



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

**Participación de la Prolactina en la Función de las Células de Goblet de Colon en
Ratones Lactantes**

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en **Biología**

Presenta:

Magali Valle Pacheco

Dirigido por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Directora

Dra. Yazmín Macotela Guzmán

Codirectora

Sinodales

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente

Dra. Yazmín Macotela Guzmán
Secretario

Mtr. José Luis Dena Beltrán
Vocal

Dra. Dulce María Palmerín Carreño
Vocal

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Vocal

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Febrero 2025
México

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

Dedicatorias

El camino para llegar aquí fue largo, lleno de sombras y más de una vez sentí el peso de la duda sobre mí. Pero en cada abismo hubo voces que me rescataron, manos que me sostuvieron, miradas que me recordaron que el caer también es parte del andar.

Este trabajo es para quienes me ayudaron a seguir caminando.

A Isaac, mi padre, por enseñarme a resistir en la adversidad, a ser valiente y constante.

A mi hermana Cecilia, mi refugio eterno, a Trinidad por darme la mano cuando lo necesité. A mi pequeña Yatziry, la luz en mis noches más largas, el amanecer que siempre espero.

A Ignacio, mi compañero de vida, por tanto amor y empatía, por estar junto a mí en cada avance y en cada retroceso.

A mis amistades, Magdalena, Sofia, Carlos, Joshua, Jorge, y Raúl, por ser el eco amable de mis palabras. A Elizabeth, por el tiempo que nos faltó.

A la Dra. Yazmín Macotela y a Dena por creer en mí, tenerme paciencia y darme un lugar para crecer.

Agradecimientos

A la asistencia técnica de: Dra. Xarubet Ruiz-Herrera, Dra. Ericka De los Ríos, Daniel Mondragón, Antonio Prado, Nutr. Fernando López-Barrera, Dr. García-Servín, Dra. Alejandra Castilla León, Dra. María Carbajo Mata y Mtra. Ana Luisa Ocampo-Ruíz. Alexandra A. E.

Este trabajo fue apoyado con recursos UNAM-DGAPA-PAPIIT IN211624 y CONAHCYT CBF2023-2024-964 a YM.

Índice

1	Introducción	1
2	Antecedentes	2
2.1	Lactancia Materna	2
2.2	Prolactina	2
2.3	Colon	6
2.3.1	<i>Desarrollo Del Colon</i>	7
2.3.2	<i>Colonocitos</i>	10
2.3.3	<i>Células Enteroendócrinas</i>	10
2.3.4	<i>Células Penacho</i>	11
2.3.5	<i>Células de Goblet</i>	11
2.3.6	<i>Secreción de Mucina</i>	15
2.4	Establecimiento de la Barrera Mucosa	16
2.5	Microbiota del Colon	17
3	Justificación.....	19
4	Hipótesis.....	20
5	Objetivos	20
6	Métodos.....	21
6.1	Modelo Biológico	21
6.2	Extracción de Colon	21
6.3	Histología de Colon.....	21
6.4	qPCR	22
6.4.1	<i>Extracción de ARN</i>	22
6.4.2	<i>RNA a cDNA</i>	23
6.4.3	<i>qPCR</i>	23

6.5	Análisis Estadísticos.....	24
7	Resultados	25
7.1	Descripción de la Estructura de las Criptas de Colon.....	25
7.2	Determinación de la Presencia de Células Caliciformes en las Criptas de Colon.....	25
7.3	Análisis de la Estructura de la Barrera Mucosa del Colon Durante la Lactancia.....	28
7.4	Evaluación de la Expresión de Genes Asociados a la Diferenciación y Función Celular.....	30
7.4.1	<i>Evaluación la Expresión de Genes Asociadas a la Diferenciación.....</i>	30
7.4.2	<i>Evaluación de la Expresión de Genes Asociados a la Función Celular</i>	31
8	Discusión.....	33
9	Conclusiones	35
10	Referencias.....	36

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del epitelio colónico.	8
Figura 2. El destino de las células epiteliales está mediado por la señalización de Notch.....	9
Figura 3. Biosíntesis y secreción de mucina (<i>Muc2</i>).....	13
Figura 4. Glicosilación de la Mucina 2.....	14
Figura 5. Estructura de las Criptas de Colon.....	26
Figura 6. Determinación de la presencia de células caliciformes en las criptas de colon..	27
Figura 7. Análisis de la estructura de la barrera mucosa del colon durante la lactancia	29
Figura 8. Diferenciación celular hacia el linaje secretor	31
Figura 9. Evaluación de la expresión de genes asociados a la función celular..	32

Índice de tablas

Cuadro 1. Las funciones más conocidas de la PRL según el taxón	4
Cuadro 2. Secuencias de oligonucleótidos.	23

Resumen

La leche materna es la fuente ideal de nutrientes y componentes bioactivos que favorece el desarrollo y supervivencia en los recién nacidos. Nuestro grupo de investigación ha demostrado, mediante un modelo murino, que la prolactina (PRL) en la leche materna es un componente bioactivo que mejora el metabolismo en crías alimentadas con leche materna alta en grasas. La PRL es una hormona pleiotrópica que se encuentra en altas concentraciones en la leche materna y actúa a través de la unión ligando-receptor, localizado en el epitelio intestinal neonatal. Se ha demostrado que la ausencia de la señalización del receptor de PRL (PRLR) afecta negativamente la abundancia y riqueza de la microbiota intestinal en roedores al destete, favoreciendo la abundancia de microbiota asociada a enfermedades metabólicas. Dado que la microbiota intestinal mantiene una simbiosis con el epitelio intestinal y su establecimiento ocurre durante la lactancia, culminando al destete, es importante entender cuál es el efecto de la PRL en la función de las células de Goblet, responsables de la secreción y formación de moco, importante para la función de barrera del intestino y para la salud de la microbiota intestinal.

Para investigar esto, utilizamos un modelo de ratones lactantes carentes del receptor de prolactina (Prlr-KO) en edades posnatales de 14 y 21 días. Evaluamos mediante RT-qPCR los genes asociados al linaje de secreción como *Atoh1* sin encontrar cambios significativos, al evaluar la expresión de *Muc2* se observó incremento significativo a lo largo del tiempo en ambos genotipos. Sin embargo la señalización del PRLR no parece ser esencial para su regulación basal. A pesar de, a nivel histológico, observamos mediante la técnica de PAS (ácido periódico de Schiff) una mayor presencia de moco en los ratones Prlr-WT en comparación con los Prlr-KO a los 21 días. Lo anterior sugiere que la señalización de PRL está implicada en la formación de la barrera mucosa del colon hacia el final de la lactancia.

Palabras clave: Células de Goblet, colon, prolactina, barrera mucosa.

Abstract

Breast milk is the ideal source of nutrients and bioactive components that support the development and survival of newborns. Our research group has demonstrated, using a murine model, that prolactin (PRL) in maternal milk is a bioactive component that improves metabolism in offspring fed with high-fat maternal milk. PRL is a pleiotropic hormone found in high concentrations in milk and acts through ligand-receptor binding located in the neonatal intestinal epithelium. The absence of prolactin receptor (PRLR) signaling negatively affects the abundance and diversity of the intestinal microbiota in weaned rodents, favoring the prevalence of microbiota associated with metabolic diseases. Given that the intestinal microbiota maintains a symbiotic relationship with the intestinal epithelium and its establishment occurs during lactation, culminating at weaning, it is crucial to understand the effect of PRL on the intestinal epithelium, in particular on the function of Goblet cells, which are responsible for mucus secretion important for the intestine's barrier function and for the health of the intestinal microbiota.

To investigate this, we used a model of lactating mice lacking the prolactin receptor (Prlr-KO) at postnatal ages of 14 and 21 days. We evaluated genes associated with the secretory lineage, such as *Atoh1*, using RT-qPCR but did not find significant changes. When assessing *Muc2* expression, we observed a significant increase over time in both genotypes; however, PRLR signaling does not appear to be essential for its basal regulation. Histologically, using the PAS (periodic acid-Schiff) technique, we observed a greater presence of mucus in Prlr-WT mice compared to Prlr-KO mice at 21 days. These findings suggest that PRL signaling is involved in the formation of the colonic mucus barrier towards the end of lactation.

Key words: Goblet cells, colon, prolactin, mucosal barrier.

1 Introducción

La lactancia es una etapa crucial en el desarrollo de los mamíferos, ya que aporta componentes nutricionales e inmunológicos, además de una serie de hormonas que afectan diferentes sistemas en el organismo del lactante. Entre estas hormonas, la prolactina (PRL) juega un papel central, no solo en la producción de leche, sino también en la regulación de otros procesos biológicos, como en el metabolismo (de Los Ríos y col., 2018b).

La prolactina es una hormona polipeptídica que inicialmente fue descrita por su capacidad de estimular la lactancia (Borba y col., 2019). Sin embargo, investigaciones más recientes han revelado que esta hormona tiene un papel mucho más amplio en la salud intestinal. En particular, la ausencia de la señalización del receptor de PRL tiene efectos sobre la abundancia y riqueza de la microbiota intestinal del colon hacia el final de la lactancia, favoreciendo la abundancia de bacterias relacionadas con enfermedades metabólicas (Luzardo-Ocampo y col., 2023).

En este sentido, el colon está protegido por una doble capa de moco, la primera es una capa interna de espeso gel adherido al epitelio, libre de bacterias, y la segunda es una capa externa suelta que sirve como hábitat para la microbiota (Tailford y col., 2015). Unas de las células presentes en el epitelio intestinal son las células de Goblet (GC), o células caliciformes, las cuales son responsables de la producción de mucina, un componente esencial del moco intestinal que protege el epitelio del colon, que mantiene una relación crítica con la microbiota y juega un papel fundamental en la barrera intestinal (Gustafsson y Johansson, 2022).

Aunque se conoce el papel de la PRL en diversas funciones biológicas, su participación en la regulación de la función de las células de Goblet durante la lactancia en ratones es desconocida. Esto resulta especialmente relevante en el contexto de la lactancia, donde la interacción entre la PRL presente en la leche materna y el desarrollo intestinal de las crías podría tener implicaciones clave para la salud metabólica y gastrointestinal. Debido a esto, nuestro objetivo fue conocer cómo la ausencia de la señalización del PRLR afecta específicamente la función de las GC en el colon de ratones lactantes.

2 Antecedentes

2.1 Lactancia Materna

La Organización Panamericana de la Salud, reconoce a la lactancia materna como una de las formas más eficaces de garantizar la salud y supervivencia de los lactantes, ya que ayuda a prevenir el sobrepeso y la diabetes tipo 2 en la niñez, además de proteger contra la leucemia y el síndrome de muerte súbita infantil (Organización Panamericana de la Salud, 2024). Durante la lactancia, la madre provee a través de la leche materna los nutrientes necesarios para el desarrollo del recién nacido. Además de ello, el Fondo de las Naciones Unidas para la infancia señala que la leche materna también ayuda en la prevención de enfermedades como obesidad, diabetes, leucemia, alergias, cáncer infantil, hipertensión y colesterol alto (UNICEF, 2024).

La leche materna es un alimento formado por diversos componentes, entre los que se enlistan anticuerpos, nucleótidos, minerales (Bautista, 2016) y hormonas como la insulina, la adiponectina, la leptina, el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), prolactina (PRL), entre otras (de Los Ríos et al, 2018a). La PRL se encuentra en altas concentraciones en la leche materna y es administrada a las crías durante la lactancia. La transferencia de la PRL en el intestino se da en el yeyuno y en el íleon mediante transcitosis mediada por su receptor (Gonnella y col., 1989).

2.2 Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada principalmente por la hipófisis anterior en los lactotrofos (Bernard, 2019). La PRL también es secretada en tejidos extrahipofisarios como el sistema inmunológico, el útero y las glándulas mamarias. Durante la lactancia, la regulación de la PRL inicia a partir de la estimulación del pezón. Factores como la luz, el estrés y el olfato también pueden incitar la producción de la prolactina en estos tejidos (Al-Chalabi y col., 2023).

La PRL hipofisaria se compone de 197-199 aminoácidos en mamíferos (Costa-Brito y col., 2022) y su regulación está mediada por dopamina (Al-Chalabi y col., 2023). La hipófisis se localiza detrás del puente nasal en una estructura ósea conocida como silla turca y está conectada al hipotálamo por el tallo infundibular. El hipotálamo participa en la regulación de la síntesis y secreción de diversas hormonas, incluyendo la PRL. La producción de esta hormona se regula a nivel de transcripción génica a través de factores que estimulan o inhiben su transcripción (Al-Chalabi y col., 2023).

