



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
Instituto de Neurobiología
NEUROBIOLOGÍA

ACCIONES DE LA PROLACTINA DE LA LECHE EN EL INTESTINO DE CRÍAS
LACTANTES

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO (A) EN CIENCIAS

PRESENTA:
ARELI BÁEZ MEZA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN
INB, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. LUIS ALBERTO TELLEZ LIMA. INB, UNAM
DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS. INMEGEN

Querétaro, Queretaro. Junio 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE	
AGRADECIMIENTOS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
ANTECEDENTES	10
LA LECHE MATERNA	10
EL TRACTO GASTROINTESTINAL	11
PROLACTINA (PRL)	15
JUSTIFICACIÓN	18
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	18
OBJETIVOS	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS	19
Modelos animales	19
Obtención de intestinos	19
Histología	20
Inmunohistoquímica	20
Inmunofluorescencia	20
Explantes intestinales	21
Extracción de RNA y qPCR	21
Medición de PRL sérica	23
Western Blot	23
Análisis estadísticos	24
RESULTADOS	25
El receptor de prolactina se encuentra en el intestino de las crías lactantes	25
La prolactina de la leche materna pasa a la circulación de crías de 12 días de edad	26

La prolactina de la leche materna se internaliza en las vellosidades del intestino.	28
STAT5 parece encontrarse fosforilado en el duodeno después de 35 minutos de ingesta de leche materna.	29
La prolactina aumenta la expresión de genes de función intestinal en el duodeno de ratas lactantes.	30
-Genes de permeabilidad intestinal: Claudina 2 y Ocludina	30
-Genes de función enteroendócrina	33
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
APÉNDICE 1 : CITOARQUITECTURA DEL INTESTINO DELGADO	41
APÉNDICE 2: DESARROLLO EMBRIONARIO Y POSTNATAL DEL INTESTINO DELGADO EN ROEDORES	42
BIBLIOGRAFÍA	43

FIG. 1 DIVISIÓN DEL INTESTINO DELGADO EN TRES SECCIONES PRINCIPALES.	11
FIG. 2 MECANISMOS PROPUESTOS DE LA ACCIÓN DE LA PROLACTINA EN EL LUMEN DEL INTESTINO DELGADO DE CRÍAS DE RATA.	17
FIG. 3 A) INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC) CONTRA EL RECEPTOR DE PROLACTINA EN LAS DIFERENTES ZONAS DEL INTESTINO DELGADO DE CRÍAS EN EDAD P12. EN CAFÉ SE MUESTRA LA SEÑAL POSITIVA DEL RECEPTOR DE PROLACTINA LOCALIZADO EN LA MEMBRANA DE LOS ENTEROCITOS. FOTOGRAFÍAS TOMADAS CON UN OBJETIVO DE 20X. NEGATIVO: IHC SIN ANTICUERPO PRIMARIO; RECEPTOR DE PRL: CON ANTICUERPO PRIMARIO 20X: ACERCAMIENTO A ZOOM DE 20X. FLECHAS ROJAS: SEÑAL POSITIVA DEL RECEPTOR DE PRL EN LAS VELLOSIDADES. B) DENSIDAD ÓPTICA DE LA SEÑAL POSITIVA AL RECEPTOR DE PROLACTINA EN CORTES HISTOLÓGICOS DE LAS TRES SECCIONES DEL INTESTINO; SE MUESTRA EL PROMEDIO DE 4 CORTES INDEPENDIENTES POR SECCIÓN MÁS EL ERROR ESTÁNDAR.	26
FIG. 4 A) NIVELES DE PRL SERICA EN CRÍAS LACTANTES DE 12 DÍAS DE EDAD CUANTIFICADOS MEDIANTE ELISA. SE OBSERVA UN INCREMENTO COMPARADO CON EL GRUPO AMAMANTADO POR 30 MINUTOS Y EUTANASIADO 5 MINUTOS DESPUÉS COMPARADO CON EL RESTO DE GRUPOS EXPERIMENTALES (OPBS= PBS ORAL, OPRL= PROLACTINA ORAL, 30'+ 5'= AMAMANTADOS 30 MINUTOS Y EUTANASIADOS 5 MINUTOS DESPUÉS, 30'+ 45'= AMAMANTADOS 30 MINUTOS Y EUTANASIADOS 45 MINUTOS DESPUÉS). SE REPORTAN PROMEDIO+ERROR ESTANDAR. P<0.05 N=8 ANIMALES POR GRUPO. B) EXPRESIÓN DE PRL EN HIPÓFISIS (CONTROL POSITIVO) DUODENO, YEYUNO E ÍLEON DE CRÍAS DE 12 DÍAS DE EDAD; NO SE DETECTÓ EXPRESIÓN DE PRL EN LAS DIFERENTES SECCIONES DEL INTESTINO(N.D). SE REPORTA EL PROMEDIO+ERROR ESTÁNDAR.(N= 5 ANIMALES POR GRUPO).	27
FIG. 5 INMUNOFLUORESCENCIA CONTRA EL RECEPTOR DE PROLACTINA Y PROLACTINA EN LAS DIFERENTES ZONAS DEL INTESTINO DELGADO DE CRÍAS EN EDAD P12. EN VERDE SE MUESTRA LA SEÑAL POSITIVA DEL RECEPTOR DE PROLACTINA (PRLR); EN ROJO SE MUESTRA LA SEÑAL POSITIVA DE LA PROLACTINA(PRL) LOCALIZADA DENTRO DE LAS VELLOSIDADES. FOTOGRAFÍAS TOMADAS CON UN OBJETIVO DE 25X. NEGATIVO: INMUNOFLUORESCENCIA SIN ANTICUERPO PRIMARIO; POSITIVO: CON ANTICUERPO PRIMARIO.MERGE: EMPALME DE SEÑAL DE PRL+ PRLR. ZOOM: ACERCAMIENTO AL 250% DEL MERGE. FLECHAS BLANCAS: LA SEÑAL DE LA PRL EN LA PERIFERIA DE LAS VELLOSIDADES.	29
FIG. 6 DETERMINACIÓN DE P-STAT5 EN DUODENO DE CRÍAS LACTANTES DE 12 DÍAS DE EDAD. A) WESTERN BLOT DE EXTRACTO DE PROTEINAS DE DUODENO DE CRÍAS LACTANTES, TRATADOS CON PBS ORAL, PRL ORAL, AMAMANTADOS 30 MINUTOS Y EUTANASIADOS 5 MINUTOS DESPUÉS (30'+5') Y AMAMANTADOS 30 MINUTOS Y EUTANASIADOS 45 MINUTOS DESPUÉS (30'+45'); PANEL SUPERIOR: STAT5 TOTAL; PANEL INTERMEDIO: STAT5 FOSFORILADO; PANEL INFERIOR: β-TUBULINA (CONTROL) SE MUESTRAN 2 ANIMALES INDEPENDIENTES POR GRUPO EXPERIMENTAL. B) CUANTIFICACIÓN DE LA DENSIDAD DEL WESTERN BLOT; SE MUESTRA EL PROMEDIO DE 2 ANIMALES INDEPENDIENTES POR GRUPO EXPERIMENTAL.	30
FIG. 7 EXPRESIÓN DE GENES DE UNIONES ESTRECHAS EN EXPLANTES DE INTESTINO DE CRÍAS DE 10 DÍAS DE EDAD TRATADOS CON 21.7 NM DE PRL. SE OBSERVA UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE CLAUDINA 2 (CLDN2) Y OCLUDINA (OCLDN) EN DUODENO TRAS EL TRATAMIENTO CON PRL (GRAFICAS EN BLANCO Y NEGRO). SE NORMALIZÓ CONTRA DUODENO PARA DETERMINAR VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES A LO LARGO DE LOS TRES SEGMENTOS DEL INTESTINO DELGADO, SE OBSERVÓ QUE HAY UNA MAYOR EXPRESIÓN DE CLDN2 Y OCLDN EN EL ÍLEON COMPARADO CON DUODENO Y YEYUNO (GRAFICAS EN COLORES) (* P<0.05 ** P<0.01 ; PROMEDIO ± ERROR ESTÁNDAR, N=8 POR GRUPO)	32
FIG. 8 EXPRESIÓN DE GENES DE ENZIMAS INTESTINALES EN INTESTINO DE CRÍAS DE 10 DÍAS DE EDAD TRATADOS CON 21.7 NM DE PRL. SE OBSERVA UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE LACTASA (LCT)) EN DUODENO TRAS EL TRATAMIENTO CON PRL (GRAFICAS EN BLANCO Y NEGRO). SE NORMALIZÓ CONTRA DUODENO PARA DETERMINAR VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES A LO LARGO DE LOS TRES SEGMENTOS DEL INTESTINO DELGADO, SE OBSERVÓ QUE HAY UNA MAYOR EXPRESIÓN DE LCT EN EL ÍLEON COMPARADO CON DUODENO Y YEYUNO, MIENTRAS QUE SE OBSERVÓ UNA MAYOR EXPRESIÓN DE SACARASA-ISOMALTASA (SI) EN YEYUNO EN COMPARACIÓN DEL DUODENO E ÍLEON (GRAFICAS EN COLORES) (* P<0.05 ** P<0.01****P<0.00001 ; PROMEDIO ± ERROR ESTÁNDAR, N=8 POR GRUPO)	34
FIG. 9 EXPRESIÓN DE GENES DE HORMONAS INTESTINALES EN EXPLANTES DE INTESTINO DE CRÍAS DE 10 DÍAS DE EDAD TRATADOS CON 21.7 NM DE PRL. SE OBSERVA UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE	

COLECISTOQUININA (CCK) EN DUODENO TRAS EL TRATAMIENTO CON PRL (GRAFICAS EN BLANCO Y NEGRO), ADEMÁS DE UN AUMENTO DE EXPRESIÓN DE PÉPTIDO INHIBIDOR GÁSTRICO (GIP) EN DUODENO E ÍLEON TRAS EL TRATAMIENTO CON PRL, MIENTRAS QUE SE OBSERVÓ UNA DISMINUCIÓN EN YEYUNO. SE NORMALIZÓ CONTRA DUODENO PARA DETERMINAR VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES A LO LARGO DE LOS TRES SEGMENTOS DEL INTESTINO DELGADO, SE OBSERVÓ QUE HAY UNA MAYOR EXPRESIÓN DE GCG EN EL ÍLEON COMPARADO CON DUODENO Y YEYUNO Y DE GIP EN YEYUNO COMPARADO CON DUODENO E ÍLEON (GRAFICAS EN COLORES) (* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; PROMEDIO \pm ERROR ESTÁNDAR, N=8 POR GRUPO) 35

FIG. 10 ACCIONES DE LA PROLACTINA DE LA LECHE EN EL INTESTINO DE CRÍAS. LA PROLACTINA DE LA LECHE LLEGA AL INTESTINO DE LAS CRÍAS (1) DONDE SE LOCALIZA EN LAS VELLOSIDADES DE LAS DIFERENTES REGIONES DEL INTESTINO, ADEMÁS ESTA SE ENCUENTRA EN LA CIRCULACIÓN DE LAS CRÍAS SIENDO ASÍ LA LECHE MATERNA LA PRINCIPAL FUENTE DE PROLACTINA CIRCULANTE EN EL SUERO DE CRÍAS DURANTE LAS PRIMERAS DOS SEMANAS POSTNATALES. POR SU PARTE, LA PROLACTINA TIENE EFECTOS EN EL INTESTINO (2) YA QUE ACTIVA VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y REGULA LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA PERMEABILIDAD INTESTINAL Y LA FUNCIÓN ENTEROENDÓCRINA. 40

TABLA 1 TIEMPOS Y TEMPERATURAS DE CICLOS DE RETROTRANSCRIPCIÓN.....	22
TABLA 2 SECUENCIA DE OLIGONUCLÉOTIDOS PARA GENES DE PERMEABILIDAD Y FUNCIÓN INTESTINAL UTILIZADOS PARA QPCR.	23
TABLA 3. PESO DEL ESTÓMAGO Y PESO CORPORAL DE CRÍAS DE RATA EN EDAD P12 DESPUÉS DE 6 HORAS DE AYUNO Y DESPUÉS DE 30 MINUTOS DE AMAMANTAMIENTO (PROMEDIO ± ERROR ESTANDAR).	26

A mis papás, mis pilares más fuertes, por sus palabras de aliento en todo momento, por estar a mi lado en cada paso que doy, por creer en mi, por nunca soltarme.

A la Dra. Yazmín, por la confianza durante todo el camino, por los consejos y la motivación a seguir cuando las cosas no iban bien.

Agradecimientos

La presente tesis fue posible gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológicas (PAPIIT) apoyos IN207321 e IN209518 y al apoyo de cada uno de los encargados de las diversas áreas del Instituto de Neurobiología.

Mi agradecimiento por la asistencia técnica en el bioterio al MVZ. José Martín García Servín y a las Dras. Alejandra Castilla León y María A. Carbajo Mata.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y a la Dra. Ericka Alejandra de los Ríos Arellano por el apoyo y asesoría en microscopía.

A la Dra. Xarubet Ruiz Herrera y el Nut. Fernando López Barrera quienes fungieron como parte medular del desarrollo experimental, así como a Daniel Mondragón y Antonio Prado por la asistencia técnica.

Resumen

La leche materna aporta múltiples beneficios en el desarrollo de la cría gracias a la composición de esta; además de los tres macronutrientes, la leche cuenta en su composición con hormonas como la prolactina. Se ha observado que, en condiciones de obesidad, la leche materna tiene menor concentración de prolactina y que las crías alimentadas con esta leche presentan alteraciones metabólicas y tras la restitución de prolactina ya sea directamente en las madres o en las crías en una dieta alta en grasa, estas alteraciones metabólicas se revierten. A pesar de demostrar que la prolactina materna tiene efectos sobre el metabolismo de las crías, los blancos tisulares en los que se llevan a cabo estos efectos se desconocen; nuestros resultados demuestran que la prolactina de la leche materna se encuentra en la circulación de la cría 5 minutos después de haber sido amamantadas, además de que se encontró la presencia de prolactina materna en las vellosidades del intestino delgado. Por otro lado, se observó que la prolactina aumenta la expresión de genes de permeabilidad y función intestinal en el duodeno de crías lactantes de 10 días de edad y pareciera activar la vía de señalización de Stat5. En conjunto, estos resultados demuestran que la principal fuente de prolactina en las crías de rata es la proveniente de la leche materna y sugieren que la prolactina ejerce sus efectos regulando la permeabilidad y función intestinal durante las primeras etapas del desarrollo.

