



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO, División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-T

SOLICITUD DE TÉRMINO DE SERVICIO SOCIAL

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre : Ilse Daniela Gutierrez Vergara	
Matrícula : 2163023669	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Callejón de las rosas #22, Barrio del Chorrillo, C.P. 40220, Taxco de Alarcón, Guerrero	
Teléfono : 7626223616	Celular : 7626253166
Correo Electrónico : danielatldv@gmail.com	CURP : GUVI980504MGRTRL01

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Procesamiento de Datos Sobre la Cuantificación de Mucopolisacáridos Intestinales de Ratones BALB/c Machos Estresados Tratados con Lactoferrina bovina	
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio de Microbiología Molecular (N-013)	
Dependencia : Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco	
Entidad Federativa : Distrito Federal	
Municipio : Coyoacán	Localidad : CDMX
Fecha de Inicio	Fecha de Término
Día 18 Mes 1 Año 2021	Día 18 Mes 7 Año 2021

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 1.- Educativo Tipo: 2.- Interno

Orientación: 10.- Otros

<p><i>Maria Elisa Drago S.</i> Maria Elisa Drago Serrano 17243 Asesor Interno Nombre, firma y No. Económico</p>	<p>FIRMAS</p>	<p><i>Fabiola Guzmán Mejía</i> Fabiola Guzmán Mejía 43134 Asesor Externo Nombre, firma y No. Económico</p>
<p><i>Ilse Daniela Gutierrez Vergara</i> Ilse Daniela Gutierrez Vergara Alumno Nombre, firma</p>		<p><i>Dra. Tomasa Verónica Barón Flores</i> Dra. Tomasa Verónica Barón Flores Vo. Bo. de la Comisión Nombre y firma de la persona que autoriza</p>

Ciudad de México., a 18 de Julio de 2021.

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el (la) alumno (a): **Ilse Daniela Gutierrez Vergara** con matrícula: **2163023669** concluyó el proyecto de Servicio Social: **“Procesamiento de Datos Sobre la Cuantificación de Mucopolisacáridos Intestinales de Ratones BALB/c Machos Estresados Tratados con Lactoferrina bovina”**. Qué se realizó en el **Laboratorio de Microbiología Molecular (N-013)** ubicado en **Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco** del **18 de Enero de 2021** al **18 de Julio de 2021** bajo mi asesoría cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE



Asesor Interno
Dra. Maria Elisa Drago Serrano
Cargo: Profesor Titular C
No. económico: 17243

Ciudad de México., a 18 de Julio de 2021.

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el (la) alumno (a): **Ilse Daniela Gutierrez Vergara** con matrícula: **2163023669** concluyó el proyecto de Servicio Social: **“Procesamiento de Datos Sobre la Cuantificación de Mucopolisacáridos Intestinales de Ratones BALB/c Machos Estresados Tratados con Lactoferrina bovina”**. Qué se realizó en el **Laboratorio de Microbiología Molecular (N-013)** ubicado en **Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco** del **18 de Enero de 2021** al **18 de Julio de 2021** bajo mi asesoría cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE



Asesor Interno
Dra. Fabiola Guzmán Mejía
Cargo: Profesor Asociado D
No. económico: 43134



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Lic. Química Farmacéutica Biológica

Reporte de Servicio Social

**Título de proyecto: Procesamiento de Datos Sobre la
Cuantificación de Mucopolisacáridos Intestinales de Ratones
BALB/c Machos Estresados Tratados con Lactoferrina bovina**

**Proyecto Genérico: “Evaluación de Productos Relacionados con
la Salud”**

Nombre: Ilse Daniela Gutierrez Vergara

Matricula: 2163023669

Correo electrónico: danielatldv@gmail.com

Asesoras:

