

**Papel de la proteína DLK1 en la regulación
hipofisaria de las células adiposas en el
ratón adulto**

Tesis Doctoral

Ricardo Alfonso Puertas Avendaño

DIRECTORAS

Dra. Carmen Díaz Delgado
Dra. Miriam González Gómez

Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética.
Sección de Biología de la Facultad de Ciencias y
Departamento de Ciencias Médicas Básicas.
Sección de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad
de La Laguna, 2016

Dra. Carmen Díaz Delgado, Profesora Titular del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Castilla-La Mancha.

CERTIFICA

Que **Ricardo Alfonso Puertas Avendaño**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo contenido en la memoria titulada **“Papel de la proteína DLK1 en la regulación hipofisaria de las células adiposas en el ratón adulto”**.

Dado que la presente Memoria reúne las adecuadas condiciones para constituir una tesis doctoral, una vez revisada, autorizo su presentación por encontrarla apta para su defensa ante el tribunal correspondiente con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad de La Laguna.

Y para que así conste, en el cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmo la presente en Albacete a 26 de Noviembre de 2015.



Fdo: Dra. Carmen Díaz Delgado



Universidad
de La Laguna

Dra. Miriam González Gómez, Profesora ayudante de Doctor del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad de La Laguna

CERTIFICA

Que **Ricardo Alfonso Puertas Avendaño**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo contenido en la memoria titulada “**Papel de la proteína DLK1 en la regulación hipofisaria de las células adiposas en el ratón adulto**”.

Dado que la presente Memoria reúne las adecuadas condiciones para constituir una tesis doctoral, una vez revisada, autorizo su presentación por encontrarla apta para su defensa ante el tribunal correspondiente con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad de La Laguna.

Y para que así conste, en el cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmo la presente en La Laguna a 26 de noviembre de 2015.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Miriam', is written over a faint, circular stamp.

Fdo: Dra. Miriam González Gómez

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, MICROBIOLOGÍA, BIOLOGÍA
CELULAR Y GENÉTICA. SECCIÓN DE BIOLOGÍA DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS Y
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS BÁSICAS.
SECCIÓN DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA
SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.**



TESIS DOCTORAL

**Papel de la proteína DLK1 en la regulación
hipofisaria de las células adiposas en el
ratón adulto**

**Ricardo Alfonso Puertas Avendaño
Enero 2016**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, MICROBIOLOGÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y
GENÉTICA. SECCIÓN DE BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS Y
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS BÁSICAS.
SECCIÓN DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA



Papel de la proteína DLK1 en la regulación hipofisaria de las células adiposas en el ratón adulto

Tesis doctoral presentada para optar al grado
de Doctor por la Universidad de La Laguna

Ricardo Alfonso Puertas Avendaño

DIRECTORAS

Dra. Carmen Díaz Delgado
Dra. Miriam González Gómez

Hace más de una década que inicié el sueño del Doctorado, el cual ha supuesto superar enormes obstáculos, pero ninguno tan duro como el perder a mi madre. Tristemente terminé este capítulo de mi vida sin usted, mamá. En silencio cuando cierro los ojos casi puedo escuchar sus sabias palabras, que además siempre estuvieron cargadas de un profundo amor, amor de madre, la echo tanto de menos mamá. Soy su hijo, usted mi madre y lo más sublime de todo es que fuimos amigos, de esos que se cuentan todo, pero que todo se guarda en cada uno. La enorme vacuidad que me embarga desde que se me fue, solo es comparable con el amor que recibí de usted. A diario me vienen a la memoria muchísimas de sus célebres frases, pero la que más me toca en lo profundo, es aquella que nació un día que le dije: “La amo tanto mamá” y usted me respondió “Yo más”, ahora conozco el valor de esa frase.

Esta Tesis Doctoral está dedicada a la memoria de mi madre, Morella Josefina Avendaño de Puertas, quien consagró toda su vida al cuidado de su familia.

Por usted mamá.

Agradecimientos

Mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la cristalización de este trabajo, especialmente a las directoras de la tesis Dra. Carmen Díaz Delgado y Dra. Miriam González Gómez.

Dra. Carmen Díaz Delgado, gracias por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación. Hemos culminado con éxito un trabajo.

Dra. Miriam González Gómez, gracias por guiarme en el camino de la ciencia y sobre todo gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo, por haberme dejado pensar, elegir y expresar mi opinión. Dos de los grandes valores que me llevo de ti son: el profundo compromiso con el que asumes el ser una Educadora y tu Pasión por la ciencia.

Dra. Carmen Damas, gracias por todo el trabajo en el procesamiento estadístico de los datos y por enseñarme a ser autónomo en esa parte tan importante de la ciencia, pero, sobre todo gracias por ayudarme en tantos momentos difíciles de mi vida. Te debo tanto que la palabra gracias me parece insuficiente, te admiro y te valoro.

Especial agradecimiento a la Dra María José Ruiz Hidalgo del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Albacete (Universidad de Castilla-La Mancha) por su colaboración en el procesamiento de los tejidos por RT-PCR, a la Dra. Julie A. Chowen y el Dr. Nicanor Morales Delgado por su valiosa colaboración en el estudio del suero mediante inmunoensayo (Departamento de Endocrinología; Hospital Niño Jesús, Madrid).

Al Dr. Gerard Tramú de la Universidad de Burdeos II (Francia) por la cesión de la mayor parte de los antisueros contra las hormonas adenohipofisarias utilizados en esta tesis.

También quiero expresar mi agradecimiento a la Sección de Biología Celular del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética de la

Facultad de Ciencias de la ULL, por haberme dado la oportunidad de iniciar esta tarea de investigación y por supuesto a las personas que trabajan en él, quienes en innumerables ocasiones me han ayudado. Especialmente a la Dra. Aixa Rodríguez que me dio la oportunidad de iniciarme en el mundo de la Biología Celular, al Dr. Miguel Ángel Pérez Batista, quien siempre tuvo una sabia recomendación cuando se la solicité, incluido los veranos de cada año cuando todos estaban de vacaciones El y yo estábamos trabajando. A la Dra. Carmen María Trujillo quien gentilmente me enseñó a interpretar una inmunorreacción, a la Dra. Ana Lancha, la Dra. María del Carmen Alfayate, el Dr. Ricardo Reyes, la Dra. Antonia Alonso, la Dra. Elena Santos, la Dra. Ana Delgado y la Dra. Carmen Yáñez, quienes de una forma u otra han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral. A mis incondicionales amigas y técnicos de laboratorio, Maritina y Tere, con todo lo que tengo que agradecerles podría hacer un libro, cada una me aportó todo lo que en sus manos estuvo y con la mejor disposición, pero, debo hacer una especial mención a Maritina quien me ha dado lo que no está escrito y lo sigue haciendo, eres mi familia, te llevo en el alma y me siento afortunado porque la vida me prestó el maravilloso regalo de llevarte en mi corazón, necesito que sepas que te amo mas allá de toda duda y condición. Y por último, pero no por ello menos importante, gracias a mi querida compañera Idaira Dorta quien llena de alegría todo el espacio que la circunda, eres una excelente compañera y amiga.

Quiero dar las gracias a mi Madre (Morella Josefina), mi Padre (Iván Antonio), mi hermano (Juan Carlos), mi sobrino (Juan Carlos hijo), mi cuñi Karen (te quiero mucho con demasiado) y mi primo (Jorge Luis), quienes siempre me han apoyado y han soportado mi ausencia dándome siempre ánimo y amor de familia, los quiero y les debo todo lo que soy.

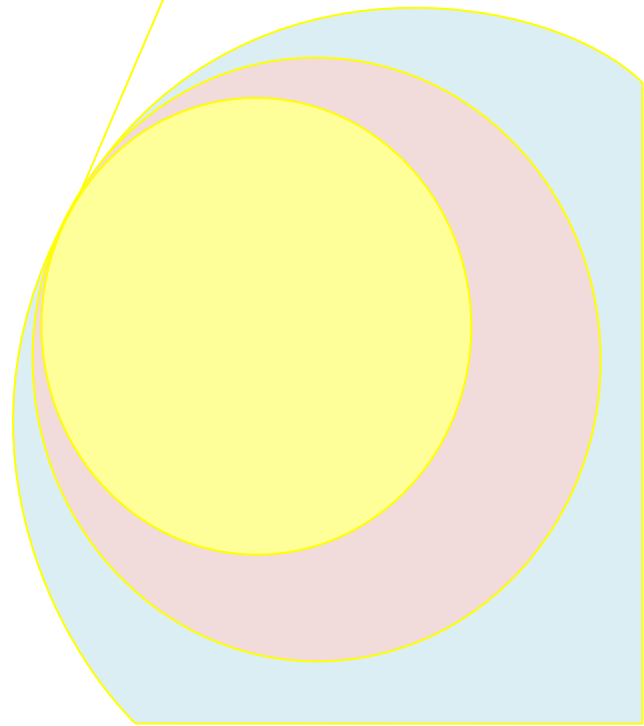
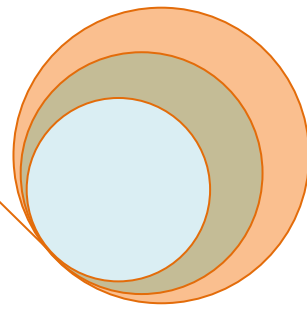
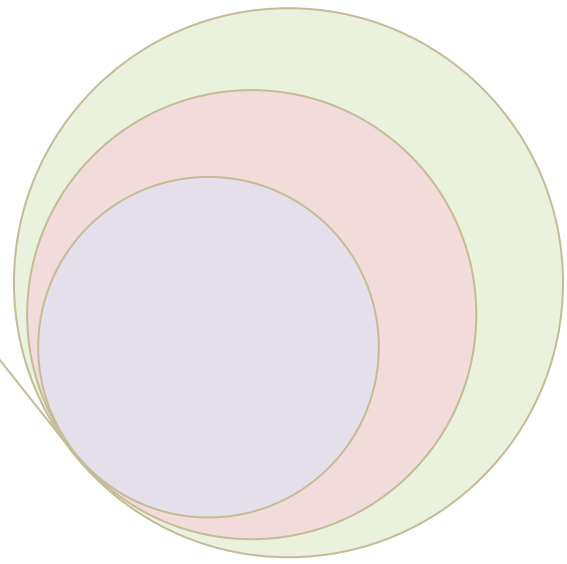
Finalmente doy las gracias a todos mis amigos que pasaron a ser parte esencial de mi vida y hoy por hoy son mi Gran Familia, por lo que deseo hacer una pequeña mención a cada uno de ellos en reconocimiento de su incondicional apoyo. Familia Casanova Ravelo, Dn Lázaro (hoy ya no está entre nosotros) muchísimas gracias por brindarme su mano y un hogar donde vivir, le ruego a Dios que lo tenga a su derecha, a mi Ángeles (Tati), contigo tengo para hacer un best seller, gracias por tus cuidados, tus sabios consejos y ese especial amor que te caracteriza te quiero mi Tati, gracias Felipe, Oliver, Rebeca, Dña Obdulía y Nirma por hacerme más fácil el camino de la vida. Familia Gil

Hernández, querida Mary me acogiste en tu casa como uno más de vosotros, tu apoyo, tu cariño son por hoy fuente de mi alegría, se puede decir más alto pero no más claro, Te adoro mi Mary. Gracias Diana, Migue, Esther, Ayose, Yoel, Silvia y Jorge por todos esos domingos en familia. Ahhh y no pienses que me olvido de ti amigo mío, mi colega de juergas y conversaciones triviales y trascendentales, entraste en mi vida con pie firme dándome apoyo, gracias Domingo Rivero (Chomi) se te quiere caxo.

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en el Congreso de Neuroendocrinología. Strasbourg-France, Septiembre, 2008 y publicados en *Journal of Neuroendocrinology* 2011; 23: 849-859.

Para la realización de este trabajo se contó con la financiación de la Consejería de Educación y Ciencia. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. (Ref. PII1I09-0065-8194).

ÍNDICE



INTRODUCCIÓN.....	2
1. Eje hipotálamo-hipófisis-adiposo	
2. El tejido adiposo como órgano endocrino. Importancia de la leptina y de su receptor.....	4
3. Papel de la leptina producida por células de la hipófisis.....	7
4. La proteína DLK1 como regulador endocrino.....	8
PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	12
PLANTEAMIENTOS.....	13
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
1. Material y Métodos.....	17
1.2. Inmunohistoquímica para microscopía óptica.....	19
1.2.1. Método inmunoenzimático indirecto.....	21
1.2.2. Colocalización.....	23
1.2.3. Control de especificidad de la reacción Inmunohistoquímica.....	26
1.2.4. Obtención y análisis de las imágenes.....	26
1.3. Análisis cuantitativo de los diferentes péptidos y receptores en la hipófisis de ratones <i>Dlk1</i> ^{-/-} comparados con los controles.....	26
1.3.1. Análisis inmunohistoquímico de los diferentes péptidos estudiados en el tejido adiposo de ratones <i>Dlk1</i> ^{-/-} comparados con los controles.....	28
1.4. Inmunohistoquímica para microscopía electrónica.....	28
1.4.1. Método de postinclusión.....	29
1.4.1.1. Método indirecto con el segundo anticuerpo conjugado con oro coloidal (OC).....	29
1.5. Análisis de la expresión cuantitativa por qRT-PCR.....	30

1.6. Determinación de los niveles de hormonas adenohipofisarias en suero por inmunoensayos de microesferas multiplex (MBIA) (ELISA).....	33
--	----

RESULTADOS

Resultados.....	36
-----------------	----

RESULTADOS EN EL RATÓN MACHO ADULTO

1. Distribución de las células adenohipofisarias productoras de hormonas.....	37
2. Expresión de la proteína DLK1 en la hipófisis. Distribución y localización.....	39
2.1 Localización subcelular.....	41
2.2. Caracterización de las células DLK1-ir del lóbulo anterior.....	43
3. Expresión del receptor de leptina en células adenohipofisarias.....	46
3.1. Colocalización del receptor de leptina en células DLK1-ir en el lóbulo anterior hipofisario.....	48
4. Detección inmunohistoquímica de la hormona leptina en células Hipofisarias.....	49
5. Análisis inmunohistoquímico de Lp en relación con DLK1 en las células somatotropas y lactotropas.....	50
6. Expresión de los receptores de hormonas adenohipofisarias en el tejido adiposo.....	52
7. Expresión de leptina y su receptor en el tejido adiposo.....	53

RESULTADOS EN EL RATÓN ADULTO CARENTE DEL GEN *Dlk1*

8. Análisis de las células productoras de hormonas adenohipofisarias en el lóbulo anterior de ratones KO- <i>Dlk1</i>	55
---	----

8.1. Descenso en el número de células somatotropas en el ratón <i>Dlk1</i> ^{-/-}	58
8.2. Análisis comparativo entre las células gonadotropas y lactotropas de ratones WT y KO.....	59
8.3. Análisis por RT-PCR de los niveles de ARNm de las hormonas FSH, LH, PRL y GH.....	60
9. Niveles séricos de las hormonas adenohipofisarias FSH, LH, PRL, GH y la hormona adipocítica leptina en los ratones <i>Dlk1</i> ^{-/-}	61
10. Expresión del receptor específico de la hormona leptina en células hipofisarias de ratones KO- <i>Dlk1</i>	62
11. Detección de la hormona adipocítica leptina en células hipofisarias de ratones KO- <i>Dlk1</i>	65
12. Análisis de los receptores de hormonas adenohipofisarias, de la hormona adipocítica y su receptor en el tejido adiposo de ratones KO- <i>Dlk1</i>	67
12.1. Análisis comparativo de los niveles de ARNm de los receptores de hormonas adenohipofisarias, leptina y su receptor en el tejido adiposo de ratones KO- <i>Dlk1</i>	70
DISCUSIÓN	
Discusión.....	73
1. Interacciones entre la hipófisis y el tejido adiposo.....	74
2. Papel de DLK1 en el eje hipófisis-adiposo.....	77
Esquema resumen de las interacciones en el eje hipófisis-adiposo.....	85

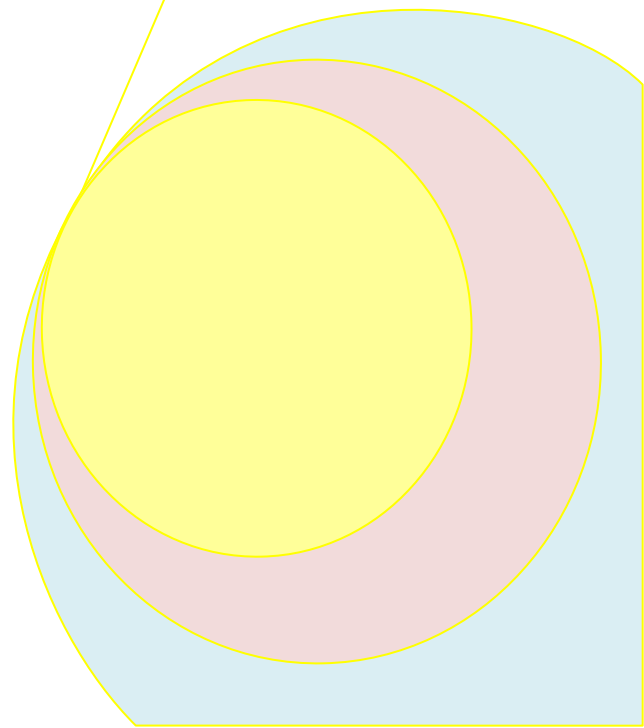
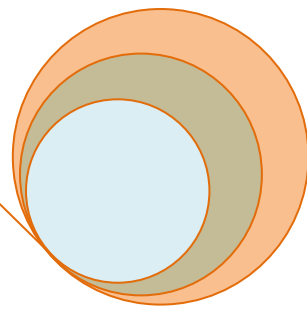
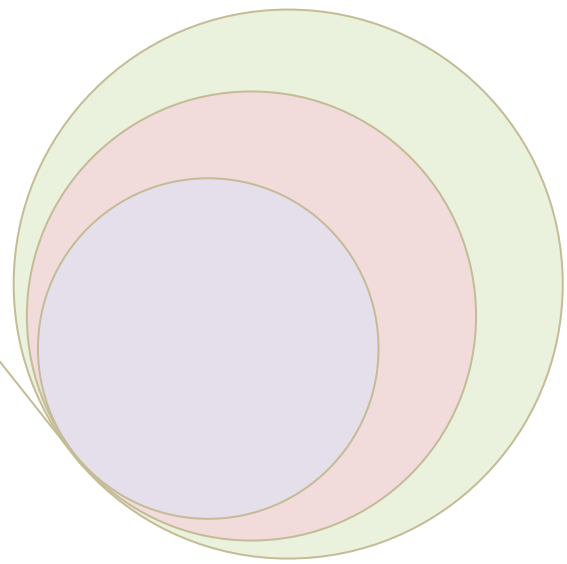
CONCLUSIONES

Conclusiones.....87

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía.....92

INTRODUCCIÓN



1. Eje hipotálamo-hipófisis-adiposo

El tejido adiposo blanco ha sido considerado clásicamente como un almacén de reservas energéticas en forma de triacilgliceroles. En condiciones de ayuno prolongado estas reservas se movilizan para ser liberadas como ácidos grasos que son oxidados en el hígado y músculo. Sin embargo, el descubrimiento de la producción del tejido adiposo de un péptido capaz de regular el balance energético (Zhang y cols., [1994](#)), produjo un enorme cambio conceptual pasando a considerarle un tejido endocrino; a dicho péptido se le denomina leptina. Posteriormente se han descubierto numerosas moléculas proteicas o de otra naturaleza, sintetizadas y secretadas por los adipocitos, conocidas genéricamente como adipocitocinas (o adipocinas). Algunas de estas adipocitocinas son la adiponectina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6), la angiotensina, el inhibidor del plasminógeno tipo 1 y estrógenos. Dichas moléculas actúan sobre la homeostasis energética, la función neuroendocrina así como, en la función inmunitaria y procesos inflamatorios (revisado en Trayhurn y Beattie [2001](#); Ahima, [2006](#)). Adipocitocinas como la leptina y la adiponectina tienen receptores en el hipotálamo al que informan sobre las reservas de grasa. Así por ejemplo, cuando hay abundante grasa acumulada, aumenta la secreción de leptina, cuyo efecto anorexigénico provoca que el hipotálamo inhiba el apetito. Por tanto, el tejido adiposo envía señales al sistema nervioso que regulan procesos metabólicos.

En un nuevo paso en el entendimiento del papel funcional del tejido adiposo, desde los años 80 se han acumulado evidencias de la existencia de receptores de hormonas y péptidos liberados por el hipotálamo y la hipófisis en las células adiposas maduras, al menos en cultivo. En concreto se han detectado el ARNm y/o la proteína de los receptores 1 y 2 del péptido hipotalámico CRH (Seres y cols., 2004), de receptores de oxitocina (Boland y Goren, 1987; Gimpl y Fahrenholz, 2001; Schaffler y cols., 2005) y vasopresina (Schaffler y cols., 2005), y de receptores de las hormonas adenohipofisarias PRL (Ling y cols., 2003; Schaffler y cols., 2005), TSH (Sorisky y cols., 2000; Schaffler y cols., 2005), GH (Hellgren y cols., 2001; Schaffler y cols., 2005), ACTH (Grunfeld y cols., 1985; Norman y cols., 2003; Schaffler y cols., 2005) y MSH (Boston y Cone, 1996; Norman y cols., 2003; Schaffler y cols., 2005). Sin embargo, no se han detectado receptores de las gonadotropinas adenohipofisarias FSH y LH (Schaffler y cols., 2005). Todo esto ha llevado a plantear la existencia de un eje hipotálamo-hipófisis-adiposo (Schaffler y cols., 2005, 2006), en el que el cerebro, a través de la hipófisis, controlaría múltiples funciones del tejido adiposo (**Fig. 1**). Dichas hormonas tendrían un papel en la secreción de adipocitocinas, regulando directamente las funciones en las que participan los adipocitos (revisado en Schaffler y cols., 2006). No obstante, hasta el momento no se ha encontrado ninguna hormona/péptido hipotalámico o hipofisario específico que actúe sólo sobre los adipocitos.

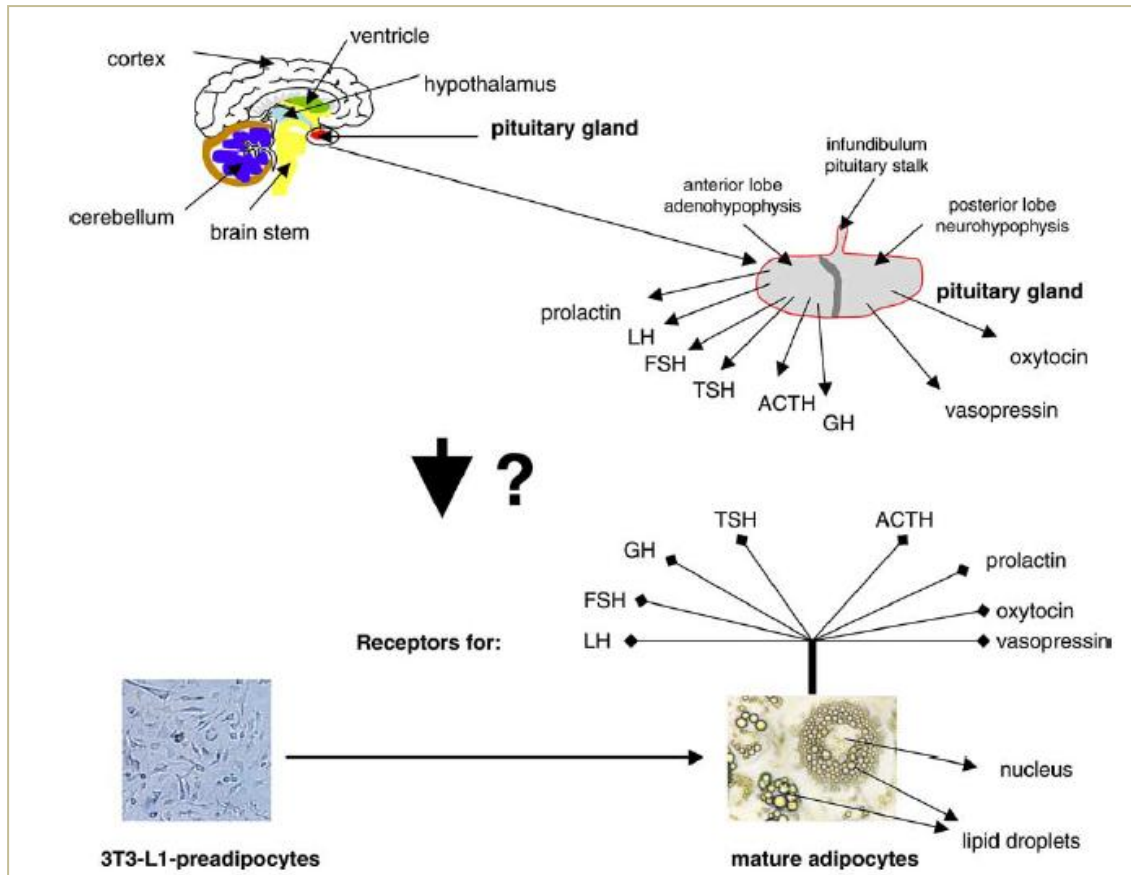


Figura 1. Hipótesis del eje hipotálamo-hipófisis-adiposo planteada por Schäffler y cols., (2005).

2. El tejido adiposo como órgano endocrino. Importancia de la leptina y de su receptor.

Como hemos dicho anteriormente, el tejido adiposo es considerado en la actualidad como un órgano endocrino activo. La leptina es un péptido anorexigénico producido mayoritariamente por las células adiposas que inhibe el apetito, estimula la termogénesis, disminuye los niveles de glucosa, incrementa la oxidación de los ácidos grasos y reduce el peso y la grasa corporal (Ahima, 2006). La leptina es una proteína de 167 aminoácidos (16 kDa). El gen que la codifica fue descubierto por Zhang y cols., (1994). Este grupo de investigadores crearon un ratón mutante homocigoto carente del gen

Ob (de *Obsessivity*), el cual desarrolla obesidad mórbida. Parte de las funciones de la leptina se deben a su acción en el hipotálamo y dependen de la presencia de receptores de leptina en grupos de neuronas hipotalámicas; ello explica la falta del reflejo de saciedad en los ratones carentes de *Ob*. El receptor específico de leptina (LpR) tiene numerosas isoformas, cuatro de las cuales se expresan en humanos. La variante b (LpRb), es la forma larga del receptor y la única que tiene dominios extracelulares que activan las cascadas de activación de quinasas JAK2, /ERK, /STAT3, /STAT5 y IRS/PI3. La delección del receptor LpRb da un fenotipo similar al de los ratones mutantes *Ob/Ob* lo que sugiere que esta isoforma es la más importante como mediador en la acción de la leptina (revisado en Wada y cols., 2014; Park y Ahima, 2015), mientras que las isoformas cortas se piensa que intervienen en el transporte de la leptina a través de la barrera hematoencefálica (Bjorbaek y cols., 1998).

El receptor LpRb está presente en poblaciones neuronales hipotalámicas del núcleo arqueado (*nucleus arcuatus*), complejo paraventricular (núcleos paraventricular, supraóptico, periventricular), núcleos dorsomedial, ventromedial y premamilar ventral, así como del hipotálamo lateral (Baskin y cols., 1999; Iqbal y cols., 2000b, 2001). Además, el LpRb se coexpresa con neuropéptidos relacionados con la ingesta, como el péptido neuropéptido Y (NPY), el péptido relacionado con agutí (AgRP), el transcrito regulado por cocaína-anfetamina (CART) y la proopiomelanocortina (POMC), en especial en el núcleo arqueado (revisado por Wada y cols., 2014). La leptina liberada por el tejido adiposo actúa en el núcleo arqueado activando las neuronas anorexigénicas que sintetizan POMC y CART, e inhiben a las neuronas orexigénicas que sintetizan

AgRP y NPY; con ello se produce una inhibición del hambre y una estimulación del gasto energético. Por el contrario, durante periodos de ayuno, los niveles de leptina se reducen rápidamente. Esto es una señal para el efecto contrario al descrito anteriormente: expresión de AgRP/NPY y supresión de POMC/CART, con lo que se estimula la ingesta de alimentos y se reduce el gasto energético (Ahima y cols., 1999; Cowley y cols., 2001). La leptina actúa también en el núcleo ventral hipotalámico que expresan el factor de transcripción estereidogénico SF1, el cual también está relacionado con la ingesta y al balance energético (Liao y cols., 2012). En el hipotálamo lateral, la leptina reduce la expresión de la hormona concentradora de melanina (MCH) y de orexinas y en consecuencia se inhibe el apetito (Abizaid y cols., 2006; Robertson y cols., 2008; Dalamaga y cols., 2013).

La leptina tiene un efecto directo o indirecto sobre la secreción y regulación de las hormonas adenohipofisarias GH, FSH/LH, ACTH, TSH y PRL (Cunningham y cols., 1999; Chehab y cols., 1997; Paz-Filho y cols., 2009). Numerosos estudios demuestran que la leptina actúa sobre los ejes hipotálamo-hipófisis-tiroides y el GH, aunque también en el eje adrenal y gonadal, bien a través del receptor de leptina, o por su acción en poblaciones neuronales hipotalámicas que regulan la actividad hipofisaria. Así por ejemplo, los ratones mutantes homocigotos para el gen del receptor de leptina manifiestan obesidad mórbida, ausencia de desarrollo puberal y un descenso en la secreción de TSH y GH (Lloyd y cols., 2001). Asimismo cuando la expresión del receptor de leptina se anula selectivamente en las células hipofisarias productoras de GH en modelos murinos, disminuyen el número de

células somatotropas y los niveles de GH en suero, mientras que hay un aumento de la adiposidad en los ratones adultos (Childs y cols., 2011).

La presencia de la forma larga del receptor de leptina (LpRb) en células del lóbulo anterior de la hipófisis se ha demostrado en rata y ratón (Jin y cols., 2000; Sone y cols., 2001), pero la distribución en cada uno de los tipos celulares es diferente en las distintas especies estudiadas. En la rata, el 97% de células somatotropas presentan el receptor de leptina, sin embargo, menos del 1% del resto de tipos celulares lo expresan (Sone y cols., 2001) mientras que, en la oveja, aproximadamente el 70% de las somatotropas y el 30% de las gonadotropas y corticotropas lo expresan (Iqbal y cols., 2000a).

3. Papel de la leptina producida por células de la hipófisis.

La leptina no sólo es producida por el tejido adiposo sino también por otros órganos, entre ellos la hipófisis. En roedores, una proporción baja de las células del lóbulo anterior hipofisario, principalmente las células TSH, contienen también leptina (7% de las células totales en el ratón y el 5% en la rata), según Jin y cols., (2000). Sin embargo, otros estudios hechos en rata encuentran que son las células somatotropas las que producen la mayoría de leptina en machos y hembras no gestantes (McDuffie y cols., 2004; Crane y cols., 2007), aunque los niveles de leptina producida por las células gonadotropas se elevan en ratas preñadas y lactantes (McDuffie y cols., 2004). En humanos la mayoría de las células que expresan leptina son las corticotropas (Popovic y cols., 2001).

Recientemente Odle y cols., (2014), han mostrado un papel diferencial de la leptina de origen adipocítico e hipofisario en el eje GH. Sus resultados se basan en la comparación de dos modelos de ratón carentes de leptina. En un modelo, los ratones no expresan de forma global la leptina y en el otro modelo los ratones carecen de leptina adipocítica. Sus hallazgos apuntan a que los adipocitos son la única fuente de la leptina circulante, que la leptina adipocítica es responsable de la secreción de GH y que la leptina hipofisaria regula el desarrollo y mantenimiento de las células somatotropas.

4. La proteína DLK1 como regulador endocrino

La proteína “Delta-like” 1 (DLK1) es una proteína transmembrana de aproximadamente 55 kDa compuesta por un dominio intracelular corto, un dominio transmembrana y una región extracelular que posee seis dominios repetidos similares al factor de crecimiento epidérmico EGF (**Fig. 2**; Laborda y cols., 1993). La secuencia extracelular de DLK1 es homóloga a la secuencia encontrada en proteínas EGF, tales como los receptores Notch y sus ligandos: Serrate, Jagget y especialmente Delta. Con este último, DLK1 guarda mayor homología, de ahí el nombre de Delta-like 1 (DLK1) (Laborda y cols., 1993). Esta proteína es procesada proteolíticamente en un sitio próximo a la membrana por una proteasa de la familia ADAM, la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral- α (TACE, ADAM17), la cual libera la región extracelular como producto soluble. Aunque normalmente se ha pensado que la proteína soluble es la que tiene una actividad biológica, se ha encontrado que la forma soluble de la proteína secretada por los astrocitos se une a la forma de DLK1 anclada en la membrana de las células madre neuronales,

manteniendo así la capacidad de auto-renovación de las mismas (Ferrón y cols., 2011).