La hormona liberadora de tirotrópina (THR) y la dopamina son secretadas por el hipotálamo y modulan la actividad de las células lactótrofas. La dopamina es liberada de forma continua por las neuronas dopaminérgicas desde los botones terminales de los nervios e interacciona con los receptores D2 en las células lactotróficas, regulando las señales intracelulares e inhibiendo la síntesis de la PRL. La regulación de la PRL también puede darse por retroalimentación negativa al estimular la liberación de dopamina (Al-Chalabi y col., 2023).

De acuerdo con Muralidhar y Lee (2013), la PRL fue observada por primera vez en 1928 por Stricker y Grueter cuando inyectaron un extracto de hipófisis bovina en conejas pseudopreñadas y como resultado las conejas comenzaron a lactar. Posteriormente Riddle y colaboradores (1933) purificaron el extracto de la hipófisis bovina y comprobaron la estimulación de la producción de leche y finalmente nombraron al extracto como “prolactina”. En 1970, Li y colaboradores presentaron la primera secuencia de aminoácidos de PRL ovina y desde entonces se han reportado la secuencia en diferentes especies. Las funciones más conocidas de la PRL varían según el taxón estudiado (Cuadro 1), por ejemplo, en mamíferos, esta hormona es conocida por ser responsable de la lactancia; en peces, se le reconoce por su participación en la osmorregulación, en cuanto a las aves, se ha visto involucrada en la regulación del comportamiento parental (Dobolyi, 2020).

La PRL pertenece a la familia de genes de las hormonas del crecimiento, la lactógeno placentaria y la somatolactina. Esta familia se originó de un gen ancestral y su historia evolutiva puede rastrearse hasta los cordados donde se dio la primera duplicación del genoma, marcando la transición hacia los vertebrados. La segunda duplicación ocurre

en la transición de agnatos (vertebrados sin mandíbula) a gnatóstomados (vertebrados con mandíbulas), en esta ronda surge un gen adicional denominado PRL2. La tercera ronda tuvo lugar después de la divergencia de los teleósteos donde aparece el gen de la somatolactina b (Ocampo Daza y Larhammar, 2018).

Cuadro 1. Las funciones más conocidas de la PRL por taxón

Taxón	Función
Mamíferos	Regulación del ciclo estral y mantenimiento del cuerpo lúteo durante el embarazo (Phillipps y col., 2020). Lactancia y cuidado parental (Brown y col., 2017).
Aves	▲Prl: Cuidado parental, comportamiento de incubación (Smiley y Adkins-Regal, 2016), parche de cría y lactancia* (Kanematsu, 1980, Wan y col., 2019). ▼Prl: Cese de comportamiento de incubación (Smiley y Adkins-Regal, 2016).
Peces	Proceso de osmorregulación en epitelios branquiales (Takei y col., 2014). ▲Prl: comportamiento de crianza y cuidado parental en peces teleósteos (Royle y Wilson, 2014).
Anfibios	Desarrollo y metamorfosis (Kikuyama y col., 2021).

La prolactina es una hormona que regula distintas funciones las cuales pueden variar entre los taxones. ▲Prl: concentración elevada de PRL, ▼Prl: Baja concentración de PRL. *En aves, se conoce como leche de buche al fluido secretado en dicho órgano; su producción es mediada por la PRL.

Cabe mencionar que no todos los vertebrados expresan todos los genes de esta familia. Los anfibios, reptiles, aves y peces teleósteos expresan ambos genes de prolactina (prolactina y prolactina 2); en mamíferos solo se conserva un gen de prolactina, ya que la PRL2 se perdió en este grupo durante la evolución. Entre las características propias de la PRL destaca que esta hormona no tiene una sola diana, ya que sus receptores son expresados por diversos órganos, siendo en su mayoría células epiteliales, donde promueve efectos proliferativos (Dobolyi, 2020).

El receptor de prolactina (PRLR) se encuentra en la familia de receptores de citoquinas tipo I y está formado por tres dominios: extracelular, transmembranal e intracelular (Costa-Brito y col., 2022). La distribución del receptor es amplia, por lo que se puede encontrar en distintos órganos y tejidos (Méndez y col. 2005), incluyendo varios

órganos del sistema digestivo, como el estómago, duodeno, yeyuno, íleon y colon (Ouhitit y col., 1994).

La acción de la PRL inicia cuando se une a un homodímero del PRLR formando un complejo heterotrimérico biológicamente activo (Costa-Brito y col., 2022). En ratones, el PRLR tiene dos isoformas, la forma larga y la forma corta. Cuando la PRL se une a la forma larga, se induce la fosforilación mediada por JAK2 de proteínas transductoras de señales y activadoras de transducción (STAT) que translocan al núcleo (Dobolyi, 2020). En el núcleo, las proteínas STAT se unen a promotores de genes con motivos de unión al ADN de la secuencia activada por γ -interferón y regula los genes diana de la PRL, estableciendo la vía canónica de JAK/STAT. Además de la vía canónica, la PRL también es capaz de desencadenar la vía P13/AKT o la vía MAPK/ERK en ambas isoformas (Costa-Brito y col., 2022).

La acción de la PRL favorece el metabolismo en diversos tejidos del cuerpo, incluyendo los principales órganos metabólicos como el páncreas, hígado, tejido adiposo, músculo, intestino e hipotálamo. En el páncreas, la PRL estimula su desarrollo durante la etapa perinatal, la proliferación y supervivencia de las células β , además de promover la secreción de insulina inducida por glucosa. La PRL regula el crecimiento hepático, la función metabólica hepática y reduce la acumulación hepática de lípidos. El aumento de la expresión del PRLR en el hígado estimula la sensibilidad a la insulina hepática y sistémica. En el tejido adiposo, la PRL regula el metabolismo de los lípidos y promueve la adipogénesis y expansión saludable del tejido adiposo y promueve la formación y activación del tejido adiposo pardo en ratones neonatos. En el hipotálamo, el aumento de la expresión del PRLR se ha visto relacionado con la sensibilidad a la insulina en todo el cuerpo y la reducción de la expresión de este receptor da lugar a la resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Macotela y col., 2022). La PRL presente en la leche materna se sugiere puede estar relacionada con la absorción de nutrientes en el intestino (Hahn-Holbrook y col., 2019).

En 2018, de Los Ríos y colaboradores estudiaron la acción de la PRL de la leche materna en la prevención de la obesidad y alteraciones metabólicas en las crías.

Encontraron que el consumo de una dieta alta en grasas por parte de las madres afecta negativamente la función de la PRL, comprometiendo la función y estructura de la glándula mamaria. Además, notaron que las crías tratadas oralmente con PRL, provenientes de madres con dieta alta en grasa, presentaron una menor adiposidad visceral y mayor hiperplasia del tejido subcutáneo. Lo que subraya la importancia de la lactancia materna y la participación de la PRL en la salud de las crías.

2.3 Colon

El intestino grueso se conecta al intestino delgado mediante la válvula ileocecal, está formado por el ciego, el colon y el recto. El colon es una parte esencial del sistema digestivo, constituye la porción distal del intestino grueso y despliega diversas funciones fundamentales. Entre sus papeles principales se incluye la recaptura de electrolitos y agua (el 80% del agua es absorbido por el intestino delgado y el 20% por el intestino grueso). Además, el colon participa en la absorción de vitaminas y en la formación, transporte y expulsión de las heces (Azzouz, 2023; Bassotti, 2015).

El transporte de agua puede seguir dos vías: la ruta paracelular, que ocurre entre los espacios de las uniones celulares, y la ruta transcelular a través de las membranas celulares. La absorción de agua y electrolitos se realiza en respuesta a un gradiente osmótico dictado por la absorción de electrolitos. El sodio es absorbido por canales de sodio, el potasio entra o sale según la concentración del mismo en el lumen y los iones de cloruro se intercambian por iones de bicarbonato por el gradiente electroquímico (Bassotti, 2015). En lo que respecta a la absorción y producción de vitaminas en el colon, la microbiota desempeña un papel crucial, ya que producen cantidades importantes de vitaminas como la vitamina K y las vitaminas B, mediante procesos de fermentación. Estas vitaminas son producidas por bacterias del colon y luego absorbidas en la sangre (Azzouz, 2023).

El epitelio del colon está formado por distintos tipos celulares los cuales derivan de las células madre que expresan el receptor acoplado a la proteína G (Lgr5) que se localizan en el fondo de la cripta. El mantenimiento de las células madre y la diferenciación celular

en el intestino requieren de la participación de diferentes vías de señalización, incluidas Wnt/ β -catenina, proteína morfogénica ósea (BMP) y PI3-quinasa/Akt y Notch (Kim y Ho, 2010).

2.3.1 Desarrollo del Colon

En el desarrollo embrionario de ratones, entre el día embrionario 8 (E8) y E9.5 se forma el tubo intestinal (Sprangers y col., 2021). El epitelio intestinal surge a partir del endodermo, una de las tres capas germinales primarias, bajo la influencia de factores de crecimiento que actúan según el patrón anteroposterior. En el caso del segmento anterior está modelado por la expresión de *Sox2* y *Hhex* mientras que en la región posterior se expresa la proteína caudal homebox 2 (*Cdx2*) (Noah y col., 2011). El proceso de formación del tubo intestinal embrionario ocurre por el plegamiento del endodermo desde los extremos anterior y posterior, denominado tubulogénesis endodérmica. Una vez que el tubo intestinal está completamente formado, hacia el E14, el epitelio simple forma un epitelio pseudoestratificado y el tubo se engrosa y alarga, conforme aumentan las dimensiones del tubo, el epitelio se convierte en epitelio estratificado con células apicales conectadas por células basales y complejos de unión. Posteriormente, el organismo se reorganiza a estado columnar. A partir del E16.5 el epitelio madura y las células precursoras se diferencian (Sprangers y col., 2021; Noah y col., 2011).

El epitelio del colon está organizado en criptas intestinales, también conocidas como criptas de Lieberkühn (Litvak, 2018). Estas criptas albergan células diferenciadas del linaje de absorción (colonocitos) y secreción (células de Goblet, enteroendócrinas y de penacho) en la zona superior de la cripta, al fondo de esta se encuentran las células madre (*Lgr5*) (Figura 1). Las células madre constantemente dan lugar a las células indiferenciadas precursoras del linaje de secreción y absorción, lo que permite la renovación del epitelio cada 5 días (Noah y col., 2011; Sprangers y col., 2021).

La diferenciación celular del epitelio intestinal comienza cuando la célula madre adulta da lugar a una célula *Lgr5* hija que abandona el fondo de la cripta intestinal y migra a la zona de amplificación de tránsito (TA). En esta zona, pasa por una breve fase de proliferación. Al salir de la TA, la célula se vuelve posmitótica y ocurre una diferenciación

terminal. Posteriormente, continúa su viaje a la zona superior de la cripta donde cumplirá funciones especializadas. En el fondo de la cripta se encuentran factores importantes involucrados en la homeostasis intestinal, como Wnt, el factor del crecimiento epidérmico (EGF), Notch e inhibidores de la proteína morfogénica ósea (BMP) (Sprangers y col., 2021).

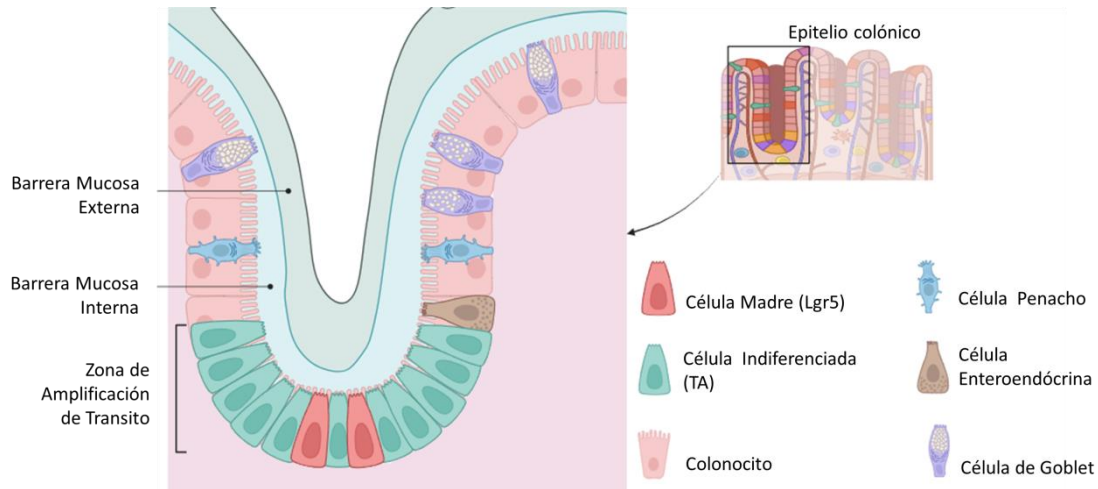


Figura 1. Esquema de una cripta de colon o cripta de Lieberkühn. La organización celular dentro de las criptas es fundamental para la homeostasis intestinal. En la parte superior de las criptas se encuentran las células diferenciadas del linaje de absorción (colonocitos) y secreción (células de Goblet, enteroendócrinas y de penacho). En el fondo de las criptas residen las células madre (Lgr5+), responsables de la renovación epitelial mediante la generación constante de células indiferenciadas, precursoras de los linajes de absorción y secreción, localizadas en la zona de Amplificación de Tránsito (TA) (Noah y col., 2011; Sprangers y col., 2021).