Maria Elisa Drago Serrano - Fabiola Guzmán Mejía

Fecha inicio: 18 de Enero 2021 Fecha fin: 18 de Julio 2021

Índice

1. Resumen
2. Abstract
3. Introducción
4. Marco teórico
 - 4.1 Estrés
 - 4.2 Barrera gastrointestinal
 - 4.2.1 Distribución Intestinal (*mucus*)
 - 4.3 Mucinas (Estructura)
 - 4.3.1 Función y distribución
 - 4.4 Mucinas y estrés
 - 4.5 Lactoferrina bovina (bLf)
 - 4.5.1 Estructura
 - 4.5.2 Función en el intestino
 - 4.6 Tinción Azul alcian
5. Justificación
6. Objetivo general
 - 6.1 Objetivos específicos
7. Material y métodos
8. Resultados
 - 8.1 Curva estándar de condroitin-4-sulfato
 - 8.2 Cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en la región proximal sin tratamiento con lactoferrina bovina
 - 8.3. Cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en la región proximal tratados con lactoferrina bovina
 - 8.4 Análisis de los mucopolisacáridos intestinales en la región proximal de ratones tratados y no tratados con lactoferrina bovina
 - 8.5 Cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en la región de colon sin tratamiento con lactoferrina bovina
 - 8.6 Cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en la región de colon tratados con lactoferrina Bovina
 - 8.7 Análisis de los mucopolisacáridos intestinales en el colon de ratones tratados y no tratados con lactoferrina bovina
 - 8.8 Resumen de datos obtenidos de la región proximal y colon de ratones no tratados con lactoferrina bovina (sin y con estrés) y ratones tratados con lactoferrina (sin y con estrés)
9. Discusión
10. Conclusión
11. Perspectiva
12. Bibliografía
13. Anexos

1. RESUMEN

Introducción. El estrés es responsable de la reducción del *mucus* que conlleva algunas enfermedades que afectan la región proximal y colon del tracto gastrointestinal. El *mucus* está compuesto de mucopolisacáridos, los cuales tienen un papel anti-inflamatorio al impedir el contacto directo con la monocapa del epitelio intestinal. La lactoferrina bovina es una glicoproteína multifuncional con potenciales efectos sobre la generación de *mucus*. **Justificación.** Al momento no se sabe cuál es el efecto de la lactoferrina bovina sobre la producción del *mucus* en condiciones de estrés. **Objetivo.** Procesar datos sobre la cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en ratones machos BALB/c sin y con estrés, tratados con y sin lactoferrina bovina, tanto en la región proximal como en el colon. **Material y Métodos.** Se realizó un análisis estadístico para comparar dos grupos independientes mediante la prueba paramétrica t de Student. Para el análisis entre cuatro grupos independientes se aplicó el ANOVA de una vía con comparaciones múltiples y la prueba post-hoc Tukey para evaluar las diferencias significativas, tomando el valor de $p < 0.05$. **Resultados.** Las comparaciones entre dos grupos indicaron que el estrés redujo la concentración de mucopolisacáridos en la región proximal y colon de ratones estresados sin y con lactoferrina bovina en comparación con sus respectivos grupos controles sin estrés. La comparación de los cuatro grupos, indicó que la concentración de mucopolisacáridos en ambas regiones en los ratones sin estrés, aumentó en los ratones tratados con lactoferrina bovina en relación al control sin lactoferrina bovina. **Conclusión.** En el presente trabajo se cumplió el objetivo de procesar los datos sobre la cuantificación de mucopolisacáridos intestinales de ratones sin y con estrés, tratados con y sin lactoferrina bovina, tanto en la región proximal como en el colon. **Perspectiva.** El presente estudio experimental podría fundamentar el empleo de la lactoferrina bovina como aditivo de terapias farmacológicas aplicadas para tratamiento de enfermedades causadas por el estrés.

Palabras clave: Estrés, Barrera Gastrointestinal, *Mucus*, Mucopolisacáridos, Lactoferrina Bovina.

2. ABSTRACT

Introduction. Stress induces the *mucus* reduction associated to some diseases that affect the proximal region and colon of the gastrointestinal tract. *Mucus* overlays the epithelium is composed by mucopolysaccharides which has an anti-inflammatory role by preventing direct contact with the monolayer of the intestinal epithelium. Bovine lactoferrin is a multifunctional glycoprotein with potential effects on *mucus* generation. **Justification.** Up to now, the effect of bovine lactoferrin on *mucus* production under stress conditions is unknown. **Objective.** To analyze data on the intestinal mucopolysaccharide quantification in unstressed and stressed male BALB/c mice without and with bovine lactoferrin treatment in the small intestine proximal region and colon. **Material and methods.** A statistical analysis were performed to compare two independent groups using the parametric Student's t test. For the analysis among four independent groups, one-way ANOVA with multiple comparisons and the Tukey post-hoc test; significant differences were regarded at $p < 0.05$ value. **Results.** Comparisons between two groups indicated that stress reduced the mucopolysaccharide concentration in the proximal region and colon in stressed mice without and with bovine lactoferrin compared to their respective unstressed control groups. Comparison among four groups indicate the mucopolysaccharide concentration in both regions in unstressed mice, increased in the mice treated with bovine lactoferrin in relation to both groups untreated with bovine lactoferrin. **Conclusion.** Data analysis on the intestinal mucopolysaccharide quantification from unstressed and stressed mice without and with bovine lactoferrin, in both in the proximal region and colon, was fulfilled. **Perspective.** The present experimental study may support the potential use of bovine as an additive for pharmacological formulations applied for the treatment of diseases caused by stress.

