obesity (1999: Geneva, Switzerland) & World Health Organization. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization. [Internet]. 2000. [Consultado marzo 2018] Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42330>
12. WHO Expert Committee on Physical Status: the Use and Interpretation of Anthropometry (1993: Geneva, Switzerland) & World Health Organization. (1995). Physical status: the use of and interpretation of anthropometry, report of a WHO expert committee. Geneva: World Health Organization.[Internet] 1995. [Consultado marzo 2018] Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/37003>
13. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: executive summary. Expert Panel on the

- Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight in Adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1998; 68(4): 899–917
14. Kang, S. M., Yoon, J. W., Ahn, H. Y., Kim, S. Y., Lee, K. H., Shin, H., ... Lim, S. Android Fat Depot Is More Closely Associated with Metabolic Syndrome than Abdominal Visceral Fat in Elderly People. *PLoS ONE*. 2011;6(11): e27694
 15. Otgonsuren M, Stepanova M, Gerber L, Younossi ZM. Anthropometric and clinical factors associated with mortality in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *DigDisSci*. 2013; 58(4): 1132-1140.
 16. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”. *Gastroenterol*. 1998; 114(4): 842–845.
 17. Rosen D and Spiegelman B. What we talk about when we talk about fat. 2014; 156(1-2):20-44
 18. Kim Y. et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007. 117(9): 2621–2637.
 19. Alam, S., Mustafa, G., Alam, M., & Ahmad, N. Insulin resistance in development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *World J GastrointestPathophysiol*. 2016; 7(2): 211–217
 20. Keith L. Moore, Arthur F. Dalley: Anatomía con orientación clínica. Editorial Médica Panamericana; 1982. 252-262
 21. Tórtora G. Derrickson B. Principles of anatomy and physiology. 14th edition. Wiley. 2013. 655-659.
 22. Martini FH, Timmons MJ, Tallitsch RB. Human Anatomy. (7th Edition). San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. 2012
 23. Gates GA, Henley KS, Polllard HM, Schmidt E, Schmidt FW. Cell population of human Liver. *J Lab Clin Med*. 1961; 57: 182-184
 24. Fiorenzo C. (2005). Fisiología médica, Milano, Italia. McGraw-Hill
 25. Claria J., Titos E. La célula de Kuppfer. *GastroenterolHepatol* 2004;27(4):264-73
 26. Harper HA. Las funciones del hígado y las pruebas funcionales hepáticas. Manual de Química Fisiológica. Quinta edición. San Francisco. El Manual Moderno; 1976. 438-449
 27. HEPAMAP. A roadmap for hepatology research in Europe: An overview for policy makers.[Internet]. [Consultado enero 2018] Disponible en: http://www.easl.eu/medias/EASLimg/News/3f9dd90221ef292_file.pdf.
 28. Bellentani S. Scaglioni F., Marino M., Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 2010; 28:155–161.
 29. Hall JE. El hígado como órgano. Tratado de Fisiología Médica. Decimotercera edición. Barcelona. Elsevier; 2016. 881-886.
 30. Tórtora G. Derrickson B. Lipid Metabolism. Principles of anatomy and physiology. 14th edition. Wiley. UnitedStates. 2013. 953-956.
 31. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterol*. 1999;116(6):1413-9

32. Puneet P. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Nonalcoholic fatty liver disease: Definitions, risk factors, and workup. *Clinical Liver Disease*. Septiembre 2012; 25. (1): 99-103.
33. Gastaldelli A. Fatty liver disease: the hepatic manifestation of metabolic syndrome. *Hypertens Res*. 2010 Jun; 33(6):546-7.
34. Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig Dis Sci*. 2005; 50:171-180.
35. Chalasani N. et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018; 67(1):328-357
36. Shakir Ali, Scott I. Friedman, Derek A. Mann. 2005. Liver diseases. Biochemical mechanisms and new therapeutic insights. Vol II. Pp 245-272. United States of America. Sciencepublishers.
37. Jeffrey D. et al. Prevalence of hepatic steatosis in a urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004. (40): 1387-1395.
38. Ratziu V1, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*. 2010; 53(2):372-84.
39. Goodman ZD. The impact of Obesity on Liver Histology. *Clin Liver Dis*. 2014; 18(1):33-40.
40. Kleiner DE, Brunt EM, Nonalcoholic fatty liver disease; pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. *SeminLiver Dis* 2012; 32(01): 003-013
41. Byrne CD, Targer G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol*. 2015; 62(1 Suppl):S47-64
42. Loomba R, Sanyal AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev GastroenterolHepatol*. 2013;10(11):686-90
43. Fabbrini E1, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010; 51(2): 679–689
44. Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porrás JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *ClinExpGastroenterol*. 2014; 5;(7):221-39.
45. Zhang J, Zhang F, Didelot X, Bruce KD, Cagampang FR, Vatish M, Hanson M, Lehnert H, Ceriello A, Byrne CD. Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. *BMC Genom*. 2009; 16; 10:478.
46. Huang Y, Ye T, Liu C, Fang F, Chen Y, Dong Y. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation affects hepatic lipid metabolism in early life of offspring rat. *J Biosci*. 2017 Jun; 42(2):311-319.
47. Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK, Hanson MA. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through

- pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br J Nutr.* 2009; 102(4):514-9.
48. Li M, Reynolds CM, Segovia SA, Gray C, Vickers MH. Developmental Programming of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Effect of Early Life Nutrition on Susceptibility and Disease Severity in Later Life. *Biomed Res Int.* 2015:437107
 49. de Los Ríos EA, Ruiz-Herrera X, Tinoco-Pantoja V, López-Barrera F, Martínez de la Escalera G, Clapp C, Macotela Y. Impaired prolactin actions mediate altered offspring metabolism induced by maternal high-fat feeding during lactation. *FASEB J.* 2018; 32(6):3457-3470.
 50. Tórtora G. Derrickson B. Hipotálamus and pituitary gland. *Principles of anatomy and physiology.* 14th edition. Wiley. 2013; 623-659.
 51. Goffin V, Binart N, Touraine P, Kelly PA. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol* 2002;64:47
 52. Bole-Feysot C., Goffin V, Edery M, Binart N, Kelli PA. Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *EndocrRevi.* 1998; 19 (3):25–268
 53. Nagano M, Kelli PA. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem.* 1994; 269(18):13337-45.
 54. Arden KC, Boutin J-M, Djiane J, Kelly PA, Cavenee WK. The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the same region of human chromosome 5. *Cytogenet Cell Genet.* 1990; 53(2-3):161–165.
 55. Moreno-Carranza B, Manríquez-Bravo M, Baez A, Ledesma-Colunga MG, Ruiz-Herrera X, Ortega-Reyes P, de los Ríos EA, Macotela Y, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Prolactin regulates liver growth during postnatal development in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2018; 314: R902–R908.
 56. Dorn C, Riener MO, Kirovski G, Saugspier M, Steib K, Weiss TS, Gäbele E, Kristiansen G, Hartmann A, Hellerbrand C. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010; 3(5):505-14.
 57. Yamaguchi R, Nakagawa Y, Liu YJ, Fujisawa Y, Sai S, Nagata E, Sano S, Satake E, Matsushita R, Nakanishi T, Chapman KE, Seckl JR, Ohzeki T. Effects of maternal high-fat diet on serum lipid concentration and expression of peroxisomal proliferator-activated receptors in the early life of rat offspring. *Horm Metab Res* 2010; 42(11): 821-825
 58. Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. 2005 Jan;87(1):81-6.

59. Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *ProgLipid Res.* 2004 Mar;43(2):91-104.
60. Health Library. [Internet]. Chicago: The University of Chicago Medicine; c2000-2018 [consultado diciembre 2017]. Disponible en: <http://healthlibrary.uchospitals.edu/Spanish/DiseasesConditions/Adult/Liver/85,P03769>.
61. Enfermeríacelayane. [Internet]. Guanajuato: Nodo Universitario de la Universidad de Guanajuato; 2018 [Consultado el 20 de marzo 2018] Disponible en: <https://blogs.ugto.mx/enfermeriaenlinea/unidad-didactica-9-el-aparato-digestivo/>

ANEXOS

Anexo 1

CUANTIFICACION DE TRIGLICERIDOS

Se realizó la cuantificación de TAG de acuerdo a las indicaciones del fabricante, por medio del siguiente Kit Comercial.