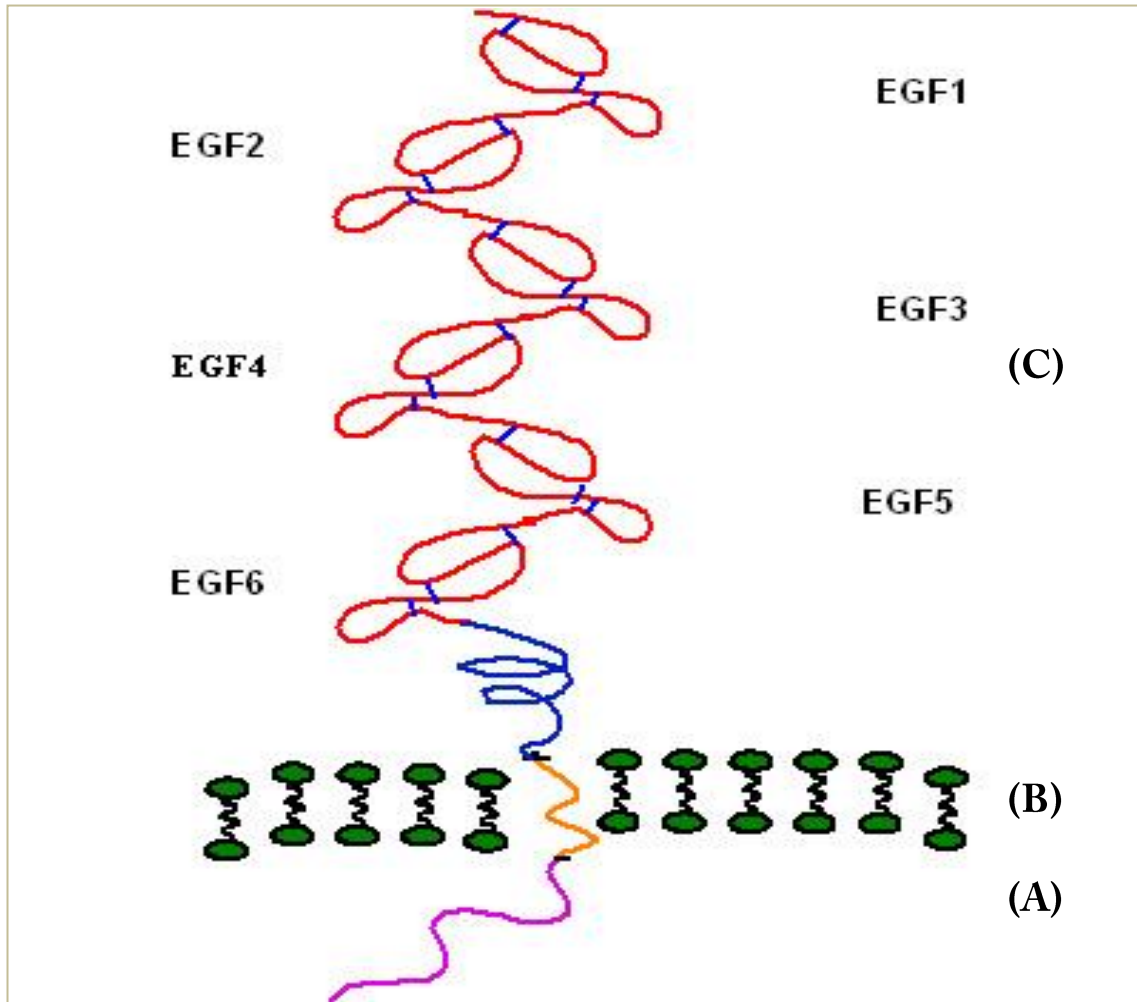


Figura 2. Dibujo esquemático de la proteína integral de membrana DLK1, en la que se representa la región intracelular corta (A), un dominio transmembrana (B) y una región extracelular con seis repeticiones en tándem de tipo EGF (C).

La proteína DLK1, o factor preadipocítico 1 (Pref-1) como también se le conoce dado su papel en la diferenciación adipocítica (Laborda, 2000), fue aislada e identificada por primera vez tanto en humanos como en ratón (Laborda y cols., 1993). Posteriormente, DLK1 fue aislado del líquido amniótico humano del segundo trimestre de gestación y se le denominó antígeno fetal 1

(FA1) (Jensen y cols., 1994). Además se le ha llamado con otros nombres: pG2 (aislado a partir de un clon de cDNA el cual se encontraba sobreexpresado en tumores de feocromocitomas (tumor de la médula suprarrenal) (Lee y cols., 1995) y ZOG (factor específico de la capa glomerular de la glándula adrenal), el cual es homólogo a *Dlk1* en ratas. Todos estos genes codifican para la misma proteína, DLK1.

Numerosos estudios han demostrado la participación de DLK1 en la regulación de procesos como la adipogénesis (Boney y cols., 1996; Smas y Sul, 1997; Bauer y cols., 1998; Garcés y cols., 1999; Ross y cols., 2004; Wang y Sul, 2006), la diferenciación neuroendocrina (Floridon y cols., 2000) y el desarrollo del sistema nervioso central y periférico (Costaglioli y cols., 2001; Christophersen y cols., 2007; Bauer y cols., 2008).

Los ratones que carecen del gen *Dlk1* presentan un tamaño reducido, tanto antes como después del nacimiento, pero un incremento en el tejido adiposo blanco y en metabolitos relacionados con los lípidos en suero en la vida adulta (Moon y cols., 2002). Por otro lado, los niveles de DLK1 en suero están regulados por la hormona GH, y cuando los niveles en suero de esta proteína son elevados hay una reducción de la grasa corporal y la masa ósea (Abdallah y cols., 2007). Todo ello apunta a un papel de DLK1 como regulador endocrino.

El gen *Dlk1* se expresa en preadipocitos pero no en adipocitos diferenciados en cultivos celulares (Smas y Sul, 1993) y tampoco se detecta en tejido adiposo blanco de varias zonas (inguinal, reproductiva, renal) en el ratón (Lee y cols., 2003). En la hipófisis de roedores, DLK1 se expresa en células

adenohipofisarias, fundamentalmente en células somatotropas (Larsen y cols. 1996; Yevtodiyyenko y Schmidt, 2006; Ansell y cols., 2007; Nakakura y cols., 2009; Cheung y cols., 2013) mientras que en cultivos de células hipofisarias se ha demostrado que DLK1 regula al gen *GH* (Ansell y cols., 2007). En la hipófisis humana, Altenberger y cols., (2006), encontraron que el gen *Dlk1* se expresa tanto en células somatotropas normales y malignas, como en células lactotropas y adenomas de células secretoras de prolactina, lo que sugiere nuevamente un papel de esta proteína en funciones endocrinas. Varios autores han identificado como localización subcelular del DLK1, la región del Golgi (Larsen y cols. 1996; Nakakura y cols. 2009. Por lo tanto, hasta ahora no se ha planteado una función reguladora de DLK1 en la hipófisis más que en las células somatotropas productoras de GH.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three sets of overlapping circles. The top set consists of three concentric circles in shades of purple, pink, and light green. The middle set consists of three concentric circles in shades of blue, brown, and orange. The bottom set consists of three concentric circles in shades of yellow, light orange, and light blue. Three thin lines (one orange, one light green, and one yellow) extend from the top left towards the circles, and a yellow line extends from the top right towards the bottom set of circles.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Planteamiento

Es bien conocido el papel de adipocinas producidas por las células adiposas como la leptina en la regulación del cerebro, informando al hipotálamo sobre la disponibilidad de nutrientes y la cantidad de tejido graso. Esto demuestra la naturaleza endocrina de las células adiposas. Sin embargo, hasta hace unos años se desconocía si el cerebro podía regular directamente al tejido adiposo. Hallazgos como la detección de receptores para las hormonas hipofisarias en los adipocitos sugieren la existencia de un eje hipotálamo-hipófisis-adiposo, así como la existencia de mecanismos de regulación entre los distintos niveles del eje (Schäffler y cols., 2005, 2006). No obstante, hasta el momento no hay ningún estudio *in vivo* que demuestre la expresión de receptores de todas las hormonas hipofisarias en el tejido adiposo ni la expresión de receptores de leptina en todos los tipos celulares en la adenohipófisis.

Por otro lado, aunque se sabe que proteína DLK1 se expresa en poblaciones hipotalámicas y en las células adenohipofisarias, especialmente en las productoras de GH de roedores y humanos, se desconoce el papel de esta proteína reguladora de la diferenciación adipocítica sobre el eje adiposo, sus posibles interacciones con la síntesis y secreción de péptidos liberados por las células hipofisarias y adiposas, y su potencial papel no solo en la diferenciación de los adipocitos sino también de las células hipofisarias. El hecho de que los ratones adultos deficientes en el gen *Dlk1* desarrollen obesidad apunta a que la

proteína que codifica está implicada en los mecanismos, aun no completamente esclarecidos, del control del apetito y del peso corporal.

¿Podrían ambos péptidos, DLK1 y leptina, ejercer funciones coordinadas en la regulación del eje hipófiso-adiposo? Para dar respuesta a esta pregunta nos planteamos estudiar las relaciones existentes entre las células hipofisarias y las células adiposas, y el papel que pueden ejercer DLK1 y leptina en dichas interacciones, así como las posibles relaciones mutuas entre ambos péptidos. Para ello hemos utilizado un modelo de ratón carente del gen *Dlk1*^{-/-}.

Objetivos

Objetivos generales.

- ✚ Evaluar la expresión y distribución de las hormonas adenohipofisarias en los ratones silvestre y las variaciones en los ratones deficientes de gen *Dlk1*.
- ✚ Confirmar la existencia de un eje neuroendocrino donde el adiposo es la glándula diana.
- ✚ Evaluar la implicación de la proteína DLK1 en el eje hipófisis-adiposo.

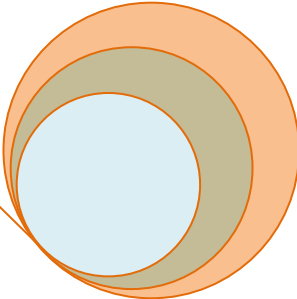
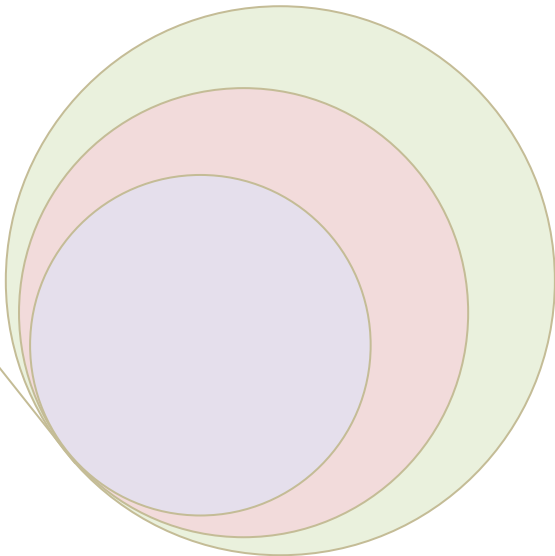
Objetivos específicos.

- 1.- Identificar y cuantificar los tipos celulares adenohipofisarios que expresan la proteína DLK1.
- 2.- Determinar la localización subcelular de la proteína DLK1 en las células adenohipofisarias.
- 3.- Analizar la expresión y distribución de la hormona leptina y su receptor específico en la adenohipófisis de ratones silvestres y las variaciones en los ratones deficientes en *Dlk1*.

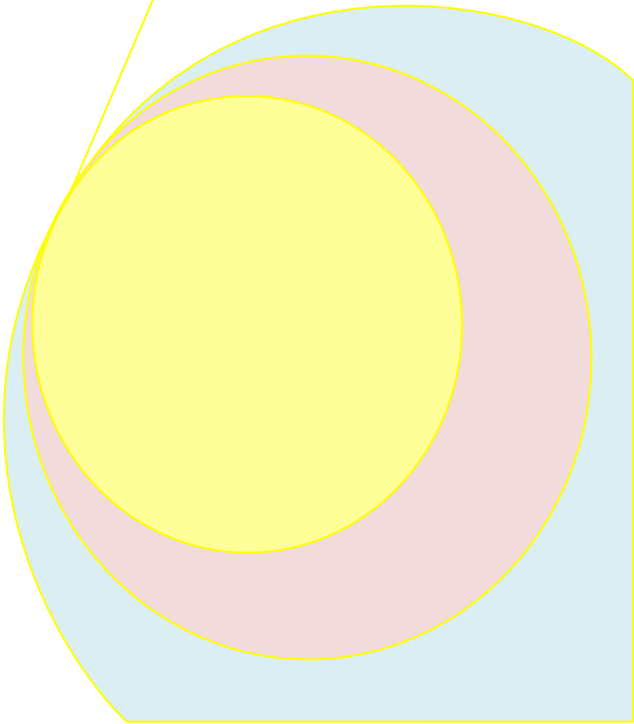
4 - Analizar la relación de leptina y de su receptor con la proteína DLK1 en los ratones silvestres.

5.- Analizar la expresión de los receptores de hormonas adenohipofisarias, de leptina y su receptor en el tejido adiposo de ratones silvestres y las modificaciones en los ratones deficientes en *Dlk1*.

6.- Medir los niveles séricos de las hormonas adenohipofisarias y de la hormona circulante leptina en los ratones silvestres y sus modificaciones en los ratones mutantes.



MATERIALES Y MÉTODOS



1. Materiales y Métodos

1.1 Animales y procesamiento de los tejidos

En el presente estudio se utilizaron un total de 46 ratones machos adultos de la cepa 129/SvJ, con edades comprendidas entre 4 y 5 meses (**Fig. 3**). Veinticuatro ratones (24) fueron silvestres (*Wildtype*, WT) y veintidos (22) carentes del gen *Dlk1* (*Dlk1*^{-/-}; *Knockout*, KO), todos ellos suministrados por el animalario de la Universidad de Castilla-La Mancha (Albacete). Los ratones deficientes del gen *Dlk1* fueron generados tal y como se describió previamente (Ragunandan R y cols., 2008). Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité de experimentación animal de la Universidad de Castilla-La Mancha y conforme con las normativas reguladoras para el uso y cuidado de animales de investigación, españolas (Real Decreto 1201/2005; Ley 32/2007) y europeas (Directiva 86/609/EEC).

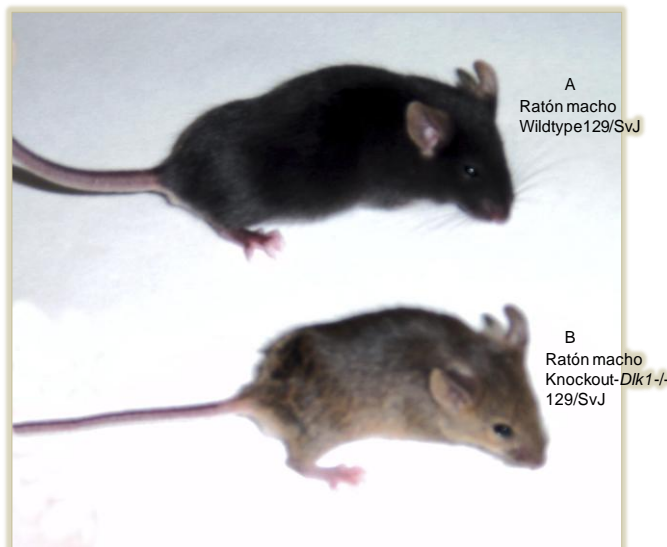


Figura 3. Ratones machos adultos de la cepa 129/SvJ. (A) Ratón silvestre o wildtype, (WT). (B) Ratón carente del gen *Dlk1*^{-/-} *Knockout*, (KO). Obsérvese el menor tamaño del ratón KO respecto al WT.

Los ejemplares sacrificados fueron anestesiados con ketamina (100mg/kg; Parke-Davis; Alcobendas) y xilacina (10mg/kg; Dibapa, Barcelona), y sometidos a perfusión intracardiaca con una solución salina 0.9%, seguida de la solución Bouin (0,9% ácido pícrico, 9% paraformaldehído, 5% ácido acético). La glándula hipofisaria y el tejido adiposo fueron separados y post fijados por inmersión en el mismo fijador durante 36 horas. Posteriormente, fueron deshidratados en alcoholes de 70°, 80°, 90°, 96° y 100° a temperatura ambiente durante 8 horas c/u. Al finalizar la deshidratación, se pasaron a xilol durante 1 hora y, seguidamente, se realizaron 3 lavados en parafina líquida, dejando el material en la estufa a unos 60°C. Finalmente, se hicieron los bloques en parafina (Merck® 1.07164). Una vez incluidos, los bloques fueron cortados en un microtomo (Leica® RM2135) en planos horizontales de 3 µm de grosor y se extendieron en portaobjetos tratados con amino-propil-trietoxisilanose. (APS). Los cortes destinados para estudiar el patrón de expresión, distribución e inmunorreactividad de las hormonas adenohipofisarias y de la proteína Dlk1 se montaron en paralelo, mientras que para las colocalizaciones, se utilizaron cortes consecutivos. Finalmente, los cortes fueron desparafinados, rehidratados y luego lavados en tampón Tris salino (TBS) a 0,05 M; pH 7,4.

Para el estudio de las hormonas adenohipofisarias, así como de la proteína DLK1, se usaron secciones representativas de tres niveles dorso-ventrales de la hipófisis. Es decir, seccionando las hipófisis, obtuvimos tres niveles de acuerdo a la distancia que mantenía cada sección respecto a la primera sección más dorsal: primer nivel o nivel dorsal, segundo nivel o nivel medio (es el que más cortes proporciona y se caracteriza por tener el lóbulo

anterior grande y completo), y tercer nivel o nivel ventral (**Fig. 4** A, B y C, respectivamente).

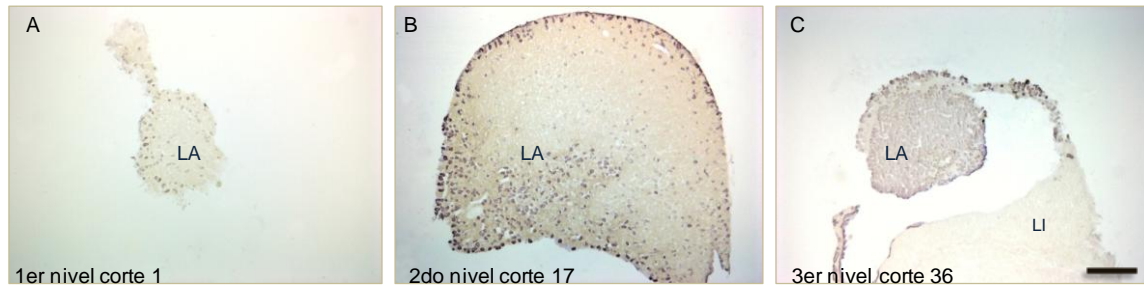


Figura 4. Imágenes representativas de los tres niveles dorso-ventrales del lóbulo anterior adenohipofisario (A, B y C). LA: lóbulo anterior. LI: lóbulo intermedio. Barra de escala: 20 μ m

En este estudio se emplearon las siguientes técnicas:

1.2. Inmunohistoquímica para microscopía óptica

La técnica de inmunohistoquímica permite detectar proteínas sobre secciones de tejido usando anticuerpos específicos. Las características de los anticuerpos utilizados se resumen en la **Tabla 1**.

¹ **Anticuerpo policlonal de conejo Anti-DLK1 (# 1125).** Creado y purificado en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Albacete (Universidad de Castilla-La Mancha). Los antisueros policlonales de conejo se hicieron contra el antígeno que codifica para una secuencia de 217 aminoácidos de la proteína DLK1 de ratón, correspondiente a seis repeticiones semejantes al EGF de la región extracelular, producida en levadura *Pichia pastoris* y fue usada para inmunizar conejos. Este anticuerpo reconoce las variantes de membrana y soluble de DLK1 en análisis de western blot de diferentes líneas celulares de ratón y no reacciona contra DLK2, una proteína altamente homóloga a DLK1. El tamaño de la banda que detecta está entre 40-55 kDa

ANTICUERPO PRIMARIO	ANTÍGENO	ORIGEN	DILUCIÓN
Policlonal de conejo Anti-DLK1 (# 1125)	Ver descripción ¹	Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha.	1:1000
Policlonal de conejo Anti-DLK1 (H-118): sc-25437	Dirigido contra los aminoácidos 266-383 de DLK1 de origen humano	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)	1:1000
Policlonal de cabra Anti-DLK1 (C-19): sc-8624	Dirigido contra la región C-terminal de DLK1 de origen humano	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)	1:800
Policlonal de conejo Anti-ACTH	Ver descripción ²	Dr. G. Tramu	1:1000
Policlonal de conejo Anti-β-TSH	Ver descripción ²	Dr. G. Tramu	1:800
Policlonal de conejo Anti-β-FSH	Ver descripción ²	Dr. G. Tramu	1:1000
Monoclonal de ratón Anti-β-(LH) Cat. nº. L7500-28B Lot. nº L6021766	Reconoce la hormona luteinizante beta (LHb) de origen humano	US Biological Biochemical & Biological. Swampscott, MA, USA).	1:500
Policlonal de conejo Anti-GH. Cat. nº AB940	Reconoce la hormona de crecimiento GH.	Chemicon Temecula, CA, USA	1:2000
Policlonal de conejo Anti-PRL	Ver descripción ²	Dr. G. Tramu	1:800
Policlonal de porcino Anti-PRL Cat. nº P9009-16 Lot. Nº L11022569	Reconoce la hormona prolactina de origen humano	US Biological Biochemical & Biological. Swampscott, MA, USA).	1:700
Monoclonal de ratón Anti-Lp Cat. nº LS-C25184 Lot. nº 16340	Reconoce la leptina humana, uniéndose a la región C-terminal (aminoácidos 131-145)	LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA).	1:50
Policlonal de cabra Anti-LpR (M-18): sc-1834	Reconoce la forma corta y larga de LpR de ratón, rata y humano	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)	1:50
Policlonal de cabra Anti-ACTHR (C-19)	Dirigido contra una secuencia aminoacídica cerca de la región N-terminal de ACTHR de origen de ratón	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)	1:50
Policlonal de cabra Anti-FSHR (N-20): sc-7798	Dirigido contra una secuencia aminoacídica cerca de la región N-terminal de FSHR de origen humano	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)	1:50
Policlonal de cabra Anti-LHR (K-15): sc-26341	Dirigido contra una secuencia aminoacídica dentro de la región interna de LHR de origen humano	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)	1:50
Policlonal de cabra Anti-TSHR (N-19): sc-7816	Dirigido contra una secuencia aminoacídica cerca de la región N-terminal de TSHR de origen humano	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)	1:50
Policlonal de cabra Anti-PRLR (E-20): sc-21816	Dirigido contra una secuencia aminoacídica dentro del dominio extracelular de PRLR de origen de ratón	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)	1:50
Policlonal de cabra Anti-GHR (L-15): sc-10354	Dirigido contra una secuencia aminoacídica cerca de la región N-terminal de GHR de origen de ratón	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)	1:50

Tabal 1. Anticuerpos y diluciones utilizadas en las técnicas inmunohistoquímicas

² **Para la identificación específica de las hormonas adenohipofisarias ACTH, TSH, FSH y PRL,** se usaron anti-sueros policlonales de conejo proporcionados por el Dr. G. Tramu, Bordeaux, Francia. Los antisueros policlonales de conejo se hicieron contra el antígeno sintético ACTH (1-24) (CIBA, Basel, Suiza), contra los antígenos sintéticos de: β -TSH humana, β -FSH humana, y PRL de rata (Chemicon International, Los Angeles, CA, USA). Sus propiedades inmunológicas se han descrito previamente (Dubois, 1972a; Dubois, 1972b; Tramu y Dubois, 1977; Hemming y cols., 1986; Jamali y Tramu, 1999).

1.2.1. Método inmunoenzimático indirecto

En el proceso de inmunohistoquímica indirecta los cortes fueron saturados en una solución de caseína al 0.5% en TBS durante 20 min, para así evitar uniones inespecíficas. Para eliminar el exceso de caseína, se hicieron tres lavados en TBS de 15 minutos cada uno y luego los cortes se incubaron en cámara húmeda con los diferentes anticuerpos primarios durante 12h a temperatura ambiente, todos ellos diluidos en TBS y tritón al 0.2%. Posteriormente, fueron incubados con el anticuerpo secundario IgG goat anti especie (conejo, ratón, cabra o porcino) según el caso, conjugado con Biotina de (Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC) a una dilución de 1/1000 durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente los cortes fueron de nuevo incubados con un complejo estreptavidina-peroxidasa de (Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC) a una dilución de 1/1000 durante 1h a

temperatura ambiente. Para el revelado de la peroxidasa se usó tampón tris (0,05 M; pH 7,6) con 0,04% 4-cloro 1-naftol (Sigma, USA) y 0,004% de peróxido de hidrógeno.

- ✚ **Revelado con 4-cloro-1-naftol (Cl-Naf) (Sigma)** al 0,004% y peróxido de hidrógeno al 0,01% en tampón tris-clorhídrico (Tris-HCl), genera un precipitado de color azul. Se lavó en tampón tris-HCl y se montó con cubreobjetos y unas gotas de glicerina tamponada.
- ✚ **Revelado con 0,004% 3-amino 9-dietilcarbazol** al 0,004% y peróxido de hidrogeno al 0,01% en tampón acetato (0,05M; pH 5); genera un precipitado de color rojo almendra. Se lavó en tampón acetato y se montó con cubreobjetos y unas gotas de glicerina tamponada.
- ✚ **Revelado con 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocioruro (DAB)** al 0,005% y peróxido de hidrógeno al 0,01 % en tampón Tris-HCl, produce un precipitado de color marrón. Los cortes se lavaron en tampón Tris-HCl, se deshidrataron en serie creciente de alcoholes y, finalmente, se sumergieron en xilol. Posteriormente, se cubrieron utilizando Eukitt.
- ✚ **Tinción Shu** (Glucosa oxidasa), según Shu y cols., (1988), 200 ml de tampón acetato: acetato de Na⁺ (0.33M; 5.44gr) en 200ml de agua destilada ajustar a pH: 6,0 con CH₃-COOH (acido acético glacial). Primera solución: en 100ml de tampón acetato se disolvió 5gr de níquel amonio sulfato, luego se añadió 400mg de glucosa más 80mg de cloruro de amonio. Segunda solución: 50mg de

DAB en 100ml de agua destilada (filtrar). Se mezcló en proporción 1:1, 100ml de la primera solución más 100ml de la segunda solución y justo antes de revelar se añadió 3mg de glucosa oxidasa más 100µl de H₂O₂. Esta tinción se utiliza cuando se requiere intensificar la señal del revelado y genera un precipitado de color gris azulado. Se lavaron los cortes y se cubrieron usando glicerina tamponada.

1.2.2. Colocalización: En la detección inmunocitoquímica de dos o más marcadores se usaron los siguientes métodos:

✚ **Método de elución-retratamiento** (Tramu y cols., 1978). El método de elución-retratamiento permite detectar dos antígenos presentes en la misma célula, al realizar dos inmunorreacciones consecutivas. Se suele usar cuando los anticuerpos que reconocen esos antígenos están hechos en la misma especie. Para ello se realizó una primera reacción según el método enzimático indirecto utilizando como revelador el 4-cloro-1-naftol. Los cortes se montaron con glicerina tamponada y se fotografiaron. Posteriormente, se procedió a la elución de los anticuerpos utilizados en la primera inmunorreacción. Tras eliminar el color de la primera reacción con acetona, se eluyó el primer anticuerpo oxidando con una mezcla proporción, 1:1, de permanganato potásico (KMnO₄) al 2,5% y ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 5% en agua destilada y metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅) al 0,5% para decolorar los cortes. A continuación, se lavaron los portaobjetos en agua destilada y se hizo una segunda

reacción inmunohistoquímica, utilizando esta vez el revelador 3-amino-9-dietilcarbazol al 0,004% y peróxido de hidrógeno al 0,01% en tampón acetato a pH 5. Después del montaje, se fotografió por segunda vez la misma zona para su comparación y análisis.

Dobles y triples marcajes por inmunofluorescencia

A diferencia del método por elución retratamiento, en el caso de dobles o triples marcajes se hacen dos o más inmunorreacciones secuenciales en el mismo corte sin hacer elución. Para ello se hizo una primera inmunorreacción siguiendo el protocolo descrito para la inmunohistoquímica indirecta, los cortes destinados para las dobles y triples marcajes se trataron de la siguiente forma: Primera inmunofluorescencia: Las secciones se incubaron durante toda la noche con cada anticuerpo primario por separado (solo cuando se usó el anticuerpo primario DLK1 de cabra, los cortes, previo a la incubación, fueron desenmascarados en tampón citrato pH=6 a 90° por 3 min en un baño térmico). Seguidamente, los cortes se incubaron durante 1-h con el respectivo anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo. Segunda inmunofluorescencia: Las secciones se volvieron a incubar toda la noche con otro anticuerpo primario, según la combinación pretendida. Posteriormente, se incubaron durante 1-h con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a otro fluoróforo diferente al anterior. Tercera inmunofluorescencia: Del mismo modo, se repitió el proceso para la tercera inmunorreacción. Todos los anticuerpos primarios fueron revelados con el secundario anti-especie acoplado al fluoróforo deseado para cada caso; CyTM 3-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), CyTM 2-conjugated AffiniPure F(ab')₂

Fragment Rabbit Anti-Goat IgG (H+L), Cy[™] 3-conjugated AffiniPure F(ab')₂
Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L), DyLight[™] 488-conjugated AffiniPure
Goat Anti-Guinea Pig IgG (H+L), Alexa 488-Donkey Anti-Rabbit IgG, DyLigth[™]
405-conjugated Streptavidin, DyLigth[™] 649-conjugated Streptavidin (1:1000;
Jackson ImmunoResearch, USA).

Combinación de elución-retratamiento e inmunofluorescencia

En casos concretos donde quisimos detectar tres marcadores en la misma sección usando dos anticuerpos primarios de la misma especie, utilizamos una combinación de ambos métodos de colocación: elución-retratamiento e inmunofluorescencia. En concreto esta combinación la usamos en la detección de DLK1, PRL y FSH/LH. Para ello, se realizó una triple inmunorreacción secuencial en las mismas secciones como se describe a continuación.

Primero, se realizó una reacción inmunohistoquímica con el anticuerpo específico conejo-anti-DLK1 (dilución 1:1000). La actividad de la peroxidasa fue revelada con 0,004% 4-cloro1-naftol (Sigma Aldrich Co.) y 0,01% de peróxido de hidrógeno. Segundo, una vez obtenidas las imágenes de esta primera inmunorreacción, los cortes fueron sometidos a elución-retratamiento e incubados con un segundo anticuerpo conejo-anti-PRL (dilución 1:800). La actividad de esta segunda reacción fue revelada con 0,004% 3-amino 9-dietilcarbazol (Sigma Aldrich Co.) y 0.01% de peróxido de hidrogeno en tampón acetato (pH5, 0,05M). Tercero, se realizó una doble inmunorreacción en las mismas secciones, usando un anticuerpo conejo-anti-FSH (dilución 1:1000) o un anticuerpo ratón-anti-LH (dilución 1:500). La FSH-ir fue revelada con DAB mientras la reacción de LH-ir fue detectada por incubación con un anticuerpo

anti-ratón acoplado a Cy3 (dilución 1:1000; Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). Las imágenes fueron adquiridas y procesadas usando un microscopio de luz (Leitz Laborlux S, Leitz, Germany) equipado con un software de análisis de imágenes Leica Q-Win (Leica, Barcelona, Spain).

1.2.3. Control de especificidad de la reacción inmunohistoquímica

El control de la especificidad de la reacción inmunohistoquímica consistió en la sustitución del antisuero específico por suero de bovino normal. En el caso de la elución-retratamiento, el antisuero específico de la segunda reacción se sustituyó por suero de bovino.

1.2.4. Obtención y análisis de las imágenes.

El material procesado para las técnicas inmunohistoquímicas fue observado con un microscopio óptico Leica DM4000B (Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL, USA). Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital de la misma casa comercial, modelo DFC300FX. Las imágenes capturadas se analizaron mediante el software Leica Q-Win v3.2. En los casos de reacciones por inmunofluorescencia el material fue estudiado con un microscopio confocal DMI4000B-TCS SPE. Software LAS-AF v.2.6 (Leica Application Suite-Advanced Fluorescence) (Leica, Barcelona, Spain).

1.3. Análisis cuantitativo de los diferentes péptidos y receptores en la hipófisis de ratones *Dlk1*^{-/-} comparados con los controles.