Key words: Stress, Gastrointestinal Barrier, *Mucus*, Mucopolysaccharides, Bovine Lactoferrin.

3. INTRODUCCIÓN

El estrés es un conjunto de reacciones fisiológicas que prepara al organismo para una acción **(Torrades, 2007)**. De acuerdo a su duración se clasifica en estrés agudo y estrés crónico. El estrés agudo es causado por un único evento de la exposición al estresor y es de corto plazo ya que dura minutos u horas. El estrés crónico es causado por eventos repetidos de la exposición al estresor, este puede llegar a durar horas e incluso días. El estrés crónico se da por el aumento en la carga alostática del sujeto que resulta de un constante vaivén entre homeostasis y estrés **(Rodríguez Fernández, et al., 2013)**.

El impacto del estrés sobre la homeostasis intestinal genera la liberación de mediadores neuroendocrinos del eje cerebro-intestino. Dicho eje comprende una rama nerviosa que incluye el sistema nervioso entérico y los sistemas nerviosos simpático y parasimpático; así como, una rama endocrina del eje hipotalámico-pituitario-adrenal **(Guzmán, et al., 2021)**. La exposición al estrés puede conducir al desarrollo de una amplia gama de enfermedades gastrointestinales, como: GERD, PUD, IBS, IBD, entre otras afecciones **(Konturek, et al., 2011)**.

Por lo tanto, para comprender el impacto del estrés sobre el tracto gastrointestinal es importante entender que la barrera gastrointestinal es una unidad funcional que se organiza en varias capas. Su función es prevenir la entrada de microorganismos patógenos y sustancias tóxicas. Una de las capas de interés para dicho estudio es el *mucus* intestinal **(Viggiano, et al., 2015)**.

El *mucus* intestinal, conformado de mucopolisacáridos, es la primera barrera física con un papel crítico anti-inflamatorio que impide el contacto directo de la microbiota y del contenido luminal con la superficie de la monocapa del epitelio intestinal y eventualmente, con las capas más internas **(Viggiano, et al., 2015)**.

Por consiguiente, los cambios en el *mucus* por efecto del estrés generan: aumento en la depleción de mucina ileal y colónica, aumento de la permeabilidad de macromoléculas; lo anterior favorece la infiltración de neutrófilos, la inflamación y la disminución de la capa de *mucus* formada por mucopolisacáridos **(Söderholm, et al., 2002)**.

La lactoferrina bovina es una proteína multifuncional que se encuentra en la leche con propiedades antivirales, antiinflamatorias, con potenciales efectos sobre el *mucus* intestinal, entre otras funciones **(Wang B., et al., 2017)**.

Es por ello que en el presente estudio se enfocó a analizar los datos sobre el efecto de la lactoferrina bovina sobre la concentración de mucopolisacáridos en ratones sometidos a estrés.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Estrés

El estrés se define como el conjunto de reacciones fisiológicas que prepara al organismo para la acción **(Torrades, 2007)**.

La respuesta al estrés está mediada por dos sistemas: el sistema simpático-adrenomedular (SAM) y el sistema hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA). El primer sistema SAM libera adrenalina, en cambio, el eje HPA, se encarga de la producción de glucocorticoides **(Romero, et al., 2020)**. El estrés estimula la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el hipotálamo (H), la hormona adrenocorticotrópica en la pituitaria (P) y hormonas glucocorticoides en región cortical de la glándula adrenal (A) **(Carabotti et al., 2015)**.

De acuerdo a su duración el estrés puede ser agudo o crónico. El estrés agudo es causado por un único evento de la exposición al estresor y es de corto plazo ya que dura minutos u horas. El estrés crónico es causado por eventos repetidos de la exposición al estresor, este puede llegar a durar horas e incluso días. El estrés crónico se da por el aumento en la carga alostática del sujeto. Esta última se define como el acumulo de eventos estresantes, que generan un constante vaivén entre homeostasis y estrés

El estrés conlleva la liberación de glucocorticoides y catecolaminas que le permiten al sujeto una respuesta eficaz frente al evento estresante **(Rodríguez Fernández, et al., 2013)**.