Abstract

Breast milk provides multiple benefits in the development of the offspring thanks to its composition; in addition to the three macronutrients, milk contains hormones such as prolactin in its composition. It has been observed that in conditions of obesity, breast milk has a lower concentration of prolactin and that the offspring fed with this milk present metabolic alterations and after the restitution of prolactin either directly in the mothers or in the offspring in a high-fat diet, these metabolic alterations are reversed. In spite of demonstrating that maternal prolactin has effects on the metabolism of the offspring, the tissue targets in which these effects are carried out are unknown; our results show that prolactin from maternal milk is found in the circulation of the offspring 5 minutes after being fed, besides the presence of maternal prolactin was found in the villi of the small intestine. On the other hand, it was observed that prolactin increases the expression of intestinal permeability and function genes in the duodenum of 10-day-old lactating pups and appears to activate the Stat5 signaling pathway. Taken together, these results demonstrate that the main source of prolactin in rat pups is from maternal milk and suggest that prolactin exerts its effects by regulating intestinal permeability and function during the early stages of development.

Antecedentes

LA LECHE MATERNA

La leche materna provee al infante con los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo durante los primeros meses de vida. La leche materna ayuda a prevenir el desarrollo de enfermedades infecciosas en la niñez y el desarrollo de sobrepeso, obesidad y diabetes mellitus a lo largo de la adolescencia y la adultez. Además, la lactancia temprana promueve la maduración del sistema inmune, favorece el desarrollo cognitivo del infante y la maduración del prematuro (Victoria et al., 2016).

La leche materna está compuesta por los tres macronutrientes principales; carbohidratos, grasas y proteínas. La lactosa es el principal carbohidrato presente en la leche materna, sin embargo, también se encuentran en ella diferentes oligosacáridos que, si bien no son digeridos por el infante, sí son una fuente importante de nutrientes para la microbiota intestinal. Los lípidos por su parte representan entre el 40-55% del aporte energético y el 98% de estos son triglicéridos, el resto son ácidos grasos de cadena corta necesarios para la maduración del tracto gastrointestinal. Por último, el contenido proteico de la leche puede dividirse en tres grupos: el suero, las caseínas y las mucinas, de estas últimas son de relevancia las inmunoglobulinas como IgA e IgG, además, dentro de las proteínas también encontramos algunas hormonas como la leptina, la insulina, la adiponectina y la prolactina (Andreas et al., 2015).

EL TRACTO GASTROINTESTINAL

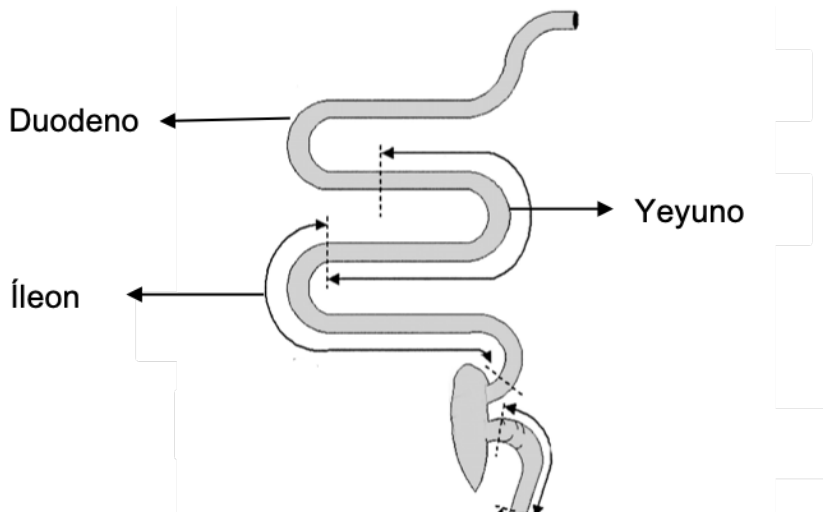


Fig. 1 División del intestino delgado en tres secciones principales.

Las funciones del intestino delgado son principalmente la digestión de los alimentos y la absorción de nutrientes provenientes de estos. Este órgano consta de tres regiones bien identificadas; en la parte más anterior, se distingue el duodeno, encargado de la degradación de los alimentos mediante la acción de enzimas secretadas tanto por el páncreas como por el hígado, mientras que en el yeyuno e íleon se absorben los nutrientes desde el lumen intestinal hacia la circulación sistémica (Walthall et al., 2005)(Figura 1). Histológicamente, el intestino delgado está compuesto por diversos tipos celulares que comprenden a los enterocitos, células caliciformes, células de Paneth y células enteroendócrinas, cada una efectuando un papel importante para el funcionamiento intestinal (Apéndice 1)

El desarrollo y maduración del intestino delgado es diferente entre especies e involucra la maduración de la mucosa intestinal. Este desarrollo y maduración conlleva dos fases en el periodo neonatal; la primera de ellas comprende la preparación del epitelio intestinal para recibir los nutrientes del calostro y de la leche materna, mientras que la segunda fase se relaciona con el cambio de las capacidades digestivas del intestino relacionados con el cambio de alimentación en el periodo de destete (Apéndice 2) (Kelly et al., 1992). Por su parte, la mucosa intestinal es producida por las células caliciformes del intestino que recubren el epitelio intestinal con una delgada capa que funciona

principalmente como barrera protectora contra microorganismos y otras sustancias nocivas que pueden dañar el epitelio, por otro lado, esta capa de mucosa es semipermeable, lo que permite el paso de gases, agua y nutrientes hasta las células epiteliales (Cornick et al., 2015).

Mientras que en humanos el intestino es completamente maduro al nacimiento, en ratas, esta maduración se da días después del nacimiento (Drozdowski et al., 2010). Durante los primeros días postnatales, las crías se alimentan primordialmente de leche materna, hasta los días 12 o 13 postnatal, después de los cuales empiezan a ingerir alimentos sólidos (Herbst & Sunshine, 1969). La inmadurez del intestino de las crías de rata se caracteriza por el retraso en el cierre de los espacios intercelulares de los enterocitos, lo que permite el paso de nutrientes, inmunoglobulinas y otras macromoléculas presentes en la leche materna (Teichberg et al., 1990). La absorción de macromoléculas en el intestino de los mamíferos altriciales se lleva a cabo mediante receptores (Arévalo Sureda et al., 2016);(Drozdowski et al., 2010), tal es el caso de la absorción de inmunoglobulinas a través de receptores Fc ubicados en las microvellosidades del yeyuno (Kelly et al., 1992), o por un sistema de transcitosis que involucra la presencia de vesículas y vacuolas en las células intestinales encargadas de la absorción (Teichberg et al., 1990). El mecanismo de transcitosis involucra la fusión de la membrana de la vacuola que transporta a las macromoléculas con la membrana basolateral de la célula y la exocitosis de su contenido al espacio intercelular (Kelly et al., 1992). Además, en esta etapa, las proteínas de gran tamaño pueden ser absorbidas en su forma biológicamente activa e íntegra gracias a que la leche contiene un número importante de inhibidores de proteasas (Kacsóh et al., 1993). Se ha demostrado que los inhibidores de proteasa no solo se encuentran presentes en la leche materna, sino también en la circulación de la cría; esto sugiere que los inhibidores se absorben igualmente en el intestino y permiten la estabilidad de los péptidos de la leche en la circulación y en otros órganos (Rao et al., 1993).

El intestino no solo cumple funciones en la digestión y absorción de nutrientes a partir de los alimentos, sino que también juega un importante rol en el sistema inmune

desde las primeras etapas de vida. Dentro de esta función, son de interés dos características del tracto gastrointestinal: a) la permeabilidad de la barrera intestinal y b) el Tejido Linfoide Asociado con el Intestino (GALT, por sus siglas en inglés).

La permeabilidad es la capacidad del tejido de realizar intercambio de moléculas entre un espacio y otro (S. H. Lee, 2015). La permeabilidad en el intestino depende de la integridad de la barrera intestinal, compuesta de dos factores principales, la mucosa intestinal y las uniones estrechas. Las uniones estrechas comprenden un grupo de proteínas que conectan las membranas de células adyacentes en sus lados apical y basolateral (Lu et al., 2013; Nusrat et al., 2000) por lo que regulan la permeabilidad al permitir o no el paso de los iones, nutrientes y agua entre células de forma selectiva; por su parte, la estrechez de la barrera está dada en función del número de proteínas y la complejidad de la red que se encuentra entre las células involucradas, además debe considerarse que la distribución de las uniones estrechas es dinámica a lo largo del intestino (Teichberg et al., 1990; Van Itallie & Anderson, 2006).

Las uniones estrechas comprenden cuatro grandes familias de proteínas: claudinas, ocludinas, moléculas de adhesión y tricelulina (S. H. Lee, 2015). A la fecha se han reportado alrededor de 24 tipos de claudinas diferentes en mamíferos (Van Itallie & Anderson, 2006) y su localización a lo largo del intestino determina una diferencia en la resistencia eléctrica transepitelial y por tanto la selectividad de iones de forma diferencial en las regiones del intestino. El desarrollo intestinal de los roedores está dado principalmente por el tipo de alimentación que llevan durante las primeras tres semanas, además, se ha reportado que el establecimiento de la microbiota intestinal promueve la maduración del intestino mediante el aumento de la expresión de Claudina-3 (Lu et al., 2013).

La regulación de la expresión, estructura y organización de las uniones estrechas está dada por diferentes estímulos ya sea fisiológicos o patológicos y están implicadas proteínas de diferentes vías de señalización como, Proteína Cinasa C (PKC), Proteínas Cinasas asociadas a mitógenos (MAPK) y la familia de las proteínas Rho. En las células epiteliales del intestino, se expresan diversas isoformas de PKC que se encuentran

directamente implicadas en la expresión de las uniones estrechas, ya que están relacionadas con el incremento o decremento de la resistencia eléctrica transepitelial y también están implicadas en la activación de los receptores tipo Toll-2 durante el reconocimiento de patógenos y procesos inflamatorios (Ulluwishewa et al., 2011).

Por otra parte, las células inmunes del intestino se encuentran alojadas dentro de tres estructuras: a) la lámina propia, b) la superficie del epitelio y c) el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Brandtzaeg, 2017). El GALT comprende a su vez diversas estructuras como las células M (células especializadas en la captación e internalización de antígenos), y las placas de Peyer, estructuras no encapsuladas y altamente especializadas que consisten en folículos linfoides contenedores de células B flanqueados por unas cuantas células T, estas placas son el principal sitio de síntesis de inmunoglobulinas A (Mowat & Agace, 2014; Pérez-Cano et al., 2005). Aunque la respuesta inmune se da a lo largo de las tres estructuras anteriormente mencionadas, el GALT es el sitio donde se induce una respuesta inmune; a pesar de que las placas de Peyer se encuentran presentes antes del nacimiento, su desarrollo y maduración se lleva a cabo en el periodo postnatal y se encuentra influenciado por la ingesta de leche materna y la colonización de la microbiota (Mowat & Agace, 2014). Se ha observado que durante esta etapa predominan las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ sobre los CD4+ y poca presencia de células B y que el cambio hacia una dieta sólida está acompañada de un cambio de la microbiota que coloniza el intestino, por lo tanto a la maduración del GALT y un cambio en las subpoblaciones de linfocitos en la edad adulta, donde predominan los linfocitos CD4+ sobre los CD8+ (Pérez-Cano et al., 2005).

Se ha sugerido que una disrupción en la barrera intestinal y variaciones en la composición de la microbiota están relacionadas con alteraciones en el metabolismo del individuo, mayormente en el desarrollo de la obesidad e intolerancia a la glucosa (Winer et al., 2016). Una característica de esta disfunción intestinal puede deberse a una alteración en la expresión y distribución de las uniones estrechas en el intestino delgado con la consecuente translocación de microorganismos patógenos hacia la circulación,

desencadenando inflamación sistémica derivada de la liberación de citosinas (Teixeira et al., 2012).

PROLACTINA (PRL)

Uno de los péptidos presentes en la leche materna es la prolactina, una hormona sintetizada por la adenohipófisis y secretada a la circulación, no obstante, también puede ser sintetizada de forma extrahipofisiaria por otros órganos. Asimismo, tanto la leche materna como el suero de las crías lactantes presentan diversas variantes biológicamente activas de la prolactina, además de que se encuentran más formas bioactivas que inmunoreactivas en la leche y en la circulación de la cría mas no en la hipófisis de éstas últimas, lo que sugiere que estas variantes bioactivas encontradas en la circulación provienen de la leche (Kacsóh et al., 1993).

La diversidad de efectos de la PRL se deben a la interacción con su receptor, una proteína transmembranal expresada en una amplia variedad de órganos incluido el intestino delgado (Bole-Feysot et al., 1998); en rata se ha reportado la expresión de las isoformas corta y larga del receptor de prolactina en el epitelio de células intestinales durante etapas embrionarias (Nagano et al., 1995) y una sobreexpresión de este durante el periodo postnatal (Ellis et al., 1996).