El destino de las células epiteliales del colon depende de la vía de Notch, la cual favorece la elección del linaje de absorción sobre el linaje de secreción (Figura 2). La activación de Notch por sus ligandos (Dll1, -3, -4 y Jagged1, -2) libera el dominio intracelular de Notch (NICD) en el citoplasma, un evento que ocurre después de la escisión del dominio extracelular del receptor, mediada por la proteasa ADAM10. Posteriormente, el dominio intracelular es liberado por la escisión intramembranal, llevada a cabo por el complejo γ -secretasa. Una vez liberado, el NICD se traslada al núcleo y se une a la proteína de unión al ADN RBP-J κ (también conocida como CSL), lo que convierte un complejo represor transcripcional en un complejo activador, en cooperación con la proteína Mastermind-like (Mam). Este complejo activado induce la transcripción de Hes1, favoreciendo la diferenciación hacia el linaje de absorción al tiempo que reprime la

expresión de Atoh1, un factor de transcripción crucial para la diferenciación hacia el linaje secretor (Noah y col., 2011; Yang y Yu, 2021).

El desarrollo intestinal en ratones continúa dos semanas después del nacimiento. La estructura de la cripta se forma por la constricción apical dependiente de miosina-II, así como la proliferación no uniforme. A los 13 días, la expresión de Lgr5 se desplaza a las células madre en la base de las criptas maduras, disminuyendo el número de células Lgr5, lo que indica que las células Lgr5 están madurando. Aunque los niveles de expresión de Lgr5 aumentan, el número total de células Lgr5 disminuye durante el desarrollo de las criptas, indicando la maduración de estas células. Para que la forma de la cripta ocurra, se requiere de fuerzas generadas por la constricción apical dependiente de miosina II, diferencias locales en la rigidez de la matriz y proliferación no uniforme (Sprangers y col., 2021).

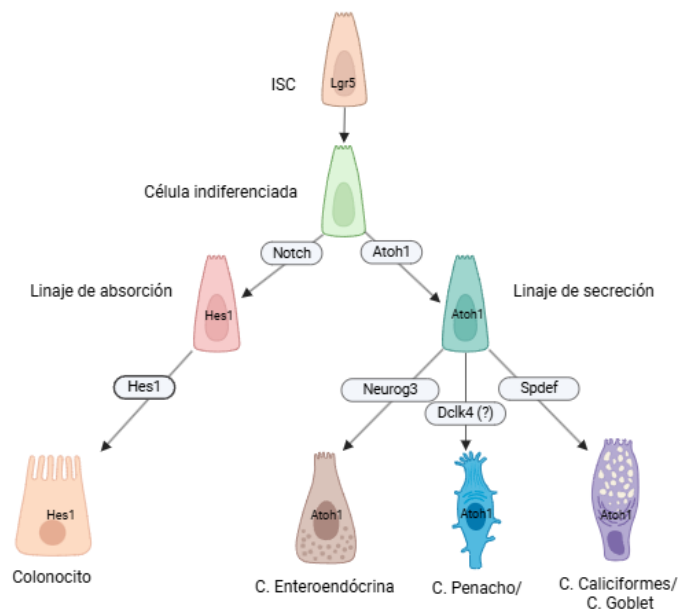


Figura 2. El destino de las células epiteliales está mediado por la señalización de Notch. La señalización de Notch juega un papel clave en determinar el destino de las células epiteliales. Las células madre del colon pueden diferenciarse hacia dos linajes celulares: las células del linaje de absorción (colonocitos) y las células del linaje de secreción. Este último linaje incluye células de Goblet, células enteroendocrinas y células penacho, cuya diferenciación es inhibida cuando la vía de Notch está activada. Imagen modificada de Takahashi y Shiraishi (2020).

2.3.2 Colonocitos

Los colonocitos, células del linaje de absorción, mantienen un metabolismo energético mediante la fosforilación oxidativa, lo que requiere de un elevado consumo de oxígeno. El alto consumo de oxígeno genera una presión parcial de oxígeno, es decir, una hipoxia epitelial. Debido a esto y a la limitada cantidad de oxígeno que atraviesa la capa mucosa, la luz intestinal favorece una microbiota anaerobia. La comunidad bacteriana anaerobia obligada favorece la fermentación de la fibra consumida por el huésped; en condiciones que alteran el metabolismo de los colonocitos, aumentan las concentraciones de oxígeno en la luz intestinal, lo cual beneficia a las bacterias anaerobias facultativas, dando como resultado un proceso denominado disbiosis en el colon (Litvak, 2018)

Las funciones inmunitarias conferidas al colon requieren de la coevolución de comunidades microbianas con el huésped desde una visión ecológica. Esta coevolución permite beneficios para ambas partes; el huésped es favorecido por la microbiota al descomponer hidratos de carbono que no pueden ser digeridos por las enzimas propias del huésped, contribuyendo además con el desarrollo inmunitario y el control de patógenos. En el colon se sitúa una gran diversidad de bacterias anaerobias obligadas principalmente de la clase Clostridia y Bacteroidia, que pueden generar diversas enzimas para diferentes carbohidratos complejos. Dentro de dicha comunidad también se encuentran bacterias anaerobias facultativas como Proteobacteria, las cuales no aportan en la digestión de fibra. (Litvak, 2018).

2.3.3 Células Enteroendócrinas

Las células enteroendócrinas representan el 1% de las células del epitelio en el intestino grueso. Se encuentran dispersas como células individuales, producen y secretan hormonas. Se han descrito 16 subtipos celulares en el intestino de ratón. La especificación de las células enteroendócrinas requiere el marcador Neurogenina 3 (*Neurog3*) y factores río abajo de este que determinan los subtipos celulares, entre ellos se encuentran Pdx1, IA1/Insm1, Nkx2.2, Pax4 y Pax6 (Noah y col., 2011).

2.3.4 Células Penacho

Las células penacho, también conocidas como células cepillo, son un tipo celular poco estudiado, representan aproximadamente un 0.4% de las células epiteliales (Gerbe y col., 2012). Se caracteriza por microvellosidades largas y gruesas de actina. Es probable que este tipo celular esté involucrado en la sensación química del contenido presente en el lumen, basándose en la expresión de proteínas involucradas en la sensación del gusto (alfa-gustducina, Tmpr5) y en la secreción de opioides como respuesta a los nutrientes luminales (Noah y col., 2011). Son células quimiosensoriales presentes en órganos huecos como el tracto respiratorio y digestivo. Se ha identificado presentes como respuesta a lesiones tisulares en el colon, pulmón y estómago. Otra función importante de las células penacho es detectar y repeler la infección del parásito a través de la expresión del receptor 1 de succinato y la secreción de la citosina IL-25 (DelGiorno y col., 2020).

Si bien las células del linaje de secreción, al cual pertenecen las células penacho, requieren de la expresión de *Atoh1*, el marcador específico de las células penacho no ha sido determinado. Distintos marcadores han sido relacionados con la diferenciación de estas células. La aparición de las células penacho en el intestino de ratones se ha identificado mediante el marcador *Dck11* una semana después del nacimiento (Gerbe y Jay, 2012).

2.3.5 Células De Goblet

Las células caliciformes o células de Goblet (GC) forman parte del linaje secretor y representan entre el 10 al 15% del epitelio del intestino delgado y hasta el 50% del epitelio del colon. Son células especializadas en la secreción de moco y, por ende, responsables de la barrera mucosa que protege el epitelio (Noah y col., 2011). Las GC mantienen la homeostasis tisular al secretar diversos factores como proteínas, factores trefoil, glicoproteínas secretadas como mucina 2 (*Muc2*) y compuestos bioactivos como las mucinas unidas a la membrana epitelial (*Muc1*, *Muc3*, *Muc17*). Estos factores están empaquetados dentro de la célula esperando para ser secretados, ya sea por exocitosis en condiciones fisiológicas o de forma apocrina o por exocitosis compuesta como respuesta a un estímulo externo (Kim y Ho, 2010; McCauley y Guasch, 2015).

La capa de moco que recubre el epitelio intestinal juega un papel fundamental en la homeostasis intestinal. El moco está formado por mucinas, proteínas con cadenas de oligosacáridos higroscópicos e hidrofílicos, secretadas por las GC (Kim y Ho, 2010). A diferencia del intestino delgado, el colon presenta dos capas de moco: una capa interna que está adherida al epitelio y le confiere protección y una capa externa que permite la colonización bacteriana (Bergstrom y Xia, 2013). La capa interna de la barrera mucosa del colon se forma mediante la fusión de la mucina secretada por las GC y el moco superficial. Inicialmente estos dos tipos de moco se encuentran separados, pero se combinan para formar una red estratificada y adherida. La participación de la transglutaminasa (*Tgm3*) permite la autoorganización y estabilización de la capa mediante enlaces iso-peptídicos covalentes entre glicoproteínas (Luis y Hansson, 2023).

La *Muc2* contiene repeticiones en tándem ricas en prolina, serina y treonina conocidas como dominios PTS. Estos dominios están altamente glicosilados y presentan a ambos lados dominios ricos en cisteína, incluyendo el dominio de nudo de cisteína C-terminal y cuatro dominios D del factor von Willebrand, elementos involucrados en la dimerización y oligomerización. Estas características estructurales y fisicoquímicas permiten a la mucina formar una red viscosa (Kim y Ho, 2010).

La O-glicosilación es un proceso crucial en la biosíntesis de las mucinas, que son componentes esenciales del moco que protege el epitelio del colon. Las mucinas se biosintetizan, glicosilan y almacenan en el aparato de Golgi (Figura 3). Debido a que las mucinas y otros componentes de la mucosidad se caracterizan por sus glicanos, esta modificación postraducciona dentro del GC es de gran importancia (Bergstrom y Xia, 2013).

A diferencia de los N-glicanos, cuyo núcleo se añade en el retículo endoplásmico, los O-glicanos se construyen en el aparato de Golgi mediante la adición secuencial de monosacáridos por glicosiltransferasas específicas. Estas enzimas están organizadas en el aparato de Golgi de acuerdo con el orden en que añaden monosacáridos, permitiendo una extensión controlada y secuencial de los glicanos (Luis y Hansson, 2023).

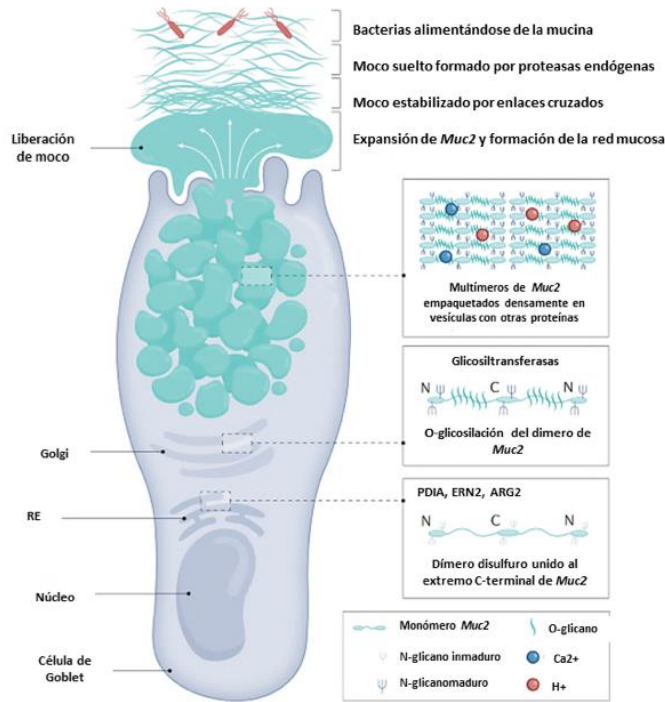


Figura 3. Biosíntesis y secreción de mucina (*Muc2*). Biosíntesis y secreción de mucina (*Muc2*) en las células de Goblet (GC) en el colon (modificado de Gustafsson y Johansson, 2022).