Por otro lado, el estrés crónico puede tener efectos región-específicos en la morfología dendrítica, neurogénesis, respuesta funcional y en la normalización de la actividad del cerebro. Los cambios mencionados son ocasionados por la exposición crónica a glucocorticoides, con efecto directo en el hipotálamo, así como en diversas estructuras que lo regulan. El aumento basal de glucocorticoides (cortisol, cortiscoteron), promueve la activación de los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides . La activación repetida de dichos receptores inducida por el estrés crónico, puede tener un efecto durante horas, días o semanas **(Rodríguez Fernández, et al., 2013)**. Así mismo se ha visto que la hipersecreción de cortisol ha sido observada como una vía fisiológica relacionada con los efectos del estrés crónico, teniendo resultados perjudiciales para la salud debido a la reducción de la eficacia inmunológica e incluso puede afectar el aparato digestivo **(Ramos, et al., 2020)**.

La exposición al estrés puede conducir al desarrollo de una amplia gama de enfermedades gastrointestinales, como: GERD, PUD, IBS, IBD e incluso puede llegar a generar alergia alimentaria (Fig.1) (Konturek, et al., 2011).

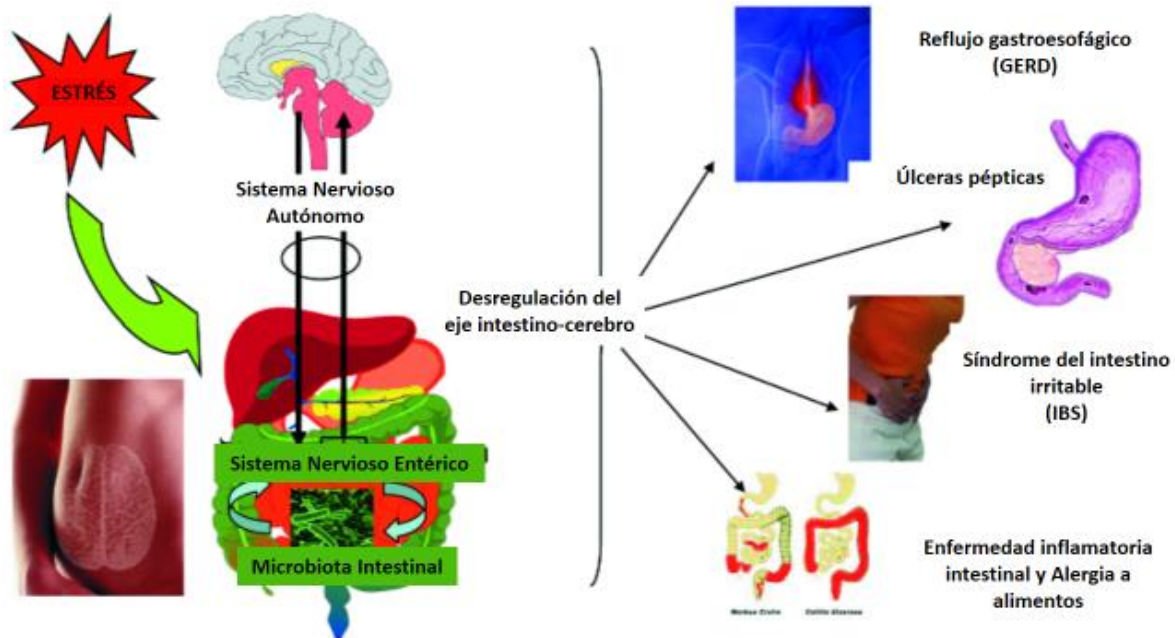


Fig. 1 Consecuencias fisiopatológicas de la alteración del eje cerebro- intestino por estrés. La exposición al estrés conduce a una alteración del eje cerebro-intestino, que resulta en el desarrollo de diferentes enfermedades del tracto gastrointestinal; GERD, PUD, IBS, IBD y alergia alimentaria (Konturek, et al., 2011).