Dentro de las funciones que ejerce la prolactina en el intestino delgado, se sabe que está estrechamente involucrada en la absorción de nutrientes, iones y agua, la proliferación de células epiteliales y la motilidad gastrointestinal (Charoenphandhu et al., 2008), asimismo aumenta la mucosa intestinal en ratas madres lactantes (Nagano et al., 1995). Estudios realizados en ratas adultas a las cuales se les inyectan dosis altas de prolactina (10 mg/día por 10 días) mostraron un aumento del peso de los animales de 4 g/día al igual que un incremento en la longitud del intestino, desde el píloro hasta el ano (Bates et al., 1964). Por otro lado, durante la lactancia las crías que han sido amamantadas presentan un intestino delgado más largo que aquellas que no han sido amamantadas, sin embargo, dicho efecto no se observa en modelos de

hiperprolactinemia inducida (Muller & Dowling, 1981), lo que sugiere que el aumento en la longitud del intestino en las crías no se deba a un efecto exclusivo de la prolactina y que intervengan otros factores presentes en la leche.

Se ha propuesto que la prolactina pasa al recién nacido a través de la leche, y que una vez que éste la ingiere, puede tener efectos participando en la regulación del desarrollo del sistema digestivo e inmune, y regulando las funciones metabólicas y endócrinas (Grosvenor et al., 1993).

Estudios en ratas lactantes sometidas a una dieta alta en grasas muestran que la leche proveniente de éstas posee una concentración baja de prolactina comparada con la leche proveniente de ratas alimentadas con una dieta control, mientras que, si aquellas alimentadas con una dieta obesogénica son suplementadas con prolactina exógena, los niveles de esta hormona en la leche se incrementan (de los Ríos et al., 2018). A su vez, las crías alimentadas con leche con un alto contenido de grasas presentan alteraciones metabólicas importantes, tales como aumento en la masa de tejido adiposo, concentraciones elevadas de triglicéridos en el hígado, además de desarrollar resistencia a la insulina. Sin embargo, si la madre o la cría se suplementan con prolactina exógena, estas alteraciones metabólicas disminuyen en la cría (de los Ríos et al., 2018). Estos hallazgos demuestran que la PRL de la leche materna ejerce efectos metabólicos benéficos en la cría.

Se ha demostrado en ratones que no es posible detectar prolactina circulante durante las primeras dos semanas de edad (Moreno-Carranza et al., 2018), y que la prolactina de la leche materna en ratas puede llegar a la circulación de la cría (Whitworth & Grosvenor, 1978) aunque se sugiere que ésta llega a la circulación principalmente en fragmentos a través de su absorción y posible proteólisis en el yeyuno e íleon (Gonnella et al., 1989).

A pesar de las evidencias existentes sobre la acción de la prolactina materna en la regulación del metabolismo en las crías, poco se sabe acerca de los blancos tisulares y celulares en donde ésta actúa. Por todo lo anterior, en el presente proyecto propusimos dos mecanismos de acción de la PRL de la leche materna en la cría (Fig.2), los cuales

no son excluyentes y podrían ocurrir en paralelo; el primero de ellos, considerando que el primer órgano con el que entra en contacto la prolactina de la leche es el intestino, sugiere que la prolactina pasa a través del epitelio intestinal hacia la circulación para dirigirse a diversos órganos diana y efectuar una acción sistémica. El segundo mecanismo sugiere que, una vez en el lumen intestinal, la prolactina materna se une a sus receptores presentes en las células intestinales y de esta manera es capaz de regular funciones como la permeabilidad intestinal, la colonización de la microbiota y la respuesta inmune de manera local. De manera interesante, alteraciones en las funciones intestinales mencionadas, se asocian con resistencia a la insulina, hígado graso y disfunción del tejido adiposo (de los Ríos et al., 2018; Winer et al., 2016).

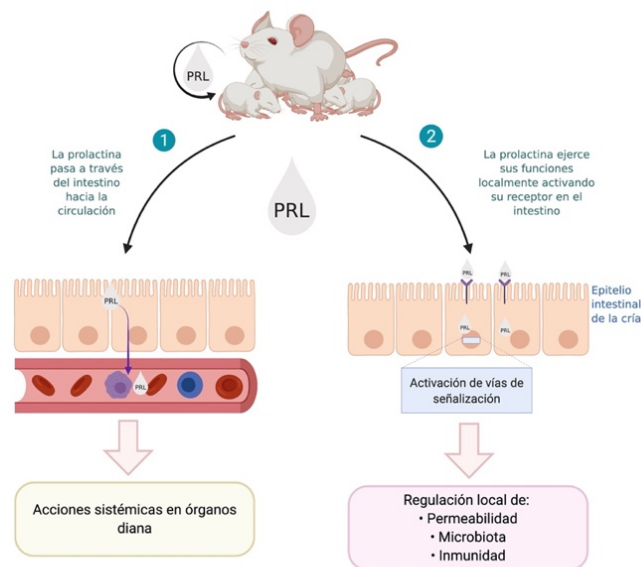


Fig. 2 Mecanismos propuestos de la acción de la prolactina en el lumen del intestino delgado de crías de rata.

Justificación

La prolactina materna juega un papel importante en la regulación del metabolismo del recién nacido, sin embargo, no se sabe con certeza cuales son los blancos tisulares y celulares de esta hormona que median sus funciones en la regulación metabólica de las crías lactantes. Conocer el sitio de acción específico de la prolactina materna dentro del recién nacido, nos permitirá comprender mejor sus efectos sobre el metabolismo del lactante, además nos permitirá conocer su papel en el desarrollo de patologías de interés en el recién nacido y con ello, poder implementar tratamientos novedosos para las mismas. En este proyecto investigamos si el intestino de las crías lactantes es un órgano blanco de las acciones de la PRL de la leche materna.

Preguntas de investigación

- ¿Cuáles son los blancos tisulares y celulares de la prolactina de la leche que median sus funciones metabólicas en el recién nacido?
- ¿Es el intestino de las crías lactantes un órgano blanco de la prolactina de la leche materna?

Objetivos

1. Corroborar que la prolactina de la leche llega a la circulación de la cría.
2. Determinar si la prolactina de la leche ejerce sus funciones en el intestino de las crías.
 - a. Corroborar la presencia del receptor de prolactina en el intestino.
 - b. Evaluar la activación del receptor de PRL en el intestino a través de la activación de su vía de señal (fosforilación de STAT5).
 - c. Evaluar la expresión de genes involucrados en la función intestinal tras la exposición directa a la prolactina.

Estrategia experimental y métodos

Modelos animales

Se utilizaron ratas Wistar gestantes, las cuales se mantuvieron en condiciones de luz:oscuridad (12:12) con alimento y agua *ad libitum* durante el periodo de gestación, el día de parto se considera como el día cero postnatal (P0) de las crías; las camadas fueron ajustadas a 8 crías por madre en el día P2, las crías se mantuvieron bajo los cuidados de la madre hasta que cumplieron 12 días de edad. El día P12, las crías fueron separadas de su madre durante 6 horas, posteriormente, las crías se dividieron en tres grupos experimentales, al primer grupo se les administraron 100 μ l de PBS estéril mediante una sonda orogástrica (grupo control), al segundo, se les administraron 3 μ g de prolactina exógena de manera orogástrica en un volumen final de 100 μ l, por último, a un tercer grupo, se le regresó con la madre durante 30 minutos para ser alimentados con leche materna y estimulados por la madre; los 30 minutos se contaron a partir de que todas las crías estuvieron pegadas a la madre y que la madre se encontrara tranquila. Minutos antes de la administración de los diferentes tratamientos, los animales fueron estimulados para provocar el vaciado de la vejiga para posteriormente ser pesados; las crías que se regresaron con la madre fueron nuevamente pesados después de los 30 minutos de ser amamantados para obtener una aproximación de la cantidad de leche que ingirieron. La obtención de sangre de las crías de los grupos PBS o prolactina oral se realizó 15 minutos después de administrado el tratamiento, mientras que las crías amamantadas, se dividieron en dos tiempos postlactancia (5 y 45 minutos) para la obtención de sangre. La sangre se colocó en hielo por 2 horas y se centrifugó a 2,500 rpm por 20 min, posteriormente se recuperó el suero y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Obtención de intestinos

Después de que las crías se eutanasiaron y se recolectó el suero, se procedió a la apertura de la cavidad abdominal mediante un corte sobre la línea media, una vez expuesto el tracto digestivo se extrajo en su totalidad, desde el estómago hasta el recto;

el estómago se separó del intestino y se pesó. El intestino por su parte se colocó en PBS estéril frío y se limpió cuidadosamente inyectando PBS frío en el lumen del intestino con la finalidad de retirar el exceso de heces que pudieran contener; posteriormente, el intestino delgado se seccionó en tres regiones correspondientes al duodeno, yeyuno e íleon; posteriormente, estas regiones se dividieron en 2 secciones que fueron almacenados en microtubos a -80°C para su posterior procesamiento.

Histología

Inmunohistoquímica

Se obtuvieron los segmentos del intestino de crías de 12 días de edad, los cuales se lavaron con PBS frío y se abrieron longitudinalmente para exponer las vellosidades. Posteriormente, con ayuda de unas pinzas de microcirugía, se enrolló el intestino de acuerdo con la técnica de “Swiss Roll” y se fijaron con formalina al 10% por 48 horas antes de ser procesadas. Se realizaron cortes en micrótomos de 5µm de grosor; posteriormente se procesaron para inmunohistoquímica para la cual se utilizó un anticuerpo primario contra el receptor de prolactina (Santa Cruz Sc-20992; dilución 1:100), y como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo Alkaline Phosphatase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson, #111-055-003, dilución 1:500), y se revelaron mediante Diaminobencidina. Las imágenes fueron tomadas a una amplificación de 20X en ScanScope.

Posteriormente se cuantificó la señal positiva en los diferentes segmentos del intestino. Se determinó la intensidad media de la señal mediante el programa ImageJ; se calculó la Densidad Óptica (DO) de las muestras mediante la fórmula $DO = \log_{10}(\text{Intensidad máxima} / \text{Intensidad media})$ considerando como intensidad máxima= 255.

Inmunofluorescencia

Se obtuvieron los segmentos del intestino de crías de 12 días de edad que fueron alimentadas por su madre durante 30 min, los cuales se lavaron con PBS frío y se abrieron longitudinalmente para exponer las vellosidades. Posteriormente, con ayuda de

unas pinzas de microcirugía, se enrolló el intestino de acuerdo con la técnica de “Swiss Roll” y se fijaron con formalina al 10% por 48 horas antes de ser procesadas. Se realizaron cortes en micrótomos de 5µm de grosor; posteriormente se procesaron para la tinción para inmunofluorescencia; se utilizó un anticuerpo primario contra el receptor de prolactina (Abcam ab2772; dilución 1:100), y como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488, Abcam ab150113, dilución 1:500), mientras que para prolactina se utilizó un anticuerpo primario Anti-Rat PRL IC-5 (AFP425-10-91; NIDDK-NIH, dilución 1:100) y como anticuerpo secundario un Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 555, Abcam ab150078; dilución 1:500). Las imágenes fueron tomadas a una amplificación de 25X en microscopio confocal Zeiss LMS 780 DUO a una longitud de onda de emisión de 488nm (verde, PRLR) y 561 (rojo, PRL).

Explantos intestinales

Se utilizaron crías de rata Wistar en edad p10, las cuales se sometieron a un periodo de ayuno de 2 horas previas al sacrificio. Una vez eutanasiadas las crías, se obtuvo el tracto gastrointestinal desde el estómago hasta el ciego, se lavaron con PBS frío, se cortó en tres segmentos correspondientes al duodeno, yeyuno e íleon y posteriormente dichos segmentos se cortaron en fragmentos de 1 cm aproximadamente, se cortaron longitudinalmente para exponer las vellosidades y se colocaron en una placa de cultivo de 48 pozos. Se les agregó 250µl de DMEM (Grupo control) o 250µl de DMEM + 21.7 nM de PRL de rata. Se incuban a 37°C por 4 horas para evaluar la expresión génica o 15 min para evaluar la fosforilación de proteínas; después del tiempo de incubación se decantó el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS frío, finalmente las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Extracción de RNA y qPCR

La extracción de RNA a partir de tejido de los explantes intestinales se realizó por el método de TRIzol. Para 50 mg de tejido se utilizó 500µl de TRIzol, se homogenizó mediante un homogenizador manual y posteriormente se agregó 100µl de cloroformo, se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C; una vez centrifugado se recuperó la

fase acuosa y se añadió 250µl de isopropanol al 100%, se dejó incubar a -20°C toda la noche. Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C; se decantó el isopropanol y se realizaron 2 lavados con etanol al 75% centrifugándose a 7,500 rpm por 5 minutos a 4°C cada uno; después del último lavado, se dejaron secar las muestras para resuspender el pellet en 50 µl de agua libre de RNAsas. Posterior a la extracción, la concentración de RNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría (NANODROP ND-1000) para llevar a cabo la síntesis de cDNA, para lo cual se utilizaron 5.8µl de Mix de reacción (2 µl Buffer 10X; 0.8µl dNTPs; 2µl Random primers; 1µl retrotranscriptasa) más el volumen correspondiente de cada muestra para obtener 2µg de cDNA, en un volumen final de 20 µl en tubos cónicos para PCR. La retrotranscripción se llevó a cabo en el termociclador bajo el esquema ilustrado en la Tabla 1.

Tabla 1 Tiempos y temperaturas de ciclos de Retrotranscripción

	PASO 1	PASO 2	PASO 3	PASO 4
TEMPERATURA	25°C	37°C	85°C	4°C
TIEMPO (MIN)	10 min	120 min	5 min	∞

Se utilizaron oligonucleótidos específicos para genes de uniones estrechas y de función intestinal, así como actina como gen de expresión constitutiva (Tabla 2) para llevar a cabo la qPCR. Se utilizaron placas de 96 pozos en las que se colocaron 5µl de muestra, 4.5 µl de Maxima SybrGreen/ROX qPCR Master Mix (Fermentas Hanover, MD, EEUU) y 0.25µl de oligonucleótidos 0.5µM para obtener un volumen final de reacción de 10µl.