La biosíntesis de los O-glicanos de tipo mucina comienza cuando una peptidil-N-acetilgalactosamina transferasa (GalNAc transferasa) añade una N-acetilgalactosamina (GalNAc) a los residuos de serina o treonina en las secuencias PTS de *Muc2*, dando lugar al antígeno Tn (GalNAc α -O-Ser/Thr) (Ismail y col., 2011). Después de la adición inicial de GalNAc, se pueden añadir otros monosacáridos como la galactosa (Gal) o N-acetilglucosamina (GlcNAc) al C-3 o C-6 del GalNAc unido al péptido, generando una de las principales estructuras centrales, denominadas Core1 a Core4 (núcleo 1 a núcleo 4). Mediante la enzima β 1,3-galactosiltransferasa del núcleo 1 (C1GalT1) sintetiza el núcleo 1 (Core1), mientras que la enzima formadora del núcleo 3 (Core3) es la N-acetilglucosaminiltransferasa del núcleo 3 (C3GnT). Posteriormente, en el núcleo 1 se forma el núcleo 2 (Core2) con la ayuda de las N-acetilglucosaminiltransferasas del núcleo 2 (C2GnT). A medida que estos núcleos pasan por el aparato de Golgi se alargan con la adición de más residuos de Gal y GlcNAc (Figura 4) (Sang y col., 2023; Cheng y Radhakrishnan, 2011).

Monosacáridos específicos, como la fucosa o el ácido N-acetilneuramínico, pueden limitar una mayor elongación. La variabilidad en la glicosilación en el aparato de Golgi depende principalmente de las glicosiltransferasas expresadas en cada célula, lo que explica la alta variabilidad entre diferentes células, órganos y especies. Dado que la biosíntesis de glicanos es secuencial, la actividad de las glicosiltransferasas individuales afecta a múltiples glicanos (Luis y Hansson, 2023). Las glicosilaciones representan aproximadamente el 80% de la masa de la mucina. A su vez, el moco está constituido en un 90-95% de agua, 1-2% de electrolitos, lípidos, proteínas, entre otros (Paone y Cani, 2020).

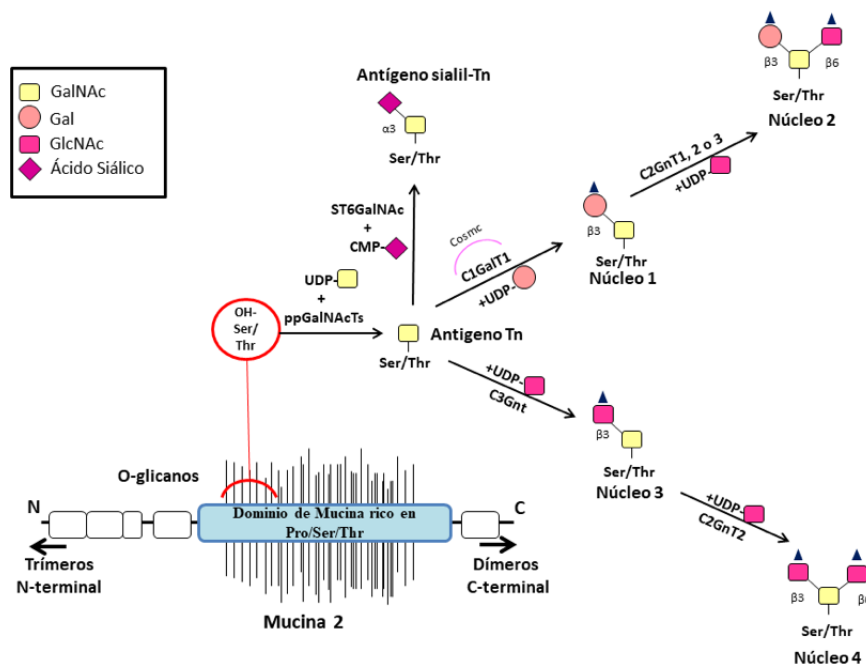


Figura 4. Glicosilación de la Mucina 2. La O-glicosilación de la mucina MUC2 comienza con la adición de N-acetilgalactosamina (GalNAc) mediada por las enzimas ppGalNAcTs, lo que da lugar al antígeno Tn. Este antígeno puede ser modificado de diferentes maneras: por la enzima C1GalT1, con la asistencia de la chaperona Cosmc, para formar la estructura del núcleo 1; por la enzima C3GnT para generar la estructura del núcleo 3; o por la enzima ST6GalNAc (una α 2,6 sialiltransferasa) que convierte el antígeno Tn en el antígeno sialil Tn. Las estructuras de los núcleos 1 y 3 pueden extenderse para formar las estructuras del núcleo 2 y núcleo 4, respectivamente; sin embargo, el antígeno Sialil Tn no puede extenderse más (modificado de Bergstrom y Xia, 2013).

Las interacciones entre la microbiota y el huésped ocurren en el moco que protege el epitelio, por lo que niveles bajos de mucina o alteraciones en las glicosilaciones de la

misma pueden traducirse en afecciones importantes tanto en ratones como en humanos (Engevik y col., 2019; Sang y col., 2023).

2.3.6 *Secreción de Mucina*

Las mucinas son glicoproteínas esenciales en la formación de la barrera mucosa. Estas proteínas altamente glicosiladas se pueden clasificar en dos tipos: mucinas transmembranales y mucinas formadoras de gel (Melhem y col., 2021). La estructura de la mucina permite que los glicanos formen estructuras tridimensionales unidas a los dominios de prolina, treonina y serina (dominios PTS), las cuales sirven como medio de interacción entre la microbiota y el organismo (Johansson y Hansson, 2016).

Las mucinas transmembranales son proteínas tipo 1 que poseen un único dominio de membrana cerca del extremo C-terminal. La parte N-terminal se localiza en la superficie de la célula, mientras que el C-terminal puede participar en la señalización intracelular. En el tracto intestinal, se expresan comúnmente las mucinas transmembranales *Muc3*, *Muc4*, *Muc12*, *Muc13* y *Muc17*. Además, *Muc1* y *Muc16* se regulan al alza en respuesta a infecciones y cáncer (Lindén y col., 2008; Johansson y Hansson, 2016). Las mucinas transmembranales desempeñan importantes funciones biológicas al formar parte del glicocáliz. Participan en la interacción célula-célula y célula-matriz, así como en la señalización celular (Tailford y col., 2015). Las mucinas gelificantes forman el esqueleto del moco, poseen dominios N- y C-terminales ricos en cisteína que regulan la oligomerización. La mucina más representativa del intestino es la *Muc2*, en el estómago y duodeno se expresa *Muc6* y *Muc5AC* se encuentra normalmente en estómago y su expresión en el intestino está relacionada con procesos infecciosos (Johansson y Hansson, 2016).

La *Muc2* es el principal componente del moco intestinal. La biosíntesis de la mucina comienza cuando el producto traduccional primario del *Muc2* se dimeriza en el retículo endoplasmático (RE) por enlaces disulfuros en el dominio CK. Los dímeros pasan al aparato de Golgi donde los dos dominios PTS se glicosilan. A lo largo de la vía secretora, el pH cambia gradualmente de 7.2 en el RE a 6.0 en el aparato de Golgi y finalmente a 5.2 en los gránulos secretores. Este cambio coincide con el aumento en la concentración de

Ca²⁺ intragranular, lo cual puede sugerir que el empaquetamiento de *Muc2* es dependiente del pH y calcio (Ambort y col., 2012).

Entre los factores que inducen la secreción y el recambio de la mucina en respuesta a estímulos se encuentran productos microbianos, citoquinas inflamatorias, procesos de producción, secreción y degradación (Lindén y col., 2008; Melhem y col., 2021). La liberación de los gránulos de mucina de las GC se mantiene a una velocidad basal por fusión de vesículas en la membrana apical. Cuando existe algún estímulo sobre las GC, ocurre un proceso denominado exocitosis compuesta y provoca la liberación de la mayoría de los gránulos de moco vaciando todo el interior de la célula y dejando expuesto el citoplasma. Esta forma de secreción reduce el tamaño de las células dificultando su identificación (Melhem y col., 2021). Una vez que los gránulos de mucina son liberados, se hidratan y se expanden aproximadamente 3000 veces su tamaño en comparación con los gránulos al interior de las células (Tailford y col., 2015).

La secreción de mucina también es dirigida por un tipo de GC situadas en la apertura de la cripta, conocidas como células caliciformes centinelas (sentinel Goblet Cell senGC), que detectan los ligandos TLR2, TLR4, TLR5 y activan NLRP6, provocando una liberación de Ca²⁺ e induciendo la secreción de *Muc2* de las GC adyacentes (Melhem y col., 2021). La expresión y secreción de mucina es controlada por citoquinas bioactivas secretadas por células activadas inmunitarias y no inmunitarias. Se clasifican en citoquinas de tipo 1 (Th1; IL-2, IL-12 e IFN- γ) o tipo 2 (Th2; incluyendo IL-4, IL-9, IL-10 e IL-13). En general, la regulación transcripcional de las mucinas está mediada por la inducción de vías de señalización, como JAK/STAT, SAPK/JNK o MAPK, que a su vez activan el factor de transcripción NF- κ B (Melhem y col., 2021).

2.4 Establecimiento de la Barrera Mucosa

El tracto digestivo está conformado por una capa única de células epiteliales encargada de diferentes procesos de absorción y secreción. Esta capa está en constante estrés físico y químico por lo que requiere de un sistema continuo de protección

(Birchenoug y col., 2015). La protección del intestino ante diversos agentes patógenos, incluyendo la microbiota propia, es garantizada por mecanismos como barrera mucosa (Johansson y Hansson, 2016). A lo largo del tracto intestinal, la capa de moco y la presencia de las GC difieren en cuanto a distribución, composición, organización, grosor y perfil de expresión. La presencia de GC aumenta en porcentaje gradualmente desde el duodeno (4%) hacia el colon distal (16%) (Melhem y col., 2021).

El colon está protegido por dos capas de moco, la capa interna permanece unida al epitelio y es impermeable para las bacterias, mientras que en la capa externa se establecen las condiciones necesarias para ser el hábitat de la microbiota (Johansson y Hansson, 2016). El mantenimiento del moco intestinal es esencial para mantener una relación homeostática entre la microbiota intestinal y el huésped. Alteraciones en esta dinámica podrían dar como resultado consecuencias graves para la salud, como colitis, cáncer colorrectal y mayor susceptibilidad a infecciones (Tailford y col., 2015). La renovación de esta capa incluye la síntesis, secreción y degradación como un ciclo delicado cuya regulación y equilibrio garantizan su función protectora. La degradación del moco se da debido a la interrupción física por las fuerzas de cizallamiento mecánico del peristaltismo¹ y la actividad enzimática microbiana (Paone y Cani, 2020). A través de la actividad enzimática, las bacterias pueden degradar los glicanos de la barrera mucosa y usarlos como sitios de unión y fuente de energía (Melhem y col., 2021).

2.5 Microbiota del Colon

La microbiota del colon está formada por billones de células microbianas que juegan un papel importante en la salud del huésped (Luzardo-Ocampo y col., 2023). El desarrollo de la microbiota tiene su origen desde el nacimiento, factores como la vía de parto y la alimentación determinan la composición de la misma (Bäckhed y col., 2016). La participación de la leche materna en el establecimiento de la microbiota y en la limitación

¹ Cizallamiento mecánico del peristaltismo: fuerzas físicas ocasionadas por los movimientos rítmicos de contracción y relajación de los músculos del intestino.

de infecciones gastrointestinales bacterianas y virales se atribuye en parte a la presencia de las mucinas en la superficie celular como la *Muc1* y *Muc15* (Lindén y col., 2008).

La PRL, un componente esencial de la leche materna, desempeña un papel crucial en la regulación del metabolismo de la descendencia. En el caso de los roedores, durante el periodo de lactancia, la leche materna se convierte en la fuente principal de la hormona. La ausencia de la señalización del PRLR está relacionada con una mayor abundancia de microbiota, intestinal relacionada con enfermedades no transmisibles crónicas (por ejemplo, resistencia a la insulina y obesidad) durante el destete en ratones (Luzardo-Ocampo y col., 2023). Estudios en ratones y en humanos han mostrado una asociación entre la alteración en la glicosilación de la mucina y las desviaciones de la ecología de la microbiota así como cambios en la composición de bacterias específicas (Tailford y col., 2015).