Para el análisis cuantitativo se examinaron secciones de hipófisis anterior mediante un microscopio confocal digitalizado DMI4000B-TCS SPE a

través de una cámara y se contaron las células inmunorreactivas por unidad de área ($30.0000 \mu\text{m}^2$). De cada hipófisis cortada en plano horizontal a un grosor de $3 \mu\text{m}$ se obtuvieron aproximadamente 31 cortes dorso-ventrales y se escogieron desde el nivel más dorsal (primer nivel) hasta el nivel más ventral (tercer nivel). Se seleccionaron para el estudio las secciones en donde el lóbulo anterior estuvo completo. De éstas elegimos una sección cada tres cortes, es decir, hubo una separación de $9 \mu\text{m}$ entre los cortes usados para el recuento, con objeto de evitar contar la misma célula dos veces. Se hicieron 10 medidas por hipófisis y se usaron 4 hipófisis por cada grupo (4 hipófisis de KO y 4 hipófisis de control WT). Para establecer el porcentaje de células que son inmunorreactivas se cuantificaron tanto las células inmunopositivas como las células totales por unidad de área ($30.000 \mu\text{m}^2$), considerando al número total de células/área como el 100%. Para el cálculo del porcentaje se usó la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de Células} = \frac{\text{Células-ir} \times \text{unidad de área}}{\text{Células totales} \times \text{unidad de área}} \times 100$$

Los porcentajes de células GH, PRL, FSH, TSH y ACTH que colocalizaron con los receptores o los péptidos, se calcularon considerando el número de células positivas para la hormona/área como el 100%. Se llevó a cabo una tinción con DAPI para visualizar los núcleos y así poder hacer el recuento del número total de células/área. Tanto las células inmunorreactivas para cada marcador como las totales por campo, fueron contadas utilizando la

herramienta Point y Multi-Point del programa Image J 1.43 (libre descarga; <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>).

Para el análisis estadístico, el número de células inmunorreactivas de cada marcador y/o combinación de marcadores en ratones WT y KO, fueron comparados usando un test Wilcoxon–Mann–Whitney. Se consideraron estadísticamente significativos los valores con $p < 0,05$. Todos los valores se representaron como la media \pm SEM. Los datos se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism 5.

1.3.1. Análisis inmunohistoquímico de los diferentes péptidos estudiados en el tejido adiposo de ratones *Dlk1*^{-/-} comparados con los controles.

Para el análisis inmunohistoquímico del péptido Lp y su receptor LpR, así como de los diferentes receptores de las hormonas adenohipofisarias ACTHR, TSHR, FSHR, LHR, PRLR y GHR, se utilizaron ocho muestras de tejido adiposo de la zona abdominal, cuatro de ratones WT y cuatro de ratones KO. Se consideraron para el análisis dos cortes por portaobjeto. Por cada corte se obtuvieron 10 imágenes capturadas al azar. Todas las imágenes fueron analizadas y procesadas, usando un microscopio de luz (Leitz Laborlux S, Leitz, Germany) equipado con Leica Q-Win image analysis software.

1.4. Inmunohistoquímica para microscopía electrónica.

Localización subcelular de Dlk1 mediante microscopía electrónica. Los ratones fueron anestesiados con ketamina+xilacina y fijados por perfusión intracardiaca con una solución fijadora de 4% paraformaldehído y glutaraldehído (Gluta) 0,05% en PBS (pH 7,4, 0,

1M). Los ratones fueron decapitados y sus hipófisis rápidamente extraídas y postfijadas por inmersión en el mismo líquido fijador durante 1 hora. Posteriormente, se lavaron en PB 0,1M y se deshidrataron en alcoholes de gradación creciente: 40°, 50°, 60°, 80°, 90° y 100°. Tras la deshidratación se lavaron en óxido de propileno y se incluyeron en Spurr: óxido de propileno (1:1), 1 hora a 4°C y en resina Spurr pura (referencia 14300; ANAME, Madrid, España) toda la noche. La polimerización se llevó a cabo a 65°C durante 48 horas.

1.4.1. Método de postinclusión

Los bloques polimerizados se cortaron en un ultramicrotomo (Reichert Ultracut S. Leica) entre 60 y 70 nm, y los cortes se recogieron sobre rejillas de 3,05 mm de níquel de 300 mesh. Previamente se realizaron cortes semifinos (0,5-1,5 μm) que teñidos con azul de toluidina se utilizaron para determinar la localización precisa del área deseada.

1.4.1.1. Método indirecto con el segundo anticuerpo conjugado con oro coloidal (OC).

Las rejillas con los cortes se lavaron en H₂O miliQ y en H₂O₂ al 10% en H₂O. Posteriormente se lavaron en tampón fosfato enriquecido (0.9% de NaCl) y se incubaron con suero de cabra en PB enriquecido 1/30 durante 30 minutos para evitar la unión del anticuerpo primario a epítomos inespecíficos. A continuación se procedió a la incubación de las rejillas con el antisuero primario: policlonal IgG anti DLK1 de conejo (# 1125) a una dilución de 1:500 en PB enriquecido, durante 5 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavaron en PB enriquecido y después en tampón tris (pH 7,6).

Finalmente se incubaron con el antisuero secundario cabra anti-conejo conjugado con oro coloidal (GAR-OC) (15 nm) diluido 1/100 en tampón tris durante 1 hora y, tras varios lavados en tampón tris, se contrastaron con acetato de uranilo al 2% (15 min) para, posteriormente, ser observadas en un microscopio electrónico Zeiss 910 (Carl Zeiss Oberkochen, Germany), equipado con un scanner de procesado lento y acoplado a una cámara para microscopio de transmisión (Fa, Proscan Elektronische Systeme GmbH, Lagerlechfeld, Germany) con un software específico para el análisis de imágenes (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Munster, Germany). La especificidad de la reacción inmunohistoquímica fue corroborada por sustitución del antisuero contra DLK1 por suero normal de cabra.

1.5. Análisis de la expresión cuantitativa por qRT-PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ácido nucleico particular, partiendo de un molde. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Albacete (Universidad de Castilla-La Mancha).

Mediante qRT-PCR se analizaron las posibles variaciones entre ratones *Dlk1*^{-/-} (KO) y controles (WT) en los niveles de los ARNm de las hormonas adenohipofisarias en la hipófisis y de sus receptores en el tejido adiposo, así como los niveles del ARNm de la leptina (Lp) y su receptor (LpR) en hipófisis y tejido adiposo. Las glándulas hipofisarias y tejido adiposo abdominal de ratones machos KO y WT fueron extraídos rápidamente después

de la eutanasia y se congelaron en nitrógeno líquido a -80°C hasta su posterior uso. Se analizaron cinco muestras de cada órgano por cada genotipo. Las muestras fueron homogeneizadas en un mortero estéril con nitrógeno líquido, y se aisló el ARN total utilizando el kit RNeasy (Qiagen, Madrid, España). Después del tratamiento con DNasa y RNasa libre de DNasa Set (Qiagen), 1 μg de ARN de cada muestra fue transcrito de forma inversa a cDNA con el kit de síntesis Revert AidTMHMinus First Strand cDNA (Fermentas, Madrid, España). El cDNA fue amplificado por PCR cuantitativo utilizando el mezclador Master-SYBR GREEN y el sistema de PCR para detección en tiempo real, ABI PRISM 7000 Sequence (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Las condiciones de PCR utilizadas fueron: una primera etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, una segunda etapa de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C , seguido por un ciclo de 1 minuto a 60°C .

Los cebadores utilizados para determinar los niveles de expresión de ARNm de los diferentes genes de ratón fueron diseñados con el Integrated DNA Tecnologías Primer Software Quest (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EE.UU.) y se muestra en la **Tabla 2**. Para validar cada par de cebadores y evaluar la eficiencia de la amplificación, las curvas de calibración se obtuvieron con diferentes diluciones de cDNA provenientes de la hipófisis y el tejido adiposo. La eficiencia de amplificación (E) se calculó de acuerdo con la ecuación: $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ (Pfaffl MW., 2001), donde la pendiente se determinó mediante una curva de regresión estándar para cada transcripción. Los niveles de mRNA fueron cuantificados relativamente mediante el método comparativo Ct (ciclo umbral) $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak KJ y cols., 2001). El ARNm de la riboproteína P0 (36B4) (Laborda J., 1991) se utilizó como control interno para

normalizar los valores de Ct de las distintas muestras. Los datos de Ct fueron adquiridos a través del método "Fit Point" de acuerdo con la PCR en tiempo real ABI PRISM 7000 software (Applied Biosystems), y luego importados a Microsoft Excel software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE.UU.).

Los datos estadísticos se determinaron a partir de diez animales diferentes, por triplicado, por cada gen diana. Los valores de cinco ratones KO se compararon con los obtenidos a partir de cinco ratones WT. Se realizó un análisis estadístico utilizando un test no paramétrico de dos colas, Wilcoxon-Mann-Whitney para muestras pequeñas. Una $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativo.

GEN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INDIRECTO
DIK1	5'-CTAACCCATGCGAGAACGATG-3'	5'-TCTTGTCGACGAATCCAGCTG-3'
PO	5'-AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT-3'	5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGG T-3'
LH	5'-ATCACCTTACCACCAGCATCTGT-3'	5'-TGAGGGCTACAGGAAAGGAGACTA-3'
FSH	5'-GCCGTTTCTGCATAAGCATCA-3'	5'-GCCAGGCAATCTTACGGTCTC-3'
PRL	5'-CAAGAAGCCCCGAATACATC -3'	5'-TCCCATTTCCTTTGGCTTCA-3'
GH	5'-ACCGACATGGAATTGCTTCG-3'	5'-TCATAGACACGGTCCGAGGTG-3'
ACTHRm	5'-GCCATTTCTGACATGTTGGGCAGT-3'	5'-AGGCTGAAGATAGAGCCCAGCAAA-3'
FSHRm	5'-ACAACGTGTCATTCAACGGAACCC-3'	5'-ATGGTTGGGCAGGGAATAGACCTT-3'
GHRm	5'-AGCCTCGATTACCAAGTGTGCTT-3'	5'-CAGCTTGTGCTTGGCTTTCCCTTT-3'
LHRm	5'-CAATGCAGTGGCCTTTGTGTCAT-3'	5'-TTGTGTCCTTGTAGGAGCCGTCA-3'
PRLRm	5'-TGGATCATTGTGGCCGTTCTCTCT-3'	5'-TCAGCAGTTCTTCAGACTTGCCCT-3'
TSHRm	5'-ACTCCTGTGCCAATCCGTTTCTCT-3'	5'-GCCAAACTTGCTGAGCAGGATGAA-3'
Lpm	5'-AGCAGTGCCTATCCAGAAAGTCCA-3'	5'-AATGAAGTCCAAGCCAGTGACCCT-3'
LpRm	5'-AAACAATGCCTCGGCTTTGAAGGG-3'	5'-TGCTCATTCCCAAAGCAACAGTGG-3'

Tabla 2. Cebadores usados en qRT-PCR. DIK1, Delta like protein 1; PO, fosfoproteína ribosomal; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona folículo estimulante; PRL, prolactina; GH, hormona de crecimiento; ACTHR, receptor de la hormona ACTH, FSHR, receptor de la hormona folículo estimulante; GHR, receptor de la hormona de crecimiento; LHR, receptor de la hormona luteinizante; PRLR, receptor de la hormona prolactina; TSHR, receptor de la hormona tirotrópica; Lp, hormona leptina y LpR, receptor de la hormona leptina.

1.6. Determinación de los niveles de hormonas adenohipofisarias en suero por inmunoensayos de microesferas multiplex (MBIA) (ELISA).

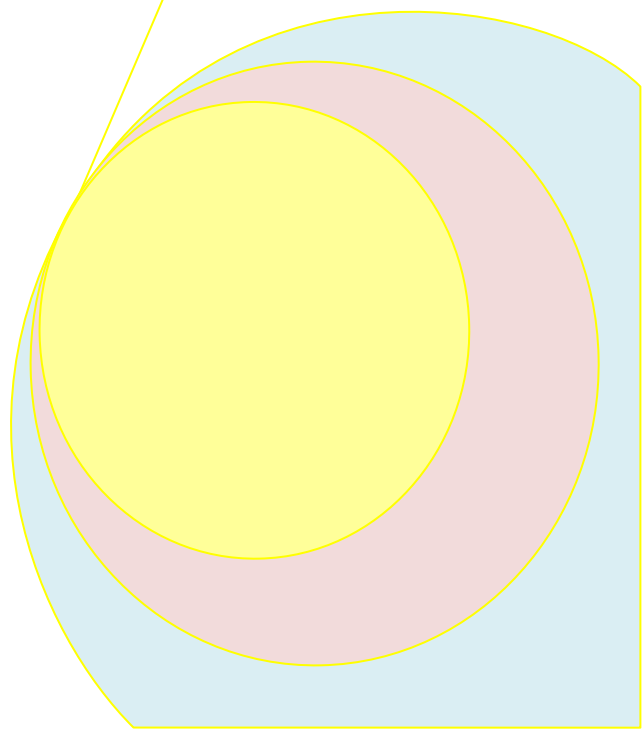
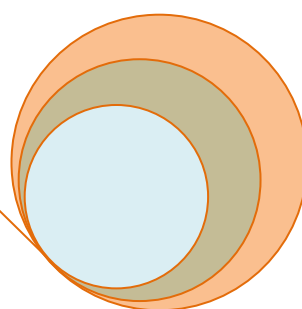
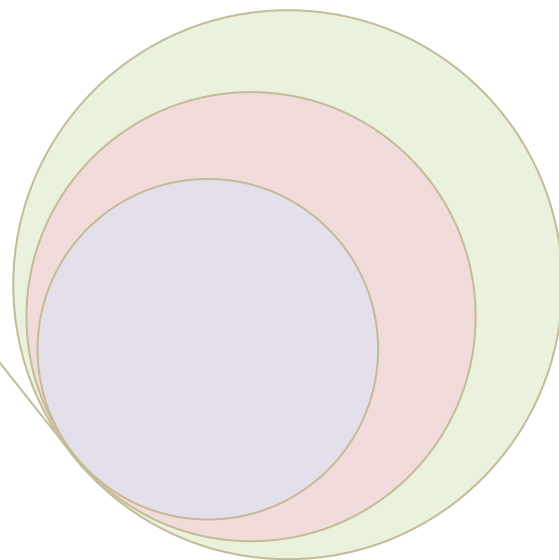
Este estudio se realizó en el laboratorio de la Dra. Julie A. Chowen (Departamento de Endocrinología; Hospital Niño Jesús, Madrid) y de la Dra. Carmen Díaz (Neurobiología Celular; Facultad de Medicina de Albacete, UCLM).

Para este análisis se usaron cinco ratones KO y cinco WT, los cuales fueron previamente anestesiados con ketamina+xilacina, posteriormente entre las 10.15 y 10.30 h de la mañana se les practicó punción cardiaca, inmediatamente se les extrajo un volumen de sangre entre 0,5-1 ml, recolectados en tubos Vacuette con separador de gel (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania). Para permitir la coagulación de la sangre se dejaron en reposo durante 20-30 min. Los tubos de sangre no heparinizados se centrifugaron a 800 revoluciones durante 15 min a temperatura ambiente, y el suero se recogió en tubos de microcentrífuga (Daslab, Barcelona, España) y almacenado a -80°C para su posterior uso. En el suero de estos ratones se midieron los niveles de leptina y varias hormonas adenohipofisarias (GH, LH, FSH y PRL), utilizando dos diferentes kits de inmunoensayo de microesferas multiplexada (MBIA) (Mouse adipocitos, Cat. #. MADPCYT-72K y Rat pituitary, Cat. # RPT86K, respectivamente; ambos de la casa; Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). Los ensayos de MBIA se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del bloqueo del filtro de la placa se lavaron con tampón de ensayo y lavado, posteriormente se recolectaron por vacío, las perlas marcadas con su respectivo fluorescente conjugado para cada anticuerpo de hormona (25 µl), luego se incubaron durante toda la noche a 4°C. Después del

lavado, se añadió 50 µl de anticuerpo secundario conjugado con biotina, y se incubaron por un periodo de 30 min a 25°C, una vez pasado este tiempo las perlas se volvieron a incubar durante 30 min con 50 µl de estreptavidina ficoeritrina. Después del lavado, las perlas se resuspendieron en una solución de Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España). y un mínimo de 50 granos o perlas por parámetro fueron examinadas en dicha suspensión o sistema de matriz de 200. Los datos en bruto (media de la intensidad de fluorescencia) se analizaron utilizando el Software Manager de Bio-Plex 4.1 (Bio-Rad Laboratories). Todas las muestras se realizaron por duplicado y dentro del mismo ensayo para todos los análisis. La sensibilidad obtenida fue de: 7,5 pg/ml, 12 pg/ml, 4,9 pg/ml, 47,7 pg/ml y 9 pg/ml para la leptina, GH, LH, FSH y PRL, respectivamente. Los coeficientes de variación para los intra e inter-ensayos fueron <4,9% y <11,7% para la leptina, <15% y <9,5% para GH, LH, FSH y PRL.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando un test no paramétrico de dos colas, Wilcoxon-Mann-Whitney para muestras pequeñas. Una $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativo.

RESULTADOS



RESULTADOS

Los resultados se han organizado en dos grandes bloques. En primer lugar se describen los resultados obtenidos en el ratón macho adulto de la cepa 129/SvJ en el genotipo silvestre (control), y en segundo lugar las variaciones encontradas en el ratón mutante carente del gen *Dlk1*^{-/-}. Este gen codifica para una proteína reguladora de la adipogénesis y de los ejes neuroendocrinos.

En los animales control se describen los resultados obtenidos en la hipófisis y en el tejido adiposo, tratando de comprender las interrelaciones hormonales y peptidérgicas entre las células adenohipofisarias y las células adiposas. Nos centraremos en las hormonas adenohipofisarias, en la proteína DLK1, en la hormona adipocítica leptina y su receptor. En la hipófisis se analizará por inmunohistoquímica la presencia de DLK1 y del receptor de leptina LpR en las células de la adenohipofisis productoras de GH, PRL, ACTH, FSH/LH, TSH, tratando de establecer si estos péptidos se expresan preferentemente en alguno de los tipos celulares específicos de la adenohipofisis. En el tejido adiposo se analizará la presencia de los receptores de las hormonas adenohipofisarias. También se detallan los resultados obtenidos por RT-PCR de los niveles de ARNm de algunas de estas moléculas en la hipófisis y en el tejido adiposo.

En el segundo bloque se comparan los resultados obtenidos en los ratones silvestres en condiciones normales con un modelo de ratón carente del gen *Dlk1*, resaltando aquellas alteraciones que pueden estar directa o indirectamente relacionadas con la ausencia de expresión de la proteína DLK1 en el eje hipófisis-adiposo. El análisis de dichas alteraciones se centra en la

adenohipófisis y en el tejido adiposo. . Por lo que, en primer lugar se describen las variaciones en la hipófisis del ratón mutante respecto al control, en el número de células de cada uno de los tipos celulares adenohipofisarios, así como las diferencias en los niveles séricos de las hormonas que producen. Luego se detallan los cambios en la expresión de la hormona adipocítica leptina Lp y se su receptor LpR en las células adenohipofisarias. Por último, se presentan las alteraciones encontradas en la expresión de los receptores de las hormonas adenohipofisarias en el tejido adiposo de ratones mutantes respecto a los controles.

RESULTADOS EN EL RATÓN MACHO ADULTO

1. Distribución de las células adenohipofisarias productoras de hormonas.

El lóbulo anterior de la adenohipófisis está constituido por células glandulares, distinguiéndose cinco tipos celulares productoras de hormonas, corticotropas (ACTH), tirotropas (TSH), gonadotropas (FSH/LH), lactotropas (PRL) y somatotropas (GH). Hemos analizado la distribución dorsoventral y la proporción de células productoras de hormonas adenohipofisarias (CPHA) en el lóbulo anterior del ratón adulto de la cepa 129/SvJ. Para ello hemos dividido la hipófisis en tres tercios (dorsal, medio y ventral). Todos los niveles mostraron células inmunorreactivas (células-ir) para las diferentes hormonas y aún cuando no se observó regionalización específica en la distribución de estas células, el tipo celular gonadotropo (FSH/LH), estuvo mayoritariamente localizado en el borde del lóbulo anterior. Adicionalmente, las células-ir del lóbulo anterior situadas en los bordes muestran una aparente mayor intensidad

en la inmunorreacción en comparación con aquellas células localizadas en la parte más central, independientemente del tipo celular (**Fig. 5**). Adicionalmente, en el lóbulo intermedio se observaron abundantes células ACTH-ir, el tipo celular característico de este lóbulo (**Fig. 5 C1.1**). El tipo celular hipofisario más abundante es el somatotro (GH; $50,3\pm 2,6\%$), seguido del lactotro (PRL; $23,9\pm 1,09\%$), corticotro (ACTH; $9,3\pm 0,6\%$), tirotro (TSH; $8,9\pm 0,5\%$) y gonadotro (FSH/LH; $8,4\pm 0,6\%$).

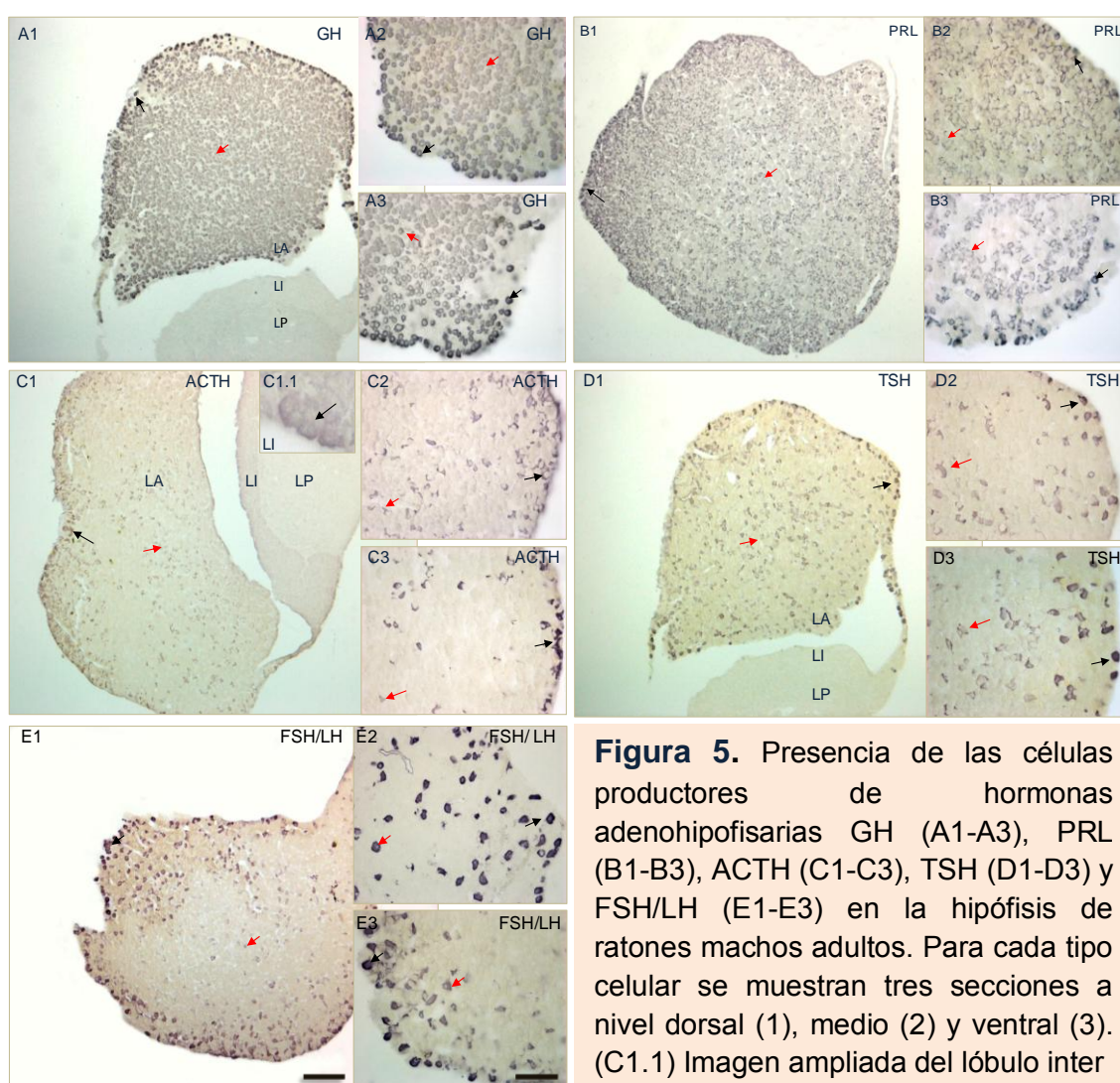


Figura 5. Presencia de las células productoras de hormonas adenohipofisarias GH (A1-A3), PRL (B1-B3), ACTH (C1-C3), TSH (D1-D3) y FSH/LH (E1-E3) en la hipófisis de ratones machos adultos. Para cada tipo celular se muestran tres secciones a nivel dorsal (1), medio (2) y ventral (3). (C1.1) Imagen ampliada del lóbulo inter

-medio en donde se observan células ACTH-ir. Las flechas señalan células inmunorreactivas con marcaje más débil (flechas rojas) o más intenso (flechas negras) localizadas respectivamente en el centro y borde de la sección. Para la detección de la peroxidasa se utilizó el revelador 4-cloro 1-naftol. LA: lóbulo anterior. LI: lóbulo intermedio. LP: lóbulo posterior. Barra de escala: (A1, B1, C1, D1 y E1) 20 μm , (A2-3, B2-3, C1.1-3, D1-3 y E2-3) 10 μm .

2. Expresión de la proteína DLK1 en la hipófisis. Distribución y localización.

En el lóbulo anterior se detectaron abundantes células DLK1-ir, ampliamente distribuidas por el mismo, mientras que no se observaron células DLK1-ir en el lóbulo intermedio. La inmunorreactividad en el lóbulo posterior fue más débil (LA, LI, LP; **Fig.6**).

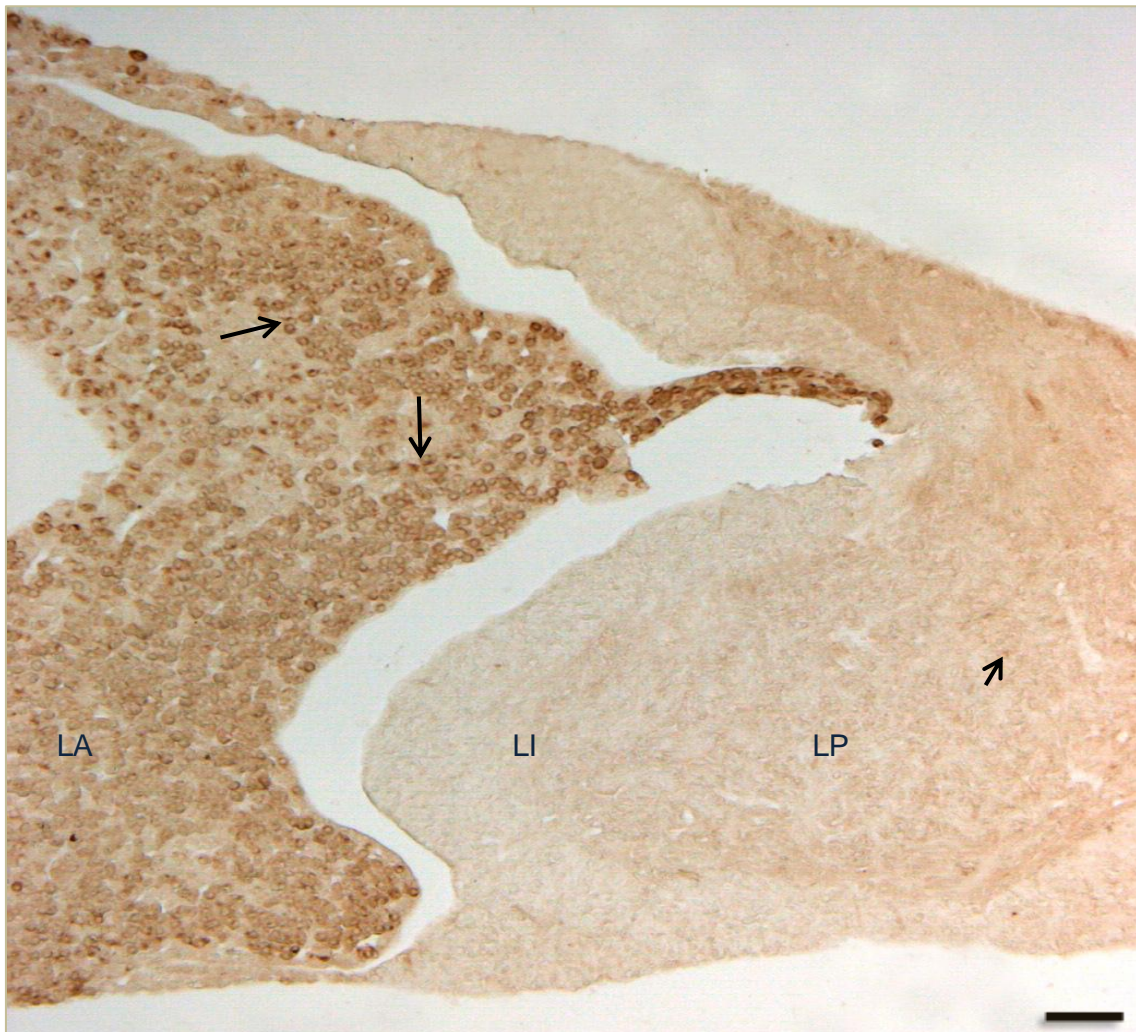


Figura 6. Distribución diferencial de las células DLK1-ir en una sección horizontal de la hipófisis de ratón adulto. Destaca el intenso marcaje en LA. Las flechas indican algunas células DLK1-ir. Para la detección de la peroxidasa se utilizó el revelador diaminobencidina. LA: lóbulo anterior; LI: lóbulo intermedio; LP: lóbulo posterior. Barra de escala: 20 µm.

Todos los niveles dorso-ventrales del lóbulo anterior hipofisario mostraron abundante cantidad de células DLK1-ir sin que se observara ninguna regionalización específica (**Fig. 7 A-C**). El porcentaje de estas células fue aproximadamente un **45%** del total. La inmunorreacción fue citoplasmática siendo muy intensa en la región adyacente al núcleo y más débil en el resto de citoplasma (**Fig. 7 D1 y D2**).

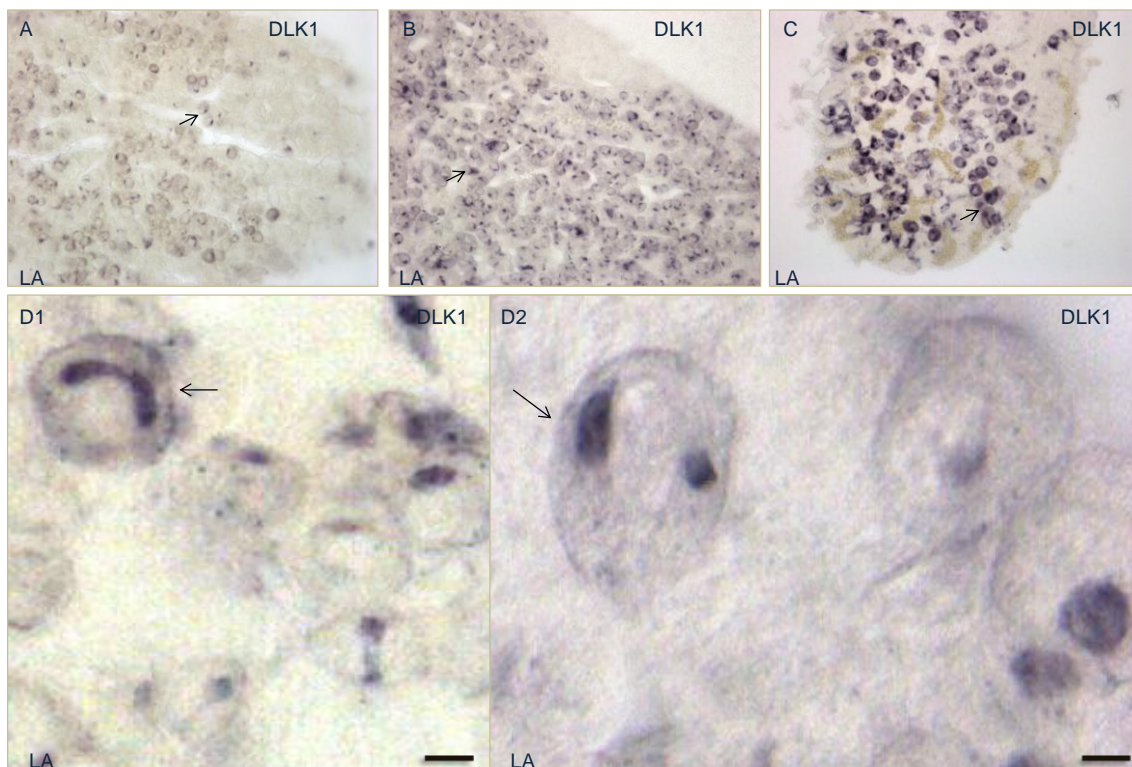


Figura 7. (A-C) Secciones de lóbulo anterior (LA) de la hipófisis tomadas de un nivel dorsal (A), intermedio (B) y ventral (C). Obsérvese la abundante cantidad de células DLK1-ir en todos los niveles (flechas). (D1 y D2) Imágenes ampliadas, nótese que la inmunorreacción para DLK1 es más intensa en la región yuxta-nuclear que en el resto de la célula. Para la detección de la peroxidasa se utilizó el revelador 4-cloro 1-naftol. Barra de escala: (A-D1) 10 μm , (D2) 5 μm .