Para la cuantificación de la expresión de los genes de interés se utilizó el gen de actina como gen constitutivo y se llevó a cabo el método comparativo de Ct mediante la fórmula $2^{\Delta Ct}$.

Tabla 2 Secuencia de oligonucleótidos para genes de permeabilidad y función intestinal utilizados para qPCR.

<i>Actina</i>	Fwd: CGTGAAAAGATGACCCAGATCA Rev: GCCTGGATGGCAACGTACATG
<i>Claudina 1 (Cldn1)</i>	Fwd: CCATCCCCTGTTACACCCT Rev: TCCTAGAACTGCCAGCTTCC
<i>Claudina 2 (Cldn2)</i>	Fwd: GGAGATCTGTTCCCAACCA Rev: GCCACCCCTCTTTCTTCTCT
<i>Ocludina (Ocln)</i>	Fwd: TCCAACGGCAAAGTGAATGG Rev: ACCTGTCGTGTAGTCGGTTT
<i>Tigh junction protein 1 (Tjp1)</i>	Fwd: CCATTCAGTTCGCTCCCATG Rev: AGAGTGGGTGTCTGCTTCTC
<i>Lactasa (Lct)</i>	Fwd: CCTACCAGAGAGTTTGGGCA Rev: CTCGGCAGCATTGAGTTAC
<i>Colecistoquinina (CCK)</i>	Fwd: CATGGGCTGGATGGATTTCCG Rev: ACATTAGGTCTGGGAGCCAC
<i>Polipéptido inhibidor gástrico (GIP)</i>	Fwd: GAGGTTGAGTCCGATCCCA Rev: AGGTCCCTGAGCACACATCTTC
<i>Glucagon (Gcg)</i>	Fwd: TCTCAGCTCAGTCCCACAAG Rev: GCAATGTTGTTCCGGTTCCT
<i>Sacarosa isomaltasa(Si)</i>	Fwd: TGCTGTACCCATACAGGCTATGC Rev: CTCTTTGCATGGATGCTGTG
<i>Maltasa glucoamilasa (Mgam)</i>	Fwd: GGTTGCTACCATCACAAATATCC Rev: GCAATCTATCCTTTCCATGTCC

Medición de PRL sérica

Los niveles de PRL sérica se midieron mediante ELISA ultrasensible (Guillou et al; 2015); para ello, los sueros de las crías se utilizaron a una dilución 1:25. Las muestras se analizaron por separado y por duplicado.

Western Blot

Se utilizaron secciones de aproximadamente 50 mg de intestino de crías de 12 días de edad y se homogenizaron en buffer de lisis modificado (RIPA); del extracto de proteína

se cargaron 75 μg en un gel SDS/PAGE al 10%, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se incubó en anticuerpo primario para phospho-Stat 5 (dilución 1:500) en agitación toda la noche a 4°C, al día siguiente se lavó la membrana y se incubó en anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1:5000) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación; pasado el tiempo de incubación se reveló por quimioluminiscencia. Se lavaron las membranas y se incubaron con NaOH 0.1 M, para posteriormente ser incubadas nuevamente con anticuerpo primario para Stat5 total (dilución 1:350), se siguió el procedimiento antes descrito hasta revelar la membrana. Se utilizó β -tubulina (dilución 1:10000) como control de carga.

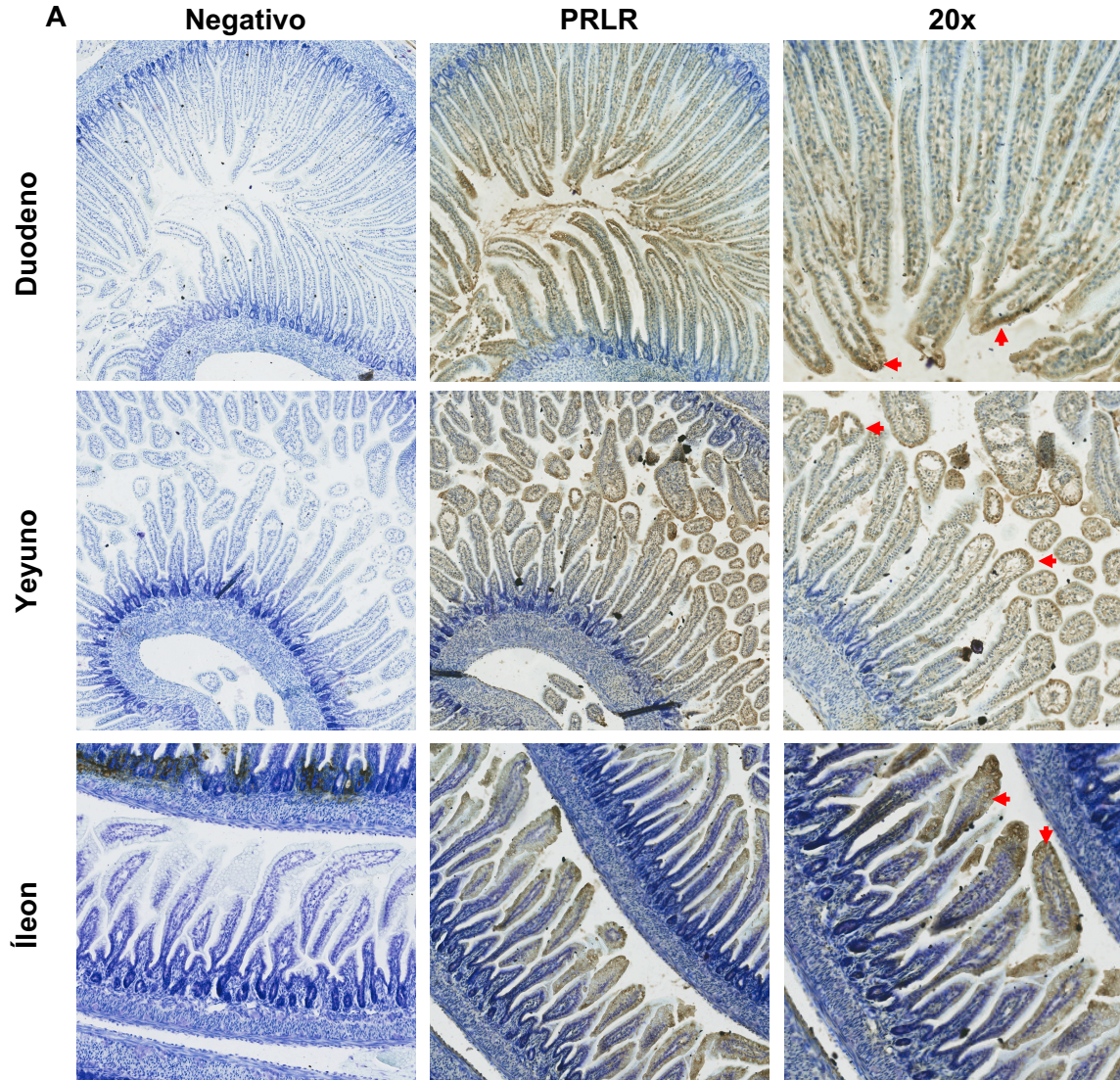
Análisis estadísticos

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de ELISA se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguida de la prueba *pos-hoc* de Tukey. El análisis de los datos obtenidos en el qPCRs se analizó por prueba t de Student y ANOVA de una vía seguida de una prueba *pos-hoc* de Tukey.

Resultados

El receptor de prolactina se encuentra en el intestino de las crías lactantes

Con la finalidad de determinar la presencia del receptor de prolactina en las diferentes regiones del intestino, se realizó una inmunohistoquímica contra el receptor en los tres segmentos del intestino delgado de crías de edad P12. Se observó que no existen diferencias en la presencia del receptor a lo largo de los diferentes segmentos del intestino y que éste se localiza en la región apical de los enterocitos de las vellosidades (Fig. 3A y 3B).



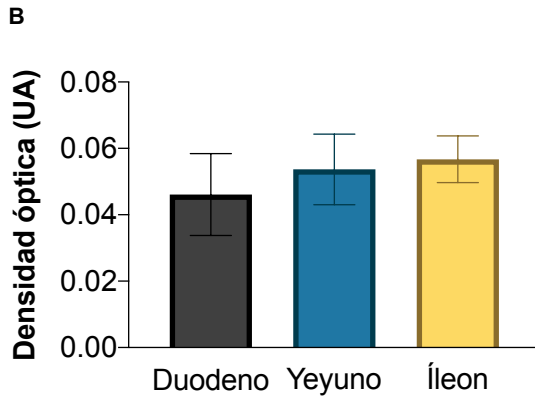


Fig. 3 A) Inmunohistoquímica (IHC) contra el receptor de prolactina en las diferentes zonas del intestino delgado de crías en edad P12. En café se muestra la señal positiva del receptor de prolactina localizado en la membrana de los enterocitos. Fotografías tomadas con un objetivo de 20X. Negativo: IHC sin anticuerpo primario; Receptor de PRL: con anticuerpo primario 20X: Acercamiento a zoom de 20x. Flechas rojas: señal positiva del receptor de PRL en las vellosidades.

B) Densidad óptica de la señal positiva al receptor de prolactina en cortes histológicos de las tres secciones del intestino; se muestra el promedio de 4 cortes independientes por sección más el error estándar.

La prolactina de la leche materna pasa a la circulación de crías de 12 días de edad

Con el propósito de determinar la ingesta promedio de leche por cría en un periodo de 30 minutos de amamantamiento, se pesaron las crías después de haber pasado 6 horas de ayuno y después de haber sido alimentados por su madre; de igual forma se pesaron los estómagos de crías que fueron eutanasiados en ayuno, así como de crías después de amamantar (Tabla 2); se observó que cada cría consume en promedio 1.0 g de leche en 30 minutos.

Tabla 3. Peso del estómago y peso corporal de crías de rata en edad P12 después de 6 horas de ayuno y después de 30 minutos de amamantamiento (promedio \pm error estandar).

	Número de crías	Peso de estómago (g)	Peso corporal (g)
Ayuno	8	0.2113 \pm 0.014	24.17 \pm 0.911
Post-amamantamiento	8	1.161 \pm 0.117***	25.28 \pm 0.962***
Diferencia de peso (g)		0.9497	1.109

*** $p < 0.0001$ = significativamente diferente comparado con el periodo de ayuno.

Por otro lado, y con el fin de evaluar si la PRL de la leche era capaz de llegar a la circulación de las crías lactantes, se analizaron los sueros de crías lactantes en edad P12 mediante ELISA ultrasensible, cuya sensibilidad es de 2 ng/ml. Las crías del grupo amamantado durante 30 minutos y eutanasiado 5 minutos después, presentó una elevada concentración de prolactina en el suero comparada con los grupos control (PBS)

y PRL oral; además, el grupo amamantado por 30 minutos y eutanasiado 45 minutos después presentó niveles séricos de prolactina más bajos que el grupo eutanasiado a los 5 minutos (Fig.4A). Dado que en el grupo control con PBS los niveles de prolactina en suero están apenas por encima del límite de detección, estos datos confirman que las crías de rata no son capaces de secretar aun su propia prolactina y que la prolactina que se encuentra en la sangre proviene de la leche materna.

En apoyo a demostrar que la prolactina que se observa en la circulación de las crías proviene de la leche materna y no es producida en el intestino de la cría se determinó que no existe expresión de prolactina en el tejido intestinal de crías lactantes de 12 días de edad por medio de PCR en tiempo real (Fig. 4B).

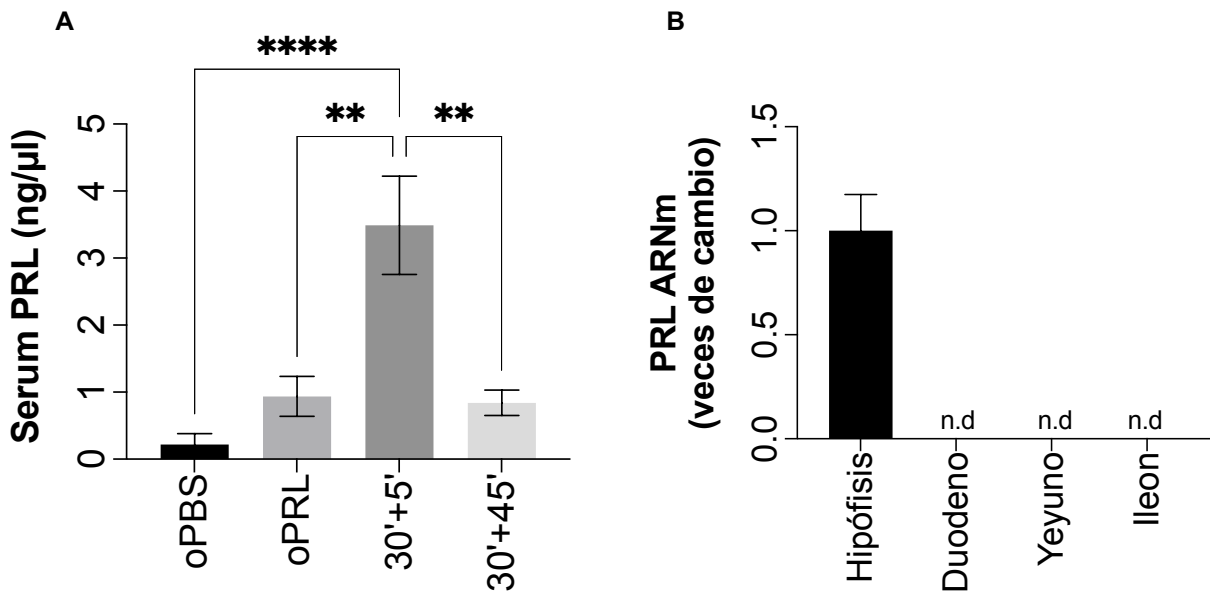
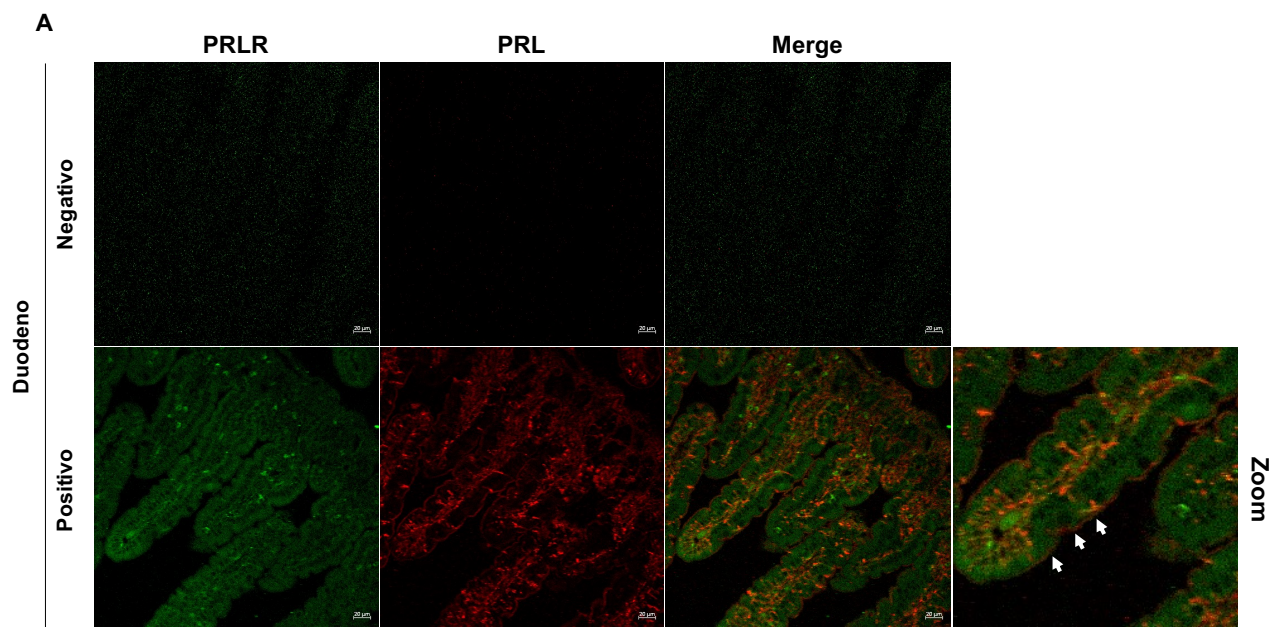