3 Justificación

La lactancia materna representa una de las estrategias más efectivas para asegurar la salud y la supervivencia de las crías. La leche materna se destaca como la opción alimenticia óptima para los lactantes, no solo por ser segura y limpia, sino también por contener anticuerpos que brindan protección contra diversas enfermedades. Además, la leche materna está compuesta por una variedad de factores como nutrientes, anticuerpos, hormonas y otros componentes bioactivos, que proveen la totalidad de la energía y los nutrientes esenciales que un recién nacido requiere.

La prolactina (PRL) es una hormona presente en la leche materna que ha demostrado estar relacionada con el establecimiento y la regulación de una microbiota intestinal favorable. Recientemente, se ha demostrado que la ausencia de señalización del receptor de PRL tiene efectos negativos sobre la abundancia y riqueza de la microbiota intestinal, beneficiando la proliferación de microorganismos asociados con enfermedades metabólicas. Esto señala la importancia de la PRL en el mantenimiento de una microbiota saludable, esencial para el desarrollo y la prevención de enfermedades.

Dado que la microbiota intestinal mantiene una simbiosis con el epitelio intestinal y, en particular, con la barrera mucosa del colon, es primordial entender el efecto de la PRL en la función de las células caliciformes (células de Goblet), que son responsables de la secreción de mucina y de la formación del moco. La mucina y la barrera mucosa juegan un papel esencial en la protección del epitelio colónico contra patógenos y en la regulación de la interacción entre la microbiota y el huésped.

Por lo tanto, investigar cómo la PRL influye en la actividad y la secreción de mucina por parte de las células Goblet durante la lactancia es crucial para comprender mejor los mecanismos subyacentes que contribuyen a la salud intestinal en el desarrollo neonatal. Este conocimiento no solo mejorará nuestra comprensión del desarrollo gastrointestinal, sino que también podría tener implicaciones importantes para la prevención y el tratamiento de enfermedades metabólicas relacionadas con desequilibrios en la microbiota intestinal.

4 Hipótesis

La falta de señalización del receptor de prolactina (PRLR) altera la función de las células de Goblet del colon comprometiendo la correcta formación de la barrera mucosa.

5 Objetivos

Objetivo general

Identificar la participación de la prolactina en la función de las células de Goblet en el colon.

Objetivos específicos

A partir de un modelo de ratones lactantes con genotipo PRLR^{+/+} y PRLR^{-/-}.

- I. Describir la estructura de las criptas de colon.
- II. Determinar la presencia de células de Goblet en las criptas de colon.
- III. Analizar la estructura de la barrera mucosa del colon durante la lactancia.
- IV. Evaluar la expresión de genes asociados a la diferenciación y función celular.

6 Métodos

6.1 Modelo Biológico

Se empleó como modelo biológico a ratones de la cepa C57BL/6 con genotipo WT (PRLR^{+/+}) y KO (PRLR^{-/-}) para el receptor de prolactina (PRLR) en edad postnatal de 14 y 21 días, proporcionados por el bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo el protocolo interno 075. Las condiciones ambientales de las camadas se mantuvieron con una temperatura de entre 22 y 24° C, períodos de luz-oscuridad de 12 horas, así como libre acceso a agua y alimento. Las camadas se ajustaron a entre 6 y 9 crías al segundo día de lactancia.

6.2 Extracción de Colon

Para la evaluación de la función de las GC del colon, se extrajo el intestino de ratones en las edades antes mencionadas y se clasificaron según su genotipo. La eutanasia se realizó bajo la normativa estipulada en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Empleando una cámara de CO₂ se logró un efecto depresivo y anestésico, provocando muerte por hipoxia. Posteriormente se realizó la dislocación cervical con la intención de descartar que el animal haya resistido a la hipoxia, para ello con ayuda de unas pinzas se hizo presión sobre la base del cráneo mientras con la otra mano se tomó la base de la cola y se dio tracción bruscamente para provocar la separación de las vértebras cervicales con el cráneo. Una vez confirmada la dislocación, se decapitó al animal y se extrajo el tejido.

Para evitar la degradación de los tejidos este procedimiento se realizó sobre hielo y usando PSB frío para retirar cualquier resto de materia fecal dentro del intestino. Los productos obtenidos se resguardaron a -80°C hasta su uso.

6.3 Histología de Colon

Se empleó la técnica de Swiss roll (Magnus, 1937) para visualizar la estructura completa del intestino. Para ello, se abrió longitudinalmente el intestino y se enrolló sobre sí mismo, los tejidos fueron fijados en formalina al 10% al menos durante 24 h, para

después ser deshidratados y fijados en parafina. Se realizaron cortes de 5 μm y se tiñeron con ácido peryódico-Schiff (PAS) y Hematoxilina Eosina.

A partir de las histologías teñidas con ácido peryódico-Schiff (PAS), se determinó la cantidad de células caliciformes (GC) y la cantidad de moco en relación con el tejido. Para el análisis de los datos, se hizo una relación entre el promedio de la GC cercanas al lumen intestinal y las criptas de cada campo. Se calculó el área que abarcaba la barrera mucosa y se dividió entre el área del tejido. Con las histologías tratadas con Hematoxilina Eosina, se midió la profundidad de las criptas. Se analizaron cuatro campos del tejido de cada individuo. Las fotografías se tomaron en microscopio óptico con campo claro a 20x y se analizaron en el programa Image-Pro Plus 7.0.

6.4 qPCR

6.4.1 *Extracción de ARN*

Se empleó entre 60 a 70 mg de tejido al cual se le adicionó 500 μL de trizol. Se sonicó la muestra al 20% de amplitud 15 segundos; el producto se centrifugó a 12000 rpm, 15 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se dejó reposar durante 5 minutos. Se adicionaron 100 μL de cloroformo y se homogenizó la muestra; después de reposar tres minutos, se centrifugó con las condiciones antes mencionadas y se recuperó la fase transparente del producto a la cual se le añadió 250 μL de isopropanol, se dejó reposar durante toda una noche a -20°C. A continuación, se centrifugó y se desechó el sobrenadante, se agregó 500 μL de etanol al 75% y se centrifugó nuevamente. Se decantó el alcohol y se dejó secar el contenido; con ayuda del spin se eliminaron los restos del etanol. El producto se resuspendió en agua libre de ARNasas.

6.4.2 RNA a cDNA

Posterior a la extracción del ARN, se cuantificó la concentración y se evaluó la pureza de la muestra utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (modelo/versión). Se verificaron las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 para asegurar una buena calidad del ARN. Para confirmar la integridad del ARN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó con el método de tinción GelRed.

Posteriormente, se realizó la síntesis de cDNA a partir de ARN, la retrotranscripción se llevó a cabo utilizando el siguiente mix de reacción para cada muestra: Buffer 1x, 2µL, dNTPs, 0.8 µL, random primers 2µL, enzima RT 1µL, del kit de transcripción inversa de ADNc de gran capacidad (Applied Biosystems #4368813). A continuación se realizó la PCR punto final con las siguientes condiciones: 25°C 10 minutos, 37°C 60 minutos, 37°C 60 minutos, 85°C 5 minutos y finalmente a 4°C.

6.4.3 qPCR

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se analizó la expresión de genes asociados con la diferenciación celular en el epitelio del colon y la formación de la barrera mucosa a la edad de 14 y 21 días después del nacimiento. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes *Atoh1* y *Muc2* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencias de oligonucleótidos.

Secuencias de Oligos utilizadas			
Nombre	Sentido	Antisentido	Temperatura de alineación
<i>Atoh1</i>	GCCTTGCCGGACTCGCTTCTC	TCTGTGCCATCATCGCTGTTAGGG	60.2°C
<i>Hes1</i>	GCTCACTTCGGACTCCATGTG	GCTAGGGACTTTACGGGTAGCA	60.2°C
<i>Tbp</i>	ACCCTTACCAATGACTCCTATG	TGACTGCAGCAAATCGCTTGG	60.2°C

Atoh1 (Factor transcripcional de BHLH atonal), *Muc2* (Mucina 2), *Hes1* (Factor de transcripción 1 BHLH de la familia Hes1).

6.5 Análisis Estadísticos

Para el análisis de datos se calculó la media y la desviación estándar para cada variable con el fin de determinar la tendencia central y la dispersión de los datos. Se comparó la media entre los dos grupos de estudio y se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas, se utilizó la prueba de t de Student. Se consideró como valor estadísticamente significativo una $p < 0.05$. Para todos los análisis estadísticos y gráficas de los mismos se utilizó GraphPad Prism 10.

7 Resultados

7.1 Descripción de la Estructura de las Criptas de Colon

Se analizó la profundidad promedio de las criptas de colon en ratones Prlr-KO en dos momentos de la lactancia, a los 14 y 21 días después del nacimiento, para ello se emplearon histologías teñidas con hematoxilina eosina. Los resultados indican que la longitud promedio de las criptas de ratones Prlr-KO no presenta diferencias significativas en comparación con los ratones del grupo silvestre para ambas edades evaluadas. La longitud promedio en los ratones en p14 Prlr-WT es de 156.5 μ m, mientras que para los ratones carentes del receptor de PRL la longitud promedio es de 160.8 μ m, al comparar estos datos obtuvimos una $p=0.5$. Al evaluar la profundidad de las criptas de colon al final de la lactancia, obtuvimos un promedio de 188.6 y 194.11 μ m para los ratones Prlr-WT y Prlr-KO, respectivamente, la p en esta edad es de 0.5, por lo que no presentan diferencias significativas (Figura 5).

7.2 Determinación de la Presencia de Células Caliciformes en las Criptas de Colon.

Para determinar la presencia de las células caliciformes en el epitelio de colon se analizó la estructura de las criptas mediante cortes histológicos teñidos con PAS. Se llevó a cabo un análisis detallado de la densidad relativa de GC por cripta de los ratones Prlr-KO y se comparó con el grupo silvestre en dos edades específicas, p14 y p21. Los resultados mostraron que la cantidad de GC por cripta fue estadísticamente similar entre ambos grupos y en ambas edades (Figura 6). La cantidad promedio de GC por cripta en p14 fue de 3.1 en ratones silvestres y de 3.3 en ratones Prlr-KO. A los 21 días después del nacimiento, el conteo de GC por cripta de colon fue 2.8 en ratones silvestres y 2.9 en ratones Prlr-KO.