El lóbulo intermedio fue inmuno-negativo para DLK1, sin embargo, en el lóbulo posterior observamos células DLK1-ir dispersas, presumiblemente pituicitos (**Fig. 8 A y B**).

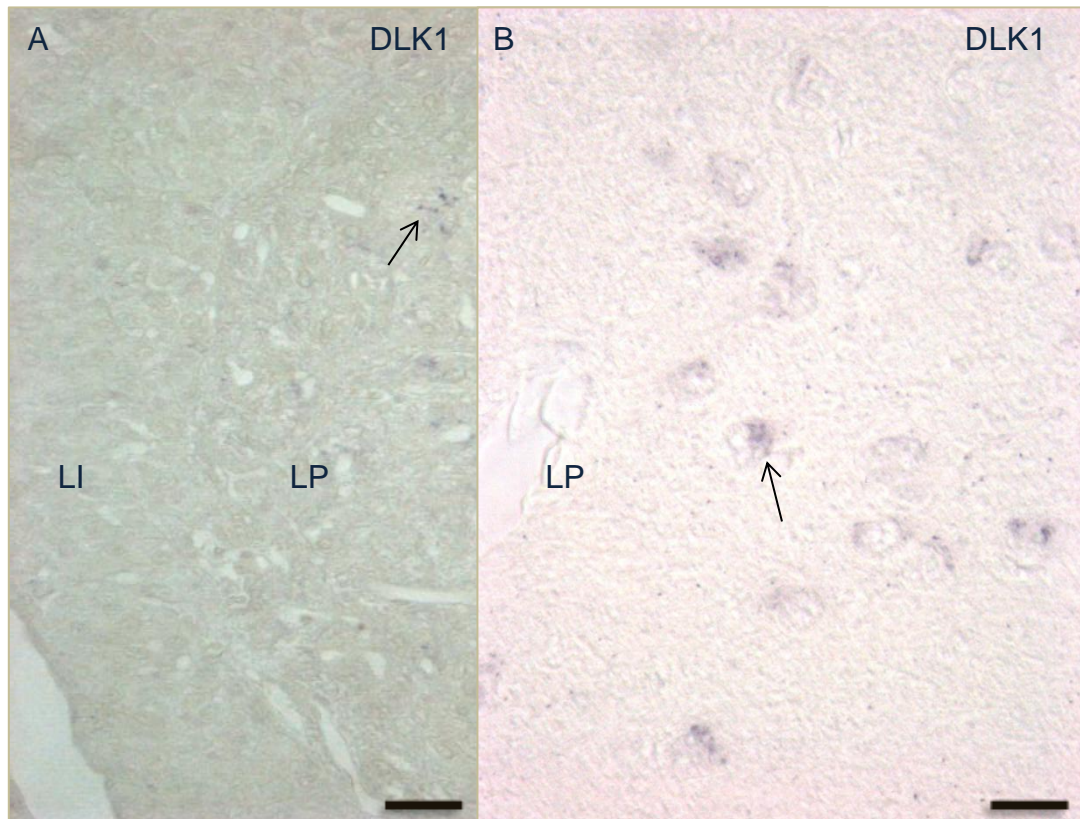


Figura 8. Inmunorreactividad para DLK1 en los lóbulos intermedio y posterior. (A) El lóbulo intermedio (LI) carece de marcaje para DLK1 mientras que el lóbulo posterior (LP) presenta células DLK1-ir dispersas (flecha), probablemente pituicitos, que se muestran a mayor aumento en (B). Para la detección de la peroxidasa se utilizó el revelador 4-cloro 1-naftol. Barra de escala: (A) 10 μ m, (B) 5 μ m.

2.1 Localización subcelular.

La técnica de microscopía electrónica reveló la ubicación subcelular de la proteína DLK1 en las células adenohipofisarias del lóbulo anterior. DLK1 se localiza principalmente en el retículo endoplasmático rugoso, cerca de la

envoltura nuclear (RER, **Fig. 9 A**, flechas negras) y dentro de las vesículas de secreción (**Fig. 9 B-D**, flechas rojas).

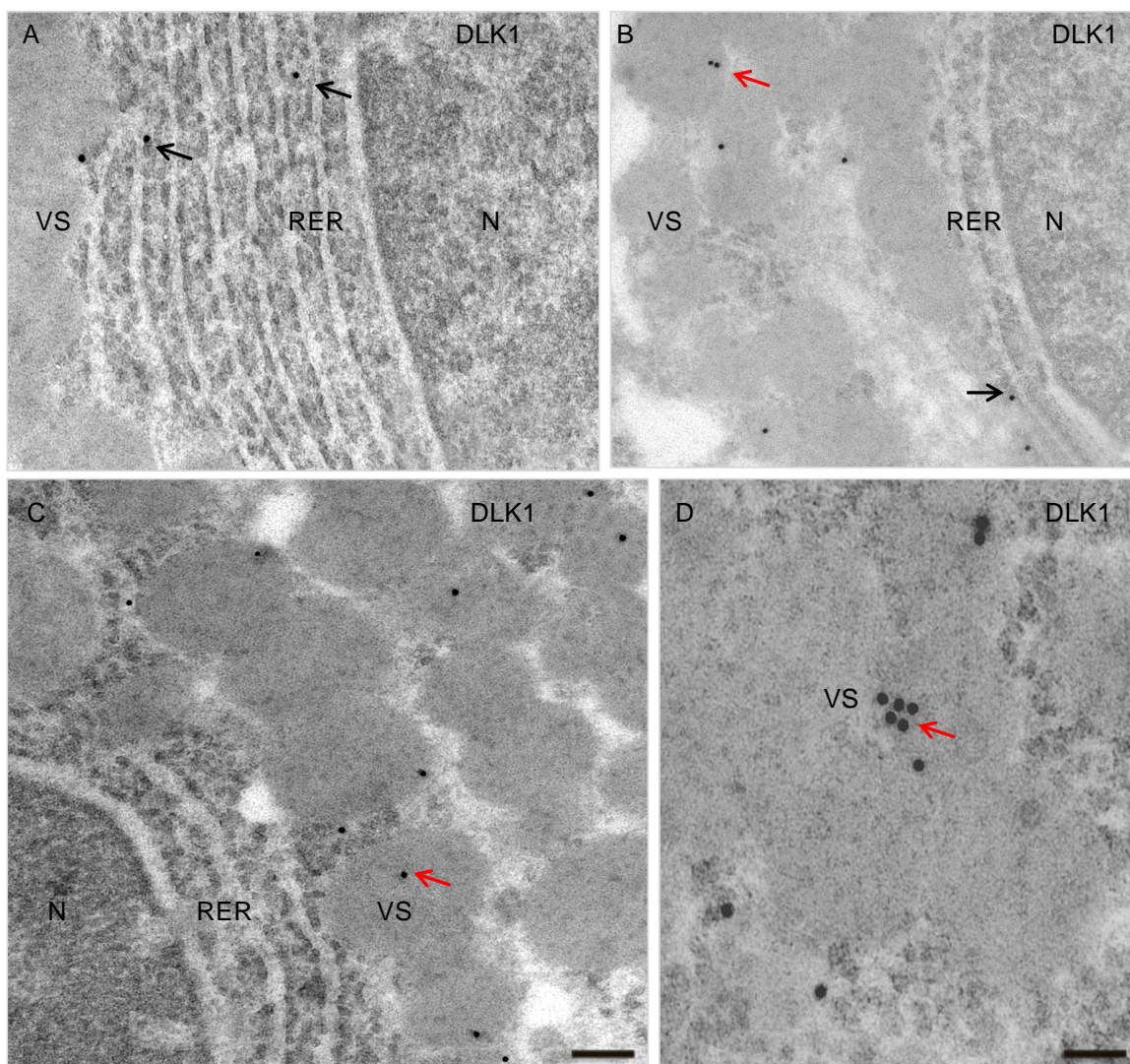


Figura 9. (A-D) Microfotografías electrónicas ilustrando la localización subcelular de DLK en el retículo endoplasmático rugoso (RER; flechas negras) adyacente al núcleo (N) y dentro de las vesículas de secreción (VS; flechas rojas). Barra de escala: (A-C) 0,5 μm , (D) 0,2 μm .

2.2. Caracterización de las células DLK1-ir del lóbulo anterior.

Para identificar los tipos celulares adenohipofisarios que son DLK1-ir usamos la técnica de elución retratamiento, determinando la presencia de DLK1 en todos los tipos celulares productores de hormonas adenohipofisarias (no mostrado). Mediante doble marcaje con inmunofluorescencia se calcularon los porcentajes de los distintos tipos de células productoras de hormonas que presentaban DLK-ir. Las células somatotropas fueron las que mayoritariamente expresaron la proteína DLK1 (**70±5,9%**, células GH-DLK1-ir), seguidas de las células lactotropas (**49,3±3,0%**, células PRL-DLK1-ir), tirotropas (**11,0±4,6%**, células TSH-DLK1-ir), gonadotropas (**7,6±3,0%**, células FSH/LH-DLK1-ir) y corticotropas (**6,7±1,7%**, células ACTH-DLK1-ir) (**Fig. 10**).

Otro dato interesante relacionado con las células adenohipofisarias gonadotropas y lactotropas fue la observación frecuente de células PRL-DLK1-ir en íntimo contacto con células gonadotropas inmunorreactivas (FSH/LH-ir) que son inmuno-negativas para DLK1 (**Fig. 11**).

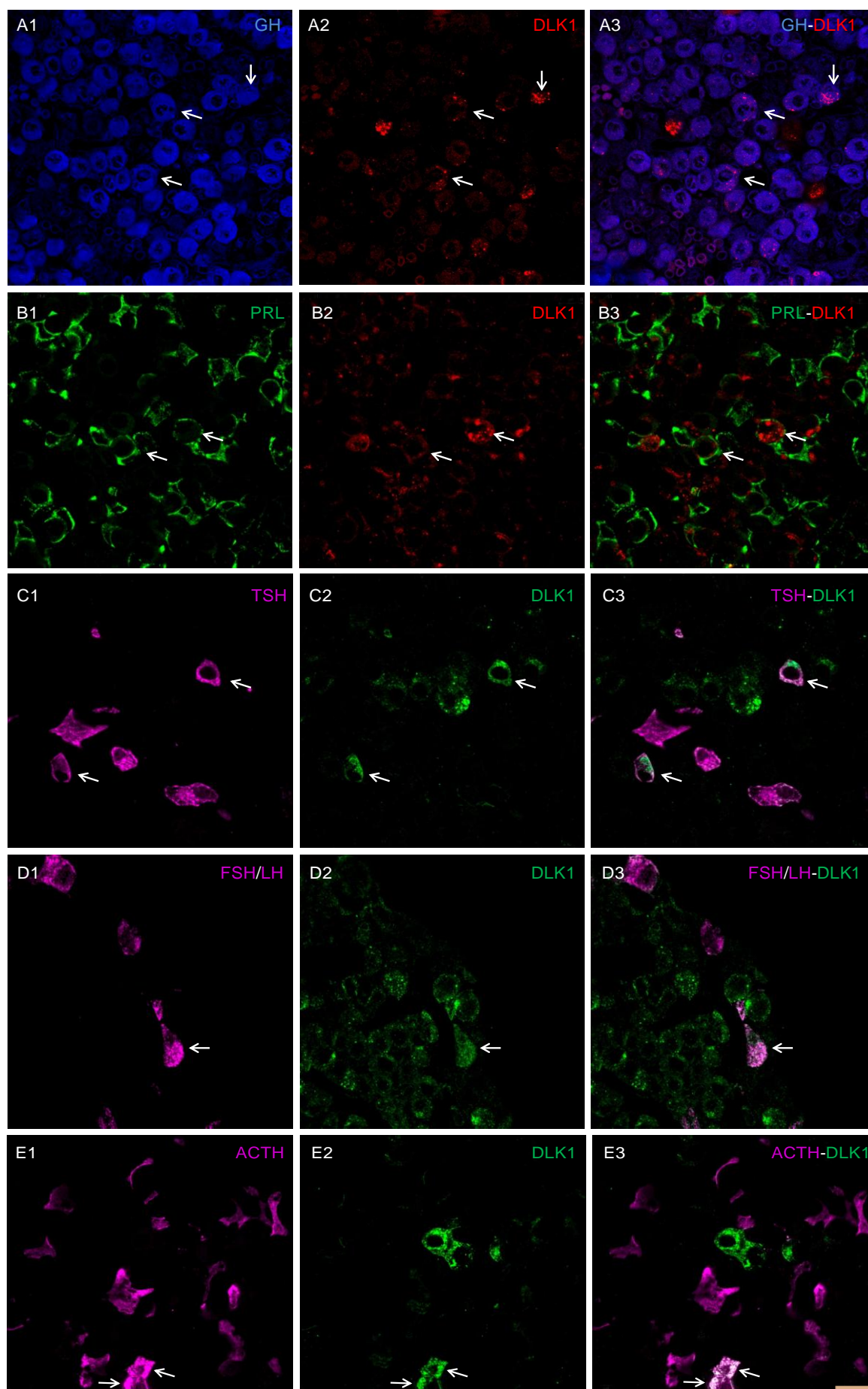


Figura 10. Identificación de células adenohipofisarias productoras de hormonas que expresan DLK1 mediante doble marcaje. La primera columna muestra los tipos celulares productores de hormonas, la segunda las células DLK1-ir y la tercera las células doblemente marcadas (flechas). Las imágenes se han ordenado en orden decreciente de colocalización, es decir, de mayor a menor porcentaje de tipos celulares que presentan DLK1. Barra de escala: 10 μ m.

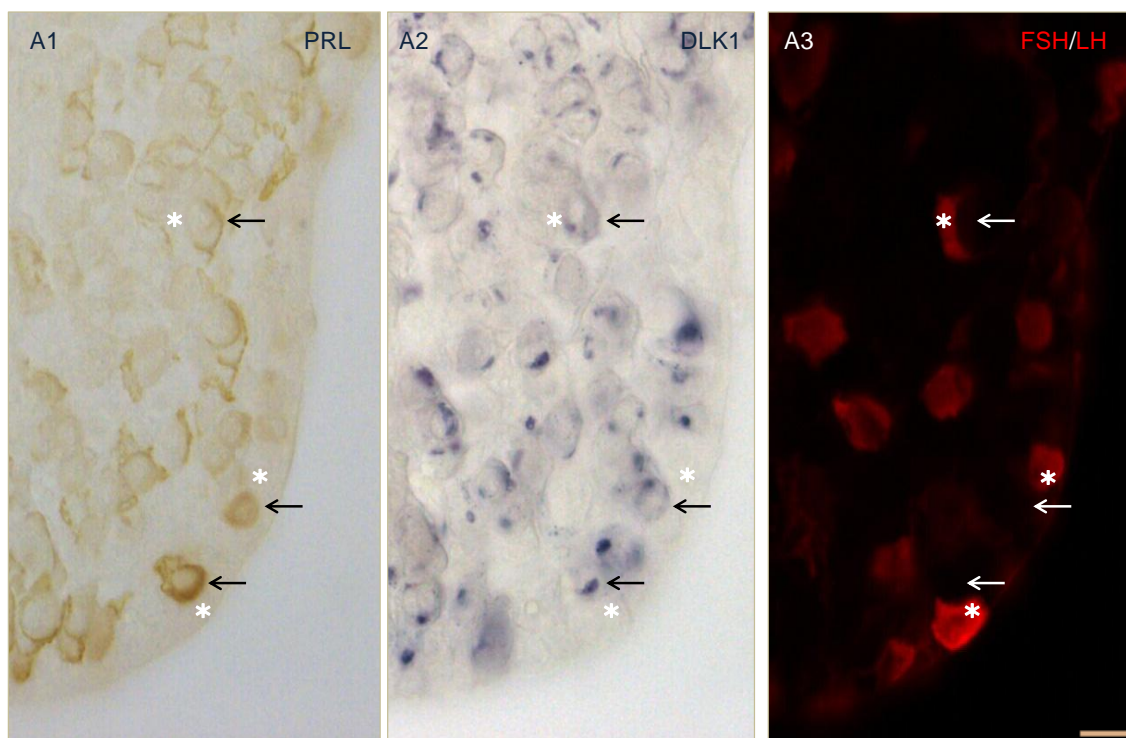


Figura 11. Inmunoreactividad para PRL (A1), DLK1 (A2) y FSH/LH (A3) en la misma sección horizontal de un lóbulo anterior hipofisario. Las células lactotropas (marrón; PRL-ir) que son también DLK1-ir (azul; señaladas con flechas negras en A1, A2 y flechas blancas en A3), aparecen próximas a células gonadotropas negativas para DLK1 (rojas; FSH/LH-ir). Para la detección de la peroxidasa en A se utilizó el revelador dietilcarbazol en A2 el 4-cloro 1-naftol y en A3 detección por inmunofluorescencia. Barra de escala: 10 μ m.

3. Expresión del receptor de leptina en células adenohipofisarias.

La inmunohistoquímica para el receptor de leptina (LpR) reveló la presencia de abundantes células LpR-ir en el lóbulo intermedio y, en menor grado, en el lóbulo anterior adenohipofisario, mientras que el lóbulo posterior no mostró inmunorreacción (**Fig. 12**). El marcaje se observó concentrado en el citoplasma. Las células LpR-ir se distribuyeron ampliamente por el lóbulo anterior e intermedio, constituyendo en el caso del lóbulo anterior un **17,09 ±0,9%** de sus células. Mediante la técnica de doble marcaje se determinó que todos los tipos celulares adenohipofisarios fueron LpR-ir en las siguientes proporciones: **41,5 ±3,9%** de las células somatotropas (células GH-LpR-ir), **13,5 ±1,7%** de las lactotropas (PRL-LpR-ir), **3,5 ±1,3%** de las gonadotropas (células FSH/LH-LpR-ir), **3,3 ±0,6%** de las tiotropas (células TSH-LpR-ir) y **3,01 ±0,5%** de las corticotropas (células ACTH-LpR-ir) (**Fig. 13 A1-3, B1-3, C1-3, D1-3 y E1-3**, respectivamente). Por otra parte, los niveles de expresión del ARNm del LpR obtenidos por RT-PCR fueron bajos y homogéneos entre las muestras analizadas, con una media de **2,05 ±0,32**.

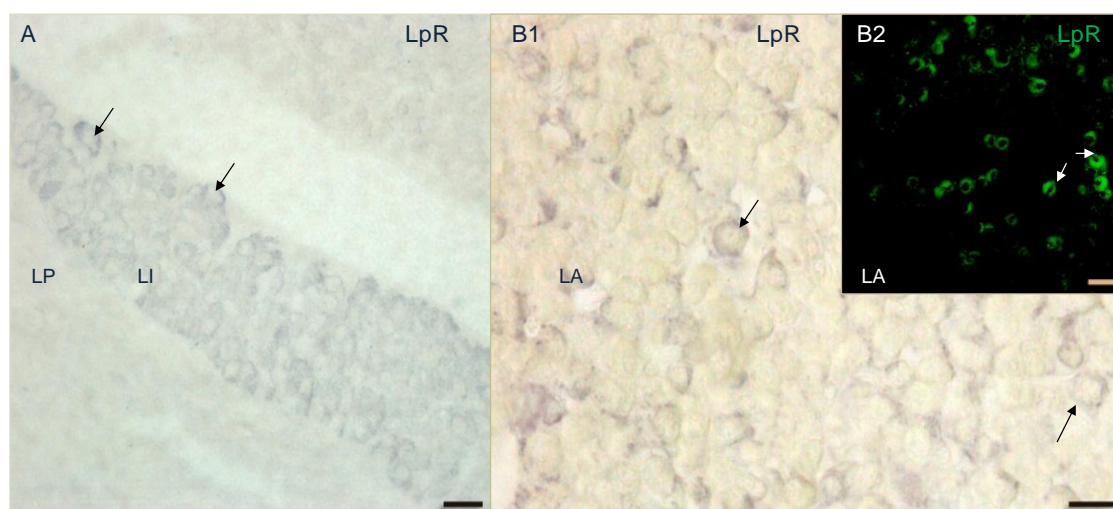


Figura 12. Expresión del receptor de leptina LpR-ir en células del lóbulo anterior de la hipófisis. (A) Presencia de abundantes células LpR-ir en el lóbulo intermedio. El lóbulo posterior no muestra marcaje inmunocitoquímico. (B1, B2) Células LpR-ir del lóbulo anterior. La imagen minimizada en B2 representa un área y/o campo completo. Las flechas señalan células LpR-ir. Para la detección de la peroxidasa en A y B1, se utilizó el revelador 4-cloro 1-naftol y en B2 detección por inmunofluorescencia. (A-B2) Barra de escala: 10 μ m.

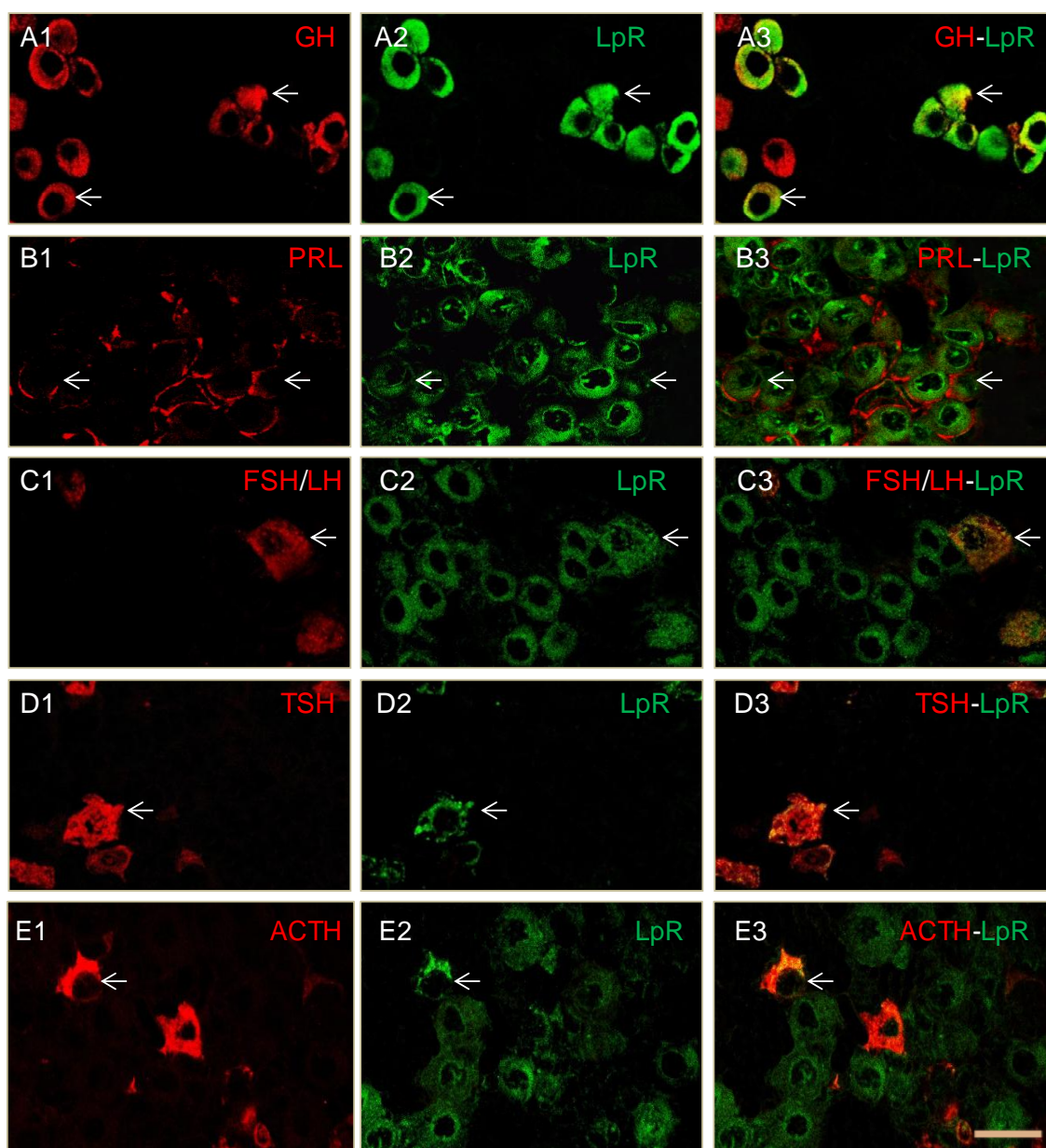


Figura 13. Localización de células productoras de hormonas que presentan el receptor de leptina (LpR) mediante marcaje inmunofluorescente en el lóbulo anterior hipofisario. La primera columna muestra cada uno de los tipos celulares productores de hormonas, la segunda las células LpR-ir y la tercera las células doblemente marcadas en secciones horizontales representativas; los dobles marcajes están realizados en la misma sección. Las flechas señalan las células doblemente marcadas. Barra de escala: 10 μm .

3.1. Colocalización del receptor de leptina en células DLK1-ir en el lóbulo anterior hipofisario.

En el apartado 2.2 de los resultados, hemos mostrado que DLK1 está presente en todos los tipos celulares productores de hormonas adenohipofisarias, mayoritariamente en somatotropas y lactotropas. Teniendo en cuenta que el receptor LpR también se observó en todos los tipos celulares adenohipofisarios, mayoritariamente en las somatotropas, podemos esperar una amplia colocalización de células DLK1-LpR-ir. El análisis del recuento celular mostró que las células DLK1-ir fueron también LpR-ir en un **46,6%** (**Fig. 14**).

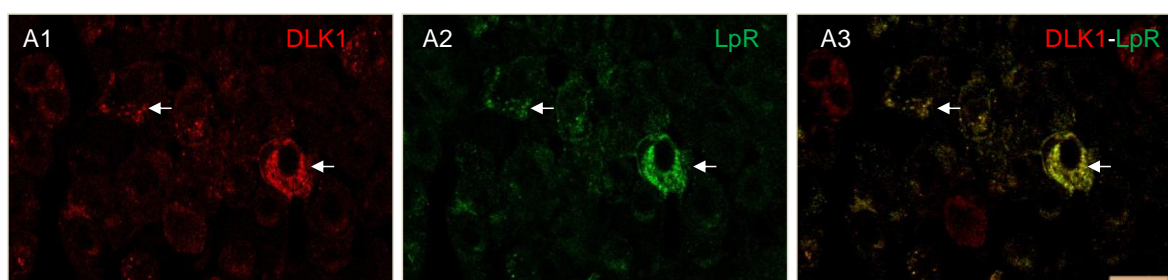


Figura 14. Expresión del receptor de leptina en células DLK1-ir del lóbulo anterior hipofisario. Las flechas señalan las células doblemente marcadas. Barra de escala: 10 μm .

4. Detección inmunohistoquímica de la hormona leptina en células hipofisarias.

Nuestros resultados también muestran la presencia de la hormona adipocítica leptina (Lp) en células del lóbulo anterior hipofisario de ratones adultos, en un porcentaje de $6,8 \pm 1,1\%$ respecto al número total de células (**Fig. 15**). Los recuentos de células en los dobles marcajes inmunofluorescentes mostraron que solo las células somatotropas y lactotropas fueron Lp-ir, en un $15,8 \pm 3,0\%$ y un $9,6 \pm 1,3\%$, respectivamente (células GH-Lp-ir y PRL-Lp-ir; **Fig.16** A1-3 y B1-3, respectivamente). Así mismo, el **100%** de las células Lp-ir también presentaron LpR-ir (células Lp-LpR-ir) (**Fig.16** C1-3). Sin embargo, la expresión del ARNm de leptina hipofisaria fue prácticamente indetectable en cuatro de las cinco muestras analizadas por RT-PCR, con una media de $2,00 \pm 1,7$.

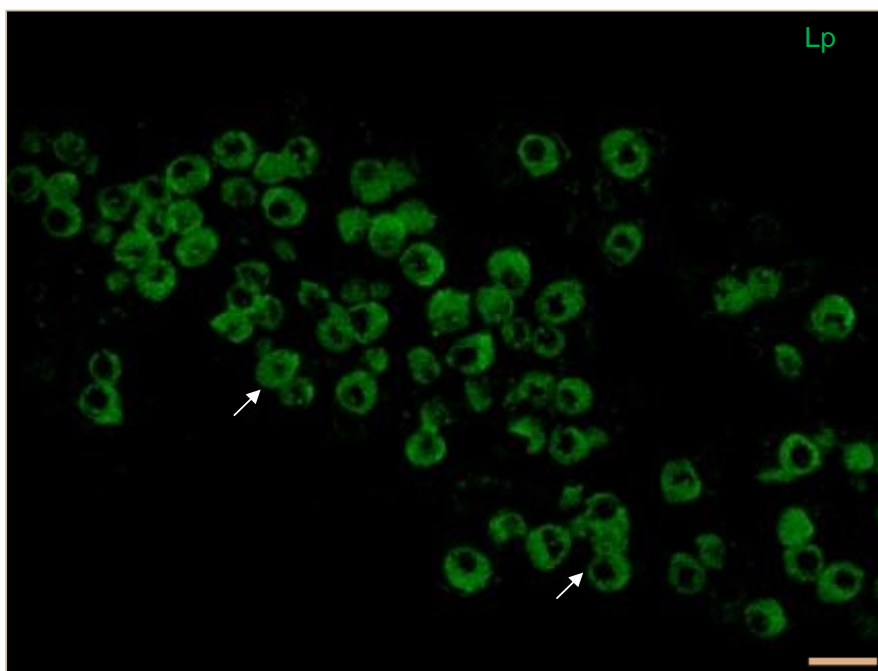


Figura 15. Detección por Inmunofluorescencia para Lp. La imagen representa un área y/o campo completo. Barra de escala: 10 μm .

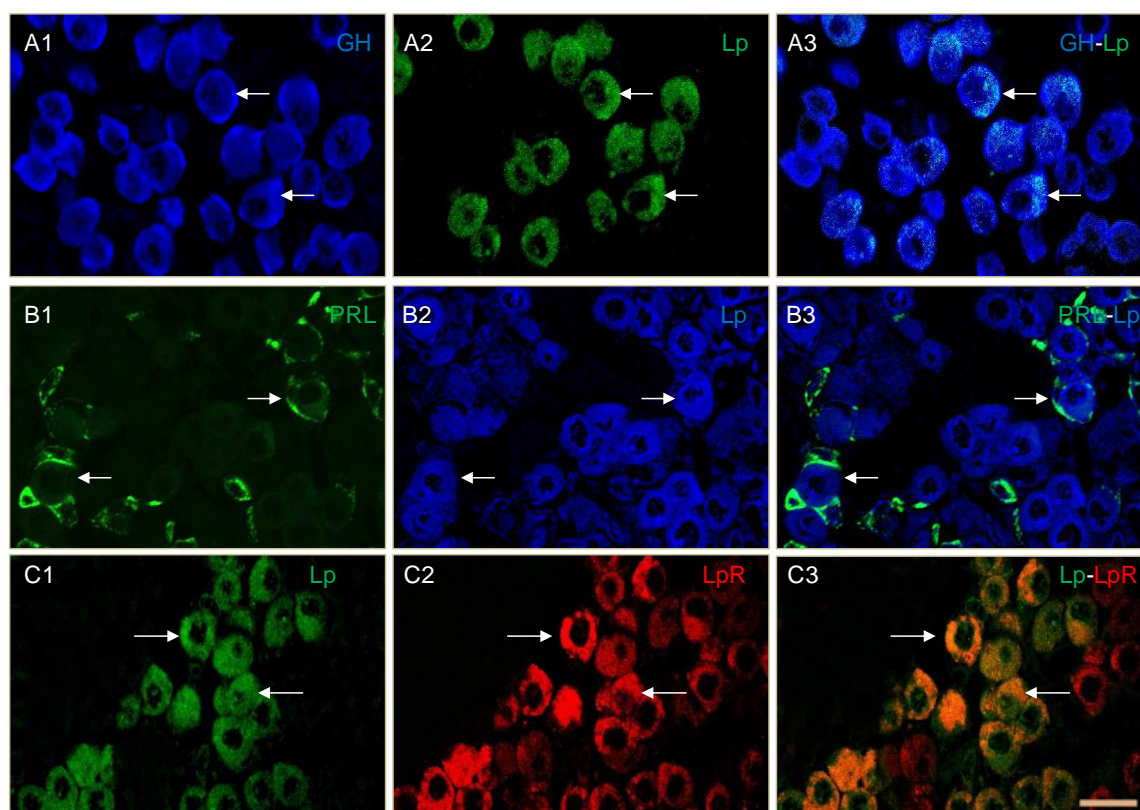


Figura 16. Expresión de la hormona adipocítica leptina (Lp) en células somatotropas y lactotropas, y de su receptor en células Lp-ir del lóbulo anterior hipofisario. (A1-A3) Colocalización de Lp-ir en células somatotropas. (B1-B3) Colocalización Lp-ir en células lactotropas. (C1-C3) Doble marcaje de Lp con LpR-ir. Las flechas señalan las células-ir doblemente marcadas. Barra de escala: 10 μ m.