Fig. 4 A) Niveles de PRL serica en crías lactantes de 12 días de edad cuantificados mediante ELISA. Se observa un incremento comparado con el grupo amamantado por 30 minutos y eutanasiado 5 minutos después comparado con el resto de grupos experimentales (oPBS= PBS oral, oPRL= prolactina oral, 30'+ 5'= amamantados 30 minutos y eutanasiados 5 minutos después, 30'+ 45'= amamantados 30 minutos y eutanasiados 45 minutos después). Se reportan Promedio+Error Estandar. $p < 0.05$ $n = 8$ animales por grupo. B) Expresión de PRL en hipófisis (control positivo) duodeno, yeyuno e íleon de crías de 12 días de edad; no se detectó expresión de PRL en las diferentes secciones del intestino(n.d). Se reporta el promedio+Error estándar.($n = 5$ animales por grupo).

La prolactina de la leche materna se internaliza en las vellosidades del intestino.

Para determinar si la prolactina de la leche que ingieren las crías en edad P12 se une a su receptor en la periferia de las vellosidades o se internaliza en éstas, se analizaron cortes de intestino por medio de inmunofluorescencia para localizar el receptor de prolactina (Alexa Fluor 488; verde) y la prolactina (Alexa Fluor 555, rojo). Se observó que existe inmunoreactividad para prolactina dentro de las vellosidades de las diferentes regiones del intestino, de igual manera se observó que el receptor de prolactina también se encuentra en el interior así como en la superficie de las vellosidades (Fig. 5). Estos resultados sugieren que la prolactina de la leche materna se internaliza en el intestino de las crías.



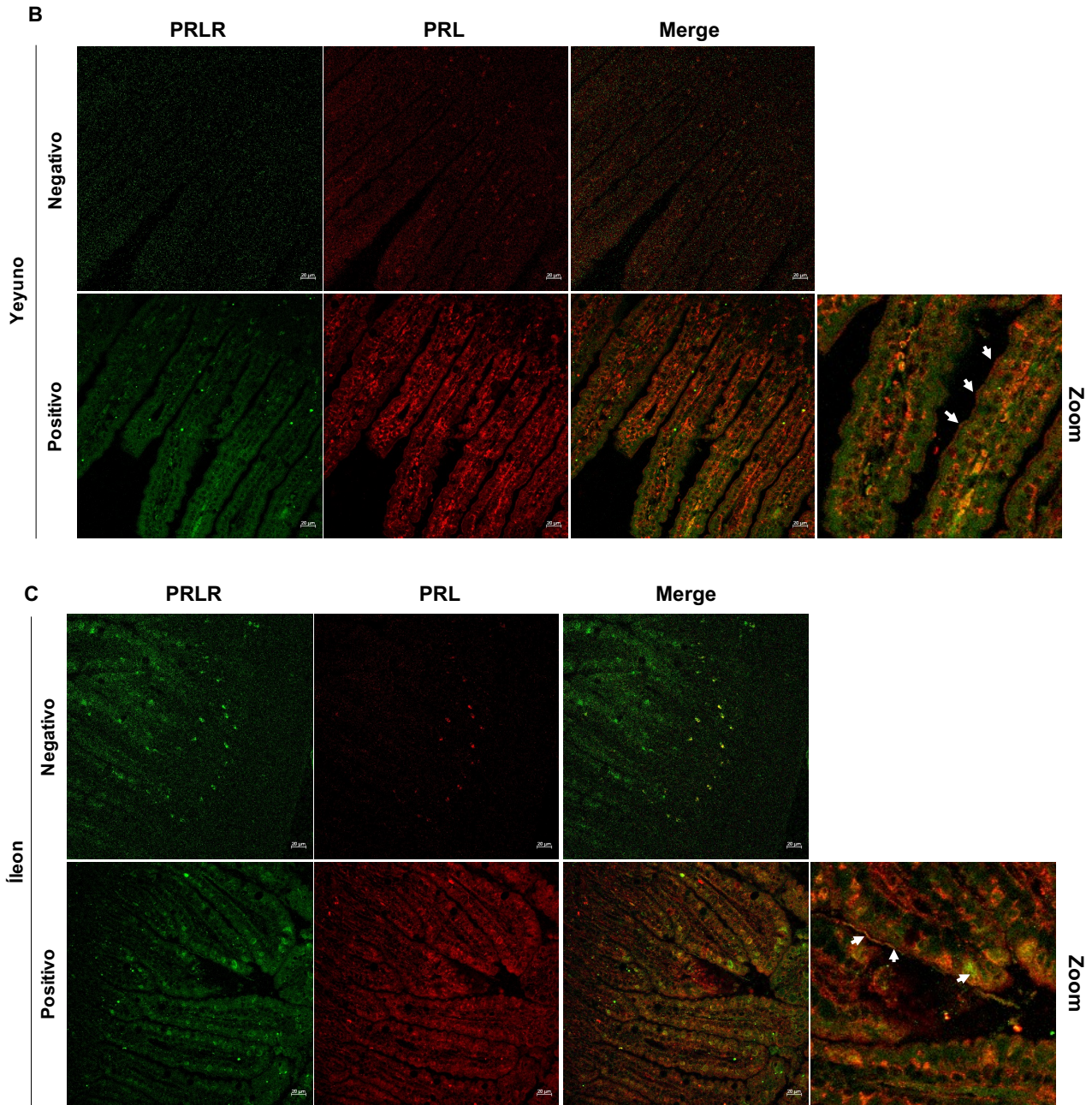


Fig. 5 Inmunofluorescencia contra el receptor de prolactina y prolactina en las diferentes zonas del intestino delgado de crías en edad P12. En verde se muestra la señal positiva del receptor de prolactina (PRLR); en rojo se muestra la señal positiva de la prolactina (PRL) localizada dentro de las vellosidades. Fotografías tomadas con un objetivo de 25X. Negativo: Inmunofluorescencia sin anticuerpo primario; positivo: con anticuerpo primario. Merge: empalme de señal de PRL+ PRLR. Zoom: Acercamiento al 250% del Merge. Flechas blancas: La señal de la PRL en la periferia de las vellosidades.

STAT5 parece encontrarse fosforilado en el duodeno después de 35 minutos de ingesta de leche materna.

Una vez determinado que el receptor de prolactina se encuentra localizado a lo largo del intestino y con el objetivo de evaluar si la PRL activa vías de señalización a nivel

intestinal mediante el acoplamiento a éste, evaluamos la activación de su vía señal canónica Jak-Stat5 en el duodeno de las crías tratadas con PRL oral o amamantadas. En un experimento preliminar, se observó la presencia de la proteína Stat-5 en su forma fosforilada en muestras de duodeno de crías de 12 días de edad mediante Western Blot (Fig. 6A). Se observó que el grupo eutanasiado 5 minutos después de ser amamantados (30'+5'), presentó una mayor fosforilación de la proteína en comparación con los demás grupos (Fig. 6B). Cabe destacar que, debido a problemas técnicos, no pudimos obtener mas Western blots para confirmar y completar estos resultados.

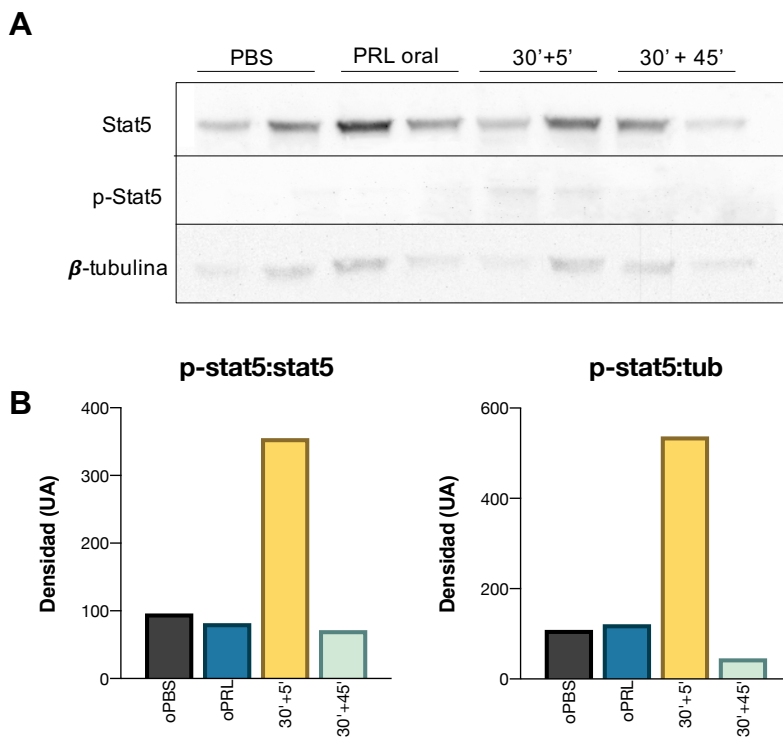


Fig. 6 Determinación de p-Stat5 en duodeno de crías lactantes de 12 días de edad. A) Western Blot de extracto de proteínas de duodeno de crías lactantes, tratados con PBS oral, PRL oral, amamantados 30 minutos y eutanasiados 5 minutos después (30'+5') y amamantados 30 minutos y eutanasiados 45 minutos después (30'+45'); panel superior: Stat5 total; panel intermedio: Stat5 fosforilado; panel inferior: β -tubulina (control) se muestran 2 animales independientes por grupo experimental. B) cuantificación de la densidad del Western Blot; se muestra el promedio de 2 animales independientes por grupo experimental.

La prolactina aumenta la expresión de genes de función intestinal en el duodeno de ratas lactantes.

-Genes de permeabilidad intestinal: Claudina 2 y Ocludina

Para explorar cuales son los efectos de la PRL en el intestino de las crías, como siguiente paso se evaluó el efecto de la hormona en explantes intestinales tratados con PRL. Se midió la expresión de genes de permeabilidad intestinal en explantes de crías

de rata en edad P10 incubados con PRL durante 4 horas *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran que el Íleon presenta una mayor expresión de Claudina-2 y Ocludina ($p < 0.001$; Fig.7) comparado con el duodeno, sin embargo, al ser tratados con prolactina, ésta estimula la expresión de Claudina-2 (Cldn2; $P < 0.05$) y Ocludina (Ocln; $P < 0.05$) en duodeno comparado con el control no tratado (Fig. 5), mientras que en yeyuno e íleon no existe un cambio en la expresión bajo la presencia de la prolactina (Fig.7). Además, se observó que no existen cambios significativos en la expresión de Tjp1 y Claudina-1 entre los diferentes segmentos del intestino. Sin embargo, se observó que la PRL incrementa la expresión de Claudina-1 en íleon comparado con el control ($p < 0.05$; Fig. 7).