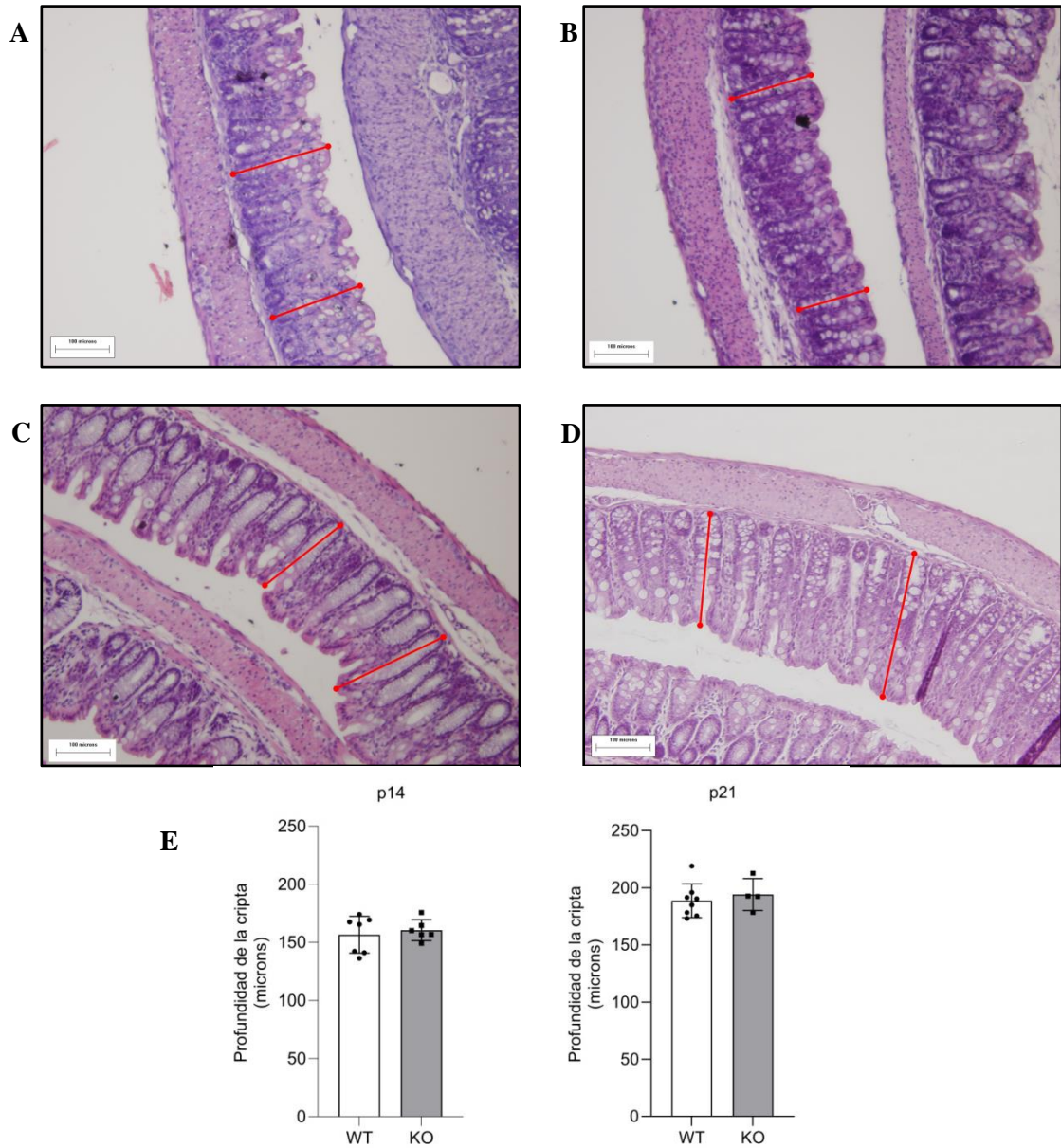


Figura 5. Estructura de las Criptas de Colon. Cortes histológicos de colon teñidos con hematoxilina y eosina. Se emplearon entre 4 y 7 ratones por grupo. A) Colon de ratón p14 Prlr-WT. B) Colon de ratón p14 Prlr-KO. C) Colon de ratón p21 Prlr-WT. D) Colon de ratón p21 Prlr-KO. E) Gráficas comparativas de la profundidad de las criptas en los grupos p14 y p21. Barra de escala: 100 μ m. Las líneas rojas señalan la profundidad de las criptas.

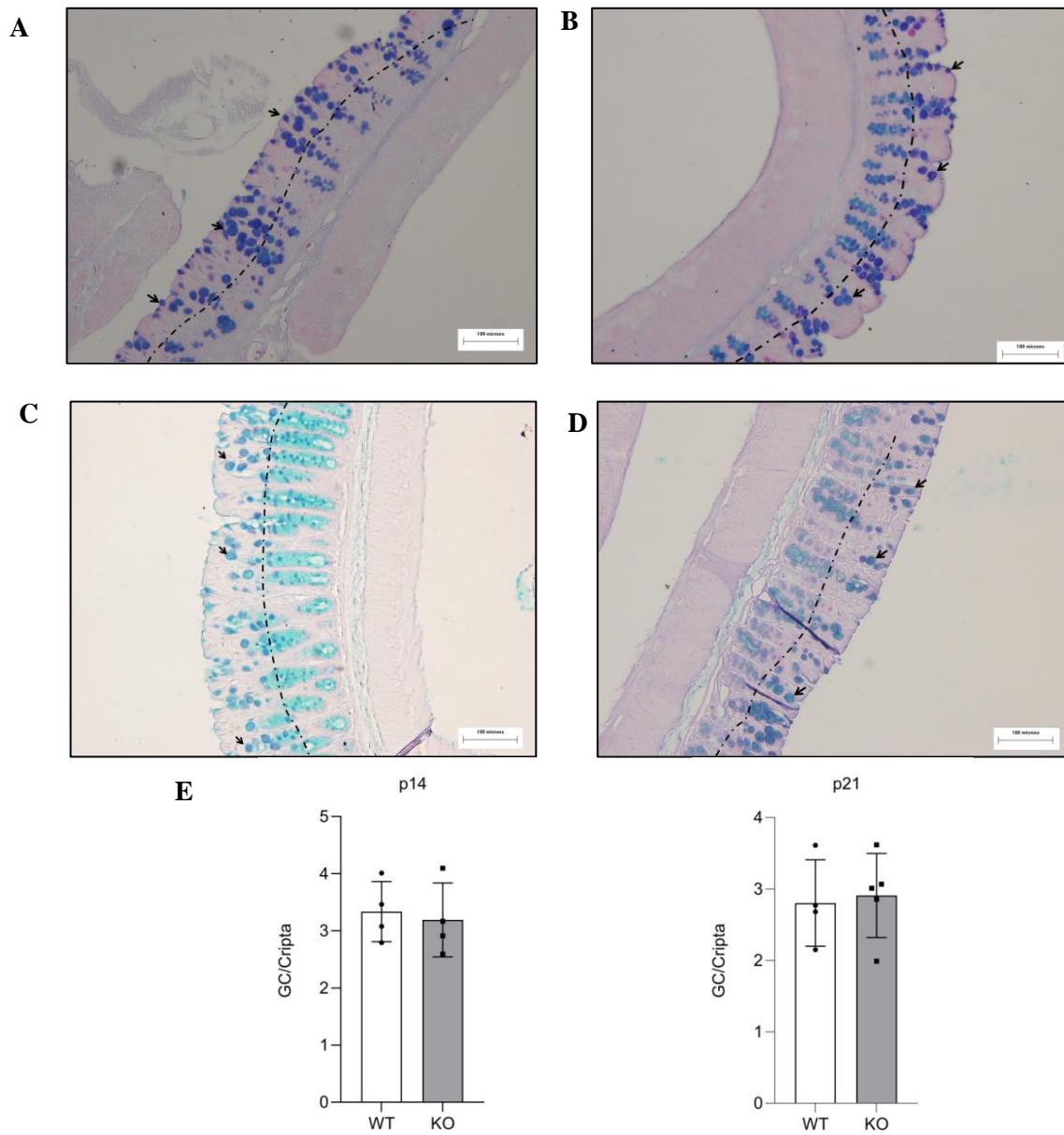
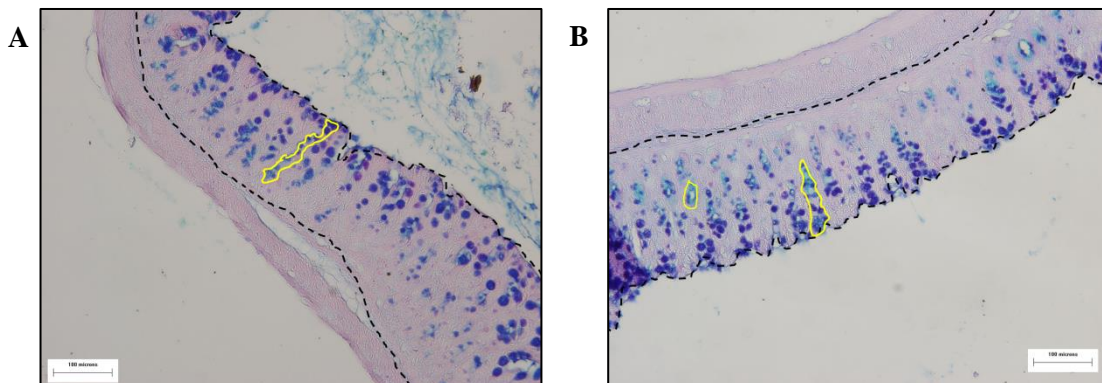


Figura 6. Determinación de la presencia de células caliciformes en las criptas de colon. Cortes histológicos de colon teñidos con ácido peryódico-Schiff (PAS), se emplearon entre 4 y 7 individuos por grupo. A) Colon de ratón p14 Prrl-WT. B) Colon de ratón p14 Prrl-KO. C) Colon de ratón p21 Prrl-WT. D) Colon de ratón p21 Prrl-KO. E) Gráficas de la cantidad de células caliciformes por cripta en los grupos p14 ($p=0.7379$) y p21 ($p=0.8020$). Barra de escala: 100 μm . La línea punteada limita el área considerada para el conteo de GC en el tejido. Las flechas señalan GC teñidas en azul.

7.3 Análisis de La Estructura de la Barrera Mucosa del Colon Durante la Lactancia.

Para evaluar la estructura de la barrera mucosa del colon, se realizó un análisis histológico utilizando tinción de PAS, que destaca las áreas mucosas teñidas en tonos azules. Se delimitó el área de las criptas colónicas y las regiones teñidas para cuantificar la relación entre el área de moco y el tejido de las criptas (Figura 7). El análisis de la relación entre el área de moco y el tejido de las criptas intestinales se realizó en ratones con eliminación del receptor de prolactina (Prlr-KO) y en ratones de tipo silvestre (Prlr-WT) a las edades de 14 y 21 días postnatales. A los 14 días, la relación entre el área de moco y el tejido de las criptas fue similar en ambos grupos, con una relación promedio de área de moco y área de tejido de 0.19 en ratones Prlr-WT y 0.23 en los individuos Prlr-KO, dando como resultado un $p=0.135$.

Sin embargo, a los 21 días, se observó un cambio en este comportamiento. Mientras que en los ratones Prlr-WT la cantidad de moco aumentó significativamente, con un resultado de 0.36, en los ratones Prlr-KO no se observó un incremento comparable, ya que la relación entre área de moco y tejido fue de 0.22. Al comparar los resultados de los ratones silvestres de 14 a 21 días, se encontró un aumento significativo del área de moco por área de tejido con un valor de $p=0.006$, por el contrario, los ratones con genotipo Prlr KO no mostraron un aumento estadísticamente significativo.



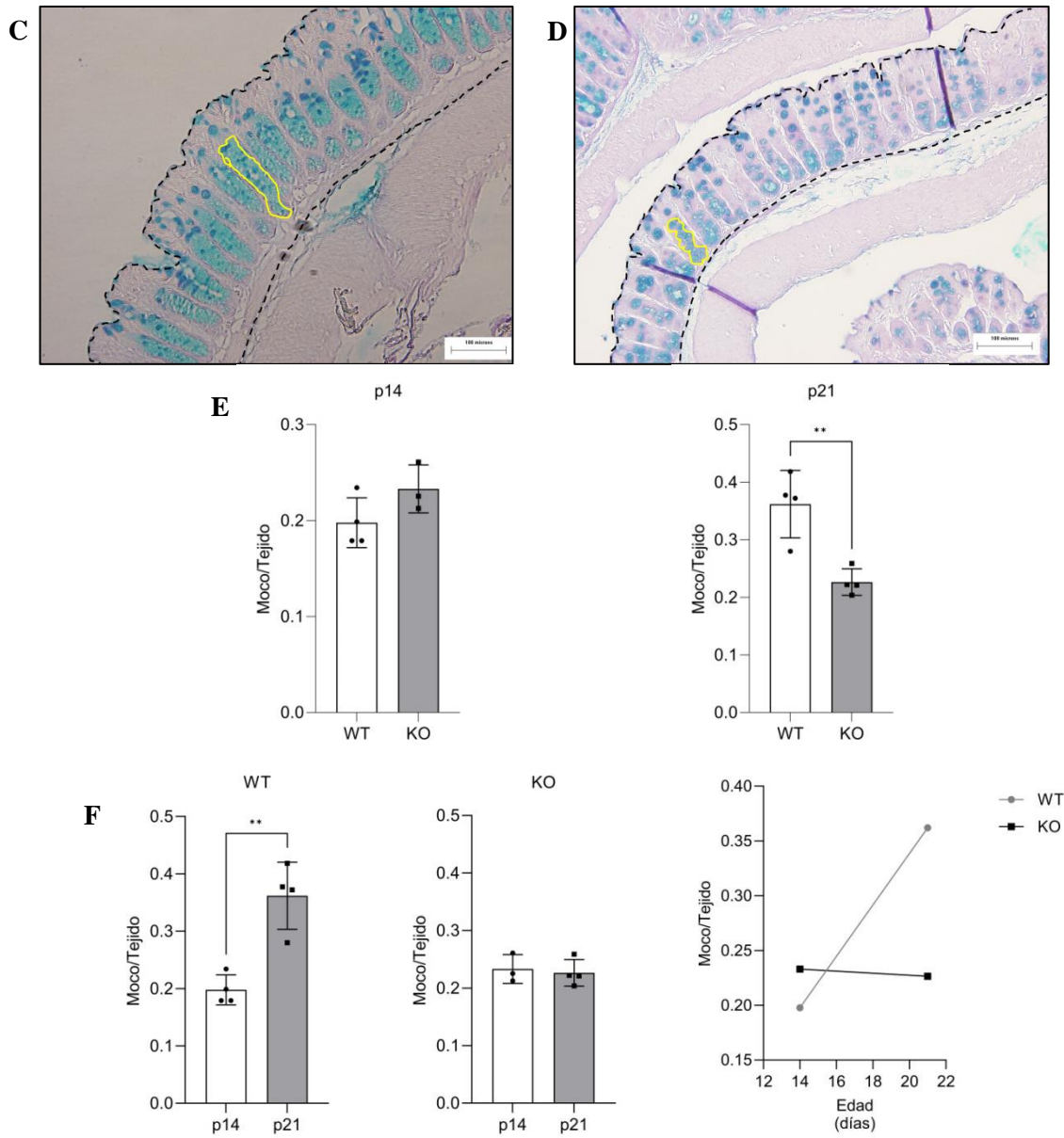


Figura 7. Análisis de la estructura de la barrera mucosa del colon durante la lactancia. Desarrollo de la barrera mucosa en cortes histológicos de colon teñidos con ácido peryódico-Schiff (PAS). A) Colon de ratón p14 Prlr-WT. B) Colon de ratón p14 Prlr-KO. C) Colon de ratón p21 Prlr-WT. D) Colon de ratón p21 Prlr-KO. E) Gráficas del desarrollo de la barrera mucosa en los grupos p14 ($p=0.1351$) y p21 ($** p=0.0131$). F) Gráficas de comparación por edad en cada genotipo Prlr-WT ($**p=0.006$) y Prlr-KO ($p=0.73$). Barra de escala: 100 μm . La línea punteada limita el tejido cuantificado; la línea amarilla limita el área de moco teñido en color azul.