5. Análisis inmunohistoquímico de Lp en relación con DLK1 en las células somatotropas y lactotropas.

En este estudio mostramos, por un lado, la presencia de la hormona Lp en las células somatotropas y lactotropas y por otro, la inmunodetección de DLK1 fundamentalmente en células somatotropas y lactotropas. Al analizar inmunohistoquímicamente la Lp en relación con DLK1, se determinó que el **59.4%** de las células Lp-ir fueron también DLK1-ir (células Lp-DLK1-ir, **Fig. 17** A1-2). Además, mediante triple marcaje se observó que las células

somatotropas y lactotropas fueron también Lp-DLK1-ir en un **6.8** y **6.0%**, respectivamente (**Fig. 17** B3-4 y C3-4, respectivamente).

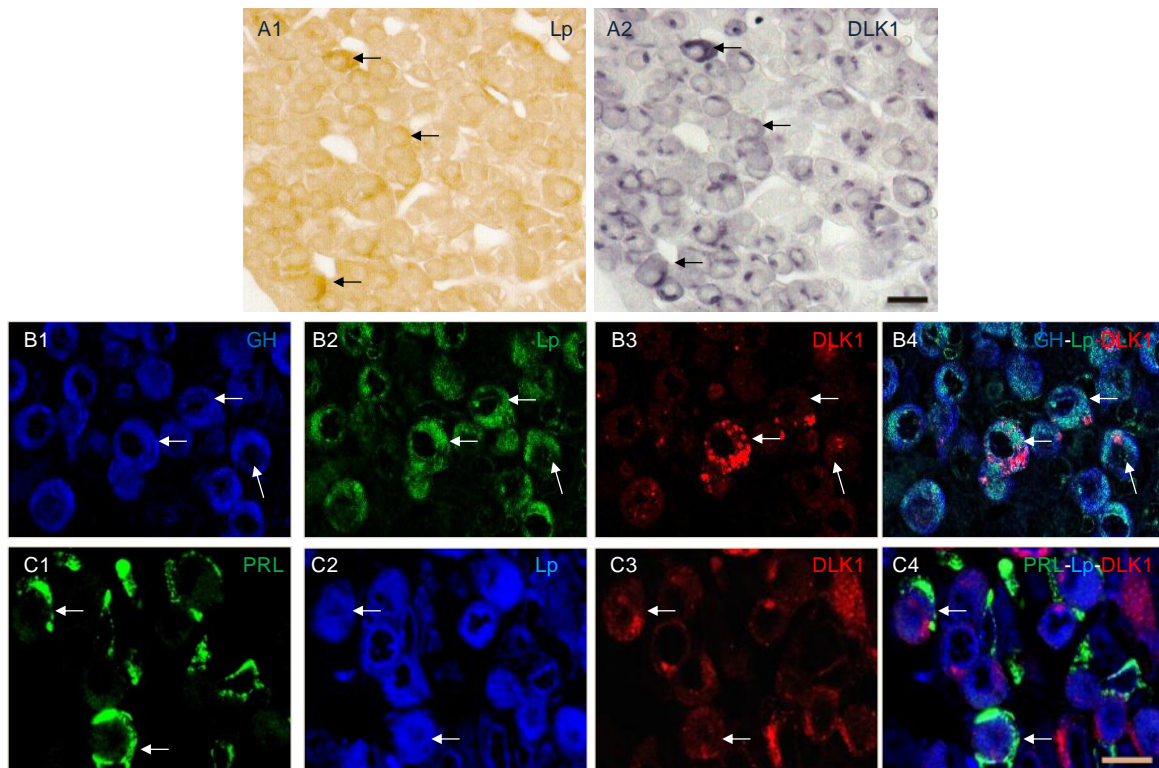


Figura 17. (A1, A2). Colocalización de la hormona leptina en células adenohipofisarias que expresan la proteína DLK1. Para la detección de la peroxidasa se utilizó el revelador diaminobencidina en A1 y en A2 el 4-cloro 1-naftol. Las flechas señalan las células en las que colocalizan ambos péptidos (células Lp-DLK1-ir). (B1-B3) Triple inmunofluorescencia que muestra células somatotropas GH que también son Lp-ir y DLK1-ir (C1-C3) Triple inmunofluorescencia en donde se observan células lactotropas PRL que también son Lp-ir y DLK1-ir. Las flechas señalan las células que expresan los tres marcadores. Barra de escala: 10 μ m.

6. Expresión de los receptores de hormonas adenohipofisarias en el tejido adiposo.

Las células adiposas fueron inmunorreactivas para todos los receptores de las hormonas adenohipofisarias ACTHR, TSHR, FSHR, LHR, PRLR, GHR (**Fig. 18**). Además se analizó la expresión de estos receptores de las hormonas adenohipofisarias en el tejido adiposo de ratones adultos mediante RT-qPCR, con oligos específicos. Se detectaron altos niveles de los ARNm de GHR y TSHR en todas las muestras (**Fig. 19**. Gráfico), bastante mayores que los niveles detectados para ACTHR y PRLR (**Fig. 19**. Gráfico), que se expresaron a un nivel intermedio. En cuanto a los niveles de expresión de los ARNm de LHR y FSHR fueron bajos, especialmente los de FSHR, y se observó una gran variabilidad entre todas las muestras (**Fig. 19**).

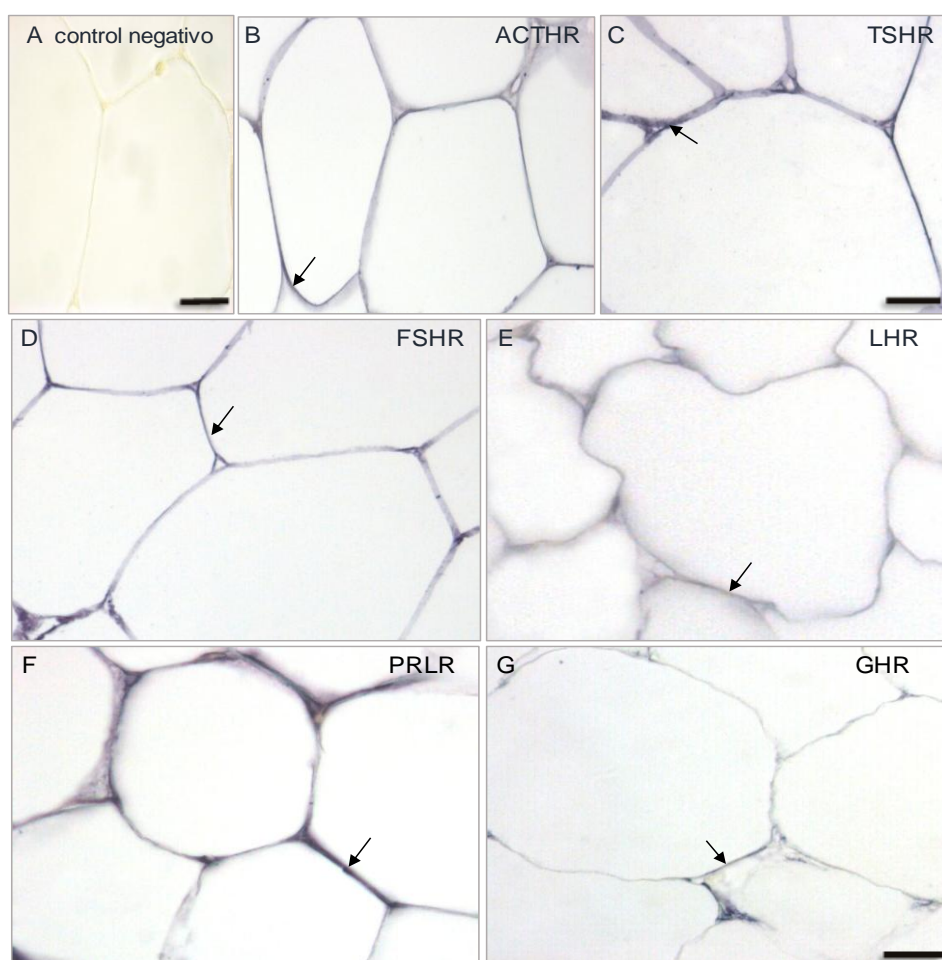


Figura 18. (A) Imagen ilustrativa del control negativo, en donde se observa el citoplasma en ausencia total de inmunoreacción (B-G). Inmunohistoquímica de los receptores de hormonas adenohipofisarias (ACTH, TSH, FSH, LH, PRL y GH) en células adiposas de ratones WT. Las flechas señalan porciones del citoplasma en forma de anillo donde la inmunotinción fue más intensa. Para la detección de la peroxidasa se utilizó el revelador 4-cloro 1-naftol. (A-G), Barra de escala: 10 μ m.

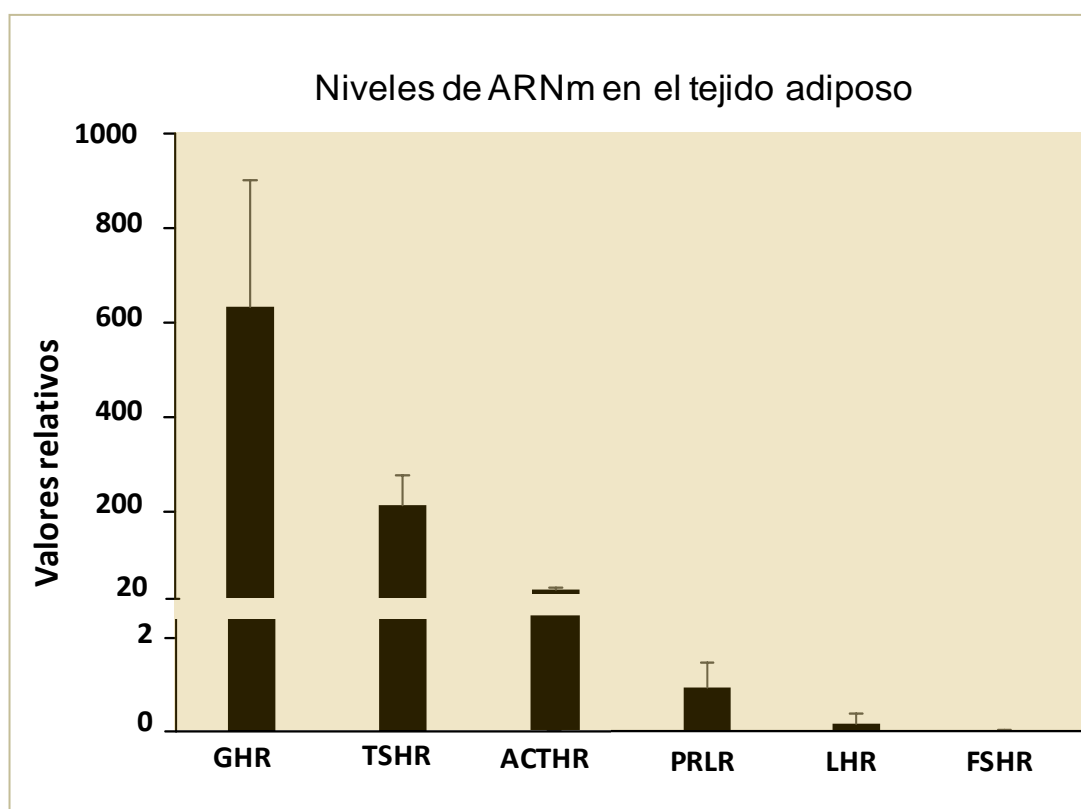


Figura 19. Valores relativos de los niveles de ARNm de los diferentes receptores de hormonas adenohipofisarias en tejido adiposo de ratones machos adultos. Las barras de error representan la variabilidad observada en los niveles de ARNm.

7. Expresión de leptina y su receptor en el tejido adiposo.

En las células adiposas se pudo detectar una débil inmunorreactividad para Lp, siendo esta más intensa para su receptor. (**Fig. 20**). Por otro lado, los niveles de expresión del ARNm de Lp por RT-PCR en el tejido adiposo fueron

muy elevados, aunque con mucha variabilidad entre las muestras (**Fig. 21**). En cambio, la expresión del ARNm del LpR, fue muy baja en este tejido y muy similar entre todas las muestras (**Fig. 21**)

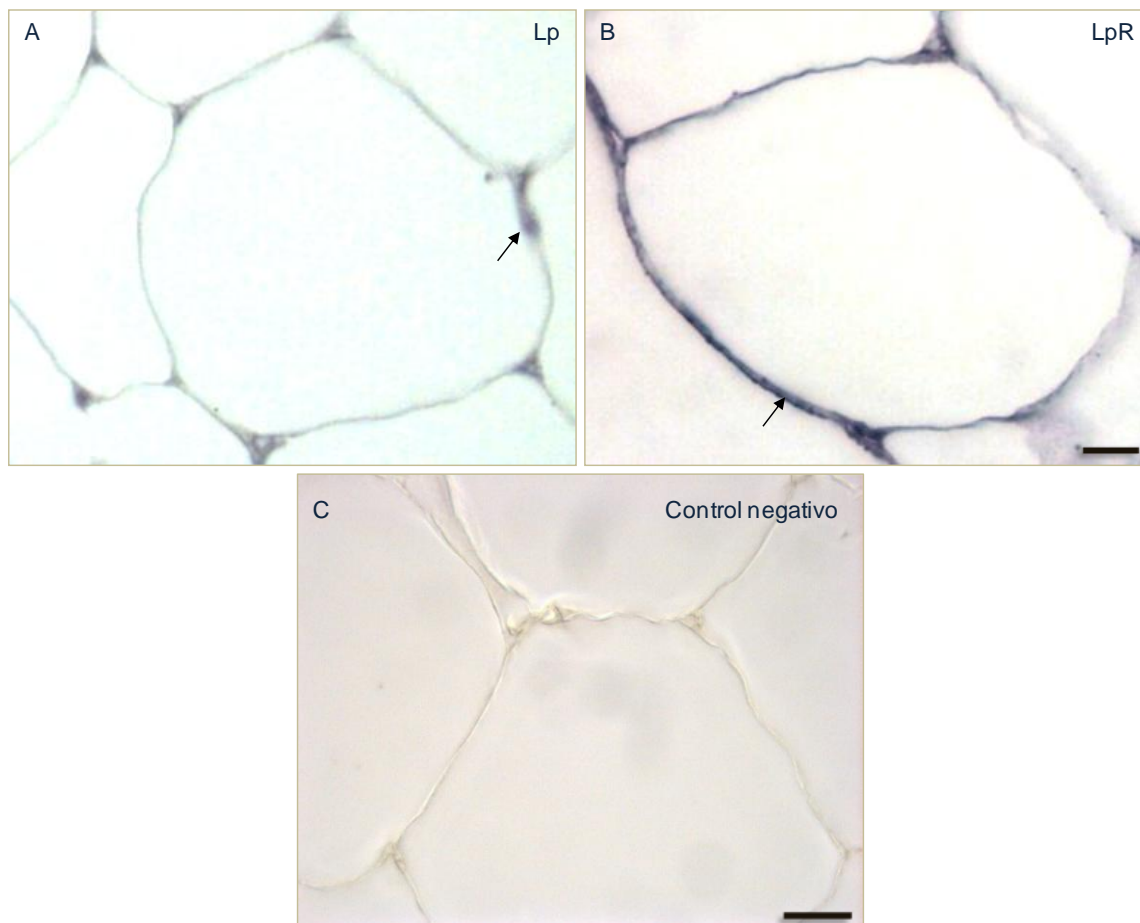


Figura 20. Detección inmunohistoquímica de la hormona adipocítica leptina Lp (A) y de su receptor LpR (B) en células adiposas. Las flechas señalan porciones del citoplasma en donde la inmunotinción fue más intensa. (C) Control negativo sin el anticuerpo primario; obsérvese el citoplasma compactado en ausencia de inmunorreacción. Para la detección de la peroxidasa se utilizó el revelador 4-cloro 1-naftol. Barra de escala (A y B) 10 μm , (C) 5 μm .

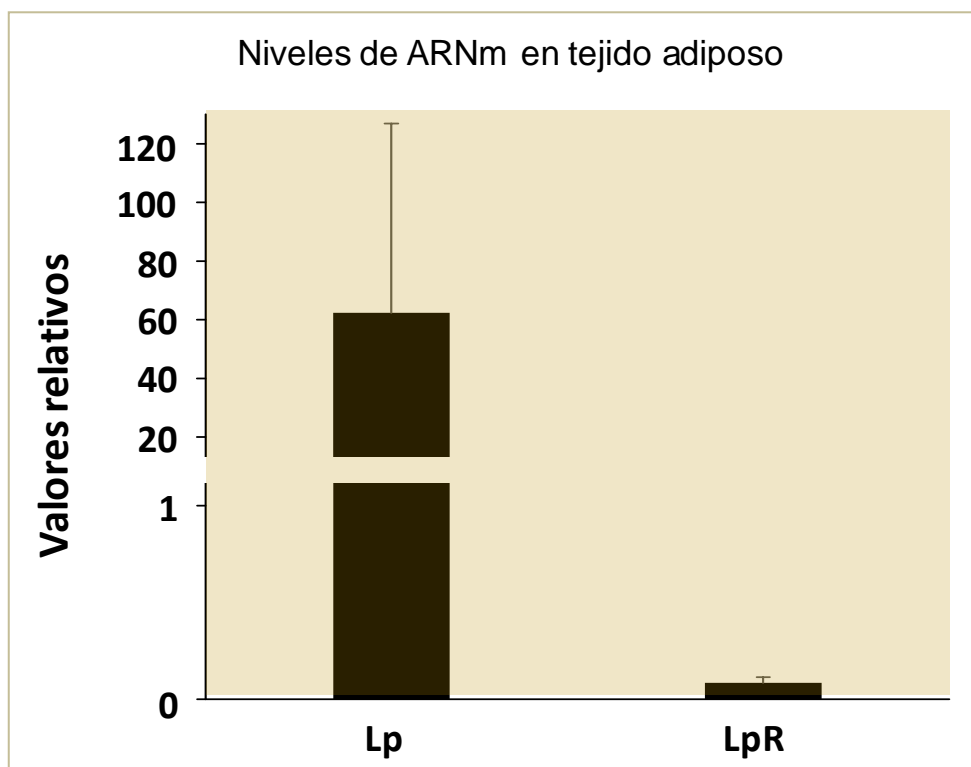


Figura 21. Valores relativos de los niveles de expresión del ARNm de leptina (Lp) y su receptor (LpR) en células adiposas de ratones machos adultos. Las barras de error representan la variabilidad observada en los niveles de ARNm.

RESULTADOS EN EL RATÓN ADULTO CARENTE DEL GEN *Dlk1*

8. Análisis de las células productoras de hormonas adenohipofisarias en el lóbulo anterior de ratones *KO-Dlk1*.

Para evaluar si la proteína DLK1 presente en las células adenohipofisarias puede afectar a la síntesis y secreción de hormonas, analizamos cada hormona mediante inmunohistoquímica, comparando los resultados de los ratones *KO-Dlk1* con los obtenidos en los ratones control.

Al igual que en los ratones control, las células productoras de hormonas adenohipofisarias estuvieron presentes y sin regionalización aparente en el lóbulo anterior de los ratones homocigotos *Dlk1*. Igualmente, las células

somatotropas fueron las más abundantes ($32,8\pm 2,4\%$ del total de células), sin embargo, este porcentaje fue un $17,5\%$ inferior al de los ratones WT (**Fig. 22; Tabla 3**); véase también apartado **8.1**. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas. El resto de los tipos celulares no mostraron diferencias significativas respecto al control ni en abundancia relativa (**Tabla 3**), ni en intensidad de la inmunorreacción (**Fig. 23 A1-C2**), salvo en los casos de las células PRL-ir y FSH-ir (analizado en el apartado **8.2**).

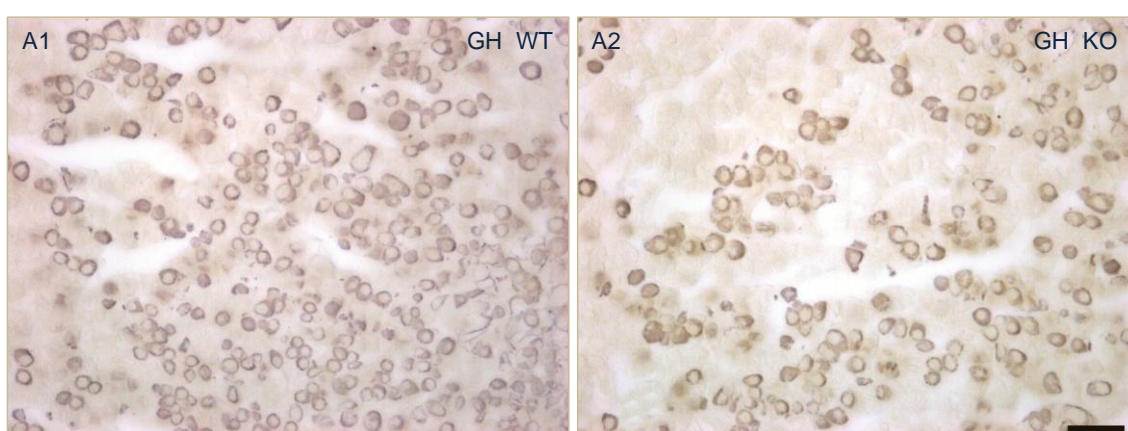


Figura 22. Células GH-ir en la adenohipófisis de un ratón deficiente de *Dlk1* comparados con el ratón control. Se muestran dos secciones horizontales de la adenohipófisis a nivel del primer tercio dorso-ventral. Obsérvese el mayor número aparente de células GH-ir en el control (A1) comparado con el mutante (A2). WT: ratones control; KO: ratones *knockout Dlk1*. Para la detección de la peroxidasa se utilizó el revelador 4-cloro 1-naftol. Barra de escala: 10 μm .

Tipos celulares adenohipofisarios	Porcentaje en WT	Porcentaje en KO	Análisis comparativo y significación estadística
Células somatotropas (GH)	$50,3\pm 2,6\%$	$32,8\pm 2,4\%$ ***	$p < 0.0001$
Células lactotropas (PRL)	$23,9\pm 1,09\%$	$26,1\pm 2,4\%$	No significativo
Células corticotropas (ACTH)	$9,3\pm 0,6\%$	$7,6\pm 0,6\%$	No significativo
Células tirotropas (TSH)	$8,9\pm 0,5\%$	$8,3\pm 0,6\%$	No significativo
Células gonadotropas (FSH/LH)	$8,4\pm 0,6\%$	$9,5\pm 0,6\%$	No significativo

Tabla 3. Porcentaje de los distintos tipos de células productoras de hormonas adenohipofisarias en ratones control (WT) y KO-*Dlk1* (KO). El menor número de células GH en el lóbulo anterior de ratones mutantes fue estadísticamente significativo. *** $p < 0,0001$.

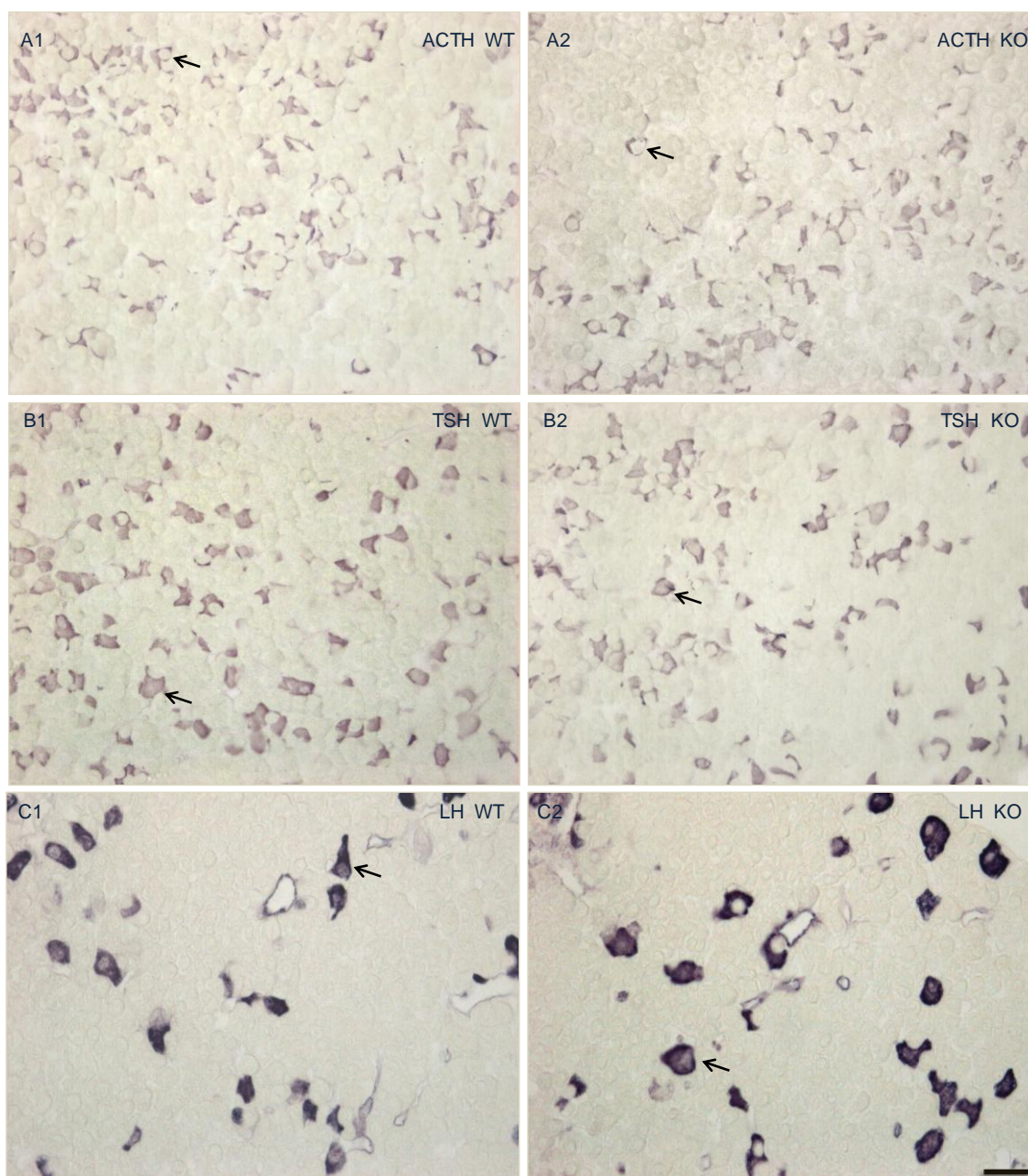


Figura 23. Células ACTH-ir, TSH-ir y LH-ir en la adenohipófisis de ratones silvestres (WT) y ratones deficientes en *Dlk1* (KO). La inmunotinción es similar en los dos genotipos para los tres tipos celulares. Las flechas señalan células inmunorreactivas. Para la detección de la peroxidasa se utilizó el revelador 4-cloro 1-naftol. Barra de escala: 10 μ m.

8.1. Descenso en el número de células somatotropas en el ratón *Dlk1*^{-/-}.

Como se ha comentado en el apartado anterior, el análisis comparado de la distribución y número relativo de células GH-ir a nivel cualitativo (ver **Fig. 22**) mostraba diferencias que se analizaron cuantitativamente mediante el recuento celular y su posterior análisis estadístico, encontrándose que el porcentaje de somatotropas disminuyó significativamente en un **17,5%** en los ratones deficientes en *Dlk1* comparado con los controles ($p < 0,0001$; $U = 358,5$) (**Fig. 24 A**; **Tabla 4**). Además se encontró diferencias significativas en el número de células GH-ir dependiendo del nivel dorso-ventral en la hipófisis. Las mayores diferencias, comparadas con el control, se detectaron en los tercios, dorsal (secciones 10-12) y ventral (secciones 22-31) donde el número de células somatotropas disminuyó drásticamente ($p < 0,05$; **Fig. 24 B**).

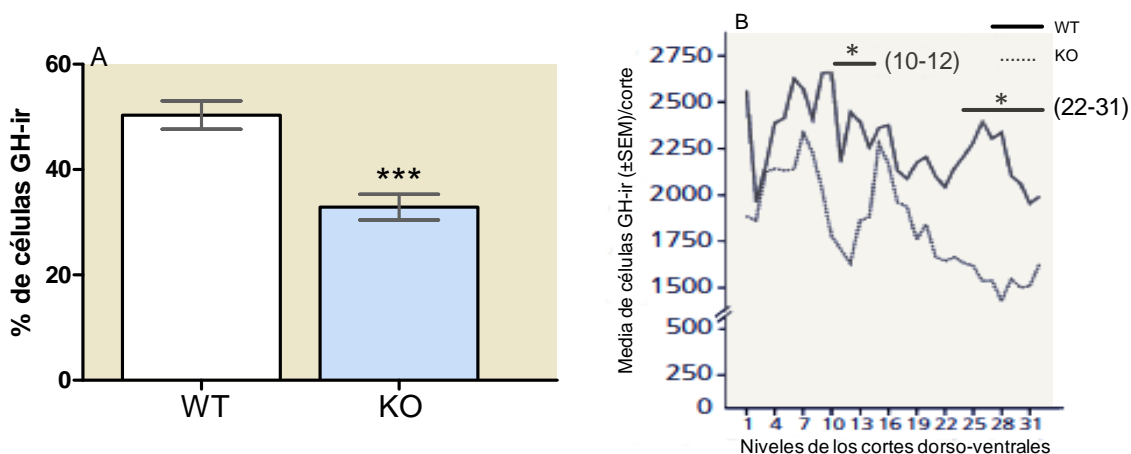


Figura 24. Número de células GH-ir en la adenohipófisis. Se observa un descenso significativo de células GH los ratones deficientes en *Dlk1* (KO) comparado con los controles (WT). (A) Porcentaje de células GH-ir en ratones WT y en ratones KO. *** Diferencia significativa frente al control ($p < 0,0001$). (B). Distribución de células GH en un plano dorso-ventral. * Diferencia significativa frente al control ($p < 0,05$).

8.2. Análisis comparativo entre las células gonadotropas y lactotropas de ratones WT y KO.

Las células gonadotropas y lactotropas de ratones *Dlk1*^{-/-} presentan diferencias notorias en la intensidad de la inmunorreacción con respecto al control. Estos dos tipos celulares mostraron una inmunotinción citoplasmática más débil en todos los niveles del lóbulo anterior adenohipofisario en los ratones mutantes respecto a los controles. Esto fue más evidente en las células FSH-ir localizadas en las zonas centrales del lóbulo anterior (**Fig. 25 A1-A2**) mientras que en el caso de las células PRL-ir todas las células presentaron una inmunotinción más débil, tanto las situadas en el borde del lóbulo como en la parte más central del mismo (**Fig. 25 B1-B2**).

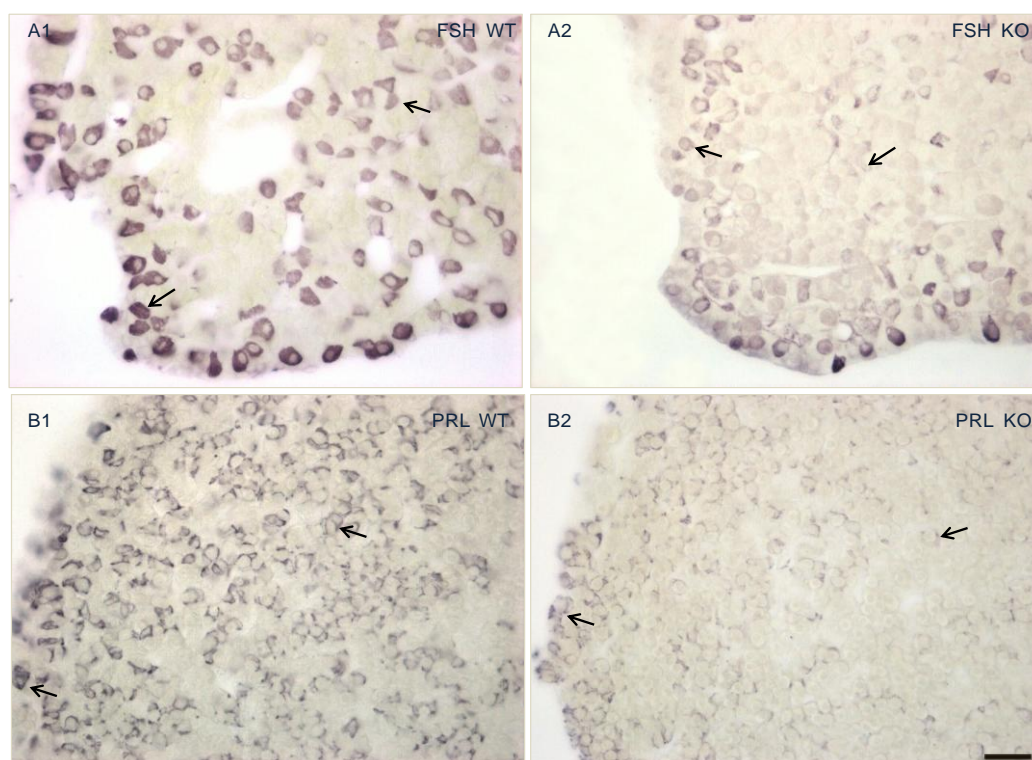


Figura 25. Células FSH-ir y PRL-ir en secciones horizontales de la hipófisis comparando la inmunotinción en los ratones WT y KO. Obsérvese la mayor intensidad de la inmunorreacción en los WT. Las flechas señalan las células inmunorreactivas. Para la detección de la peroxidasa se utilizó el revelador 4-cloro 1-naftol. Barra de escala: 10 μ m.