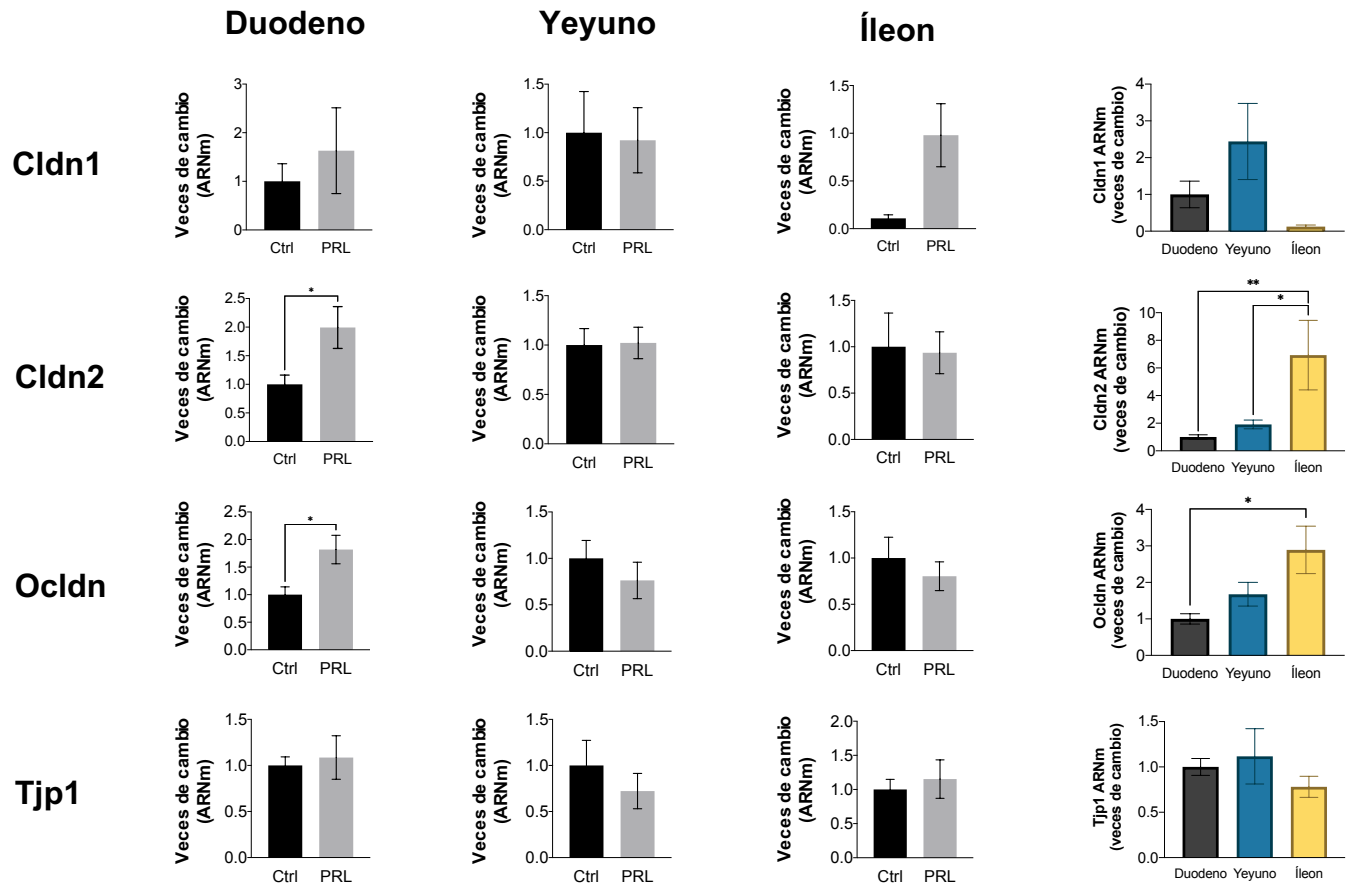


Fig. 7 Expresión de genes de uniones estrechas en explantes de intestino de crías de 10 días de edad tratados con 21.7 nM de PRL. Se observa un aumento en la expresión de Claudina 2 (Cldn2) y Ocludina (Ocldn) en duodeno tras el tratamiento con PRL (Graficas en blanco y negro). Se normalizó contra duodeno para determinar variaciones en la expresión de los genes a lo largo de los tres segmentos del intestino delgado, se observó que hay una mayor expresión de Cldn2 y Ocldn en el íleon comparado con duodeno y yeyuno (Graficas en colores) (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; promedio \pm error estándar, $n = 8$ por grupo)

-Genes de función enteroendócrina

Además, se midió la expresión de genes de función intestinal en explantes de crías de rata en edad P10 incubados con PRL durante 4 horas *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran que existe una mayor expresión de lactasa en íleon respecto al duodeno ($p < 0.0001$). Por su parte, se observó que la prolactina estimula la expresión de Lactasa en duodeno, pero no en yeyuno e íleon (Fig. 8; Lct $P < 0.05$), mientras que no se observó efecto de la PRL sobre la expresión de Maltasa-Glucoamilasa (Mgam) ni de Sacarasa-isomaltasa (Si) en ninguna región del intestino, a pesar de haber una mayor expresión de Si en yeyuno comparado con duodeno (Fig. 8).

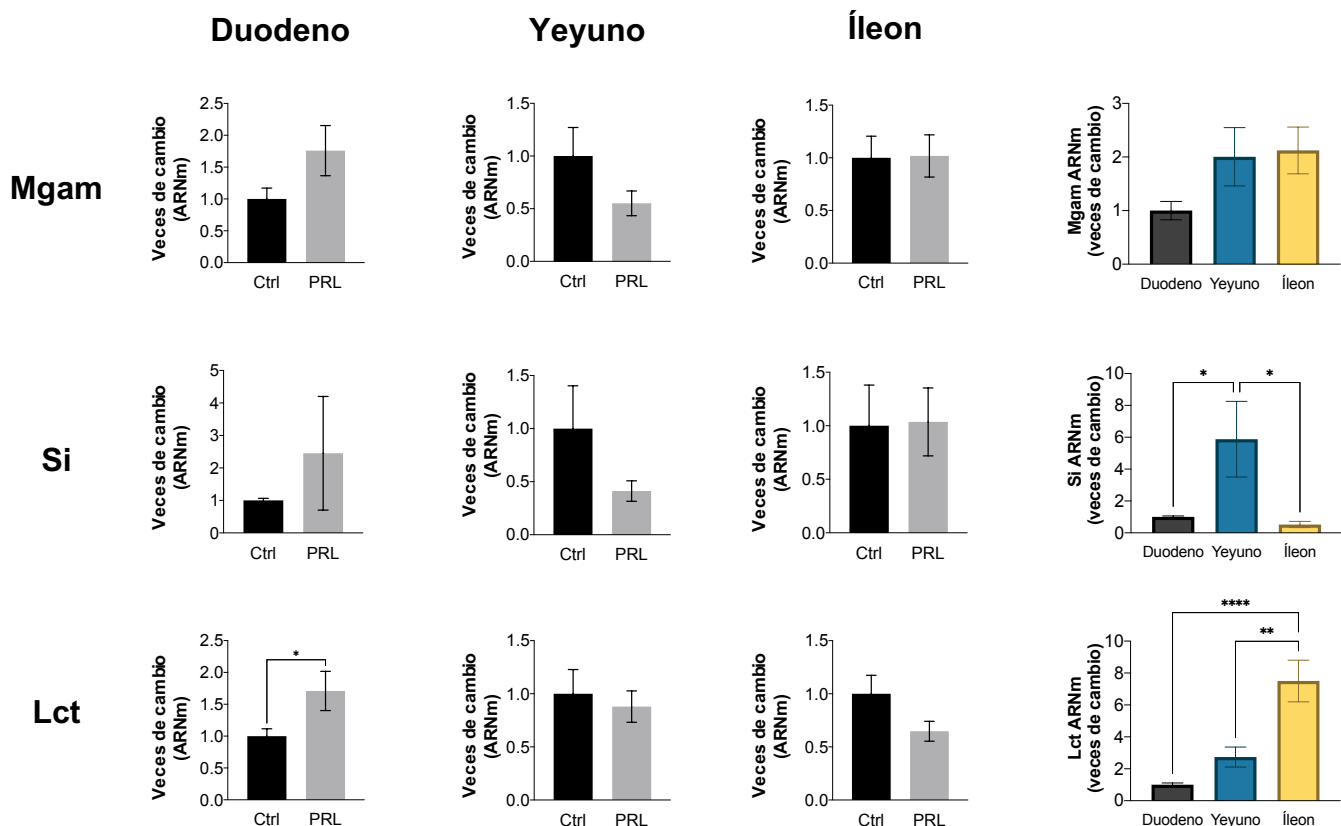


Fig. 8 Expresión de genes de enzimas intestinales en intestino de crías de 10 días de edad tratados con 21.7 nM de PRL. Se observa un aumento en la expresión de Lactasa (Lct) en duodeno tras el tratamiento con PRL (Graficas en blanco y negro). Se normalizó contra duodeno para determinar variaciones en la expresión de los genes a lo largo de los tres segmentos del intestino delgado, se observó que hay una mayor expresión de Lct en el íleon comparado con duodeno y yeyuno, mientras que se observó una mayor expresión de Sacarasa-isomaltasa (Si) en yeyuno en comparación del duodeno e íleon (Graficas en colores) (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ **** $p < 0.00001$; promedio \pm error estándar, $n=8$ por grupo)

De igual manera, se observó una mayor expresión de Polipéptido inhibidor gástrico (Gip, por sus siglas en inglés) en yeyuno comparado con duodeno ($p < 0.001$), no obstante, la prolactina incrementó la expresión de Gip en duodeno ($P < 0.01$) e íleon ($P < 0.05$) mientras que la disminuyó en yeyuno (Fig. 9).

En el caso de la colecistoquinina, no se observaron diferencias significativas en su expresión a lo largo del intestino delgado, sin embargo, se observó que la prolactina incrementó la expresión de ésta en duodeno (CCK; $P < 0.01$) comparado con el control (Fig.9). Por último, se observó mayor expresión de Glucagón en íleon respecto al

duodeno ($p < 0.001$) aunque no hubo diferencias significativas de la expresión de glucagón en cada región del intestino tras la exposición a prolactina (Fig.9)

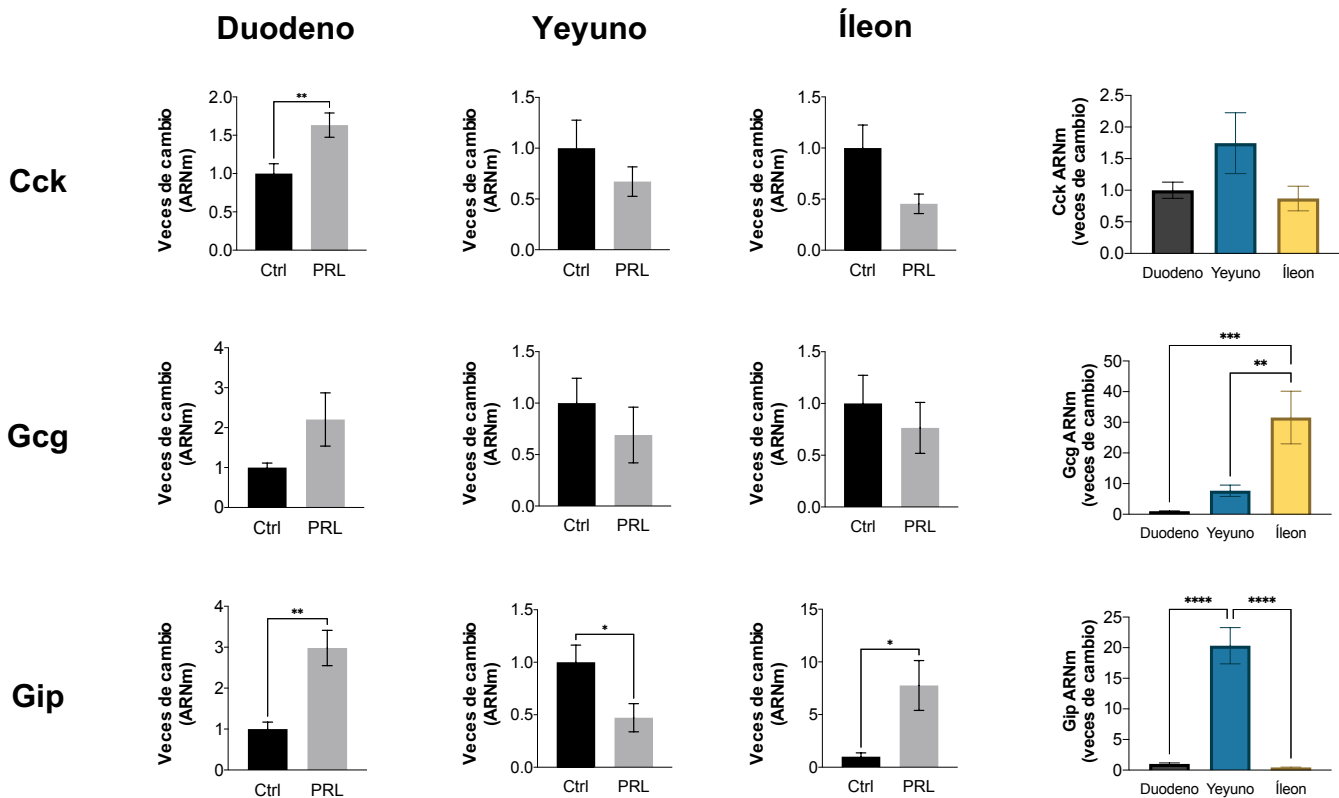


Fig. 9 Expresión de genes de hormonas intestinales en explantes de intestino de crías de 10 días de edad tratados con 21.7 nM de PRL. Se observa un aumento en la expresión de Colecistoquinina (Cck) en duodeno tras el tratamiento con PRL (Gráficas en blanco y negro), además de un aumento de expresión de Péptido inhibidor gástrico (Gip) en duodeno e íleon tras el tratamiento con PRL, mientras que se observó una disminución en yeyuno. Se normalizó contra duodeno para determinar variaciones en la expresión de los genes a lo largo de los tres segmentos del intestino delgado, se observó que hay una mayor expresión de Gcg en el íleon comparado con duodeno y yeyuno y de Gip en yeyuno comparado con duodeno e íleon (Gráficas en colores) (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; promedio \pm error estándar, $n=8$ por grupo)

Discusión de Resultados

La prolactina ejerce sus efectos mediante la activación de su receptor, el cual se encuentra ampliamente distribuido en los diferentes órganos diana de esta hormona. En murinos adultos, se ha determinado la presencia del receptor de prolactina mediante inmunofluorescencia a lo largo del tracto gastrointestinal, expresándose mayormente en las vellosidades del duodeno, yeyuno e ileón así como en las criptas del colon (Aoki et al., 2019); por su parte, se ha reportado la presencia del receptor de prolactina durante el desarrollo fetal de ratones en el intestino delgado (Freemark et al., 1995); los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran mediante tinciones de inmunohistoquímica la presencia del receptor de prolactina en tejido de intestino delgado de crías de 12 días de edad, a pesar de que éstas no produzcan aún su propia prolactina corroborando que dicho receptor se empieza a expresar desde etapas muy tempranas de la vida.