7.4 Evaluación de la Expresión de Genes Asociados a la Diferenciación y Función Celular

7.4.1 Evaluación la Expresión de Genes Asociadas a la Diferenciación Celular

Para determinar el efecto de la prolactina en el destino celular del epitelio colónico, se evaluó mediante RT-qPCR la expresión de *Atoh1* en el colon de los ratones Prlr-KO y se comparó con los ratones silvestres a los 14 y 21 días posteriores al nacimiento (p14 y p21). Los datos se expresan en veces de cambio usando el promedio de Prlr-WT p14 como punto de comparación a la edad de p14 y en veces de cambio por edades en Prlr-WT. El promedio de p14 Prlr-KO se usó para veces de cambio para por edades en Prlr-KO (Figura 8).

La expresión promedio de *Atoh1* a los 14 días fue de 4.51 y 5.29, en ratones silvestres y Prlr-KO respectivamente, con un valor de $p=0.24$. A los 21 días después del nacimiento la expresión promedio de *Atoh1* fue 5.24 en Prlr-WT y 5.88 en Prlr-KO, el valor de $p=0.71$. Los resultados de estos análisis mostraron que no hubo diferencias significativas en la expresión de *Atoh1* entre los ratones Prlr-KO y Prlr-WT en ambas edades. Al comparar la expresión de *Atoh1* en p14 y p21 para cada genotipo se encontró un valor de $p=0.49$ en los ratones silvestres y $p=0.71$ en ratones nulos para el receptor de PRL.

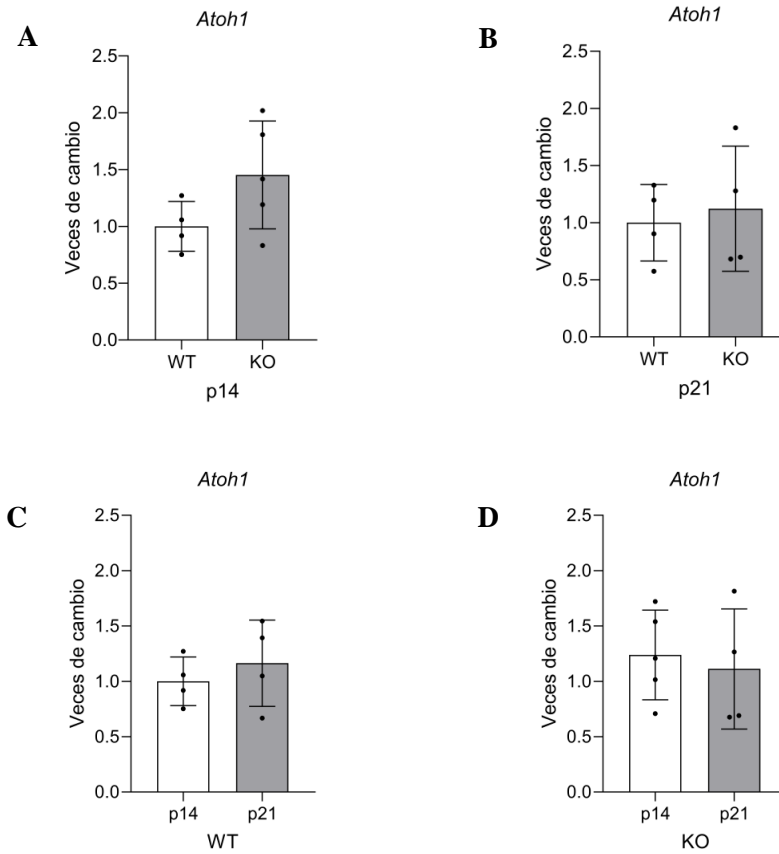


Figura 8. Expresión de genes asociados a la diferenciación celular. Comparación de la expresión de *Atoh1* en veces de cambio. A) p14 ($p=0.107$), B) p21 ($p=0.719$), C) Prlr-WT ($p=0.49$) por edad y D) Prlr-KO ($p=0.71$) por edad. Los datos se presentan con la media \pm DE.

7.4.2 Evaluación de la Expresión de Genes Asociados a la Función Celular.

La función principal de las células de Goblet es la biosíntesis y secreción de mucina. Para determinar el impacto de la ausencia del PRLR en la expresión de mucina en las GC, se evaluó mediante qPCR la expresión de *Muc2* en el colon de ratones con carentes del receptor de prolactina (Prlr-KO) y se comparó con la expresión en ratones silvestre a las edades de 14 y 21 días. Los datos se expresan en veces de cambio usando el promedio de Prlr-WT p14 como punto de comparación a la edad de p14 y p21, en veces de cambio por edades en Prlr-WT. El promedio de p14 Prlr-KO se usó para veces de cambio por edades en Prlr-KO.

Los resultados muestran que la expresión de *Muc2* entre los ratones Prlr-KO y los ratones Prlr-WT en ambas edades evaluadas (14 y 21 días) presenta un comportamiento similar, sin mostrar cambios significativos. Al analizar la expresión de mucina a lo largo del tiempo, comparando los resultados a los 14 días contra los resultados a los 21 días se observó un incremento significativo en la expresión de *Muc2* tanto en el modelo silvestre como en el modelo Prlr-KO con valores de $p=0.009$ en Prlr-WT y $p=0.04$ en ratones Prlr-KO (Figura 9).

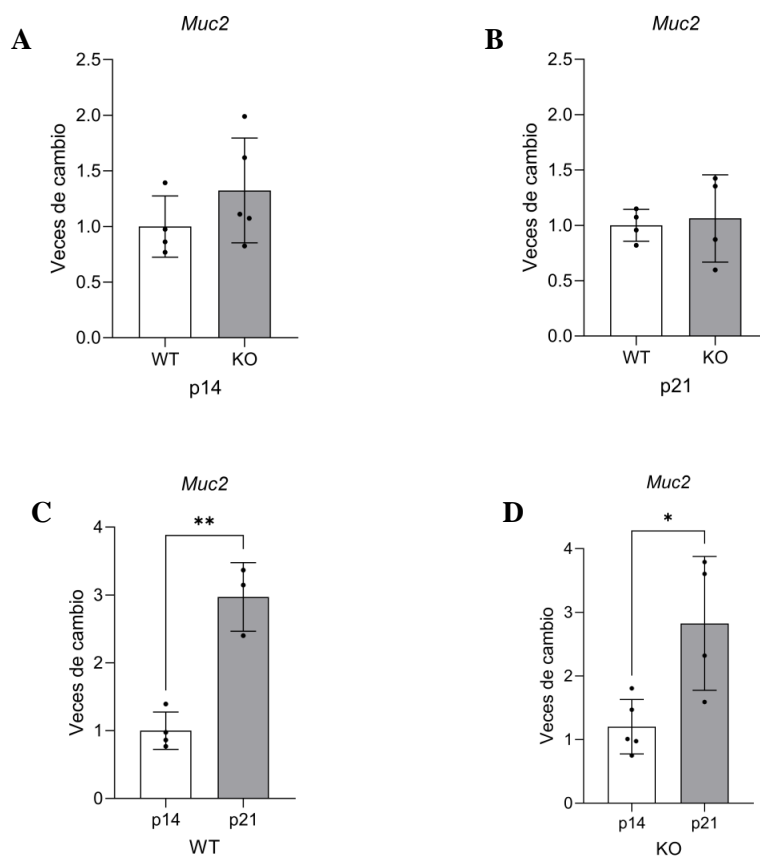


Figura 9. Evaluación de la expresión de genes asociados a la función celular. Comparación de la expresión *Muc2* en veces de cambio. A) p14 ($p=0.24$), B) p21 ($p=0.78$), C) Prlr-WT por edad ($**p=0.009$) y D) Prlr-KO ($*p=0.04$) por edad. Los datos se presentan con la media \pm DE.

8 Discusión

Los análisis morfológicos realizados muestran que la estructura de las criptas de colon no se ve alterada por la ausencia del PRLR durante la lactancia. La profundidad de las criptas fue similar entre los ratones Prlr-KO y los silvestres, indicando que la prolactina no tiene un efecto significativo en el desarrollo estructural del epitelio del colon en esta etapa del desarrollo. Este resultado sugiere que, aunque la prolactina ha sido vinculada al desarrollo de otros tejidos, como el páncreas o el tejido adiposo (Macotella y col., 2022), no participa de forma directa en la regulación de la arquitectura de las criptas durante la lactancia, específicamente en términos de la longitud de las criptas.

El número de GC se mantiene constante en los ratones Prlr-KO, al igual que en los ratones silvestres. Esto sugiere que la señalización de la prolactina a través de su receptor no afecta la diferenciación celular hacia el linaje secretor del epitelio de colon, al menos en la cantidad de GC. De igual forma, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *Atoh1*, un factor clave en la diferenciación hacia el linaje secretor. Esto puede sugerir que la proliferación y la diferenciación de células progenitoras hacia este linaje están reguladas por vías independientes a la señalización de la prolactina durante la lactancia.

Los resultados indican que PRL tiene un papel visible en la modulación de la barrera mucosa del colon, particularmente al final de la lactancia. Se encontró que los ratones Prlr-KO no muestran el incremento en la producción de moco que se presenta típicamente en los ratones silvestres a los 21 días de edad. Lo cual sugiere que la señalización del PRLR es necesaria para el desarrollo adecuado de la barrera mucosa en esta etapa crítica de la transición hacia la alimentación sólida. La producción de moco, cuya estructura depende principalmente de mucina 2 (*Muc 2*), es esencial para la protección del epitelio colónico y regular la interacción con la microbiota, un proceso que parece depender de la prolactina en etapas finales de la lactancia.

Al comparar la expresión de *Muc2* en ratones Prlr-KO y Prlr-WT por edad, se encontró que no hay diferencias significativas, lo que sugiere que la señalización del PRLR no es esencial para este proceso en términos de regulación génica basal. Sin embargo, al

analizar la expresión de *Muc2* durante los días 14 y 21, tanto en los ratones Prlr-KO y en los ratones silvestres se encontró un incremento significativo de la expresión. El incremento de la expresión de *Muc2* a los 21 días coincide con la transición hacia la alimentación sólida así como una mayor interacción del epitelio intestinal con la microbiota. Estudios previos han demostrado que la expresión de *Muc2* está influenciada por factores como el contacto con componentes bacterianos y la señalización de citoquinas derivadas del sistema inmune (Gustafsson y Johansson, 2022).

En los ratones Prlr-KO, la ausencia del PRLR podría afectar aspectos funcionales del moco, como su estructura y composición, los cuales no dependen directamente de la expresión de *Muc2*. Esto podría predisponer a estos ratones a una mayor vulnerabilidad intestinal frente a enfermedades crónicas no transmisibles. Además, la falta de señalización del PRLR se ha relacionado con enfermedades como la resistencia a la insulina y la obesidad durante el periodo de destete (Luzardo-Ocampo y col., 2023).