8.3. Análisis por RT-PCR de los niveles de ARNm de las hormonas FSH, LH, PRL y GH.

Para evaluar si la ausencia de DLK1 afecta a la expresión de aquellas hormonas adenohipofisarias en que se detectan diferencias a nivel inmunohistoquímico, se analizaron los niveles de expresión de los ARNm de las hormonas FSH, LH, PRL y GH mediante RT-PCR, comparando los ratones mutantes con los controles. Los datos obtenidos se resumen en la **Figura 26**. Los niveles de ARNm de la hormona FSH se redujeron significativamente a un **56,4 ±9,4%** de lo obtenido en los controles ($p < 0,05$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión de los ARNm de LH, PRL y GH entre los ratones *Dlk1*^{-/-} y los controles.

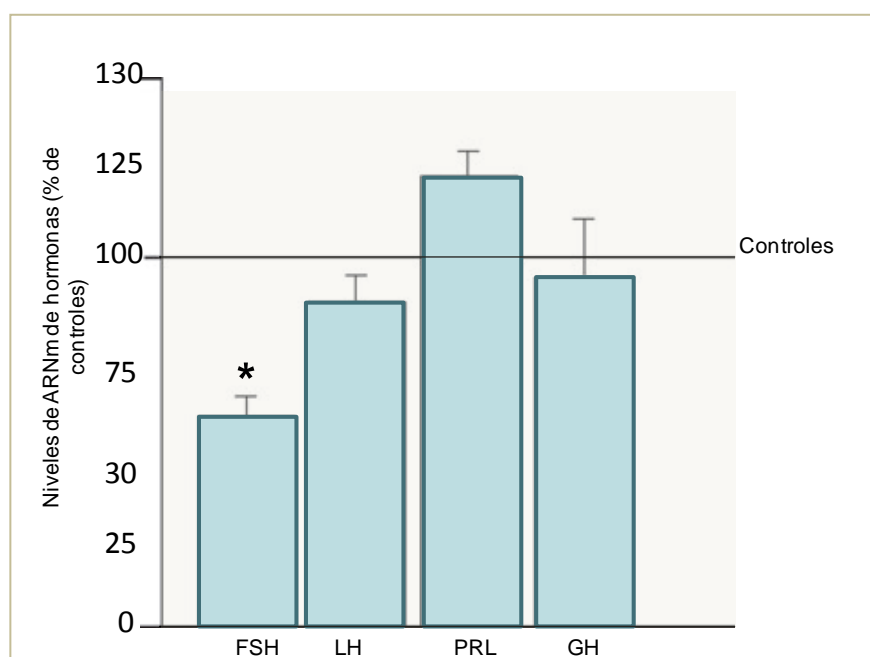


Figura 26. Niveles de expresión de los ARNm de FSH, LH, PRL y GH en la hipófisis de ratones *Dlk1*^{-/-} comparados con los ratones control. Los datos de la RT-PCR muestran una reducción significativa en los niveles de ARNm de FSH en los ratones *Dlk1*^{-/-}, expresado como el porcentaje del total del nivel de expresión del ARNm de dicha hormona en los ratones control. * Diferencia significativa frente al WT ($p < 0,05$). Cada columna representa la media del porcentaje \pm SEM. GH, hormona de crecimiento; FSH, hormona folículo estimulante; LH, hormona luteinizante; PRL, prolactina.

9. Niveles séricos de las hormonas adenohipofisarias FSH, LH, PRL, GH y la hormona adipocítica leptina en los ratones KO-*Dlk1*.

Dado que en los ratones KO se observaron variaciones en la inmunorreactividad y expresión de las hormonas adenohipofisarias FSH, PRL y GH, se procedió a medir los niveles de estas hormonas en el suero sanguíneo de ambos genotipos de ratones. También hemos incluido en este estudio la hormona luteinizante (LH) por estar producida y secretada por el mismo tipo celular gonadotropo productor de la FSH.

El análisis estadístico de los resultados no mostró diferencias significativas en los niveles séricos de FSH, LH y GH entre ratones *Dlk1*^{-/-} y controles (**Fig. 27**). Con respecto a los niveles circulantes de la hormona PRL, estuvieron en el límite de detección en el suero de los ratones WT y solo detectable en tres de las cinco muestras sanguíneas de los ratones *Dlk1*^{-/-}, por lo que no se obtuvieron datos que permitieran ser analizados

Teniendo en cuenta que los ratones adultos *Dlk1*^{-/-} presentan una mayor masa de grasa corporal, niveles altos de lípidos circulantes y que todas las células productoras de hormonas hipofisarias expresan receptores de leptina (véase **INTRODUCCIÓN**), se analizaron también los niveles de leptina sérica. El análisis de los resultados mostró un incremento significativo en los niveles circulantes de leptina hasta un porcentaje del **736,8 ±51,3%** respecto al nivel de referencia encontrado en los ratones control ($p < 0,001$) (**Fig. 27**).

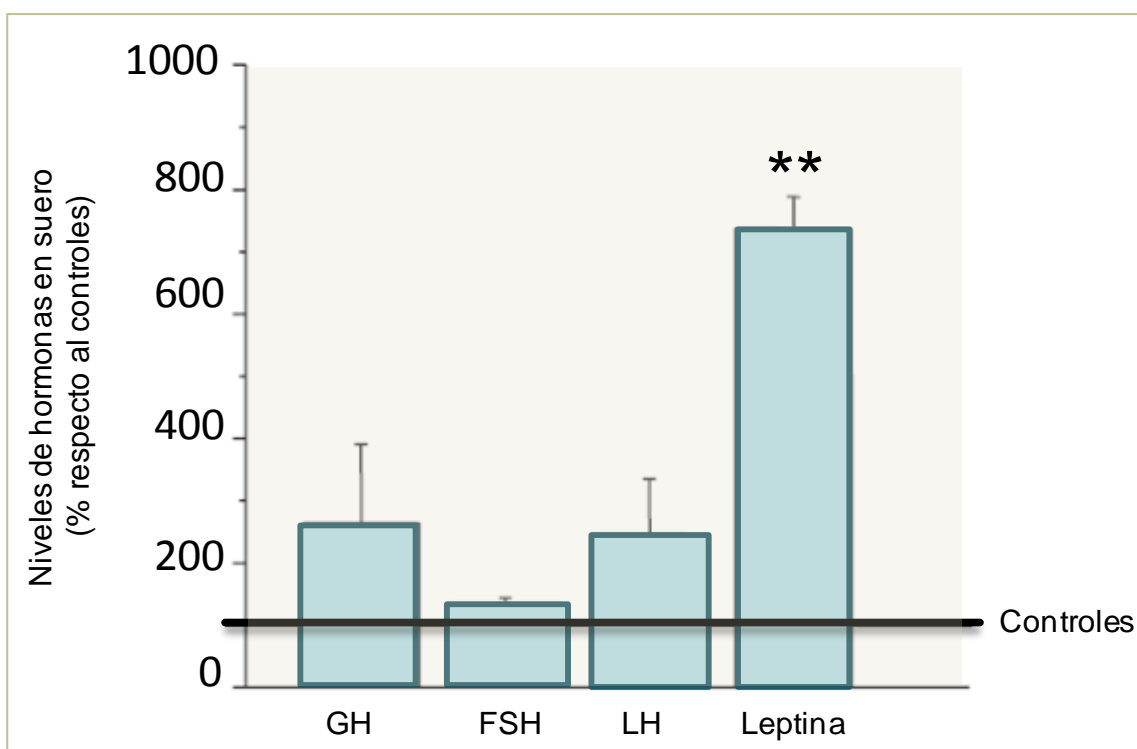


Figura 27. Niveles circulantes de las hormonas GH, FSH, LH y leptina en ratones *Dlk1*^{-/-} comparados con los controles. Los datos obtenidos mediante ELISA muestran un incremento significativo en los niveles séricos de leptina en los ratones *Dlk1*^{-/-}, expresados como el porcentaje del total de los niveles de concentración de las hormonas en los controles. ** Diferencia significativa frente a los animales control ($p < 0,001$). GH, hormona de crecimiento. FSH, hormona folículo estimulante. LH, hormona luteinizante.

10. Expresión del receptor específico de la hormona leptina en células hipofisarias de ratones KO-*Dlk1*.

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que en los ratones KO-*Dlk1* los niveles circulantes de leptina adipocítica están significativamente incrementados, de ahí la importancia de analizar las variaciones en la expresión del receptor de leptina (LpR) en el lóbulo anterior de la hipófisis en estos ratones y compararlas con los ratones control.

El análisis inmunohistoquímico mostró la presencia de células LpR-ir en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis de ratones mutantes (**Fig. 28 A, B1-2, respectivamente**). Sin embargo, el número de células LpR-ir en el lóbulo anterior fue de **27,17 ±1,5%**, mostrando un aumento significativo del **10%** ($p<0.0001$; $U= 1805$) en comparación con el control (**Fig. 29 A. Tabla 4**). Por otra parte, LpR también estuvo presente en todas las células adenohipofisarias y, del mismo modo que en los controles, se expresó mayoritariamente en células somatotropas en un **53,1 ±4.0%** (células GH-LpR-ir). Este porcentaje supuso un incremento significativo del **11,6%**, respecto al control ($p<0.05$; $U= 560.0$) (**Fig. 29 B**). En relación al resto de tipos celulares no se encontraron diferencias significativas respecto a los animales control (**Tabla 4**). En cuanto a los niveles de ARNm del LpR fueron ligeramente más altos que en los ratones control (**Fig. 30**).

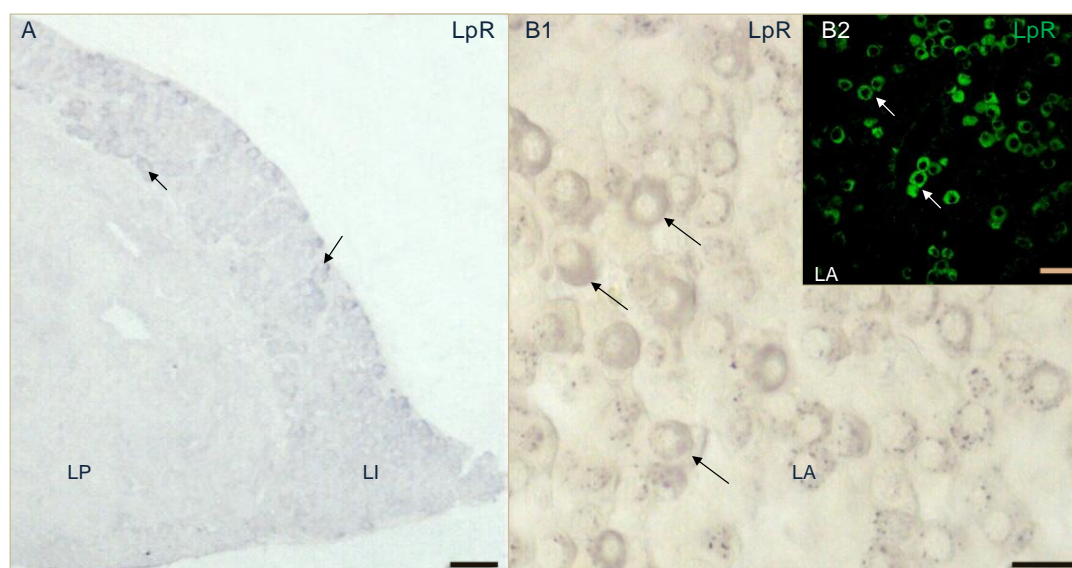


Figura 28. Presencia del receptor de leptina (LpR) en el lóbulo intermedio (A) y en el lóbulo anterior de la hipófisis en ratones *Dlk1*^{-/-}. Las flechas señalan células inmunorreactivas en ambos lóbulos. Obsérvese la abundante presencia de células LpR-ir en el lóbulo intermedio. (B1) Imagen ampliada para observar detalles. (B2) Imagen inmunofluorescente minimizada que representa un área y/o campo completo. Para la detección de la peroxidasa en A y B1 se utilizó el revelador 4-cloro 1-naftol y en B2 detección por inmunofluorescencia (A) Barra de escala: 20 μ m, (B1-2) Barra: 10 μ m.

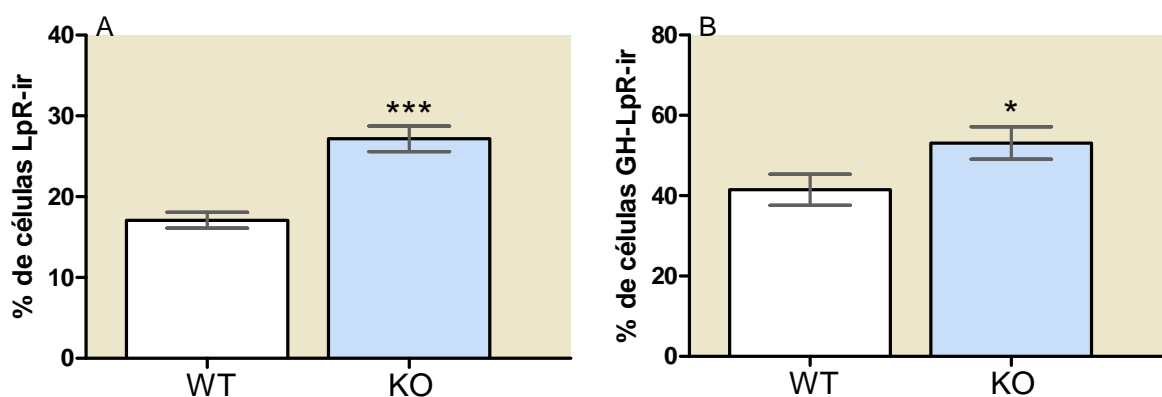


Figura 29. Porcentaje de células LpR-ir y GH-LpR-ir en la adenohipófisis de ratones *Dik1*^{-/-} comparado con los animales control. (A) La gráfica muestra el porcentaje de células LpR con respecto al número total de células por área, tomando como 100% al número total de células/área. El porcentaje de células LpR es mayor en los ratones *Dik1*^{-/-} (KO) que en los controles (WT). *** Diferencia significativa frente al control ($p < 0,0001$). (B) La gráfica muestra el porcentaje de células GH-LpR respecto al número total de células GH/área, tomando como el 100% el número total de células GH/área. El porcentaje de células GH-LpR es mayor en el KO que en el WT. * Diferencia significativa frente al WT con una $p < 0,05$.

Tipos celulares	Porcentaje en ratones WT	Porcentaje en ratones KO	Análisis comparativo y Significación estadística
Células LpR	17,09±0,9%	27,17±1,5%***	$p < 0,0001$
Células GH-LpR	41,5±3,8%	53,1±4,0%*	$p < 0,05$
Células PRL-LpR	13,5±1,7%	16,1±1,6%	n/s
Células FSH/LH-LpR	3,5±1,3%	5,0±0,9%	n/s
Células TSH-LpR	3,3±0,6%	4,0±0,8%	n/s
Células ACTH-LpR	3,0±0,5%	3,6±0,7%	n/s

Tabla 4. Tabla comparativa del porcentaje de adenohipofisarias productoras de hormonas que también son LpR-ir en ratones control (WT) y *Dik1*^{-/-} (KO). Sólo se encontraron aumentos significativos en el porcentaje de células LpR y de células GH-LpR-ir en los ratones KO en comparación con los WT. *** Diferencia significativa frente al WT con una $p < 0,0001$. * Diferencia significativa frente al WT con una $p < 0,05$.

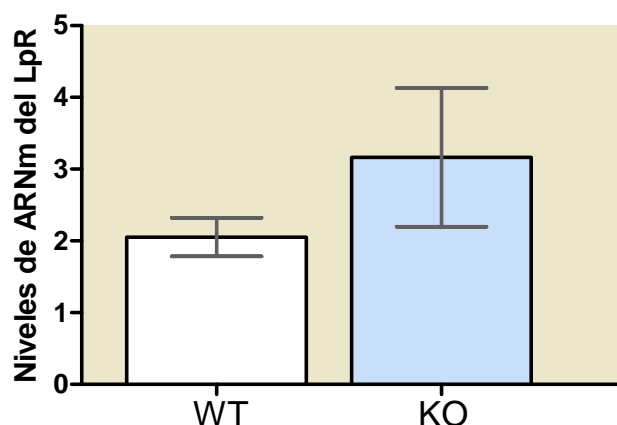


Figura 30. Niveles de ARNm de LpR en hipófisis de ratones *Dlk1*^{-/-} (KO) comparados con los controles (WT). Las columnas representan los valores del porcentaje de la media (\pm SEM) para cada genotipo. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas.

11. Detección de la hormona adipocítica leptina en células hipofisarias de ratones KO-*Dlk1*.

De igual modo que en los ratones control, se observaron escasas células Lp-ir en el lóbulo anterior hipofisario de los ratones *Dlk1*^{-/-} (**Fig. 31**), siendo solo un **3,0 \pm 0,6%** del total de células. Este porcentaje mostró una reducción significativa del **3,8%** respecto al control ($p < 0,05$; $U = 555,0$) (**Fig. 32 A**). Adicionalmente, y de forma similar a los ratones control, solo las células somatotropas y lactotropas fueron Lp-ir. De las células somatotropas, solo un **10,2 \pm 1,7%** fueron Lp-ir, lo que supuso un descenso del **5,6%** respecto al control, aunque esta diferencia no fue significativa. Con respecto a las células lactotropas, un **4,8 \pm 1,1%** fueron Lp-ir, mostrando una disminución significativa respecto al control del **4,8%** ($p < 0,01$; $U = 532,5$) (**Fig. 32 B**). No obstante, y de igual manera que los ratones control, la colocalización Lp-LpR-ir también fue del **100%**. En cuanto a los niveles de ARNm de Lp obtenidos por RT-qPCR fueron prácticamente indetectable en todas las muestras y muy similares a los controles (**Fig. 33**).

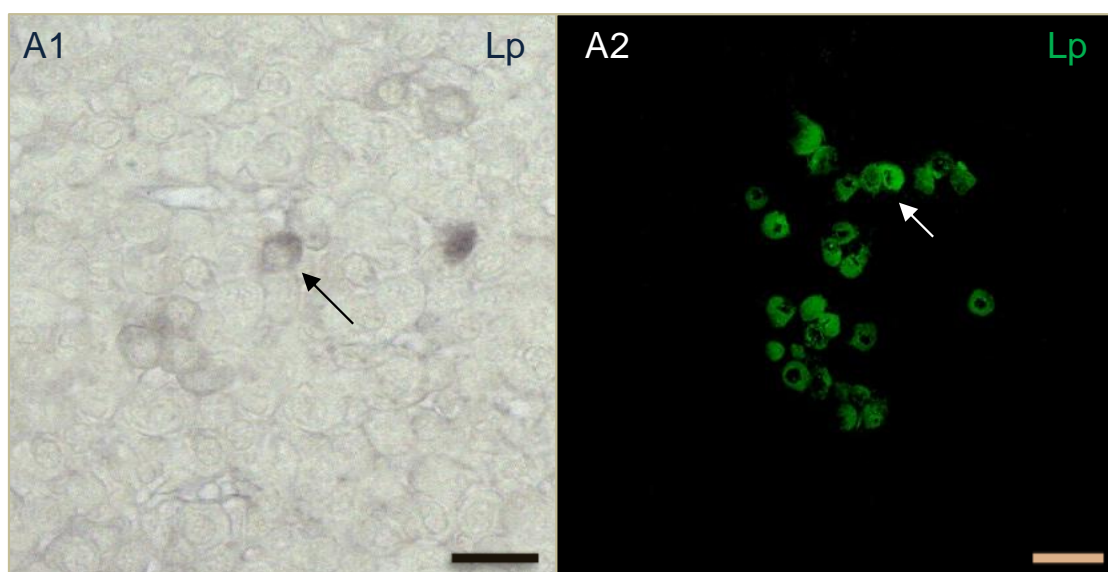


Figura 31. Detección de la hormona leptina en células del lóbulo anterior adenohipofisario de ratones *Dlk1^{-/-}*. (A1) Inmunorreacción por peroxidasa fue detectada mediante la tinción Shu. (A2) Detección de Lp por inmunofluorescencia representando un área y/o campo completo. Barra de escala: 10 μ m.

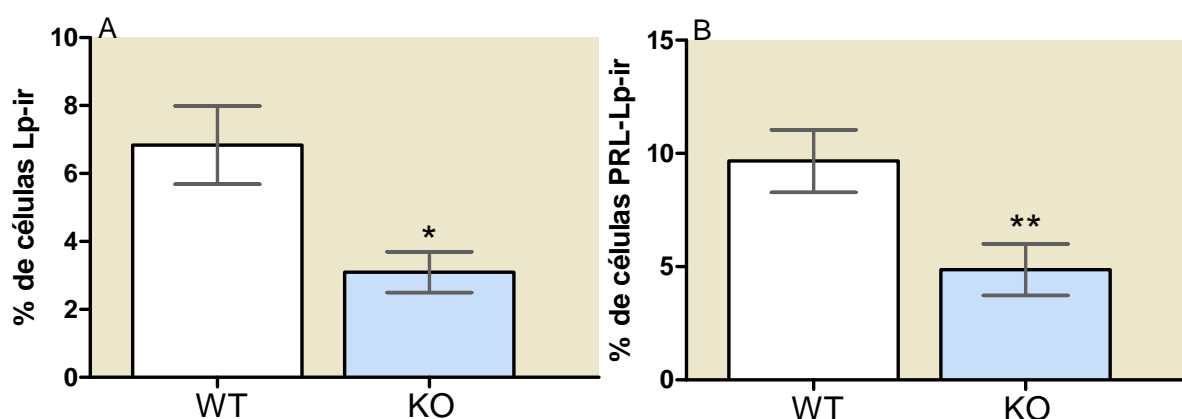
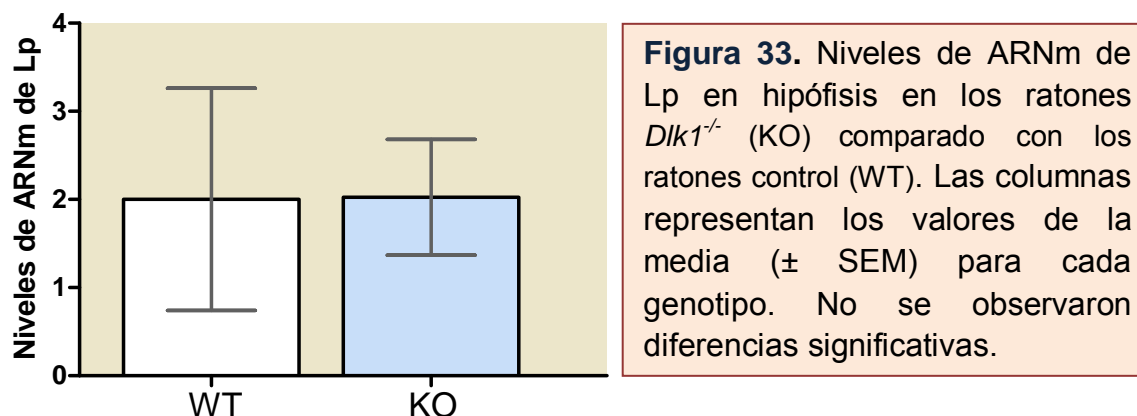


Figura 32. Porcentaje de células inmunorreactivas Lp y PRL-Lp en los ratones *Dlk1^{-/-}* (KO) comparado con los ratones control (WT). (A) Se muestra el porcentaje de células Lp-ir con respecto al número total de células por área, tomando como 100% al número total de células/área. El porcentaje de células Lp es menor en el KO que en el WT. * Diferencia significativa frente al WT con una $p < 0,05$. (B). Muestra el porcentaje de células PRL-Lp-ir respecto al número total de células PRL-ir/área, tomando como el 100% el número total de células PRL-ir/área. El porcentaje de células PRL-Lp-ir es menor en KO en comparación con los WT. ** Diferencia significativa frente al WT con una $p < 0,01$.



12. Análisis de los receptores de hormonas adenohipofisarias, de la hormona adipocítica y su receptor en el tejido adiposo de ratones KO-*Dlk1*.

Las células adiposas de los ratones KO-*Dlk1*, al igual que los ratones control, mostraron inmunorreactividad para los receptores de hormonas adenohipofisarias (**Figs. 34**), así como para leptina y su receptor (**Fig. 35**). Sin embargo, no se detectaron diferencias en la intensidad de la inmunotinción entre ambos grupos, si bien la inmunorreactividad para Lp en las células del ratón mutante fue, en apariencia, algo más débil que en el control (comparar con **Fig. 20**, ratones control).

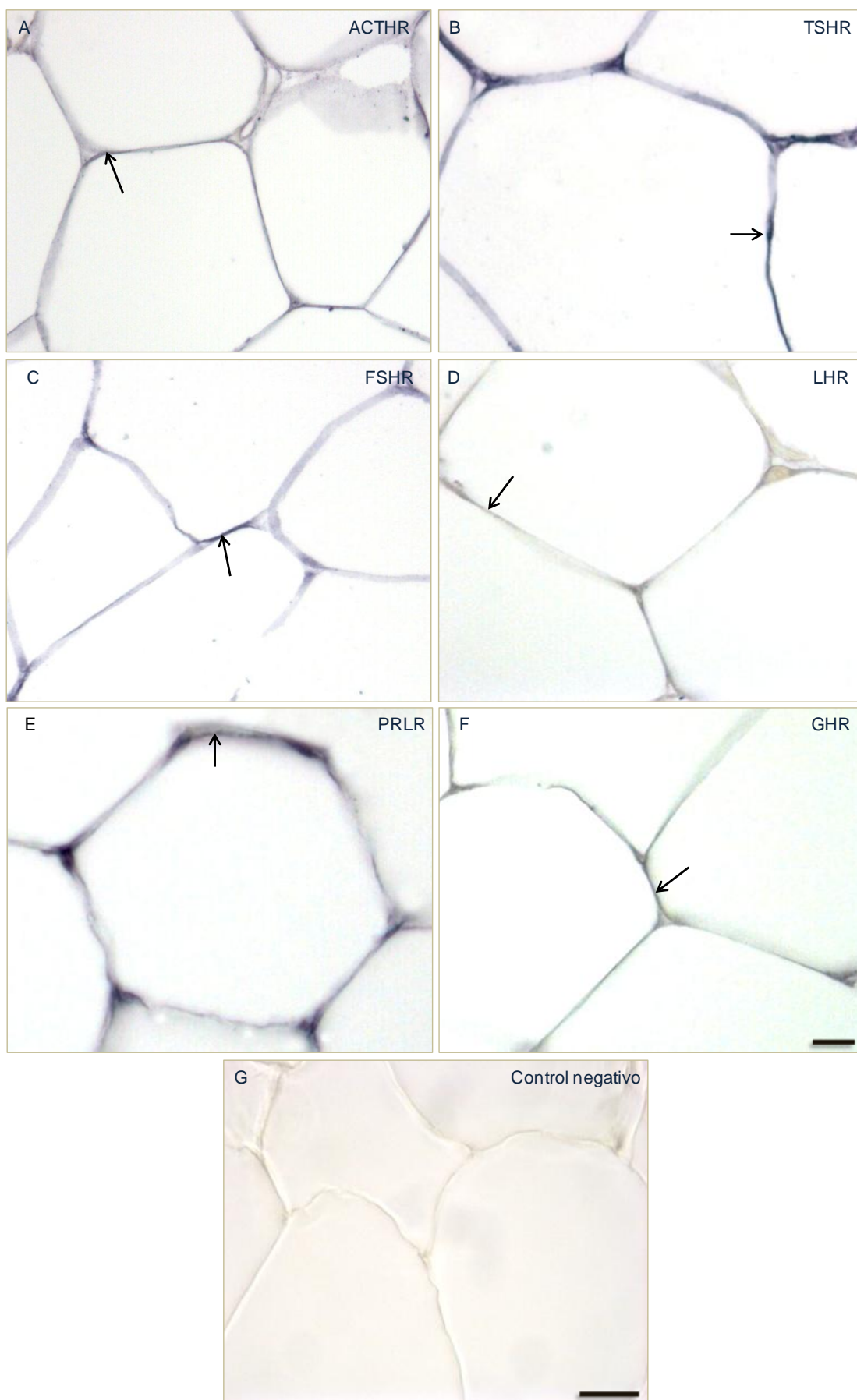


Figura 34. (A-F). Inmunorreacción de los receptores de las hormonas adenohipofisarias ACTH, TSH, FSH, LH, PRL y GH en células adiposas de ratones *Dlk1*^{-/-}. Las flechas señalan porciones del citoplasma en forma de anillo donde la inmunotinción fue más intensa. Para la detección de la peroxidasa se utilizó el revelador 4-cloro 1-naftol. (G) Control negativo. (A-F), Barra de escala: 10 μ m, (G) Barra de escala: 5 μ m.

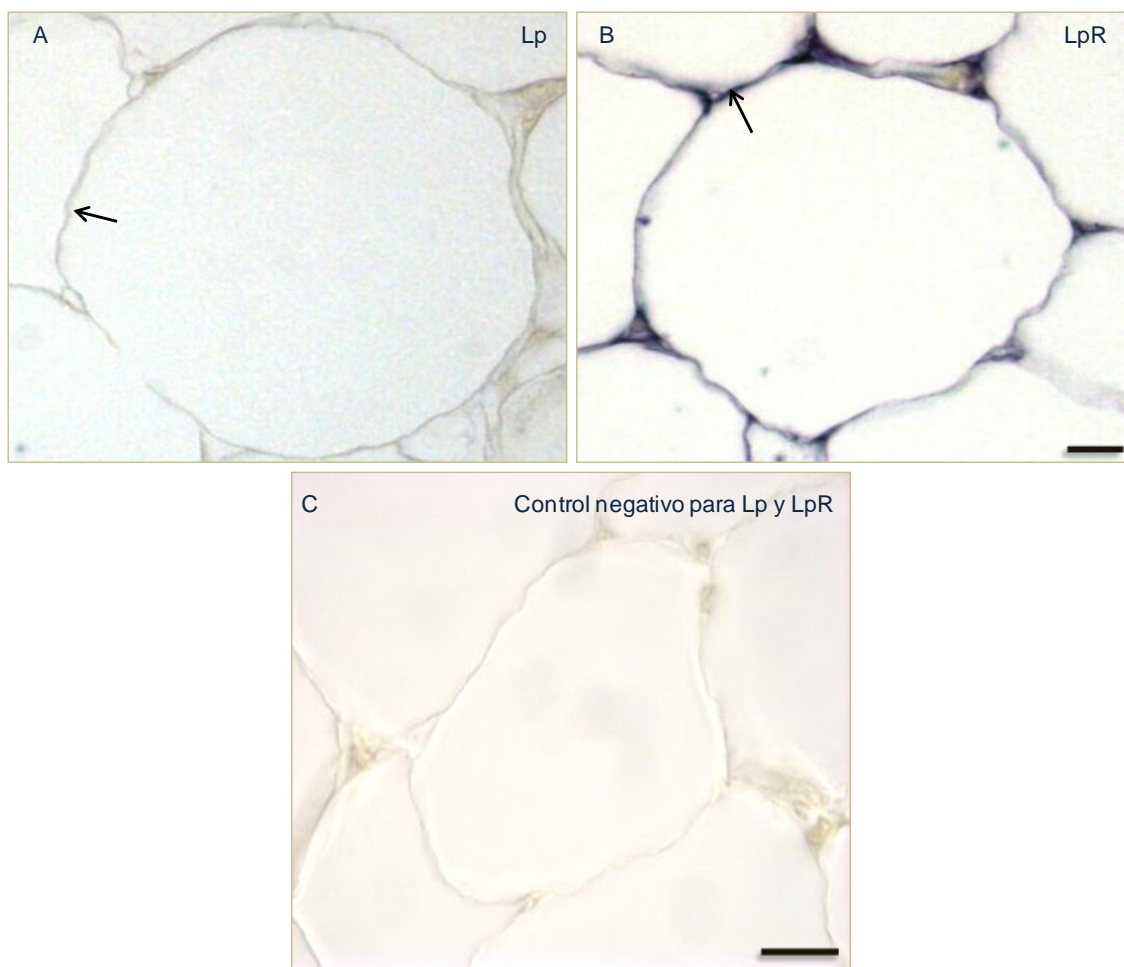


Figura 35. (A-B). Inmunohistoquímica de la hormona adipocítica leptina (Lp) y su receptor (LpR) en células adiposas de ratones *Dlk1*^{-/-}. Las flechas señalan porciones del citoplasma en forma de anillo, donde la inmunotinción fue más intensa. Para la detección de la peroxidasa se utilizó el revelador 4-cloro 1-naftol. (C) Imagen ilustrativa del control negativo, (A-B), Barra de escala: 10 μ m; (C) Barra de escala: 5 μ m.