Triglyceride Colorimetric Assay Kit

Item No. 10010303

About This Assay

Cayman's Triglyceride Colorimetric Assay provides a simple, reproducible, and sensitive tool for assaying triglycerides in plasma, serum, cell lysates, and tissue homogenate samples. The Triglyceride Colorimetric Assay uses the enzymatic hydrolysis of the triglycerides by lipase to glycerol and free fatty acids. The glycerol released is subsequently measured by a coupled enzymatic reaction system (Figure 1). The glycerol formed in reaction 1 is phosphorylated to glycerol-3-phosphate in a reaction catalyzed by glycerol kinase (eq 2). The glycerol-3-phosphate is oxidized by glycerol phosphate oxidase producing dihydroxyacetone phosphate and hydrogen peroxide (eq 3). Peroxidase catalyzes the redox-coupled reaction of H_2O_2 with 4-aminoantipyrine (4-AAP) and N-Ethyl-N-(3-sulfopropyl)-m-anisidine (ESPA), producing a brilliant purple color (eq 4). The absorbance is measured at 540 nm.

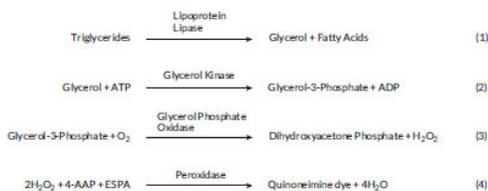


Figure 1. Triglyceride assay scheme

PRE-ASSAY PREPARATION

Reagent Preparation

- 1. Triglyceride Standard - (Item No. 10010509)**
The vial contains 400 μ l of a 1,000 mg/dl solution of Triglyceride Standard. It is ready to use as provided to prepare the standard curve. Sufficient Triglyceride Standard is provided to prepare three standard curves.
- 2. Standard Diluent Assay Reagent (5X) - (Item No. 700732)**
The vial contains 12 ml of a (5X) salt solution. Prior to use, dilute the contents of the vial with 48 ml of HPLC-grade water. This diluted Standard Diluent solution is used to prepare the triglyceride standards and may be stored for six months at room temperature until it is ready for use.
- 3. Sodium Phosphate Assay Buffer - (Item No. 700003)**
The vial contains 4 ml of 250 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2. Prior to use, dilute the contents of the vial with 16 ml of HPLC-grade water. This diluted buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.2) is used to prepare the triglyceride enzyme solution. The Assay Buffer may be stored for at least six months at room temperature until it is ready for use.
- 4. Triglyceride Enzyme Mixture - (Item No. 10010511)**
The vial contains a lyophilized enzyme mixture. Reconstitute the contents of the vial with 1 ml of HPLC-grade water. Transfer the reconstituted solution to a 15 ml centrifuge tube wrapped in aluminum foil. Add 14 ml of the diluted Assay Buffer to the reconstituted solution and mix by inversion. NOTE: A portion of the 14 ml should be used to rinse any residual solution from the vial. This solution is now ready to use in the assay. If the entire solution is not used at one time, the solution should be stored at 4°C. Do NOT Freeze! The solution is stable for one month when stored at 4°C; a slight pink discoloration may occur but will have no effect on the assay performance.

Sample Preparation

Plasma

Typically, normal human plasma has triglyceride concentrations in the range of 40-160 mg/dl (male) or 35-135 mg/dl (female).⁹

1. Collect blood using an anticoagulant such as heparin, EDTA, or citrate.
2. Centrifuge the blood at 700-1,000 x g for 10 minutes at 4°C. Pipette off the top yellow plasma layer without disturbing the white buffy layer. Store plasma on ice. If not assaying the same day, freeze at -80°C. The plasma sample will be stable for one month while stored at -80°C.
3. Plasma does not need to be diluted before assaying.

Serum

Typically, normal human serum has triglyceride concentrations in the range of 40-160 mg/dl (male) or 35-135 mg/dl (female).⁹

1. Collect blood without using an anticoagulant.
2. Allow blood to clot for 30 minutes at 25°C.
3. Centrifuge the blood at 2,000 x g for 15 minutes at 4°C. Pipette off the top yellow serum layer without disturbing the white buffy layer. Store serum on ice. If not assaying the same day, freeze at -80°C. The serum sample will be stable for one month while stored at -80°C.
4. Serum does not need to be diluted before assaying.