Debido a que la prolactina ejerce sus efectos a través de la activación de su receptor, y puesto que éste se encuentra expresado en la membrana de los enterocitos, nuestros resultados preliminares obtenidos mediante Western blot sugieren que la prolactina que proviene de la leche materna pudiera activar vías de señalización a nivel intestinal, sin embargo es necesario realizar más experimentos para confirmar dichos resultados; por otro lado, se analizó con experimentos ex vivo si la prolactina ejerce un efecto directo en el intestino activando genes relacionados con la permeabilidad intestinal.

Considerando que una de las funciones principales del intestino delgado es la absorción de moléculas y nutrientes, se determinó el efecto de la prolactina en la permeabilidad intestinal de crías en un modelo de obesidad. De los Rios demostró que en crías alimentadas por madres con una dieta alta en grasa, la permeabilidad aumenta comparada con aquellas crías amamantadas por madres en dieta control y que además, si a estas crías se les administra prolactina exógena, la permeabilidad intestinal se restituye (datos no publicados); mientras que nuestros resultados demuestran que la prolactina promueve la expresión tanto de Claudina 2 y Ocludina en el duodeno de crías.

En roedores recién nacidos, el tracto gastrointestinal no se encuentra completamente maduro, esto implica uniones estrechas laxas que permiten el paso de moléculas de gran tamaño a través del intestino delgado, hacia la circulación de la cría.

Se ha visto que en el yeyuno de ratón la claudina 2 presenta una mayor expresión en el día 1, la cual decae gradualmente hasta el día 90 para alcanzar los niveles de expresión de la edad adulta. Por su parte la Ocludina, presenta una menor expresión que la claudina 2 en el día 1 y aumenta en menor medida hasta el día 90, sin embargo se considera una de las proteínas de las uniones estrechas que mayor expresión presenta en el intestino durante la etapa postnatal (Holmes et al., 2006). Además, la claudina 2 juega un papel importante regulando selectivamente el paso de iones principalmente de sodio; por su parte, la ocludina se expresa en las regiones laterales de las células epiteliales y por tanto es importante para la estructura y mantenimiento de la barrera intestinal (B. Lee et al., 2018); por su parte, la claudina 1 se encuentra ampliamente expresada en el íleon de ratones y su principal función es mantener la integridad de la barrera epitelial (Lu et al., 2013). Dado que el duodeno es el principal sitio donde empieza la absorción de ciertos nutrientes, estos resultados sugieren que la prolactina regula la permeabilidad intestinal y posiblemente su propio paso hacia la circulación de la cría además de promover la integridad de la barrera intestinal y de esta forma evitar el paso de agentes patógenos hacia la circulación.

Así mismo, diversas enzimas intestinales también presentan un perfil de expresión específica durante los primeros días de edad del individuo. Las principales enzimas que se observan en el intestino de las crías son diversas hidrolasas encargadas de degradar los disacáridos presentes en la leche a carbohidratos simples; la lactosa es el disacárido más abundante en la leche materna, por lo que su hidrolasa, la lactasa, se encuentra mayormente expresada en el intestino de las crías durante las primeras dos semanas de edad, después de este tiempo su expresión disminuye conforme la dieta de los roedores cambia a una dieta combinada y posteriormente a una dieta sólida donde la presencia de lactosa es poca o nula mientras que se aumenta la presencia de otros disacáridos como la sacarosa y la maltosa, por ello las enzimas que las degradan; la sacarasa y la maltasa, respectivamente, presentan una baja expresión durante las primeras dos semanas postnatales (Henning, 1985). La exposición de los explantes de intestino de crías de 10 días de edad a prolactina, presentaron un aumento de la expresión de la enzima lactasa en el duodeno, este resultado sugiere que la prolactina de la leche materna induce la degradación de la lactosa presente en ésta mediante la activación directa de la lactasa y

que esta acción se lleva a cabo de forma específica en el duodeno. Por su parte, ni la maltasa ni la sacarasa isomaltasa presentaron cambios en su expresión en ningún segmento del intestino tras el tratamiento con prolactina, lo cual corrobora que la acción de estas dos enzimas no tiene un papel importante durante las primeras dos semanas de desarrollo sino hasta que empieza a haber un cambio hacia una dieta más sólida.

Además, se observó que la prolactina induce la expresión de GIP en el duodeno de crías lactantes. Esta hormona se incrementa cuando existe una dieta alta en grasas y proteínas en animales adultos y estimula la liberación de glucagón por parte del páncreas en crías lactantes. (Lefebvre, 1983). Se ha observado que la colecistoquinina circulante administrada exógenamente tiene un rol en el bloqueo del apetito de las crías lactantes así como comportamientos de ingesta y que este efecto es dependiente de la edad de las crías, del tipo de alimentación que ingieren y la dosis de hormona administrada (Lorenz, 1994); observamos que la prolactina induce a su vez la expresión de colecistoquinina en el duodeno de las crías, lo que sugiere que la prolactina puede estar regulando la ingesta de leche materna en crías de dos semanas de edad.

Al nacimiento, los lactótrofos de las ratas no producen ni sintetizan prolactina sino hasta el día 4 postnatal (Frawley & Miller, 1989), sin embargo, los niveles de prolactina sérica son bajos y prácticamente indetectables tanto en hembras como machos durante las primeras dos semanas de edad (Döhler & Wuttke, 1974); estos resultados los corroboramos en crías a las que se les administró PBS oral, donde observamos que no se detectó PRL en suero a los 12 días de edad.

Por otro lado, estudios realizados en 1978 por Withworth y colaboradores, demostraron que la prolactina radiomarcada presente en la leche llega a la circulación de las crías tras haber sido amamantadas durante un periodo de 30 min, observándose la mayor concentración de dicha prolactina 5 minutos después de ser alimentados, mientras que al inyectar intraperitonealmente la prolactina radiomarcada en las crías, ésta se recupera en el suero a los 15 minutos después de haber sido administrada. Nuestros resultados corroboran que hay ausencia de prolactina endógena en el suero en crías de edad P12, además de observarse un aumento significativo de prolactina en crías que fueron amamantadas durante 30 minutos y el suero obtenido 5 minutos después, estos

datos demuestran que la prolactina de la leche materna es capaz de atravesar el epitelio intestinal hacia la circulación.

Además, tras la administración oral de prolactina exógena, los niveles de ésta en circulación fueron menores a los observados en el grupo de lactancia a pesar de que el modo de administración mimetiza la ingesta de la leche; esta diferencia de concentración en ambos grupos puede deberse a diversos factores que pueden estar alterando la estructura de la prolactina impidiendo que llegue al lumen intestinal. Al ser administrada de forma oral en un vehículo simple como el PBS, la prolactina exógena carece de los demás componentes que presenta la leche materna, como lo son algunos inhibidores de proteasas, haciendola más susceptible a las condiciones ácidas del estómago y a la alta cantidad de proteasas que se encuentran presentes en el tubo digestivo; otro factor que puede estar influyendo es la ausencia de distensión abdominal necesario para provocar el vaciamiento gástrico. Durante el tiempo en que las crías son alimentadas por la madre, el volumen de leche ingerido es constante y es aproximadamente de 2 g/h mientras que el volumen de prolactina exógena administrada es de 100µl, el cual resulta insuficiente para promover el vaciamiento hacia el intestino delgado.

Por último y de acuerdo a lo reportado por Moreno-Carranza y colaboradores en 2018, el hígado de crías durante las primeras dos semanas de edad expresa de forma local su propia prolactina, sin embargo este no es el caso del intestino ya que no se observó la expresión del gen de prolactina en el intestino de crías de 12 días de edad; además, los resultados obtenidos por inmunofluorescencia mostraron una evidente presencia de prolactina en el intestino de crías amamantadas por 30 min dentro de las vellosidades en las diferentes regiones del intestino delgado. Estos resultados en conjunto, apoyan que todos los efectos observados a nivel intestinal son ejercidos por la prolactina que proviene de la leche materna.

En resumen, los resultados reportados muestran que el receptor de prolactina se encuentra presente en las diferentes regiones del intestino de ratas lactantes de 12 días de edad, y que la hormona podría ser capaz de activar vías de señalización en este tejido. Además, demuestran que la prolactina tiene un efecto directo sobre el intestino de las crías ya que activa la expresión de genes de permeabilidad y función intestinal y que

dicho efecto está dado por la prolactina presente en la leche materna al determinarse que crías en edad P12 no tienen prolactina circulante y que el intestino no produce prolactina local. Mas aún, la prolactina de la leche también tiene la capacidad de atravesar el intestino y llegar a la circulación de la cría.

Dado que es conocido que la prolactina tiene una acción inmunomoduladora en otros órganos diana, hipotetizamos que la prolactina de la leche presente también estos efectos inmunomoduladores a nivel intestinal en las primeras etapas de desarrollo promoviendo la secreción de citocinas así como la modulación del establecimiento de la microbiota intestinal, de esta forma se propone a la prolactina de la leche como un factor que interviene en la regulación del metabolismo en el desarrollo postnatal, siendo el intestino el primer órgano blanco, mediador de los efectos de esta hormona.

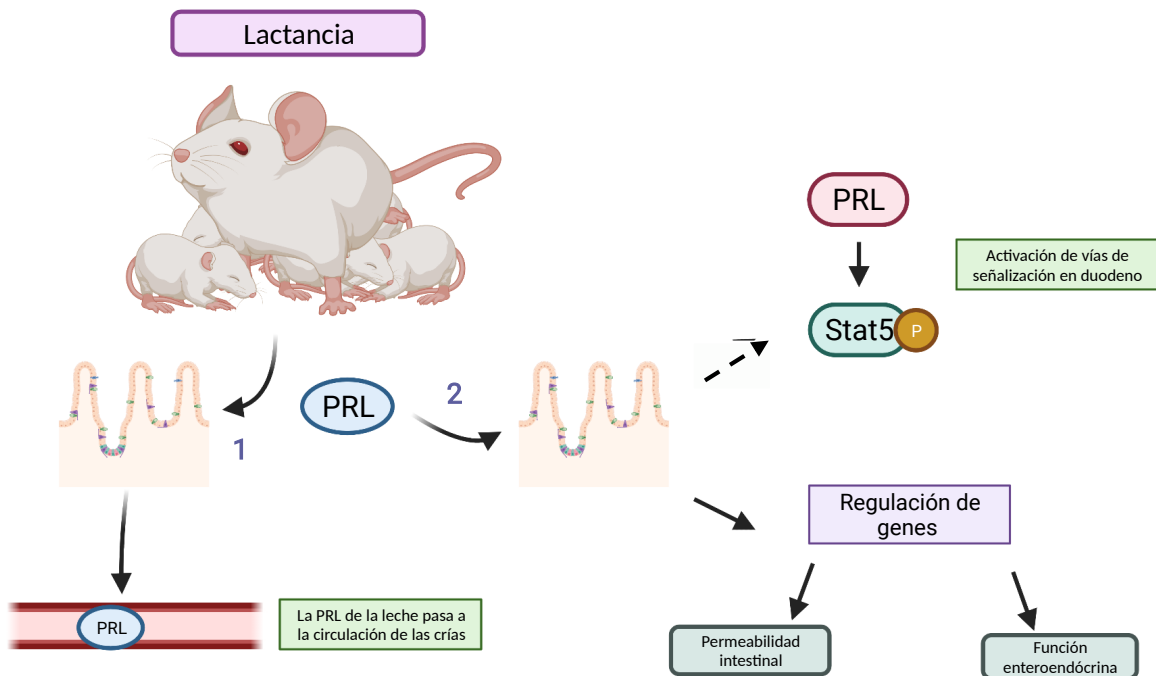
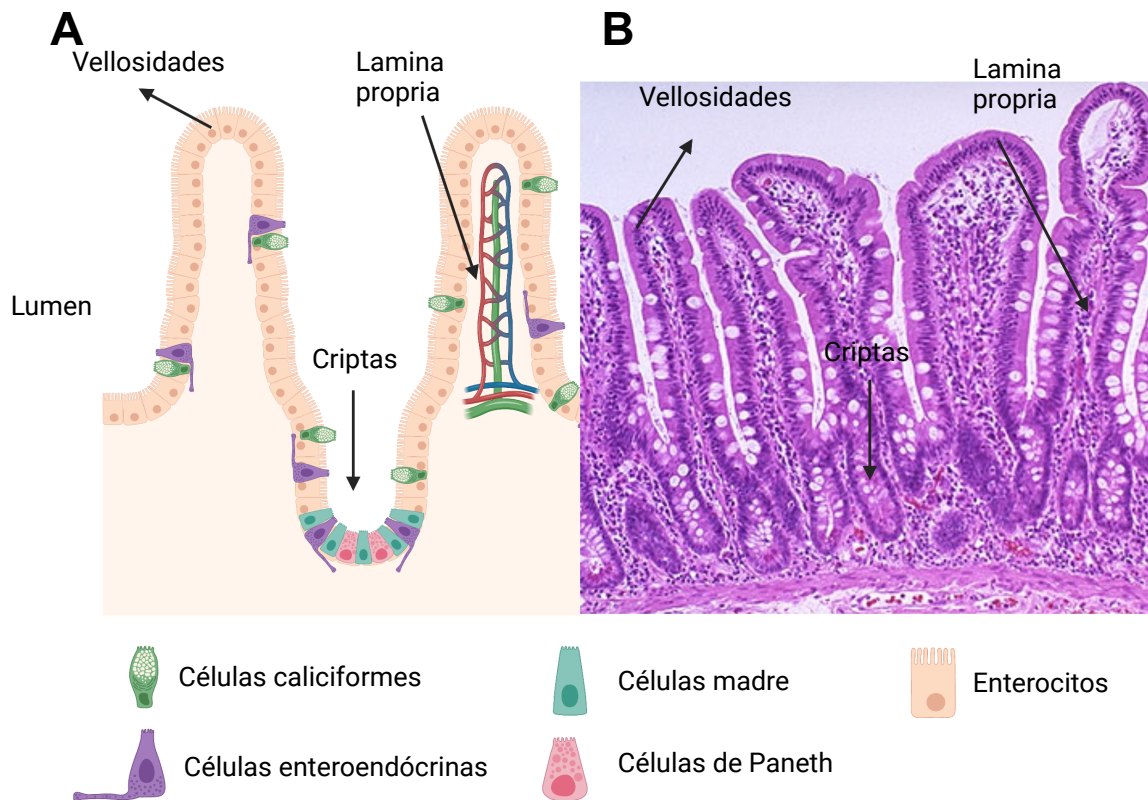