12.1. Análisis comparativo de los niveles de ARNm de los receptores de hormonas adenohipofisarias, leptina y su receptor en el tejido adiposo de ratones *KO-Dlk1*.

En cuanto a los niveles de los ARNm de los receptores de ACTH, TSH, FSH, LH, PRL, GH, así como de Lp y su receptor LpR por RT-qPCR solo hemos detectado diferencias significativas en los niveles de expresión del receptor de la hormona tirotrópica (TSHR), siendo mayor el nivel de ARNm en el adiposo de los *KO-Dlk1* que de los controles (WT) ($p < 0.01$; $U = 0.0000$) (**Fig. 36 A**). Por el contrario, los niveles de ARNm de los restantes receptores de hormonas adenohipofisarias (**Fig. 36 B-F**), así como de Lp y LpR, fueron similares a los de ratones controles (**Fig. 37 A y B**).

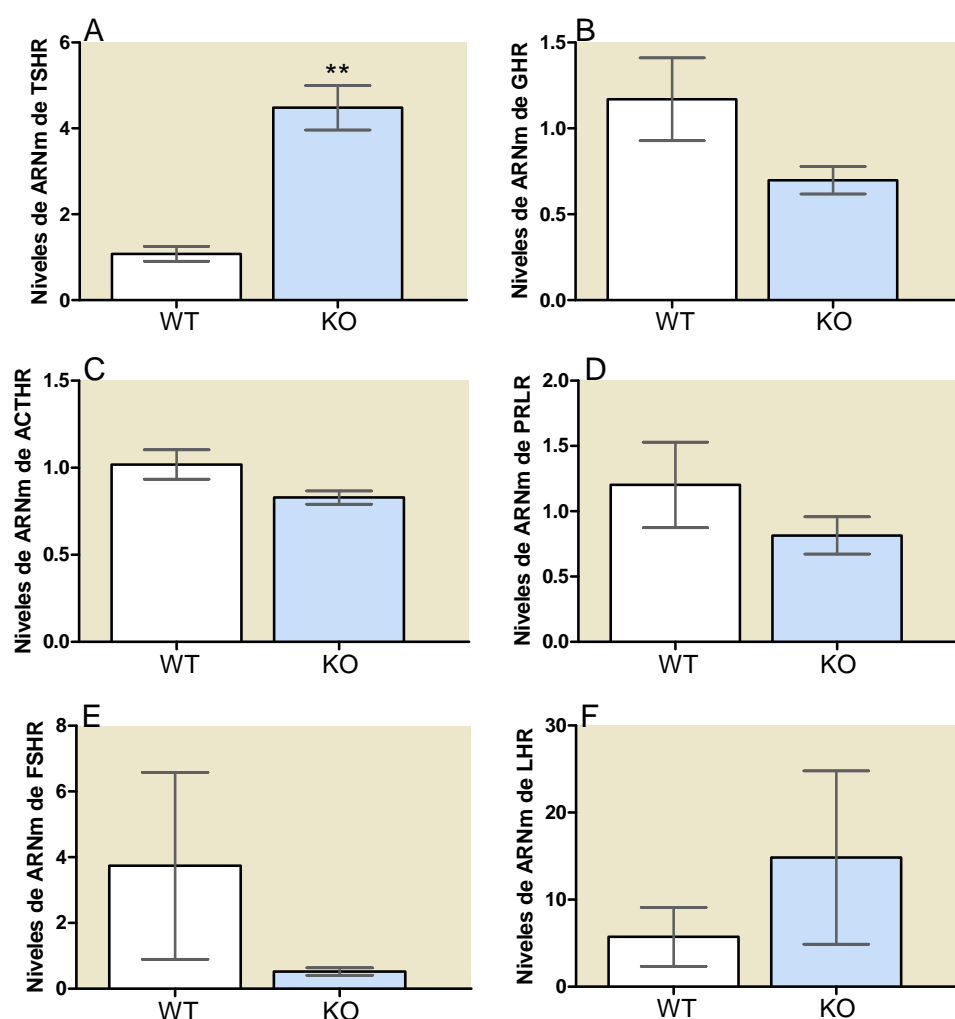


Figura 36. Niveles de ARNm de los diferentes receptores de hormonas adenohipofisarias en tejido adiposo de ratones *Dlk1*^{-/-} (KO) comparados con los controles (WT). Solo se detectó un incremento significativo en los niveles de ARNm de TSHR en ratones KO comparado con los ratones WT (A). Las columnas representan los valores de la media (\pm SEM) para cada genotipo. ** Diferencia significativa frente al WT con una $p < 0,01$.

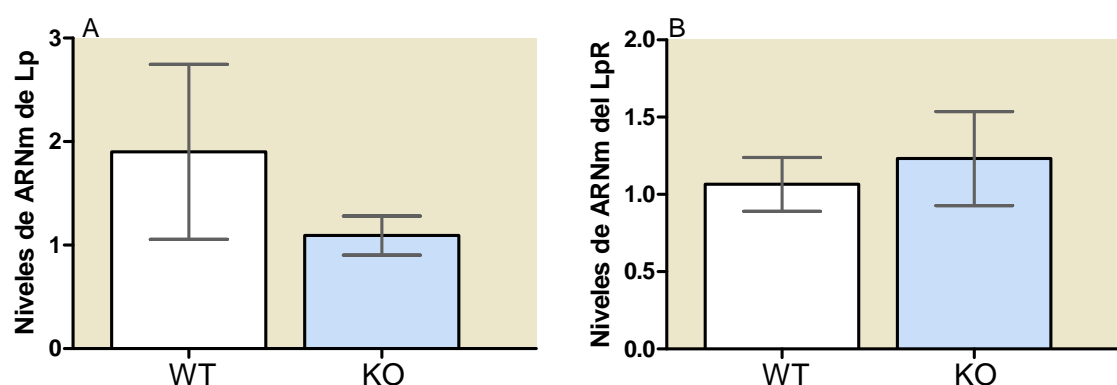
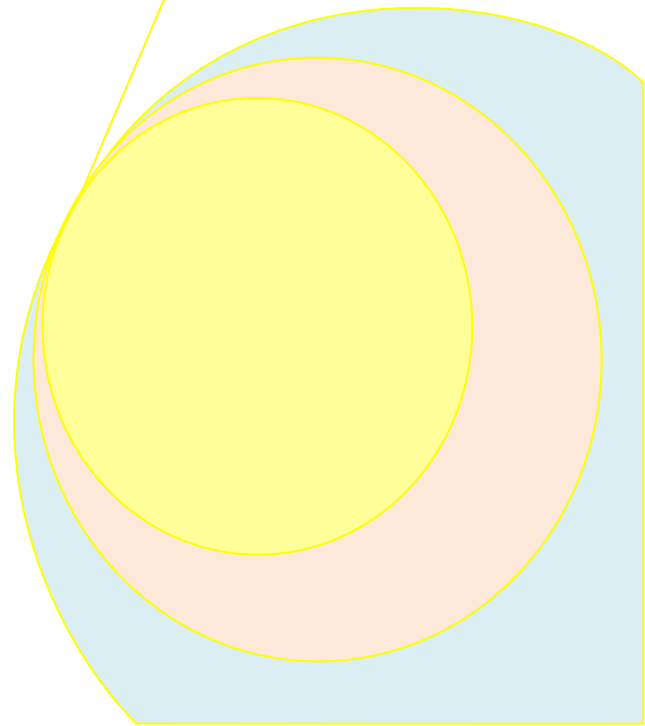
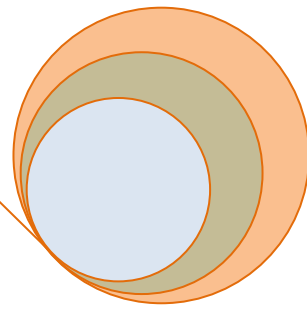
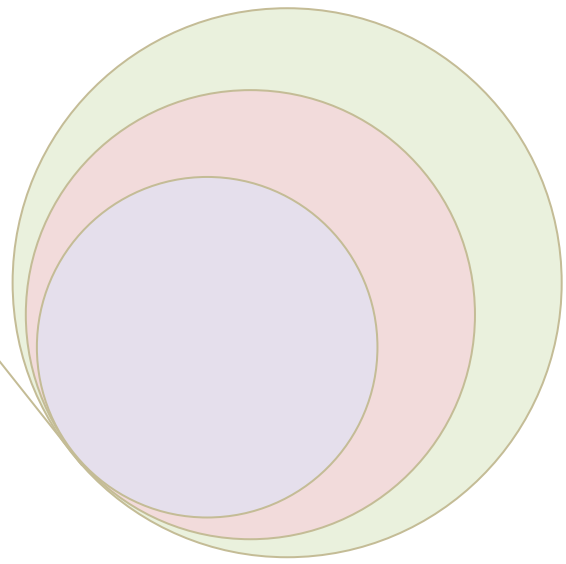


Figura 37. Gráfico A. Niveles de ARNm de Lp (A) y su receptor LpR (B) en tejido adiposo de ratones *Dlk1*^{-/-} (KO) comparados con los controles (WT). Las columnas representan los valores de la media (\pm SEM) para cada genotipo. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas.

DISCUSIÓN



Discusión

Numerosas evidencias han llevado a que en la última década se haya aceptado la existencia de un eje hipotálamo-hipófisis-adiposo. Estas evidencias ponen de manifiesto la naturaleza endocrina de las células adiposas, así como la existencia de mecanismos de retroalimentación entre los distintos niveles del eje (Schäffler y cols., 2005; 2006). Nuestro trabajo es el primer estudio *in vivo* que muestra la expresión de los receptores de hormonas hipofisarias en células adiposas, además de su relación con el receptor de la hormona adipocítica leptina (LpR) en las células hipofisarias. Este estudio lo hemos realizado utilizando un modelo de ratón 129/SvJ carente del gen *Dlk1*. Este gen codifica una proteína reguladora de la diferenciación adipocítica y de los ejes neuroendocrinos.

Los principales hallazgos del estudio han sido:

1) Demostrar que las células adiposas expresan, a nivel de ARNm y proteína, receptores para todas las hormonas adenohipofisarias, siendo los niveles más altos para los receptores de GH y TSH, y que todas las células hipofisarias expresan LpR.

2) Mostrar que la leptina hipofisaria puede actuar de manera autocrina sobre las células GH y PRL y paracrinamente sobre los otros tipos celulares en la hipófisis de ratón.

3) Demostrar que la producción de leptina hipofisaria está regulada por la proteína DLK1 y que esta última modula la acción de la leptina adipocítica sobre las células productoras de leptina hipofisaria.

1. Interacciones entre la hipófisis y el tejido adiposo

En este trabajo mostramos, por primera vez en el ratón *in vivo*, la expresión a nivel de ARNm y proteína de los receptores para todas las hormonas hipofisarias en las células adipocíticas, y del LpR en todas las células hipofisarias. Esto apoya la existencia de un eje neuroendocrino donde el adiposo es la glándula diana. Esto fue hipotetizado por primera vez en 2005 por Schäffler y colaboradores. Estos autores demostraron *in vitro* la expresión de receptores de las distintas hormonas hipofisarias, excepto de las gonadotropas, en células adiposas humanas en cultivo. Anteriormente, sólo se conocía la acción del adiposo sobre el hipotálamo por la presencia de LpR en diferentes núcleos hipotalámicos que controlan la ingesta (Mizuno y cols., 1996; Baskin y cols., 1999). Asimismo, la interacción de la leptina, por medio de sus receptores, con células hipofisarias se había demostrado en rata y ratón, por RT-PCR (Jin y cols., 2000) y por inmunohistoquímica (Sone y cols., 2001; Sone y Osamura, 2001).

La detección de LpR en células hipofisarias presenta diferencias entre las distintas especies estudiadas, indicando una regulación diferencial específica de la especie. Así, en hipófisis ovina, Iqbal y cols., (2000a) encontraron LpR en el 69% de las células somatotropas, en el 29% de gonadotropas y en el 27% de corticotropas. En células hipofisarias de rata, un 97% de células GH y menos del 1% de los otros tipos celulares presentaban LpR (Sone y cols., 2001; Sone y Osamura, 2001). En el ratón, el 6,4% de células del lóbulo anterior hipofisario presentaron LpR; de estas células el 36,1% fueron células somatotropas (Cai, 1999). De la misma forma, nuestros

resultados en el ratón de la cepa 129/SvJ muestran que el receptor LpR se encuentra mayoritariamente en las células somatotropas GH-ir (**42%**) del lóbulo anterior hipofisario. No obstante también está presente en el resto de tipos celulares productores de hormonas: en el **13,5%** de las lactotropas y sólo en el **3%** de las gonadotropas, tirotropas y corticotropas; esto no había sido mostrado anteriormente. Por tanto, según nuestros resultados, el péptido leptina (Lp) parece regular, en mayor o menor medida, los distintos ejes hipofisarios y, además, todas las hormonas hipofisarias pueden regular directamente las funciones de las células adiposas.

Hay que destacar la relación de la Lp con las células GH y PRL, únicos tipos celulares productores de esta hormona en el ratón estudiado. Aunque en la mayoría de las especies las células que expresan Lp difieren de las que expresan su receptor, en el ratón 129/SvJ, las células que expresan Lp (somatotropas y lactotropas) son también las que presentan en mayor proporción los receptores para esta hormona adipocítica, lo que sugiere que, estas células son las únicas que podrían regular la producción de sus hormonas autocrinamente mediante la Lp. Al mismo tiempo, nuestros resultados confirmarían la existencia de un eje hipotálamo-hipófisis-adiposo, al menos con la GH, cuyos receptores se expresan mayoritariamente en las células adiposas. Según nuestros resultados, el **6,8 %** de las células del lóbulo anterior hipofisario presenta Lp, concretamente en las células GH y PRL, células que presentan también el mayor porcentaje de LpR. En un trabajo previo realizado en ratón, se muestra un porcentaje del 7% células hipofisarias que expresan Lp igual al que nosotros encontramos (Jin y cols., [2000](#)). Sin embargo, el mayor porcentaje de Lp lo encontraron en células TSH (31%) y, en

un pequeño porcentaje en gonadotropas, de forma similar a lo encontrado en rata, donde son las células TSH las que expresan mayoritariamente Lp (Morash y cols., 1999). No obstante, estudios más recientes hechos en rata muestran que el 48% de las células del lóbulo anterior hipofisario que expresan Lp son células GH (McDuffie y cols., 2004). Estos autores encontraron que en la rata hembra el porcentaje de células GH que expresa Lp varía en las distintas fases del ciclo estral y que los estrógenos incrementan la presencia de este péptido en las células GH. Sin embargo, encontraron que los estrógenos, por sí solos, no eran suficientes para dicho incremento, indicando la necesidad de otros moduladores neuroendocrinos. Por otro lado, en humanos, a pesar de haber un 21% de células GH que expresan Lp, las células que mayoritariamente expresan el péptido son las ACTH, con el 70% (Popovic y cols., 2001). La naturaleza de estas diferencias entre especies necesita ser aclarada.

Numerosos trabajos han estudiado la relación de la hormona adipocítica Lp con la síntesis y liberación de la hormona GH. Así, Carro y colaboradores sugirieron que la Lp regula la secreción de GH a nivel hipotalámico (Carro y cols., 1999; 2000). Posteriormente, diversos estudios han puesto de manifiesto el papel de la Lp en la liberación de GH y mantenimiento del número de células somatotropas hipofisarias ya que, cuando se eliminaban los receptores de Lp de las células GH se producía una deficiencia de GH y un aumento de la adiposidad (Childs y cols., 2011). Por otro lado, la relación inversa observada por varios autores entre GH y leptina en suero, llevó a la conclusión de que la Lp inhibe la secreción de GH (Chen y cols., 2001; Roh y cols., 2001; Liu y cols., 2009). Teniendo en cuenta la existencia de más de una fuente de Lp en los componentes del eje hipófisis-adiposo, las células hipofisarias y las

adipocíticas, Odle y cols., (2014) desarrollaron una estrategia para diferenciar ambas fuentes, utilizando dos modelos de ratón carentes de Lp. En un modelo, los ratones no expresan de forma global la Lp y en el otro modelo los ratones carecen de Lp adipocítica. En este estudio se demostró que los adipocitos son la única fuente de Lp circulante en el ratón, siendo la responsable de la secreción de GH. Por otro lado, sus resultados apuntan a que la Lp hipofisaria es necesaria para el desarrollo y mantenimiento de las células GH.

2. Papel de DLK1 en el eje hipófisis-adiposo

En nuestro trabajo hemos utilizado un modelo de ratón carente de la proteína DLK1 (o factor pre-adipocítico 1), conocido inhibidor de la adipogénesis (Hansen y cols., 1998, Smas y Sul, 1993). Además de su papel sobre la diferenciación de los adipocitos, DLK1 tiene un importante papel sobre los ejes neuroendocrinos (Cheung y cols., 2013).

La proteína DLK1 fue observada por primera vez asociada a la región del Golgi de las células somatotropas (Larsen y cols., 1996). Posteriormente, diversos autores han mostrado su presencia en células somatotropas y lactotropas, sugiriendo un papel en la regulación de estas hormonas adenohipofisarias (Altenberger y cols., 2006; Yevtodiyenko y Schmidt, 2006; Ansell y cols., 2007). En nuestro estudio hemos descrito, por primera vez en el ratón, la presencia de la proteína DLK1 en todos los tipos celulares y, al igual que Nakakura y cols., (2009) en la rata, también observamos su presencia mayoritaria en las células somatotropas y lactototropas (70% y 50%, respectivamente).

Para estudiar el papel de DLK1 en las poblaciones celulares de la hipófisis anterior, hicimos un análisis comparativo de la distribución de células productoras de hormonas que hay en hipófisis de ratones silvestres y sus variaciones asociadas con la carencia del gen *Dlk1* en ratones KO-*Dlk1*.

Los distintos tipos de células adenohipofisarias en esta cepa de ratones (129/SvJ) estuvieron presentes en todos los niveles del lóbulo anterior hipofisario, ampliamente distribuidos por el mismo, y sin ninguna regionalización específica, como ocurre en otras especies de mamíferos, incluyendo otras cepas de ratones (Japón y cols., 1994; Reyes y cols., 2008 a, b y c). No obstante observamos, en todos los niveles dorso-ventrales de la hipófisis, que la intensidad de la inmunorreacción para las distintas hormonas fue mayor en las células periféricas que en aquellas células ubicadas en la parte central del lóbulo. Ello sugiere que este patrón de intensidad de las hormonas adenohipofisarias ha de ser considerado al momento de estudiar posibles cambios de estas células. Por otro lado, y de igual modo que en otros mamíferos, incluido humanos (Yeung y cols., 2006), las células somatotropas y las lactotropas fueron los tipos celulares más abundante en el lóbulo anterior de la hipófisis (50% y 23%, respectivamente), y en una proporción próxima al 10% las células corticotropas, tirotropas y gonadotropas.

Utilizando el modelo de ratón mutante *Dlk1*^{-/-}, demostramos por primera vez que, la delección del gen *Dlk1* reduce el número de células GH pero no los niveles de su ARNm, disminuye la inmunoreactividad de FSH y sus niveles de ARNm y la inmunoreactividad de las células PRL pero no de su ARNm.

Como hemos dicho anteriormente, las células GH en el ratón son el tipo celular que expresa mayoritariamente DLK1, estando este tipo celular implicado

directamente en el control del crecimiento y el desarrollo de obesidad (Nam y Lobie, 2000), promoviendo proliferación y diferenciación, e incremento del metabolismo en sus tejidos diana (McElvaine y cols., 2007). El número significativamente menor de células GH en los ratones *Dlk1*^{-/-} se explicaría teniendo en cuenta que, en estos ratones, hemos observado una disminución significativa de células Lp-ir y, según Odle y cols., (2014), la Lp hipofisaria regula positivamente la cantidad de células GH. Por otro lado, nuestros datos sugieren un importante papel para DLK1 en la producción de Lp hipofisaria, por su efecto en el número de células que la producen, en el caso de las células GH, o en la síntesis en el caso de las células PRL (el número de células lactotropas no varía en el ratón mutante pero si hay un descenso significativo en el número de células PRL-Lp-ir). Todo ello explicaría que la carencia del gen *Dlk1* en ratones se caracterice por un tamaño menor pre- y postnatalmente y una adiposidad acelerada en el adulto (Moon y cols., 2002; Raghunandan y cols., 2008). Existen evidencias de una acción indirecta de DLK1 sobre la proliferación de preadipocitos y otros tipos celulares (Smas y Sul 1993; Laborda, 2000), y de cómo esta proteína actúa como un modulador de la señalización de Notch (Baladrón y cols., 2005; Bray y cols., 2008). Esta vía de señalización ha sido implicada en el mantenimiento y la proliferación de progenitores de tipos de células específicas en el desarrollo hipofisario (Chen y cols., 2006; Zhu y cols., 2006). Por tanto, es posible que la proteína DLK1 mantenga la proliferación de los progenitores a través de Notch.

No obstante, los niveles similares de ARNm de GH entre ratones KO-*Dlk1* y controles (WT) sugieren que el número menor de las células somatotropas del ratón mutante están expresando mayores niveles del ARNm.

Como los niveles de Lp en suero están aumentados en los ratones KO, esta Lp circulante de origen adipocítica sería la responsable de mantener la secreción de GH a niveles comparables a los controles (Odle y cols., 2014). Sin embargo, Ansell y cols., (2007) encontraron que DLK1 inhibe la actividad del promotor de GH reprimiendo *Pit-1*, un gen que activa la transcripción del promotor de GH. Por lo tanto, otra posible explicación es que la expresión de GH se incrementa porque su inhibidor, DLK1, no está presente en los ratones KO-*Dlk1*, por lo que se puede presentar una mayor actividad en la transcripción de *Pit1*.

Los ratones *Dlk1*^{-/-} presentan niveles más altos de Lp en suero, aumento de adiposidad y aumento de LpR en las células hipofisarias, así como un ligero aumento, aunque no significativo, de GH en suero y una disminución no significativa del ARNm de GHR en las células adiposas. El aumento significativo de Lp circulante y de la cantidad de células LpR-ir hipofisarias podría explicar el aumento no significativo en los niveles séricos de las hormonas GH, FSH y LH, observado en los ratones KO comparado con los WT. A este respecto Odle y cols. (2014), demostraron que la Lp circulante es determinante para los adecuados niveles séricos de las hormonas GH, FSH, LH y PRL.

Todos estos resultados indican que DLK1 podría ser un regulador importante en las células productoras de hormonas adenohipofisarias y de Lp, actuando como un factor endocrino co-liberado con las hormonas, induciendo autocrina o paracrinamente la proliferación de células GH, y como factor paracrino o yuxtacrino sobre las células PRL y FSH/LH, modulando, la transcripción de GH y de FSH (ver más adelante). Además DLK1 también

podría ser un modulador en la producción de Lp hipofisaria, dado que los ratones KO-*Dlk1* mostraron una reducción significativa en la población celular Lp-ir. Estos planteamientos se ven apoyados por nuestras observaciones sobre la localización subcelular de DLK1 en células del lóbulo anterior hipofisario mediante microscopía electrónica. Hasta el momento solo se había descrito a la proteína DLK1 en la zona del Golgi de las células somatotropas mediante inmunohistoquímica (Larsen y cols., 1996), y posteriormente, mediante inmunofluorescencia, en las células adenohipofisarias de rata (Nakakura y cols., 2009). Nuestros resultados muestran, por primera vez, la ubicación subcelular de DLK1 principalmente en el retículo endoplasmático rugoso (RER) y dentro de las vesículas de secreción de las células adenohipofisarias. Debido a que DLK1 es una glicoproteína (Floridon y cols., 2000), era esperable su ubicación en el aparato de Golgi. Nuestra observación de que DLK1 se encuentra dentro de grandes vesículas de secreción, sugiere la presencia de una forma soluble de la proteína. Previamente, Smas y col., (1997) plantearon que la forma soluble de DLK1 deriva de la escisión proteolítica de esta proteína asociada a la membrana. Sin embargo, nuestros datos indican que la escisión también puede tener lugar en el aparato de Golgi y que la proteína soluble se libera desde las vesículas de secreción junto con la hormona GH o las otras hormonas adenohipofisarias. Una vez liberada puede actuar de forma paracrina sobre las células vecinas o de forma endocrina, liberándose a la sangre. Ferrón y cols. (2012) demostraron que durante la neurogénesis postnatal, la isoforma de DLK1 secretada por nichos de astrocitos es requerida por la DLK1 transmembrana de células madre neurales, lo que estimula su auto-renovación. Por ello sugerimos que, la forma soluble de DLK1 liberada desde las vesículas

de secreción podría actuar autocrina o paracrinamente, uniéndose a la forma anclada a la membrana, o bien, contribuir a los niveles séricos de DLK1 en sangre. A este respecto, en nuestro estudio hemos observado abundantes células PRL-DLK1-inmunorreactivas en íntimo contacto con células FSH-DLK1 negativas. La estrecha relación entre las células lactotropas y gonadotropas es necesaria para la acción indirecta de GnRH en la liberación de PRL (Denef, 2008), por lo que sugerimos que DLK1 podría estar implicado en una acción yuxtacrina que regula la comunicación entre las células lactotropas y las células gonadotropas.

Los ratones carentes de DLK1 presentan una reducción significativa de ARNm de FSH pero no de LH en la hipófisis de ratón, indicando un papel diferencial de DLK1 en la síntesis de estas hormonas. Por otro lado, hay un aumento no significativo de la expresión de LHR en las células adiposas y una disminución de FSHR. En este sentido, los datos publicados muestran que la Lp, en condiciones normales, regula indirectamente la producción de GnRH a nivel hipotalámico en rata y estimula directamente la producción de hormonas gonadales, por medio del LpR presente en las células gonadotropas (Nagatani, 1998; Yu, 1997). Posteriormente, Iqbal y cols. (2000) y Sone y cols. (2001) descubrieron que el tipo mayoritario de células hipofisarias que presentaban LpR eran las somatotropas, tanto en hipófisis ovina como de rata, sugiriendo que la Lp producida por las células gonadotropas en estas especies, actuaba paracrinamente sobre las células GH. En nuestro modelo encontramos que, si bien el 3,5% de las células gonadotropas presentaban LpR, no expresaban Lp. Sin embargo, la leptina está presente en células PRL, las cuales tienen una conocida relación con las células gonadotropas (Denef, 2008) y con las que

DLK1 puede llevar a cabo una señalización yuxtacrina (ver más arriba). Por otro lado, en ratones carentes de *Dlk1* hay un aumento no significativo de LpR en las células gonadotropas, al tiempo que una disminución significativa de Lp en las células PRL, lo que podría indicar que es la Lp adipocítica la que ejerce un papel sobre las células gonadotropas y que éste es dependiente de DLK1.

Por otro lado, los ratones *Dlk1*^{-/-} presentan menos GHR y una ligera disminución de PRLR en las células adiposas, y por el contrario, tienen un aumento altamente significativo de TSHR. Si tenemos en cuenta que la presencia de TSHR en adipocitos está relacionada con su diferenciación y desarrollo (Elgadi y cols., 2010; Haraguchi y cols., 2013) y que DLK1 inhibe dicha diferenciación, la ausencia de DLK1 permite el aumento de TSHR y el consiguiente aumento de adipocitos observado en nuestro modelo. Esto permite sugerir que la inhibición de DLK1 sobre la diferenciación de preadipocitos está mediada por su capacidad de regular la expresión de TSHR en la célula adiposa. Según List y cols., (2013), la pérdida de GHR en las células adiposas aumenta los niveles de Lp, de la misma forma que la disminución de PRLR sobre estas células, según los resultados de Brandebourg y cols., (2007a y b), quienes demostraron que la PRL inhibe normalmente la lipólisis y la liberación de Lp en adipocitos de rata. En nuestro estudio, los ratones *Dlk1*^{-/-} presentan una reducción, aunque no significativa, tanto de GHR como de PRLR que podría, en parte, contribuir al aumento de Lp en suero. Por otro lado, el aumento de Lp está originado por el aumento de receptores de TSH que lleva a un aumento de células adiposas, dado su papel en la adipogénesis (Lu M, 2008; Lu S, 2012).

En resumen, en el ratón 129/SvJ hemos observado que en el eje hipófisis-adiposo, la glándula diana o tejido adiposo, está regulada por varias hormonas hipofisarias y que la Lp, principal hormona liberada por las células adiposas, no sólo actúa sobre las células hipofisarias sino que, es producida por parte de ellas donde ejerce un papel autocrino y/o paracrino. Además, en la regulación del eje está implicada la proteína DLK1. Las hormonas GH, PRL, LH y TSH actúan sobre la célula adiposa fundamentalmente en relación a la liberación de la hormona Lp, estimulando o inhibiendo su síntesis y liberación o aumentando el número de células adiposas.

DLK1 está presente en las células preadipocíticas durante todo el desarrollo (Smas y Sul, 1993) pero desaparece, según estos autores, una vez diferenciadas a adipocitos. Resultados no mostrados de nuestro grupo, permiten detectar sin embargo, una débil expresión de *Dlk1* en tejido adiposo diferenciado. DLK1 puede actuar sobre la adipogénesis, modulando la expresión de los receptores de hormonas hipofisarias implicadas en este proceso como la TSH, y a nivel hipofisario, regulando la proliferación de células GH y controlando la secreción de hormonas, así como la síntesis y liberación de Lp hipofisaria. En la figura 38, hemos resumido las interacciones planteadas entre las células adenohipofisarias y las células adiposas a través de dos factores reguladores, la leptina y DLK1.