Cell Lysates

1. Collect cells (~18 x 10⁶ cells) by centrifugation (i.e., 1,000-2,000 x g for 10 minutes at 4°C). For adherent cells, do not harvest using proteolytic enzymes; rather use a rubber policeman.
2. Resuspend the cell pellet in 1-2 ml of cold diluted Standard Diluent.
3. Sonicate the cell suspension 20X at one second bursts.
4. Centrifuge cell suspension at 10,000 x g for 10 minutes at 4°C.
5. Remove the supernatant and store on ice. If not assaying on the same day, freeze at -80°C until use. The sample will be stable for at least one month.
6. Before assaying, further dilute the samples 1:2-1:3 with diluted Standard Diluent.

Tissue Homogenates

1. Weigh tissue and then mince into small pieces.
2. Homogenize 350-400 mg of minced tissue in 2 ml of the diluted Standard Diluent containing protease inhibitors of choice (see Interference section).
3. Centrifuge at 10,000 x g for 10 minutes at 4°C.
4. Transfer the entire supernatant to another tube. Store the supernatant on ice. If not assaying the same day, freeze at -80°C. The sample will be stable for one month while stored at -80°C. *NOTE: When centrifuged at high speeds some tissue homogenates, such as liver, will leave a layer of insoluble fat at the top of the centrifuge tube. Be sure to include this layer when transferring the supernatant.*
5. Typically, tissue samples require dilutions of at least 1:5 or greater. Dilute the samples using the diluted Standard Diluent before assaying.

ASSAY PROTOCOL

Plate Set Up

There is no specific pattern for using the wells on the plate. A typical layout of triglyceride standards and samples to be measured in duplicate is given below in Figure 2. We suggest you record the contents of each well on the template sheet provided (see page 18).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	2	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	3	3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D	4	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E	5	5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
F	6	6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
G	7	7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
H	8	8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

1-8 = Standards
S = Samples

Figure 2. Sample plate format

Pipetting Hints

- It is recommended that an adjustable pipette be used to deliver reagents to the wells.
- Before pipetting each reagent, equilibrate the pipette tip in that reagent (i.e., slowly fill the tip and gently expel the contents, repeat several times).
- Do not expose the pipette tip to the reagent(s) already in the well.

General Information

- All reagents except samples must be equilibrated to room temperature before beginning the assay.
- The final volume of the assay is 160 µl in all wells.
- The incubation temperature is at room temperature.
- It is not necessary to use all the wells on the plate at one time.
- It is recommended that the standards and samples be assayed at least in duplicate.
- Monitor the absorbance at 530-550 nm using a plate reader.

Standard Preparation

Take eight clean test tubes and label them 1-8. Add 200 µl of the diluted Standard Diluent (Item No. 700732) to tubes 2-8. Add 400 µl of diluted Standard Diluent to tube 1. Add 100 µl of Triglyceride Standard (Item No. 10010509) to tube 1 and mix thoroughly. The concentration of Tube 1 is 200 mg/dl (2.26 mmol/L), from which serial dilutions will be made. Serially dilute the triglycerides by removing 200 µl from tube 1 and adding it to tube 2; mix thoroughly. Next, remove 200 µl from tube 2 and place it into tube 3; mix thoroughly. Repeat this process for tubes 4-7. Tube 8 only has diluted Standard Diluent and is used as the blank. We recommend that you store these diluted standards for no more than one to two hours. See Table 1, on page 12, for the triglyceride concentrations of the serial dilutions.

Tube	Triglyceride Concentration (mg/dl)
1	200
2	100
3	50
4	25
5	12.5
6	6.25
7	3.125
8	0

Table 1. Preparation of Triglyceride Standards

Performing the Assay

1. Triglyceride Standard Wells - Add 10 µl of standard (tubes 1-8) per well in the designated wells on the plate (see suggested plate configuration, Figure 2, page 10).
2. Sample Wells - Add 10 µl of sample to two or three wells. *NOTE: The amount of sample added to the well should always be 10 µl.*
3. Initiate the reaction by adding 150 µl of diluted Enzyme Buffer solution to each well.
4. Carefully shake the microwell plate for a few seconds to mix. Cover with the plate cover.
5. Incubate the plate for 15 minutes at room temperature.
6. Read the absorbance at 530-550 nm using a plate reader.