9 Conclusiones

Los resultados de este estudio muestran que, aunque la PRL presente en la leche materna no tiene un papel significativo en la estructura de la cripta o en la proliferación y diferenciación de las células del colon hacia el linaje de secreción mediada por *Atoh1*, sí tiene participación en la función primordial de las células de Goblet, es decir, en la formación de la barrera mucosa.

La hipótesis planteada en este estudio proponía que la falta de señalización del receptor de prolactina altera la función de las células de Goblet del colon, comprometiendo la correcta formación de la barrera mucosa. Los resultados muestran que la ausencia de la señalización del PRLR afectó la presencia de moco en las criptas de colon, un componente esencial en la protección física, química y biológica del epitelio. Aunque no se observaron diferencias significativas en la expresión génica basal de *Muc2*, la estructura de la barrera mucosa parece estar comprometida en los ratones Prlr-KO.

Esta investigación señala la importancia de la señalización de PRL en la función de las GC durante la lactancia, especialmente al final de la lactancia, cuando el organismo se prepara para la transición alimentaria y la interacción creciente con la microbiota. Estos hallazgos abren nuevas líneas de investigación para comprender cómo la PRL modula la formación de la barrera mucosa del colon y cómo podría influir en la salud intestinal a largo plazo, particularmente en relación con la microbiota y su papel en enfermedades metabólicas e inflamatorias.

10 Referencias

Al-Chalabi, M., Bass, A. N., Als Salman, I. (2023). Physiology, Prolactin. In StatPearls. StatPearls Publishing.

Ambort, D., Johansson, M. E., Gustafsson, J. K., Nilsson, H. E., Ermund, A., Johansson, B. R., Koeck, P. J., Hebert, H., Hansson, G. C. (2012). Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5645–5650. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120269109>

Azzouz LL, Sharma S. Physiology, Large Intestine. [Updated 2023 Jul 31]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507857/>

Bäckhed, F.; Roswall, J.; Peng, Y.; Feng, Q.; Jia, H.; Kovatcheva-Datchary, P.; Li, Y.; Xia, Y.; Xie, H.; Zhong, H.; y col. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 2015, 17, 690–703

Bassotti, G., Battaglia, E. (2015). Physiology of the Colon. In: Ratto, C., Parrello, A., Dionisi, L., Litta, F. (eds) *Coloproctology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10154-5_7-1

Bautista, C. J., Montañó, S., Ramirez, V., Morales, A., Nathanielsz, P. W., Bobadilla, N. A., Zambrano, E. (2016). Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. *British Journal of Nutrition*, 115(3), 538–546. doi:10.1017/S0007114515004547

Bergstrom, K. S., Xia, L. (2013). Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis. *Glycobiology*, 23(9), 1026–1037. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt045>

Bernard, V., Young, J. Binart, N. (2019). Prolactin — a pleiotropic factor in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 15, 356–365. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0194-6>

Birchenoug, G. M. H., Johansson, M. EV., Gustafsson, J. K., Bergström, J. H., Hansson, G. C., (2015), New developments in goblet cell mucus secretion and function, *Mucosal Immunology* 8 (4) 712-719.

Borba, V. V., Zandman-Goddard, G., Shoenfeld, Y. (2019). Prolactin and autoimmunity: The hormone as an inflammatory cytokine. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 33(6), 101324.
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.101324>

Brown, R. S. E., Aoki, M., Ladyman, S. R., Phillipps, H. R., Wyatt, A., Boehm, U., Grattan, D. R. (2017). Prolactin action in the medial preoptic area is necessary for postpartum maternal nursing behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(40), 10779–10784.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1708025114>

Cheng, P. W., Radhakrishnan, P. (2011). Mucin O-glycan branching enzymes: structure, function, and gene regulation. *Advances in experimental medicine and biology*, 705, 465–492. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7877-6_25

Costa-Brito, A. R., Gonçalves, I., Santos, C. R. A. (2022). The brain as a source and a target of prolactin in mammals. *Neural regeneration research*, 17(8), 1695–1702.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.332124>

de los Ríos Arellano, E. A. (2018a). Efectos de la prolactina proveniente de la leche materna en la prevención de obesidad y alteraciones metabólicas en las. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Neurobiología].
https://repositorio.unam.mx/contenidos/efectos-de-la-prolactina-proveniente-de-la-leche-materna-en-la-prevencion-de-obesidad-y-alteraciones-metabolicas-en-la-90525?c=48GbEr&d=false&q=*&i=1&v=1&t=search_0&as=2

de Los Ríos, E. A., Ruiz-Herrera, X., Tinoco-Pantoja, V., López-Barrera, F., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., Macotela, Y. (2018b). Impaired prolactin actions mediate altered offspring metabolism induced by maternal high-fat feeding during lactation.

FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 32(6), 3457–3470. <https://doi.org/10.1096/fj.201701154R>

DelGiorno, K. E., Naeem, R. F., Fang, L., Chung, C. Y., Ramos, C., Luhtala, N., O'Connor, C., Hunter, T., Manor, U., Wahl, G. M. (2020). Tuft Cell Formation Reflects Epithelial Plasticity in Pancreatic Injury: Implications for Modeling Human Pancreatitis. *Frontiers in physiology*, 11, 88. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00088>

Dobolyi, A., Oláh, S., Keller, D., Kumari, R., Fazekas, E. A., Csikós, V., Renner, É., Cservenák, M. (2020). Secretion and Function of Pituitary Prolactin in Evolutionary Perspective. *Frontiers in neuroscience*, 14, 621. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00621>

Engevik, M. A., Luk, B., Chang-Graham, A. L., Hall, A., Herrmann, B., Ruan, W., Endres, B. T., Shi, Z., Garey, K. W., Hyser, J. M., Versalovic, J. (2019). *Bifidobacterium dentium* Fortifies the Intestinal Mucus Layer via Autophagy and Calcium Signaling Pathways. *mBio*, 10(3), e01087-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01087-19>

Gerbe, F., Legraverend, C., Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 69(17), 2907–2917. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0984-7>

Gonnella, P. A., Harmatz, P., Walker, W. A. (1989). Prolactin is transported across the epithelium of the jejunum and ileum of the suckling rat. *Journal of Cellular Physiology*, 140(1), 138-149. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041400117>

Gustafsson, J. K., & Johansson, M. E. V. (2022). The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 19(12), 785–803. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00675-x>

Hahn-Holbrook, J., Saxbe, D., Bixby, C. y col., (2019), Human milk as “chrononutrition”: implications for child health and development. *Pediatr Res* 85, 936–942. <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0368-x>

Ismail, M. N., Stone, E. L., Panico, M., Lee, S. H., Luu, Y., Ramirez, K., Ho, S. B., Fukuda, M., Marth, J. D., Haslam, S. M., Dell, A. (2011). High-sensitivity O-glycomic analysis of mice deficient in core 2 {beta}1,6-N-acetylglucosaminyltransferases. *Glycobiology*, 21(1), 82–98. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq134>

Johansson, M. E., Hansson, G. C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature reviews. Immunology*, 16(10), 639–649. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.88>

Kanematsu, S. (1980). Crop sac stimulation after electrochemical stimulation of the brain in the pigeon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 42, 212–218. doi: 10.1016/0016-6480(80)90190-2

Kikuyama, S., Hasunuma, I., Okada, R. (2021). Development of the hypothalamo-hypophyseal system in amphibians with special reference to metamorphosis. *Molecular and cellular endocrinology*, 524, 111143. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111143>

Kim Y. S., Ho S. B. (2010). Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010; 12(5): 319–330. Published online 2010 Aug 13. doi: 10.1007/s11894-010-0131-2

Lindén, S. K., Florin, T. H., McGuckin, M. A. (2008). Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PloS one*, 3(12), e3952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003952>

Litvak, Y., Byndloss, M. X., Bäumlér, A. J. (2018). Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6418), eaat9076. <https://doi.org/10.1126/science.aat9076>

Luis, A. S., Hansson, G. C., (2023) Intestinal mucus and their glycans: A habitat for thriving microbiota. *Cell Host Microbe* 31 (7): 1087-1100. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.05.026>

Luzardo-Ocampo I., Ocampo-Ruiz A.L., Dena-Beltrán J.L., Martínez de la Escalera G., Clapp C., Macotela Y. (2023), The Diversity of Gut Microbiota at Weaning Is Altered

in Prolactin Receptor-Null Mice. *Nutrients*. 2023; 15(15):3447.

<https://doi.org/10.3390/nu15153447>

Macotela, Y., Ruiz-Herrera, X., Vázquez-Carrillo, D. I., Ramírez-Hernandez, G., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C. (2022). The beneficial metabolic actions of prolactin. *Frontiers in endocrinology*, 13, 1001703.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1001703>

Magnus H. A. (1937). Observations on the presence of intestinal epithelium in the gastric mucosa. *The Journal of Pathology and Bacteriology*.;44(2):389–398.

McCauley H. A., Guasch G. (2015). Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia. *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Ltd 21(8) 492-503, 2015 <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.06.003>

Melhem, H., Regan-Komito, D., Niess, J. H. (2021). Mucins Dynamics in Physiological and Pathological Conditions. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13642. <https://doi.org/10.3390/ijms222413642>

Méndez I., Cariño C., Díaz L. (2005). La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos. *Revista de investigación clínica*, 57(3), 447-456. de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762005000300009&lng=es&tlng=es

Muralidhar, K., & Lee, J. (2013). Prolactin and angiogenesis: Biological implications of microheterogeneity. In G. M. Nagy & B. E. Toth (Eds.), *Prolactin*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/54318>

Noah, T. K., Donahue, B., Shroyer, N. F. (2011). Intestinal development and differentiation. *Experimental cell research*, 317(19), 2702–2710. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.09.006>

Ocampo Daza, D., & Larhammar, D. (2018). Evolution of the growth hormone, prolactin, prolactin 2 and somatolactin family. *General and comparative endocrinology*, 264, 94–112. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.01.007>

Organización Panamericana de la Salud. (2024). Lactancia materna y alimentación complementaria. <https://www.paho.org/es/temas/lactancia-materna-alimentacion-complementaria>

Ouhtit, A., Kelly, P. A., Morel, G. (1994). Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rat digestive tissues. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 266(5), G807-G816.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.1994.266.5.G807>

Paone, P., Cani, P. D. (2020). Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut*, 69(12), 2232–2243. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322260>

Phillipps, H. R., Yip, S. H., Grattan, D. R. (2020). Patterns of prolactin secretion. *Molecular and cellular endocrinology*, 502, 110679.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110679>

Royle, N. J., Russell, A. F., Wilson, A. J. (2014). La evolución de la crianza flexible. *Science (Nueva York, N.Y.)*, 345(6198), 776–781.
<https://doi.org/10.1126/science.1253294>

Sang, X., Wang, Q., Ning, Y., Wang, H., Zhang, R., Li, Y., Fang, B., Lv, C., Zhang, Y., Wang, X., Ren, F. (2023). Age-Related Mucus Barrier Dysfunction in Mice Is Related to the Changes in Muc2 Mucin in the Colon. *Nutrients*, 15(8), 1830.
<https://doi.org/10.3390/nu15081830>

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (1999). NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación*.

Smiley, K. O. Adkins-Regan, E. (2016). Relationship between prolactin, reproductive experience, and parental care in a biparental songbird, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *General and comparative endocrinology*, 232, 17–24.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.11.012>

- Sprangers, J., Zaalberg, I.C. Maurice, M.M. (2021). Organoid-based modeling of intestinal development, regeneration, and repair. *Cell Death Differ* 28, 95–107
<https://doi.org/10.1038/s41418-020-00665-z>
- Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., Juge, N. (2015). Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Frontiers in genetics*, 6, 81.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00081>
- Takahashi, T., Shiraishi, A. (2020). Stem Cell Signaling Pathways in the Small Intestine. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2032.
<https://doi.org/10.3390/ijms21062032>
- Takei, Y., Hiroi, J., Takahashi, H., Sakamoto, T. (2014). Diverse mechanisms for body fluid regulation in teleost fishes. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 307(7), R778–R792.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00104.2014>
- UNICEF. Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia, (s.f.). Lactancia materna. UNICEF México. Recuperado el 09 de Octubre del 2024 de
<https://www.unicef.org/mexico/lactancia-materna>
- Wan, X. P., Xie, P., Bu, Z., Zou, X. T., Gong, D. Q. (2019). Prolactin induces lipid synthesis of organ-cultured pigeon crops. *Poultry science*, 98(4), 1842–1853.
- Yang, S., Yu, M. (2021). Role of Goblet Cells in Intestinal Barrier and Mucosal Immunity. *Journal of inflammation research*, 14, 3171–3183.
<https://doi.org/10.2147/JIR.S318327>