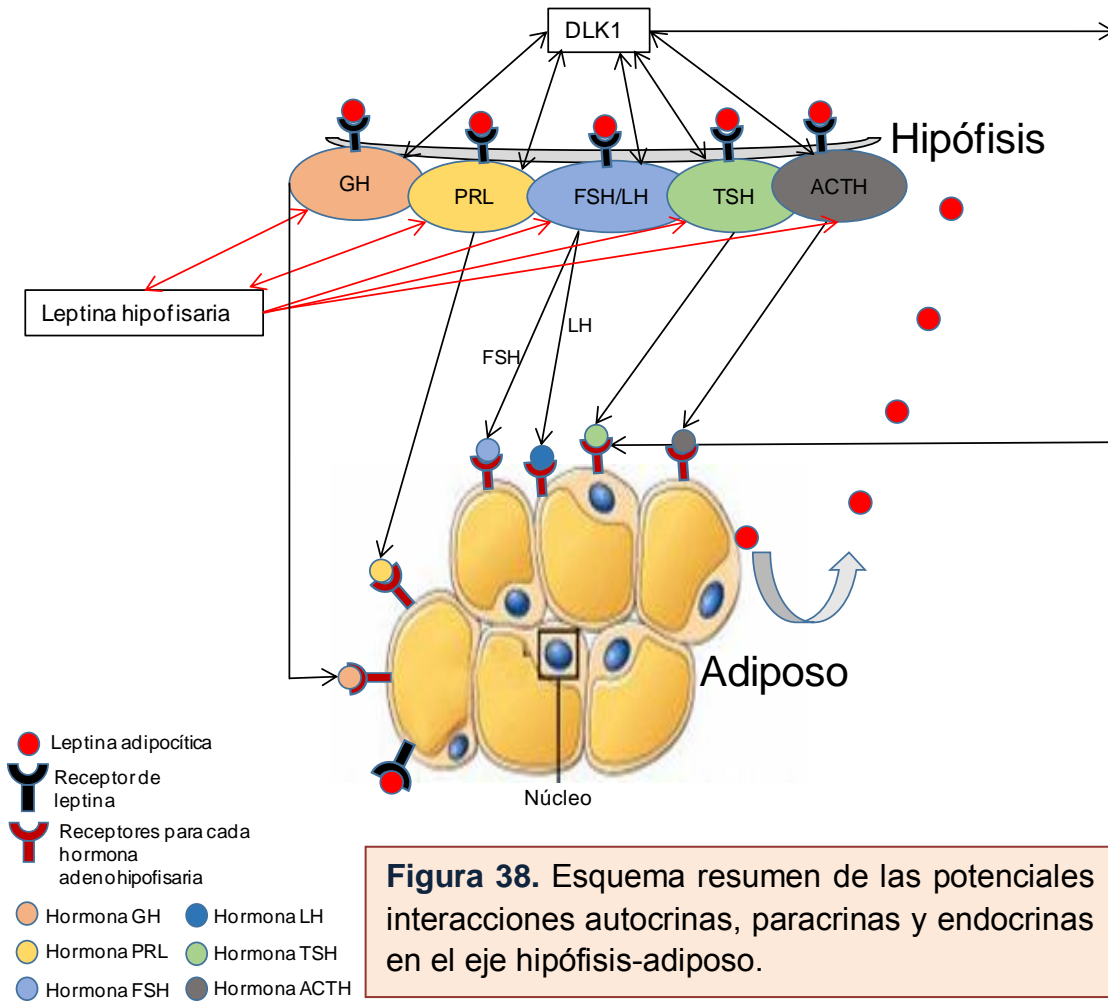
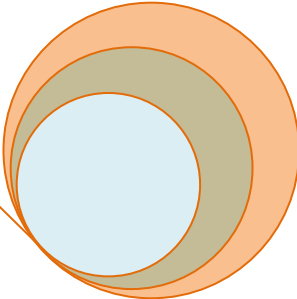
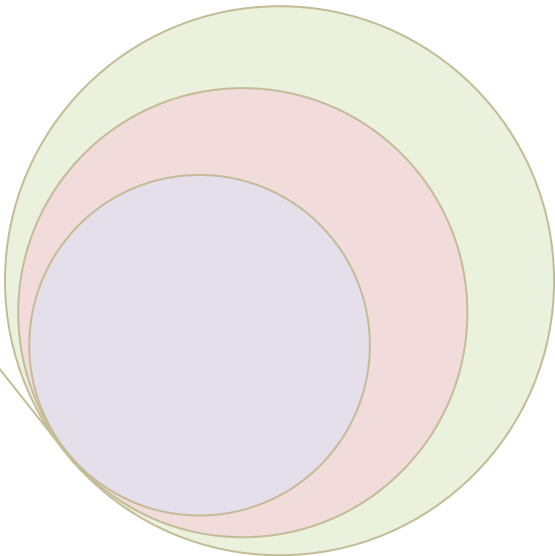
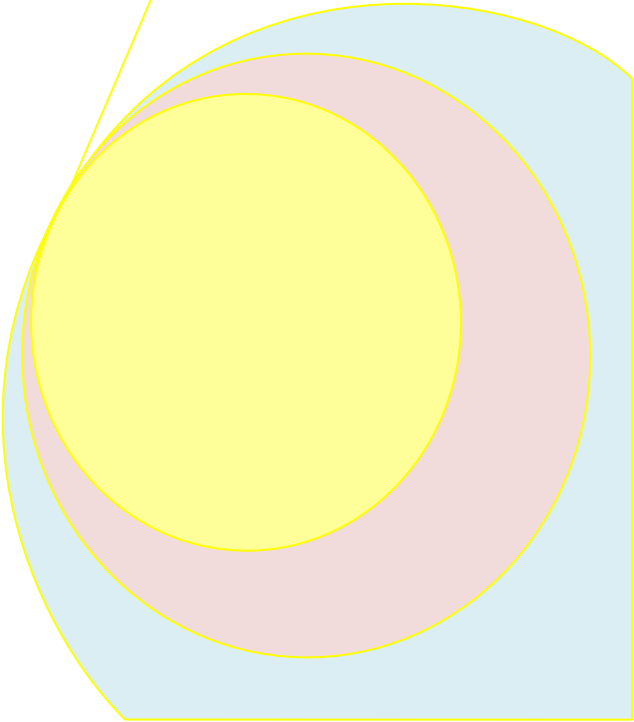


Figura 38. Esquema resumen de las potenciales interacciones autocrinas, paracrinas y endocrinas en el eje hipofisario-adiposo.



CONCLUSIONES



Conclusiones:

Del análisis de los resultados hemos obtenido las siguientes conclusiones:

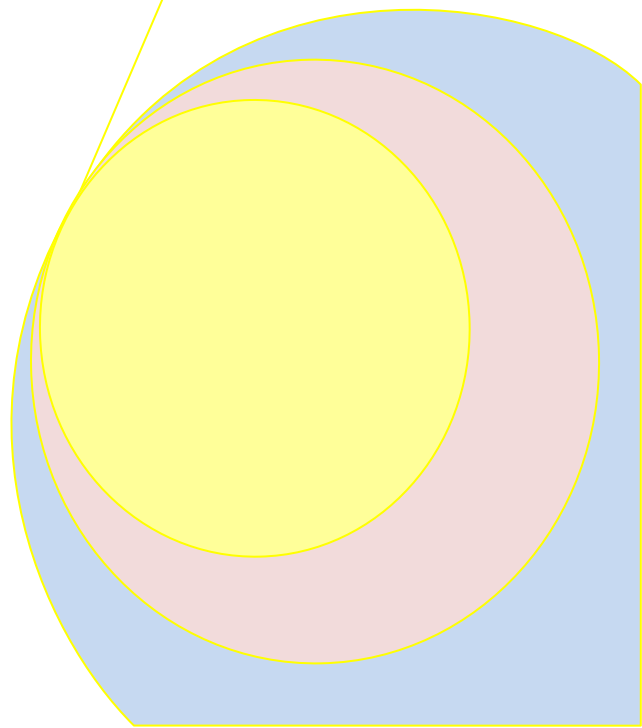
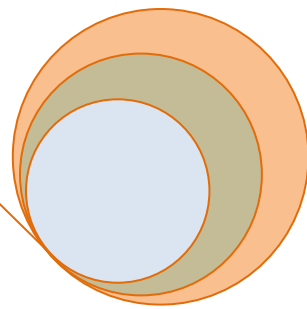
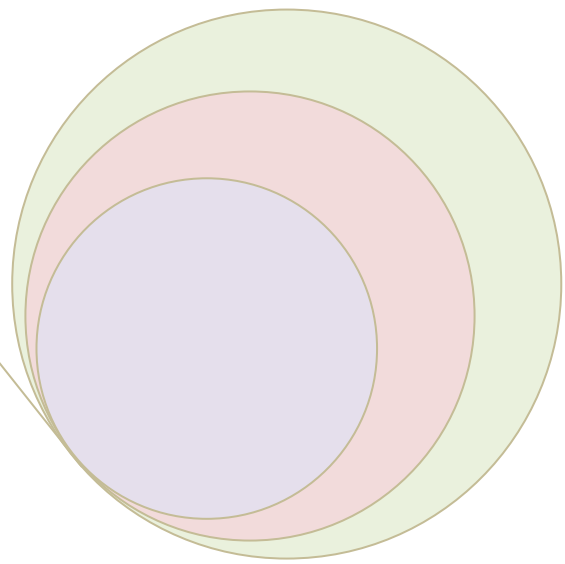
- 1 Las células adiposas expresan, a nivel de ARNm y proteína, receptores para todas las hormonas adenohipofisarias, siendo los niveles más altos para los receptores de GH y TSH. Por otro lado, todas las células hipofisarias expresan el receptor de leptina, siendo las somatotropas las que lo expresan en mayor cantidad. Estos resultados apoyan la existencia de un eje hipófisis-adiposo.
- 2 Las células adenohipofisarias que expresan leptina, somatotropas y lactotropas, son también las que presentan en mayor proporción los receptores para esta hormona adipocítica, sugiriendo la acción autocrina de la leptina sobre estos dos tipos celulares.
- 3 Las células productoras de hormonas adenohipofisarias están presentes en los ratones silvestres (WT) y en ratones carentes del gen *Dlk1* (KO), distribuidas por todo el lóbulo anterior. Sin embargo, en los ratones KO, el número de células GH es significativamente menor, aunque no los niveles de su ARNm. La inmunotinción de FSH es sensiblemente más débil y sus niveles de ARNm son significativamente menores que en el WT, mientras que la hormona LH no presenta cambios entre ambos genotipos. La inmunotinción de la hormona PRL es más débil, pero los niveles de su ARNm son similares entre WT y KO. Estas variaciones en las hormonas de los ratones KO sugieren firmemente el papel de DLK1 como regulador en los ejes neuroendocrinos.

- 4 La proteína DLK1 se localiza en todos los tipos celulares adenohipofisarios, mayoritariamente en somatotropas y lactotropas. A nivel subcelular DLK1 se encuentra en el retículo endoplasmático rugoso y dentro de las vesículas de secreción. Esta última localización subcelular sugiere una segunda vía de producción para la forma soluble de DLK1, secretada junto con las hormonas adenohipofisarias.
- 5 La estrecha relación entre las células PRL-DLK1 positivas y las células FSH-DLK1 negativas sugiere que DLK1 podría estar implicada en una acción yuxtacrina entre las células lactotropas y gonadotropas, necesaria para la acción indirecta de GnRH en la liberación de PRL.
- 6 En ausencia de DLK1 disminuye de forma significativa la cantidad de células Lp-ir y el número de células GH-ir. Estos resultados apoyan el papel de Dlk1 en la producción de leptina hipofisaria, fundamentalmente reduciendo el número de células que la producen, y el papel de la leptina en el mantenimiento de las células GH.

- 7 En ausencia de DLK1 hay un aumento de leptina en suero, aumento de adiposidad y aumento de LpR en las células hipofisarias, así como un ligero aumento de GH en suero. Estos resultados indican que DLK1 podría ser un regulador importante en las células productoras de hormonas adenohipofisarias y de Lp, actuando como un factor endocrino co-liberado con las hormonas, induciendo autocrina o paracrinamente la proliferación de células GH, y como factor paracrino o yuxtacrino sobre las células PRL y FSH/LH, modulando, la transcripción de GH, FSH y de PRL.
- 8 Los ratones *Dlk1*^{-/-} presentan unos niveles menores de ARNm de GHR y una ligera disminución de los niveles del ARNm de PRLR en las células adiposas, pero tienen un aumento altamente significativo de TSHR. Este incremento de la expresión de TSHR estaría en relación directa con el aumento de los adipocitos observado en nuestro modelo, y sugiere que la inhibición que ejerce DLK1 sobre la diferenciación preadipocítica está mediada por su capacidad de regular la expresión de TSHR en la célula adiposa.
- 9 El aumento no significativo de LpR en las células gonadotropas acompañado de la disminución significativa de Lp hipofisaria, sugiere que es la leptina adipocítica la que ejerce su acción sobre las células gonadotropas, reduciendo significativamente los niveles de ARNm de FSH pero no de LH, y ésta es dependiente de DLK1.

- 10 El conjunto de estos resultados ponen de manifiesto el eje hipófisis-adiposo, donde la glándula diana o tejido adiposo está regulada por las hormonas hipofisarias, las cuales estimulan o inhiben la síntesis y liberación de la leptina, principal hormona liberada por las células adiposas. La leptina no sólo actúa sobre las células hipofisarias, sino que es producida por ellas ejerciendo, por tanto, un papel autocrino y/o paracrino. Además, en la regulación del eje está implicada la proteína DLK 1.

BIBLIOGRAFÍA



Bibliografía

Abdallah BM, Ding M, Jensen CH, Ditzel N, Flyvbjerg A, Jensen TG, Dagnaes-Hansen F, Gasser JA, Kassem M. *Dlk1/FA1 is a novel endocrine regulator of bone and fat mass and its serum level is modulated by growth hormone.* *Endocrinology* 2007;148:3111-3121.

Abizaid A, Gao Q, Horvath TL. *Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance.* *Neuron.* 2006;51:691-702.

Ahima RS. *Adipose tissue as an Endocrine Organ.* *Obesity* 2006 August;14: Supplement.

Ahima RS, Kelly J, Elmquist JK, Flier JS. *Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia.* *Endocrinology* 1999;140:4923-4931.

Altenberger T, Bilban M, Auer M, Knosp E, Wolfsberger S, Gartner W, Mineva I, Zielinski C, Wagner L, Luger A. *Identification of DLK1 variants in pituitary- and neuroendocrine tumors.* *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:995-1005.

Ansell PJ, Zhou Y, Schjeide BM, Kerner A, Zhao J, Zhang X, Klibanski A. *Regulation of growth hormone expression by Delta-like protein 1 (Dlk1).* *Mol Cell Endocrinol* 2007;271:55-63.

Baladrón V, Ruiz-Hidalgo MJ, Nueda ML, Díaz-Guerra MJ, García-Ramírez JJ, Bonvini E, Gubina E, Laborda J. *dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats.* *Exp Cell Res* 2005;303:343-359.

Baskin DG, Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Porte Jr D, Breininger JF, Jonak Z, Schaefer J, Krouse M, Burghardt C, Campfield LA, Burn P, Kochan JP. *Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus.* *J. Histochem. Cytochem.* 1999;47:353-362.

Bauer SR, Ruiz-Hidalgo MJ, Rudikoff EK, Goldstein J, Laborda J. *Modulated expression of the epidermal growth factor-like homeotic protein dlk influences stromal-cell-pre B-cell interactions, stromal cell adipogenesis, and pre-B-cell interleukin-7 requirements.* *Mol Cell Biol* 1998;18:5247-5255.

Bauer M, Szulc J, Meyer M, Jensen CH, Terki TA, Meixner A, Kinkl N, Gasser T, Aebischer P, Ueffing M. *Delta-like 1 participates in the specification of ventral midbrain progenitor derived dopaminergic neurons.* *J Neurochem* 2008;104:1101-1115.

- Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, , Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS.** *Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels.* *Endocrinology* 1998;139:3485-3491.
- Boland D, Goren HJ.** *Binding and structural properties of oxytocin receptors in isolated rat epididymal adipocytes.* *Regul Pept* 1987;18:7-18.
- Boney CM, Fiedorek FT, Paul SR Jr, Gruppuso PA.** *Regulation of preadipocyte factor-1 gene expression during 3T3-L1 cell differentiation.* *Endocrinology* 1996;137:2923-2927.
- Brandebourg TD, Hugo E, Ben-Jonathan N.** *Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions, Diabetes. Obes. Metab.* 2007;9:464-476.
- Brandebourg TD, Bown JL, Ben-Jonathan N.** *Prolactin upregulates its receptors and inhibits lipolysis and leptin release in male rat adipose tissue.* *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2007;357:408-413.
- Bray SJ, Takada S, Harrison E, Shen SC, Ferguson-Smith AC.** *The atypical mammalian ligand delta-like homologue 1 (Dlk1) can regulate Notch signalling in Drosophila.* *BMC Dev Biol* 2008;8:11.
- Cai A, Hyde JF.** *The human growth hormone-releasing hormone transgenic mouse as a model of modest obesity: differential changes in leptin receptor (OBR) gene expression in the anterior pituitary and hypothalamus after fasting and OBR localization in somatotrophs.* *Endocrinology.* 1999 Aug;140(8):3609-14.
- Carro E, Senaris RM, Seoane LM, Frohman LA, Arimura A, Casanueva FF, Dieguez C.** *Role of growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin on leptin-induced GH secretion.* *Neuroendocrinology* 1999;69:3-10.
- Carro E, Seoane LM, Senaris R, Casanueva FF, Dieguez C.** *Leptin increases in vivo GH responses to GHRH and GH-releasing peptide-6 in fooddeprived rats.* *European Journal of Endocrinology* 2000;142:66-70.
- Chen C, Roh SG, Nie GY, Loneragan K, Xu RW, Ruan M, Clarke LJ, Goding JW, Gertler A.** *The in vitro effect of leptin on growth hormone secretion from primary cultured ovine somatotrophs.* *Endocrine.* 2001 Feb;14(1):73-8.
- Chen J, Crabbe A, Van Duppen V, Vankelecom H.** *The notch signaling system is present in the postnatal pituitary: marked expression and regulatory activity in the newly discovered side population.* *Mol Endocrinol* 2006;20:3293-3307.
- Cheung LYM, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Tissier PR.** *Pituitary Phenotypes of Mice Lacking the Notch Signalling Ligand Delta-Like 1 Homologue.* *Journal of Neuroendocrinology* 2013; 25:391-401.

Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME. *Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin.* Science 1997; 275(5296):88-90.

Childs GV, Akhter N, Haney A, Syed M, Odle A, Cozart M, Brodrick Z, Gaddy D, Suva LJ, Akel N, Crane C, Benes H, Charlesworth A, Luque R, Chua S, Kineman RD. *The somatotrope as a metabolic sensor: deletion of leptin receptors causes obesity.* Endocrinology 2011;152:69-81.

Costaglioli P, Come C, Knoll-Gellida A, Salles J, Cassagne C, Garbay B. *The homeotic protein dlx is expressed during peripheral nerve development.* FEBS Letters 2001;509: 413-416.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M. *Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus.* Nature 2001; 411:480-484.

Crane C, Akhter N, Johnson BW, Iruthayanathan M, Syed F, Kudo A, Zhou YH, Childs GV. *Fasting and Glucose Effects on Pituitary Leptin Expression: Is Leptin a Local Signal for Nutrient Status?* J Histochem Cytochem 2007;55:1059-1074.

Christophersen NS, Grønborg M, Petersen TN, Fjord-Larsen L, Jørgensen JR, Juliusson B, Blom N, Rosenblad C, Brundin P. *Midbrain expression of Delta-like 1 homologue is regulated by GDNF and is associated with dopaminergic differentiation.* Exp Neurol 2007;204:791-801.

Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. *Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms.* Biology of Reproduction 1999; 60(2):216-222.

Dalamaga M, Chou SH, Shields K. *Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives.* Cell Metab 2013;18:29-42.

Denef C. *Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk.* J Neuroendocrinol 2008;20:1-70.

Dubois MP. *Localisation par immunocytochimie des hormones glycoprotéiques hypophysaires chez le vertébré. Colloque INSERM: 'Les hormones glycoprotéiques hypophysaires'. Hôpital Saint Antoine. Paris: Inserm 1972a; 27-47.*

Dubois MP. *Localisation cytochimique par immunofluorescence des sécrétions corticotropes, a et b mélanotropes au niveau de l'antéhypophyse des bovins, ovins et porcins.* Z Zellforsch Mikrosk. Anat 1972b;125:200-209.

Elgadi A, Zemack H, Marcus C, Norgren S. *Tissue-specific knockout of TSHr in white adipose tissue increases adipocyte size and decreases TSH-induced lipolysis.* Biochemical and Biophysical Research Communications 2010;393:526-530.

Ferrón SR, Charalambous M, Radford E, McEwen K, Wildner H, Hind E, Morante-Redolat JM, Laborda J, Guillemot F, Bauer SR, Fariñas I, Ferguson-Smith AC. *Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche-astrocytes regulates neurogenesis.* Nature **2012**;475(7356):381-385.

Floridon C, Harken Jensen C, Thorsen P, Nielsen O, Lone Sunde Jes Grabow Westergaard, Thomsen SG, Teisner B. *Does Fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation.* Differentiation **2000**;66:49-59.

Garcés C, Ruiz-Hidalgo MJ, Bonvini E, Goldstein J, Laborda J. *Adipocyte differentiation is modulated by secreted delta-like (dlk) variants and requires the expression of membrane-associated dlk.* Differentiation **1999**;64:103-114.

Gimpl G, Fahrenholz F. *The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation.* Physiol Rev **2001**;81:629-683.

Grunfeld C Hagman J, Sabin EA, Buckley DI, Jones DS, Ramachandran J. *Characterization of adrenocorticotropin receptors that appear when 3T3-L1 cells differentiate into adipocytes.* Endocrinology **1985**;116:113-117.

Hansen LH, Madsen B, Teisner B, Nielsen JH, Billestrup B. *Characterization of the inhibitory effect of growth hormone on primary preadipocyte differentiation,* Mol. Endocrinol **1998**;12:1140-1149.

Haraguchi K, Shimura H, Lin L, Endo T, Onaya T. *Differentiation of rat preadipocytes is accompanied by expression of thyrotropin receptors.* Published Online **2013**;July 01.

Hellgren G, Albertsson-Wikland K, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B. *Growth hormone receptor interaction with JAK proteins differs between tissues.* J Interferon Cytokine Res **2001**;21:75-83.

Hemming FJ, Dubois MP, Dubois PM. *Somatotrophs and lactotrophs in the anterior pituitary of fetal and neonatal rats. Electron-microscopic immunocytochemical identification.* Cell Tissue Res **1986**;245:457-460.

Iqbal J, Pompolo S, Considine RV, Clarke IJ. *Localization of leptin receptor-like immunoreactivity in the corticotropes, somatotropes, and gonadotropes in the ovine anterior pituitary.* Endocrinology **2000a**;14:1515-1520.

Iqbal J, Pompolo S, Murakami T, Clarke IJ. *Localization of long-form leptin receptor in the somatostatin-containing neurons in the sheep hypothalamus.* Brain Res **2000b**;887: 1-6.

Iqbal J, Pompolo S, Murakami T, Grouzmann E, Sakurai T, Meister B, Clarke IJ. *Immunohistochemical characterization of localization of long-form leptin receptor (OB-Rb) in neurochemically defined cells in the ovine hypothalamus.* Brain Res **2001**;920:55-64.

Jamali, KA, Tramu G. *Control of rathypothalamic pro-opiomelanocortin neurons by a circadian clock that is entrained by the daily light-off signal.* *Neuroscience*, 1999;93:1051-1061.

Japón MA, Rubinstein M, Low MJ. *In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development.* *J Histochem Cytochem* 1994 Aug;42(8):1117-25.

Jensen CH, Krogh TN, Hojrup P, Clausen PP, Skjodt K, Larsson LI, Enghild JJ, Teisner B. *Protein structure of fetal antigen 1 (FA1). A novel circulating human epidermal-growth-factor-like protein expressed in neuroendocrine tumors and its relation to the gene products of dlk and pG2.* *Eur J Biochem* 1994;225:83-92.

Jin L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura RY, Kulig E, Lloyd RV. *Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells.* *Endocrinology* 2000;141:333-339.

Laborda J, Sausville EA, Hoffman T, Notario V. *dlk1 a Putative Mammalian Homeotic Gene Differentially Expressed in Smal Cell Lung Carcinoma and Neuroendocrine Tumor Cell Line.* *The Journal of Biological Chemistry* 1993 February;268(6):3817-3820.

Laborda J. *The role of the epidermal growth factor-like protein dlk in cell differentiation.* *Histol Histopathol* 2000;15:119-129.

Larsen JB, Jensen CH, Schroder HD, Teisner D, Bjerre P, Hagen C. *Fetal antigen 1 and growth hormone in pituitary somatotroph cells.* *Lancet* 1996;347:191.

Larson BA, Sinha YN, Vanderlaan WP. *Serum growth hormone and prolactin during and after the development of the obese-hyperglycemic syndrome in mice.* *Endocrinology* 1976;98:139-145.

Lee YL, Helman L, Hoffman T, Laborda J. *dlk, pG2 and Pref-1 mRNAs encode similar proteins belonging to the EGF-like superfamily. Identification of polymorphic variants of this RNA.* *Biochim Biophys Acta* 1995;1261:223-232.

Lee K, Villena JA, Moon YS. Kee-Hong Kim, Lee S, Kang C, Sul HS. *Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1).* *J. Clin. Invest* 2003;111:453-461.

List EO, Berryman DE, Funk K, Gosney ES, Jara A, Kelder B, Wang X, Kutz L, Troike K, Lozier N, Mikula V, Lubbers ER, Zhang H, Vesel C, Junnila RK, Frank SJ, Masternak MM, Bartke A, Kopchick JJ. *The role of GH in adipose tissue: lessons from adipose-specific GH receptor gene-disrupted mice.* *Mol Endocrinol.* 2013;Mar;27(3):524-35.

Liao GY, An JJ, Gharami K, An JJ, Gharami K, Waterhouse EG, Vanevski F, Jones KR, Xu B. *Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin*. *Nat Med* 2012;18:564-571.

Ling C, Svensson L, Odén B, Weijdegård B, Edén B, Edén S, Billig H. *Identification of functional prolactin (PRL) receptor gene expression: PRL inhibits lipoprotein lipase activity in human white adipose*. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1804-1808.

Liu Y, Zhong Y, Pei J, Zhu Y, Hu Y, Chi S, Kaye AD. *Inhibitory effect of leptin on growth hormone secretion of GH3 cells: involvement of cell proliferation, apoptosis and intracellular free Ca²⁺*. *Cytokine*. 2009 May;46(2):245-50.

Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(delta delta C(T)) method*. *Methods* 2001;25:402-408.

Lloyd RV, Long J, Tsumanuma I, Vidal S, Kovacs K, Horvath E, Scheithauer BW, Couce ME, Burguera B. *Leptin and receptor in Anterior Pituitary Function*. *Pituitary* 2001;4:33-47.

Lu M, Lin RY. *TSH stimulates adipogenesis in mouse embryonic stem cells*. *Journal of Endocrinology* 2008;196:159-169.

Lu S, Guan Q, Liu Y, Wang H, Xu W, Li X, Fu Y, Gao L, Zhao J, Wang X. *Role of extrathyroidal TSHR expression in adipocyte differentiation and its association with obesity*. *Lipids in Health and Disease* 2012;11:17

McDuffie IA, Akhter N, Childs GV. *Regulation of leptin mRNA and protein expression in pituitary somatotropes*. *J Histochem Cytochem* 2004;52:263-273.

McElvaine AT, Korytko AI, Kilen SM, Cuttler L, Mayo KE. *Pituitary-specific expression and Pit-1 Regulation of the rat growth hormone-releasing hormone receptor gene*. *Mol Endocrinol* 2007;8:1969-1983.

Mizuno TM, Bergen H, Funabashi T, Kleopoulos SP, Zhong YG, Bauman WA, Mobbs CV. *Obese gene expression: reduction by fasting and stimulation by insulin and glucose in lean mice, and persistent elevation in acquired (diet-induced) and genetic (yellow agouti) obesity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;Apr 16;93(8):3434-8.

Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ, Sul HS. *Mice lacking paternally expressed Pref-1 / Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity*. *Mol Cell Biol* 2002;22:5585-5592.

Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E. *Leptin gene expression in the brain and pituitary gland*. *Endocrinology* 1999;140:5995-5998.

Nagatani S, Zeng Y, Keisler DH, Foster DL, Jaffe CA. *Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep*. *Endocrinology* 2000;141:3965-3975.

Nam SY, Lobie PE. *The mechanism of effect of growth hormone on preadipocyte and adipocyte function.* *Obes Rev* 2000;1:73-86.

Nakakura T, Sato M, Suzuki M, Hatano O, Takemori H, Taniguchi Y, Minoshima Y, Tanaka S. *The spatial and temporal expression of delta-like protein in the rat pituitary gland during development.* *Histochem Cell Biol* 2009; 131:141-153.

Norman D Isidori AM, Frajese V, Caprio M, Chew SL, Grossman AB, Clark AJ, Michael Besser G, Fabbri A. *ACTH and α -MSH inhibit leptin expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes: model for a central-peripheral melanocortin-leptin pathway.* *Mol Cell Endocrinol* 2003;200:99-109.

Odle AK, Haney A, Allensworth-James M, Akhter N, Childs GV. *Adipocyte vs pituitary leptin in the regulation of pituitary hormones: Somatotropes develop normally in the absence of circulating leptin.* *Endocrinology* 2014.

Park HK, Ahima RS. *Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism.* *Metabolism* 2015;64:24-34.

Paz-Filho G, Delibasi T, Erol HK, Wong MaLi, Licinio J. *Congenital leptin deficiency and thyroid function.* *Thyroid Research* 2009; 2:11.

Pfaffl MW. *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.* *Nucleic Acids Res* 2001;29:45.

Popovic V, Damjanovic S, Dieguez C, Casanueva FF. *Leptin and the pituitary.* *Pituitary* 2001;4:7-14.

Raghunandan R, Ruiz-Hidalgo M, Jia Y, Ettinger R, Rudikoff E, Riggins P, Farnsworth R, Tesfaye A, Laborda J, Bauer SR. *Dlk1 influences differentiation and function of B lymphocytes.* *Stem Cells Dev* 2008;17:495-507.

Reyes R, Martínez S, González-Gómez M, Tramu, Bello AR. *Origin of Adenohypophysial Lobes and Cells from Rathke's Pouch in Swiss Albino Mice. Proliferation and Expression of Pitx 2 and Calbindin D28K in Corticotropic and Somatotropic cell Differentiation.* *Anat. Histol. Embryol* 2008a.

Reyes R, González-Gómez M, Bello AR. *Origin of Adenohypophysial Lobes and Cells from Rathke's Pouch in Chicken (Gallus gallus) and Japanese Quail (Coturnix coturnix japonica). Expression of Calcium-Binding Proteins.* *Anat. Histol. Embryol* 2008b.

Reyes R, Valladares F, Gutiérrez R, González-Gómez M, Bello AR *Immunohistochemical distribution of regulatory peptides in the human fetal adenohypophysis.* *J. Anat* 2008c;212:817-826.

Robertson SA, Leininger GM, Myers Jr MG. *Molecular and neural mediators of leptin action.* *Physiol Behav* 2008;94:637-642.

Roh SG, Nie GY, Loneragan K, Gertler A, Chen C. *Direct modification of somatotrope function by long-term leptin treatment of primary cultured ovine pituitary cells.* *Endocrinology.* 2001 Dec;142(12):5167-71.

Ross DA, Rao PK, Kadesch T. *Dual roles for the Notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes,* *Mol. Cell. Biol* 2004;24:3505-3513.

Schäffler AN, Binart N, Schölmerich J, Büchler C. *Hypothesis paper: brain talks with fat—evidence for a hypothalamic–pituitary–adipose axis?* *Neuropeptides* 2005;39:363-367.

Schäffler AN, Schölmerich J, Büchler C. *The role of ‘adipotropins’ and the clinical importance of a potential hypothalamic–pituitary–adipose axis.* *Nature Clinical practice Endocrinology & Metabolism* 2006;July (2):7.Review.

Seres J, Bornstein SR, Seres P, Willenberg HS, Schulte KM, Scherbaum WA, Ehrhart-Bornstein M. *Corticotropin-releasing hormone system in human adipose tissue.* *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89: 965-970.

Shu SY, Ju G, Fan LZ. *The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system.* *Neurosci Lett.* 1988;Feb 29;85(2):169-71.

Smas CM, Sul HS. *Pref-1, a protein containing EGF-like repeats inhibit adipocyte differentiation.* *Cell* 1993;73:725-734.

Smas CM, Chen L, Sul HS. *Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation.* *Mol Cell Biol* 1997;17: 977-988.

Smas CM, Sul HS. *Molecular mechanisms of adipocyte differentiation and inhibitory action of pref-1.* *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1997;7:281-298.

Sone M, Nagata H, Takekoshi S, Osamura RY. *Expression and localization of leptin receptor in the normal rat pituitary gland.* *Cell Tissue Res* 2001;305:351-356.

Sone M, Osamura RY. *Leptin and the pituitary.* *Pituitary* 2001 Jan-Apr;4(1-2):15-23.

Sorisky A, Bell A, Gagnon A. *TSH receptor in adipose cells.* *Horm Metab Res* 2000;32:468-474.

Tramu G, Dubois MP. *Comparative cellular localisation of corticotrophin and melanotropin in lerot adenohypophysis (*Eliomys quercinus*). An immunohistochemical study.* *Cell Tissue Res* 1977;183:457-469.

Tramu G, Pillez A, Le´onardelli J. *An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous location of two antigens by immunocytochemistry.* *J Histochem Cytochem* 1978;26:322-324.

Trayhurn P, Beattie JH. *Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ.* Proc Nutr Soc. 2001 Aug;60(3):329-39.

Wada N, Hirako S, Takenoya F, Kageyama H, Okabe M, Shioda S. (2014) J Chem Neuroanat 2014;61(62):191-199.

Wang Y, Sul HS. *Ectodomain shedding of preadipocyte factor 1 (Pref-1) by tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) and inhibition of adipocyte differentiation.* Mol Cell Biol 2006;26:5421-5435.

Yevtdiyenko A, Schmidt JV. *Dlk1 expression marks developing endothelium and sites of branching morphogenesis in the mouse embryo and placenta.* Dev Dyn 2006;235:1115-1123.

Yeung CM, Chan CB, Leung PS, Cheng CH. *Cells of the anterior pituitary.* Int J Biochem Cell Biol 2006;38:1441-1449.

Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. *Role of leptin in hypothalamic-pituitary function.* PNAS 1997;94:1023-1028.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature 1994;372:425-432.

Zhu X, Zhang J, Tollkuhn J, Ohsawa R, Bresnick EH, Guillemot F, Kageyama R, Rosenfeld MG. *Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis.* Genes Dev 2006;20:2739-2753.