ANALYSIS

Calculations

1. Calculate the average absorbance of each standard and sample.
2. Subtract the absorbance value of standard 8 (0 mg/dl) from itself and all other values (both standards and samples). This is the corrected absorbance.
3. Graph the corrected absorbance values (from step 2 above) of each standard as a function of the final triglyceride concentration (mg/dl) (see Table 1, page 12). A typical triglyceride standard curve is shown in Figure 3 on page 14.
4. Calculate the values of triglyceride samples using the equation obtained from the linear regression of the standard curve by substituting the corrected absorbance values for each sample into the equation.

$$\text{Triglycerides (mg/dl)} = \left[\frac{(\text{Corrected absorbance}) - (y\text{-intercept})}{\text{Slope}} \right]$$

Performance Characteristics

Precision:

When a series of sixteen human serum samples were assayed on the same day, the intra-assay coefficient of variation was 1.34%. When a series of sixteen human serum samples were assayed on six different days under the same experimental conditions, the inter-assay coefficient of variation was 3.17%.

Assay Range:

Under the standardized conditions of the assay described in this booklet, the dynamic range of the kit is 0-200 mg/dl triglyceride.

Representative Triglyceride Standard Curve

The standard curve, presented below, is an example of the data typically provided with this kit; however, your results will not be identical to these. You must run a new standard curve - do not use this data to determine the values of your samples.

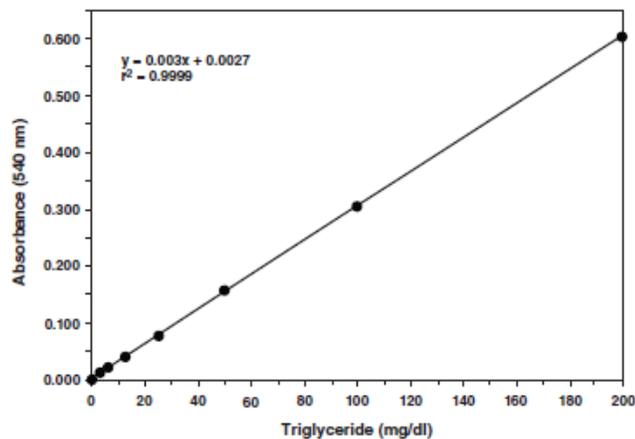


Figure 3. Triglyceride standard curve

Anexo 2

HISTOLOGÍA DE HIGADO

Se extrae el hígado y se corta en pedazos para guardarse en cassette marcado con el número de muestra. Se almacena en formalina 4% bajo refrigeración hasta su uso.

Cortes

Equipo

- Micrótopo.
- Navaja perfil alto o bajo
- Porta objetos
- Plancha (37°C)
- Baño de flotación (40°)
- Pinzas/pinceles
- Muestras incluidas en parafina

Procedimiento:

1. Enfriar los cassetes
2. Ajustar las micras y ángulos del micrótopo y poner la navaja.
3. Posicionar el cassette y deslizar la manija para cortar.
4. Escoger un corte adecuado (al menos tres en tira) y pasarlo al baño de flotación. Esperar a que se estire.
5. Etiquetar el portaobjeto.
6. Una vez estirada la tira, tomarlo con el portaobjeto y secar el exceso de agua.
7. Poner en plancha caliente y dejar secar.

Anexo3

Tinción hematoxilina-eosina

Una vez desparafinados los portaobjetos, proceder a la tinción del tejido.

Material

- Cajas coplin
- Canastilla
- Pinzas
- Tapas coplin

Procedimiento

QUIMICO	TIEMPO	FUNCIÓN
Xilol	5 min	Desparafinar
Xilol	5min	Desparafinar
Etanol 100	1min	Hidratar
Etanol 70	1min	Hidratar
Agua destilada	1min	-
Hematoxilina Harris	8min	Coloración de nucleos
Agua corriente	10min	Quitar exceso de hematoxilina
Alcohol ácido 1%	2seg	Quitar exceso de hematoxilina
Agua corriente	5min	Quitar el exceso de alcohol
Agua amoniacal .2%	1min	Transformar el color morado a azul
Agua corriente	5min	Blueing
Etanol 100	2seg	
Eosina 2%	1min	Agregar color al tejido
Etanol 70	2seg	Deshidratar
Etanol 100	2seg	Deshidratar
Xilol	2seg	-
Xilol	2min	Necesario para entalan
Entalan	-	
Agregar cubreobjeto	-	

Al terminar, dejar secar el entalan y limpiar bien con Xileno para quitar el exceso de entalan. Una vez realizado esto están listos para observarse al microscopio.