4.2 Barrera Gastrointestinal

La barrera gastrointestinal es una unidad funcional que se organiza en varias capas. Su función es prevenir la entrada de microorganismos patógenos y sustancias tóxicas así como regular la absorción de nutrientes, electrolitos y agua desde el lumen hasta la circulación sanguínea. Desde la capa más externa a la más interna, la barrera intestinal está formada por microbiota, *mucus* y la monocapa de células epiteliales (Viggiano et al., 2015).

La microbiota intestinal es un ecosistema complejo que incluye al menos 10^{14} bacterias, contando con hasta 2000 tipos de especies, con predominio de bacterias anaerobias, y también otros microbios, como levaduras y virus. Estos virus principalmente bacteriófagos que tienen una gran influencia en los ciclos bioquímicos y se ha previsto que ayuden a mantener la diversidad de especies microbianas. La microbiota intestinal interactúa con el cuerpo humano de manera simbiótica, así mismo, juega un papel primordial ya que está involucrada en

funciones como: el metabolismo de nutrientes y fármacos, la regulación de vías metabólicas, el mantenimiento de la integridad epitelial, la modulación de la motilidad gastrointestinal, la estimulación y maduración de la inmunidad sistémica y de las mucosas, la producción de vitaminas y micronutrientes **(Viggiano, et al., 2015)**.

Por otro lado, las células epiteliales están organizadas en una sola capa de 20 μm y se clasifican en 5 tipos celulares que son: enterocitos, células endocrinas, células M, células caliciformes y células de Paneth. Las células epiteliales actúan como una barrera física, inhibiendo la translocación del contenido luminal en los tejidos internos. Están conectados por uniones intercelulares, caracterizadas por proteínas transmembrana que interactúan con células cercanas y con proteínas intracelulares asociadas con el citoesqueleto. Juntos, estos componentes forman una red compleja y homogénea **(Viggiano, et al., 2015)**.

Las células caliciformes son las encargadas de la secreción del *mucus*. El *mucus* intestinal es la primera barrera física con un papel crítico anti-inflamatorio. Lo anterior obedece a que el *mucus*, impide el contacto directo de la microbiota y del contenido luminal con la superficie de la monocapa del epitelio intestinal y eventualmente, con las capas más internas. El *mucus* es una matriz gelatinosa y pegajosa en la cual se secreta la inmunoglobulina A (IgA) y péptidos antimicrobianos que protegen al epitelio de los microorganismos y antígenos patógenos; así mismo, el *mucus* actúa como agente lubricante del epitelio intestinal **(Viggiano, et al., 2015)**. El *mucus* en la región proximal consiste en una sola capa mientras que en colon posee dos capas: una interna y otra externa. La capa interna no permite que las bacterias penetren y la capa externa constituye el hábitat de la microbiota intestinal. Así mismo la mucina es un mucopolisacárido altamente glicosilado, secretada por las células caliciformes que se combina con otras proteínas secretadas en la superficie del epitelio intestinal **(Viggiano, et al., 2015)**.

Dentro de las funciones del *mucus* se encuentran la lubricación, el mantenimiento de una capa hidratada sobre el epitelio, como barrera a patógenos y sustancias nocivas y como una capa de gel permeable para el intercambio de gases y nutrientes con el subyacente epitelio **(Bansil, Turner, 2006)**.

Además de sus funciones protectoras, el *mucus* también participa en muchos procesos patológicos. El *mucus* como se mencionó es la primera barrera con la que los nutrientes y los fármacos entéricos deben interactuar y difundirse a través de ella para ser absorbidos y acceder al sistema circulatorio y sus órganos terminales objetivo **(Bansil, Turner, 2006)**.

De tal forma que el *mucus* tiene un papel importante en la protección del tracto gastrointestinal, ya que es la barrera física de protección del mismo, es por ello que

para entender el impacto causado por el estrés en el intestino nos enfocaremos en el *mucus* como parte clave de estudio.

4.2.1 Distribución Intestinal (*Mucus*)

Se ha sugerido una organización funcional del sistema de *mucus* intestinal de acuerdo a la liberación, grosor, permeabilidad, tiempo de crecimiento y propiedades adhesivas del *mucus* (**Ermund, et al., 2013**).