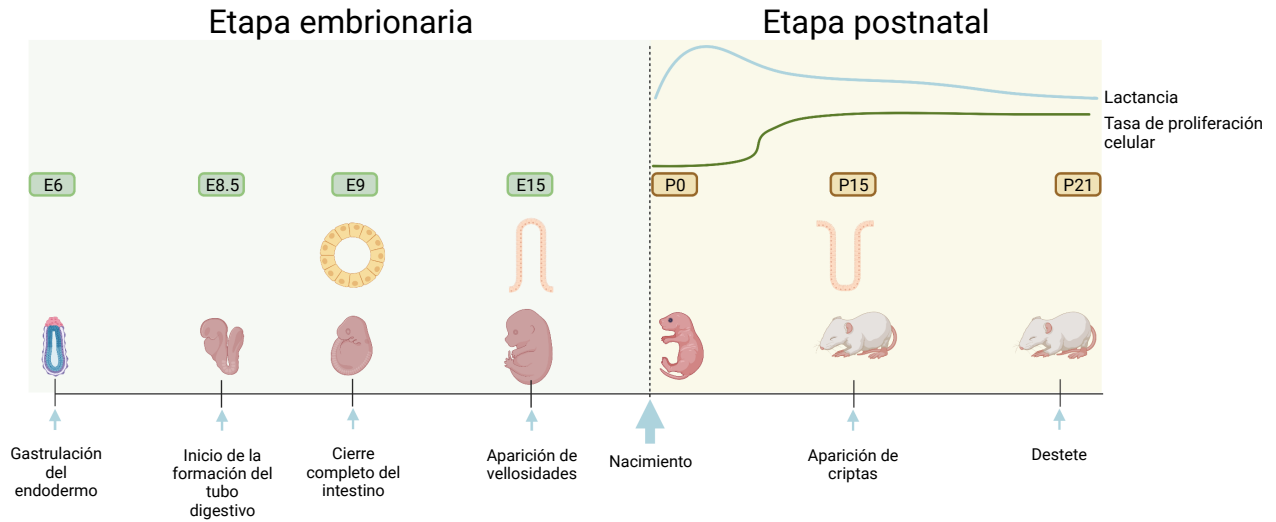
Fig. 10 Acciones de la prolactina de la leche en el intestino de crías. La prolactina de la leche llega al intestino de las crías (1) donde se localiza en las vellosidades de las diferentes regiones del intestino, además esta se encuentra en la circulación de las crías siendo así la leche materna la principal fuente de prolactina circulante en el suero de crías durante las primeras dos semanas postnatales. Por su parte, la prolactina tiene efectos en el intestino (2) ya que activa vías de señalización y regula la expresión de genes relacionados con la permeabilidad intestinal y la función enteroendócrina.

Apéndice 1 : Citoarquitectura del intestino delgado



Apéndice 1 En la histología del intestino delgado se observan dos partes de interés: las vellosidades que son las partes más altas y las criptas; a lo largo de las vellosidades se distinguen 5 tipos celulares: a) enterocitos: células encargadas de la absorción de nutrientes, b) Células caliciformes: células especializadas secretoras de mucinas para la formación de la mucosa intestinal; c) Células enteroendócrinas: secretoras de hormonas intestinales; d) Células de Paneth: células especializadas del sistema inmune; mientras que en las criptas se encuentran nichos de células madres que darán lugar a las células especializadas del intestino.

Apéndice 2: Desarrollo embrionario y postnatal del intestino delgado en roedores



Apéndice 2 Desarrollo del intestino delgado durante la etapa embrionaria y postnatal de ratas. Durante el desarrollo embrionario, se inicia el desarrollo del intestino tras la gastrulación del endodermo en el día E6, de la cual deriva el tracto gastrointestinal; durante el día E8.5 se inicia la formación del tubo digestivo y se completa el cierre en el día E9, es hasta el día E15 donde aparecen las vellosidades desde el duodeno hasta el colon.

Después del nacimiento, el intestino de las ratas no se encuentra maduro completamente, sino que su maduración se alcanza una vez que se establecen las criptas en el día P15; además, hay una baja tasa de proliferación celular en el día P0 y aumenta gradualmente entre el día P10 y P11 .

Bibliografía

Andreas, N. J., Kampmann, B., & Mehring Le-Doare, K. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, *91*(11), 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>

Aoki, M., Wartenberg, P., Grünewald, R., Phillipps, H. R., Wyatt, A., Grattan, D. R., & Boehm, U. (2019). Widespread Cell-Specific Prolactin Receptor Expression in Multiple Murine Organs. *Endocrinology*, *160*(11), 2587–2599. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00234>

Arévalo Sureda, E., Weström, B., Pierzynowski, S. G., & Prykhodko, O. (2016). Maturation of the Intestinal Epithelial Barrier in Neonatal Rats Coincides with Decreased FcRn Expression, Replacement of Vacuolated Enterocytes and Changed Blimp-1 Expression. *PLOS ONE*, *11*(10), e0164775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164775>

Bates, R. W., Milkovic, S., Garrison, M. M., Milkovic, S., & Garrison, M. M. (1964). Effects of Prolactin, Growth Hormone and ACTH, Alone and in Combination, Upon Organ Weights and Adrenal Function in Normal Rats. *Endocrinology*, *74*(5), 714–723. <https://doi.org/10.1210/endo-74-5-714>

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews*, *19*(3), 225–268. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>

Brandtzaeg, P. (2017). Role of the Intestinal Immune System in Health. En D. C. Baumgart (Ed.), *Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: From Epidemiology and*

Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic Approach (pp. 23–56). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33703-6_2

Charoenphandhu, N., Wongdee, K., Teerapornpuntakit, J., Thongchote, K., & Krishnamra, N. (2008). Transcriptome responses of duodenal epithelial cells to prolactin in pituitary-grafted rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *296*(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.09.025>

Cornick, S., Tawiah, A., & Chadee, K. (2015). Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*, *3*(1–2), e982426. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.982426>

de los Ríos, E. A., Ruiz-Herrera, X., Tinoco-Pantoja, V., López-Barrera, F., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., & Macotella, Y. (2018). Impaired prolactin actions mediate altered offspring metabolism induced by maternal high-fat feeding during lactation. *The FASEB Journal*, fj.201701154R. <https://doi.org/10.1096/fj.201701154R>

Döhler, K. D., & Wuttke, W. (1974). Serum LH, FSH, Prolactin and Progesterone from Birth to Puberty in Female and Male Rats. *Endocrinology*, *94*(4), 1003–1008. <https://doi.org/10.1210/endo-94-4-1003>

Drozdowski, L. A., Clandinin, T., & Thomson, A. B. (2010). Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *16*(7), 787–799. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i7.787>

Ellis, L. A., Mastro, A. M., & Picciano, M. F. (1996). Milk-borne prolactin and neonatal development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *1*(3), 259–269. <https://doi.org/10.1007/BF02018079>

Frawley, L. S., & Miller, H. A. (1989). Ontogeny of Prolactin Secretion in the Neonatal Rat Is Regulated Posttranscriptionally. *Endocrinology*, 124(1), 3–6. <https://doi.org/10.1210/endo-124-1-3>

Freemark, M., Nagano, M., Edery, M., & Kelly, P. A. (1995). Prolactin receptor gene expression in the fetal rat. *Journal of Endocrinology*, 144(2), 285–292. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1440285>

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>

Grosvenor, C. E., Picciano, M. F., & Baumrucker, C. R. (1993). Hormones and growth factors in milk. *Endocrine Reviews*, 14(6), 710–728. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-6-710>

Henning, S. J. (1985). Ontogeny of Enzymes in the Small Intestine. *Annual Review of Physiology*, 47(1), 231–245. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.47.030185.001311>

Herbst, J. J., & Sunshine, P. (1969). Postnatal Development of the Small Intestine of the Rat: Changes in Mucosal Morphology at Weaning. *Pediatric Research*, 3(1), 27–33. <https://doi.org/10.1203/00006450-196901000-00004>

Holmes, J. L., Van Itallie, C. M., Rasmussen, J. E., & Anderson, J. M. (2006). Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expression Patterns*, 6(6), 581–588. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.12.001>

Kacsóh, B., Veress, Z., Tóth, B. E., Avery, L. M., & Grosvenor, C. E. (1993). Bioactive and immunoreactive variants of prolactin in milk and serum of lactating rats and their pups. *Journal of Endocrinology*, 138(2), 243–257. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1380243>

Kelly, D., Begbie, R., & King, T. P. (1992). Postnatal intestinal development. *BSAP Occasional Publication*, 15, 63–79. <https://doi.org/10.1017/S0263967X00004092>

Lee, B., Moon, K. M., & Kim, C. Y. (2018). Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *Journal of Immunology Research*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2645465>

Lee, S. H. (2015). Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intestinal Research*, 13(1), 11–18. <https://doi.org/10.5217/ir.2015.13.1.11>

Lefebvre, P. J. (Ed.). (1983). *Glucagon II: Vol. 66 / 2*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-69019-8>

Lorenz, D. N. (1994). Effects of CCK-8 on ingestive behaviors of suckling and weanling rats. *Developmental Psychobiology*, 27(1), 39–52. <https://doi.org/10.1002/dev.420270105>

Lu, Z., Ding, L., Lu, Q., & Chen, Y.-H. (2013). Claudins in intestines. *Tissue Barriers*, 1(3). <https://doi.org/10.4161/tisb.24978>

Moreno-Carranza, B., Bravo-Manríquez, M., Baez, A., Ledesma-Colunga, M. G., Ruiz-Herrera, X., Reyes-Ortega, P., de los Ríos, E. A., Macotela, Y., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2018). Prolactin regulates liver growth during postnatal development in mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 314(6), R902–R908. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00003.2018>

Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(10), 667–685. <https://doi.org/10.1038/nri3738>

Muller, E., & Dowling, R. H. (1981). Prolactin and the small intestine. Effect of hyperprolactinaemia on mucosal structure in the rat. *Gut*, 22(7), 558–565. <https://doi.org/10.1136/gut.22.7.558>

Nagano, M., Chastre, E., Choquet, A., Bara, J., Gespach, C., & Kelly, P. A. (1995). Expression of prolactin and growth hormone receptor genes and their isoforms in the gastrointestinal tract. *The American Journal of Physiology*, 268(3 Pt 1), G431–442. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.268.3.G431>

Nusrat, A., Turner, J. R., & Madara, J. L. (2000). IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: Nutrients, cytokines, and immune cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(5), G851–G857. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.5.G851>

Pérez-Cano, F. J., Castellote, C., Marín-Gallén, S., Franch, À., & Castell, M. (2005). Neonatal Immunoglobulin Secretion and Lymphocyte Phenotype in Rat Small Intestine Lamina Propria. *Pediatric Research*, 58(1), 164–169. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000156367.60769.36>

Rao, R. K., Lam, K., Philipps, A. F., Williams, C., Lake, M., & Koldovsk, O. (1993). Presence of Multiple Forms of Peptidase Inhibitors in Rat Milk: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 17(4), 414–420. <https://doi.org/10.1097/00005176-199311000-00014>

Teichberg, S., Isolauri, E., Wapnir, R. A., Roberts, B., & Lifshitz, F. (1990). Development of the Neonatal Rat Small Intestinal Barrier to Nonspecific Macromolecular Absorption: Effect of Early Weaning to Artificial Diets. *Pediatric Research*, 28(1), 31–32. <https://doi.org/10.1203/00006450-199007000-00008>

Teixeira, T. F. S., Collado, M. C., Ferreira, C. L. L. F., Bressan, J., & Peluzio, M. do C. G. (2012). Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *Nutrition Research*, 32(9), 637–647. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.07.003>

Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Wells, J. M., & Roy, N. C. (2011). Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. *The Journal of Nutrition*, 141(5), 769–776. <https://doi.org/10.3945/jn.110.135657>

Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2006). Claudins and Epithelial Paracellular Transport. *Annual Review of Physiology*, 68(1), 403–429. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404>

Victora, C. G., Bahl, R., Barros, A. J. D., França, G. V. A., Horton, S., Krasevec, J., Murch, S., Sankar, M. J., Walker, N., & Rollins, N. C. (2016). Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *The Lancet*, 387(10017), 475–490. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7)

Walthall, K., Cappon, G. D., Hurtt, M. E., & Zoetis, T. (2005). Postnatal development of the gastrointestinal system: A species comparison. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 74(2), 132–156. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20040>

Whitworth, N. S., & Grosvenor, C. E. (1978). Transfer of milk prolactin to the plasma of neonatal rats by intestinal absorption. *The Journal of Endocrinology*, 79(2), 191–199.

Winer, D. A., Luck, H., Tsai, S., & Winer, S. (2016). The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 23(3), 413–426. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.003>