Anexo 4

Tinción con faloidina

Se desparafinan las laminillas durante 1 hora a 60°C y se procede a iniciar el tren de tinción:

1. Xileno 5min
2. Etanol 100% 5min
3. Etanol 96% 5min
4. Etanol 80% 5min
5. Agua corriente 10min
6. PBS 3min
7. PBS+TRITÓN 5min
8. Secar laminillas.
9. Rodear cortes de tejido con plumón hidrofóbico.
10. Poner en cámara húmeda en oscuridad durante 10min con faloidina.
11. Realizar tres lavados con PBS y secar.
12. Poner 20ul de Vectashield+DAPI y poner cubreobjetos.
13. Sellar con esmalte y refrigerar.

Anexo 5

Extracción de RNA por método de TRIzol

MATERIAL *Todo el material a utilizar debe ser esterilizado previo al uso*

- Eppendorf 1.5ml
- Puntas
- Micropipeta
- Tubos grandes para tejido

REACTIVOS

- Trizol
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 75%
- Agua libre de RNAsas

EQUIPO

- Polytron
- Microcentrífuga
- Vortex

PROCEDIMIENTO

- Homogenizar las muestras en 1ml de Trizol por cada 50-100mg de tejido. (1.5-2.0 mL)
- Remover la grasa, centrifugando a 12 000 g por 10 min / 4 C.
- Remover la capa superior de grasa, y transferir la fase clara a un tubo limpio
- Incubar 5 min a temperatura ambiente
- Adicionar 200 μ L de cloroformo por cada 1 mL de TRIzol usado (300-400 μ L).
- Agitar vigorosamente con la mano durante 15 seg e incubar 3 min a temperatura ambiente
- Centrifugar a 12 000 g por 15 min / 4 C.
- Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo limpio.
- Adicionar 500 μ L de isopropanol por cada 1 mL de TRIzol (750-1000 μ L).
- Incubar 10 min a temperatura ambiente (Se puede dejar toda la noche a -20 C).
- Centrifugar a 12 000 g por 10 min / 4C.
- Decantar el sobrenadante y lavar el pellet con 1 mL de etanol 75 % por cada 1 mL de TRIzol usado (1.5-2.0 mL). Agitar con la mano y centrifugar a 7 500 g por 5 min / 4 C.
- Decantar el sobrenadante. Dar un spin en la centrifuga para quitar el exceso de etanol.
- Resuspender en agua libre de RNAsas (20-50 μ L).

Anexo 6

CUANTIFICACIÓN DE RNA

Para cuantificar la concentración y evaluar la pureza del RNA extraído, se diluyeron 1.5uL de RNA en 1.5uL de agua libre de RNAsas. Posteriormente se realiza la lectura de las absorbancias a las longitudes de onda 260 y 280nm en espectrofotómetro nanodrop.

La pureza del RNA en relación a la presencia de proteínas se obtiene con el cociente de las absorbancias a las longitudes de 260 y 280nm. (A_{260}/A_{280}). Ésta debe estar entre 1.9 y 2.2, si el valor de lectura no se encuentra en este intervalo, se puede inferir que el RNA se encuentra contaminado con proteínas.



SÍNTESIS DE cDNA

High capacity cDNA reverse transcription kit – Applied Biosystems

Procedimiento:

- 1) Cuantificar en el Nano Drop las muestras de RNA
- 2) Hacer una mix de reacción con:
 - 2 μ l Buffer 10X
 - 0.8 μ l dNTP's
 - 2 μ l Random Primers
 - 1 μ l Enzima RT
- 3) Colocar 5.8 μ l del mix de reacción en tubos de 200 μ l
- 4) Adicionar el volumen necesario para tener 1 μ g de RNA (hasta 14.2 μ l)
- 5) Llevar a un volumen final de 20 μ l con agua libre de RNAsas.
- 6) Realizar un blanco sin enzima (negativo).
- 7) Poner la reacción en el termociclador.
- 8) Pasar el cDNA a tubos de 600 μ l.
- 9) La muestra se diluye con agua libre de RNAsa, llevar a 400 μ l las muestras provenientes de tejido y a 200 μ l muestras de cultivo celular.

Reacción:

- 10 min / 25 °C
- 2 horas / 37 °C
- 5 min / 85 °C
- ∞ / 4°C

Anexo 8

PCR en tiempo real

Procedimiento

- 1) En placas para PCR, adicionar a cada pozo:
 - 5 μ L SYBR-Green (ya trae la enzima incorporada)
 - 5 μ L cDNA
 - 0.5 μ M de cada oligo (se puede usar de 0.2 – 0.5 μ M)
- 2) Se prepara un Mix de reacción con SYBR-Green y una dilución 1:100 de cada oligo (100 μ M), dependiendo del número de muestras para amplificar.
- 3) Se adiciona 5 μ L del Mix y después 5 μ L del cDNA.
- 4) Se sella la placa y se centrifuga brevemente (1000-1200 rpm).
- 5) Correr la reacción en el termociclador.

Para evaluar los oligos:

- 1) Se hace un gradiente de temperatura, tomando una muestra de cDNA donde se exprese el gen deseado. Se evalúan 6 temperaturas.

A	Temperatura 1
B	Temperatura 2
C	Temperatura 3
D	Temperatura 4
E	Temperatura 5
F	Temperatura 6

- 2) Se realiza una curva estándar, tomando una muestra de cDNA donde se exprese el gen deseado (por triplicado). Se toma la muestra directa, y de ahí, se hacen 5 diluciones seriadas 1:2.

	1	2	3
A	Directa	Directa	Directa
B	Dilución 1	Dilución 1	Dilución 1
C	Dilución 2	Dilución 2	Dilución 2
D	Dilución 3	Dilución 3	Dilución 3
E	Dilución 4	Dilución 4	Dilución 4
F	Dilución 5	Dilución 5	Dilución 5

Reacción

- 95 °C / 10 min
- 95 °C / 10 s
- Temperatura (depende de oligos) / 20 s
- 72 °C / 30 s
- Lectura de plato
- 39 ciclos
- Curva de melting 65-95 °C. De 0.5 °C por 0.05 °C
- Lectura de plato
- 4 °C / 2:30 min

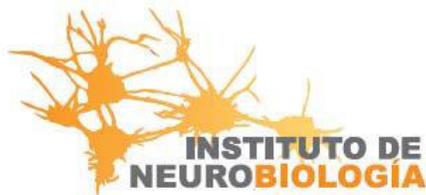
Extracción de DNA

Extracción pura

1. Obtener los últimos 1 a 3 mm de la cola del ratón y colocarlos en tubo eppendorf.
2. Agregar 200 μ L de buffer de digestión.
3. Agregar 2 μ L de proteinasa K (10 mg / mL)
4. Agite a 800 rpm durante +/- 6 horas o 600 rpm durante la noche, ambos a 55 °C.
5. Centrifugar a 14000 rpm durante 15 min.
6. Retire el sobrenadante (\approx 180 μ L) y colocarlo en un eppendorf nuevo.
7. Agregar 180 μ L de isopropanol (volumen 0,7). Nota: el isopropanol se evapora fácilmente, por lo tanto, no permita que el matraz se abra por completo.
8. Mezclar bien en vortex hasta observar precipitado de DNA.
9. Retirar el ADN con una punta. Dejar que el ADN se seque durante 30 minutos (Nota: no más de 2 horas).
10. Resuspender con 200 μ L de agua Milli Q o Tris EDTA.
11. Dejar disolver a 37 °C durante +/- 2 horas.
12. Guardar extracto de ADN a 4 °C hasta su uso.

Buffer de digestión (500 mL):

Agua Milli Q -----	415 mL
TrisHCl [1M] pH 8.0 -----	50 mL
EDTA [0,5M] -----	5 mL
SDS 10% -----	10 mL
NaCl [5M] -----	20 mL



SECRETARIA ACADÉMICA
INEU/SA/CB/205

A quien corresponda
Presente

Por medio de la presente les informo que el trabajo de investigación aprobado "**Efecto de la hormona prolactina en la función metabólica de células adiposas y su impacto en la obesidad: Mecanismos moleculares involucrados**"; este proyecto es parte del protocolo general "Regulación hormonal de la obesidad" dirigido por la Dra. Yazmín Macotela Guzmán el cual fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación del INB con el número 075 el 05 de noviembre de 2014. Como resultado se encuentra que cumple con la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) clave NOM-062-ZOO-1999. Para la evaluación de dicho proyecto este comité también tomó en cuenta los criterios de ética para el uso de animales de investigación según los estándares internacionales de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH).

Sin más por el momento le agradezco la atención que se sirva dar a la presente y le envío un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Campus Juriquilla, Qro, 12 de septiembre del 2017

Dr. Ataulfo Martínez Torres
Presidente del Comité de Ética en Investigación

ccp.- Dra. Yazmín Macotela Guzmán