En el caso del intestino delgado el *mucus* es laxo y penetrable por lo que puede permitir una fácil penetración de nutrientes (**Ermund, et al., 2013**). El *mucus* del intestino delgado llena el espacio luminal entre las vellosidades y generalmente también cubre las puntas de estas. Sin embargo, como el *mucus* no está anclado a la superficie epitelial, se mueve con las ondas peristálticas en dirección distal. Las células caliciformes secretan constantemente *mucus* con alto contenido de MUC2, especialmente de las aberturas de las criptas, de tal forma que el *mucus* secretado de la cripta se mezcla con las secreciones de las células de Paneth que contienen péptidos antibacterianos, enzimas como lisozima y proteínas como DMBT1 (**Pelaseyed, et al., 2014**). El *mucus* del intestino delgado es el hábitat de bacterias que viven en simbiosis, ya que degradan el *mucus* y ayudan a su renovación, en tanto que el *mucus* proporciona los nutrientes para su proliferación (**Pelaseyed, et al., 2014**).

En contraste con el intestino delgado, en el estómago, el *mucus* es una monocapa que se encuentra firmemente adherida. Esta capa interna de *mucus* solo se puede eliminar después de la aplicación de una fuerza que dañe el epitelio (**Ermund, et al., 2013**).

Por otro lado el colon tiene dos capas de *mucus*, una capa interna donde el *mucus* es impermeable a las bacterias y está formada por una red de mucina MUC2, esta capa interna de *mucus* se renueva continuamente por secreción de las células epiteliales superficiales. Una estimación del recambio de la capa de *mucus* interna en el tejido colónico distal murino vivo sugiere que la capa se renueva cada 1 a 2 horas. Por supuesto, esta rápida renovación es importante para mantener esta capa interna de *mucus* libre de bacterias. Otro factor importante son las capas escalonadas de la mucina MUC2 que actúan como un filtro de exclusión de tamaño lo cual no permiten que las bacterias penetren, es por ello que esta capa interna no es penetrable por bacterias, sin embargo las proteínas de 50 kDa, pueden atravesar esta capa (**Pelaseyed, et al., 2014**).

En cambio, en la capa externa, el *mucus* es laxo, sin anclar y permite que las bacterias penetren. Esta capa externa de *mucus* sirve como hábitat y como fuente parcial de alimento para estas bacterias **(Johansson, et al., 2013)**.

4.3 Mucinas (Estructura)

Las mucinas son glicoproteínas extracelulares grandes con pesos moleculares que oscilan entre 0,5 y 20 MDa. Las mucinas que se encuentran unidas a la membrana, así como las mucinas secretadas son altamente glicosiladas y están compuestas de carbohidratos, principalmente de N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, fucosa, galactosa y ácido siálico (ácido N- acetilneuramínico) y trazas de manosa y sulfato **(Bansil, Turner, 2006)**.

Las mucinas tienen una estructura de cadena principal de proteínas altamente polimérica, unidas a numerosas cadenas laterales de oligosacáridos hidrofóbicos e hidrófilos que contribuyen a la formación de una estructura similar a un gel. Están unidas a una amplia variedad de cadenas laterales de oligosacáridos unidos a oxígeno que constituyen más del 70% del peso de la molécula. Se han identificado hasta 20 genes de mucina diferentes, que van de *MUC1* a *MUC20* según el orden de su descubrimiento. Los genes de mucina se expresan en forma específica de tejido y tipo celular y se clasifican ampliamente en dos tipos: secretorios y asociados a la membrana **(Kim y Ho, 2010)**. Las mucinas secretadas tienen un alto contenido de MUC2.

4.3.1 Función y Distribución

Las mucinas son resistentes a las proteasas endógenas y a sus dominios centrales de mucina, están protegidos por glucanos, los extremos N-terminales y C-terminales están estabilizados con numerosos enlaces cruzados entre los aminoácidos de cisteína; es por ello que las enzimas digestivas no pueden digerir otros glucanos que no sean almidón y algunos disacáridos, por lo que deja intactas a las mucinas **(Johansson, et al., 2013)**.

De acuerdo a sus propiedades estructurales, la función de las mucinas es la protección, así como lubricar el tracto gastrointestinal. El *mucus* nativo no es pegajoso ni hidrofóbico, sus características pegajosas e hidrofóbicas aparecen después de que se ha almacenado o purificado **(Caldara, et al., 2012)**.

En el intestino delgado y grueso, MUC2 es la principal mucina secretora sintetizada y secretada por las células caliciformes **(Fig. 2) (Andrianifahanana, et al., 2006)**.

La mucina MUC2 tiene propiedades estructurales y fisicoquímicas similares a las de otras mucinas secretoras formadoras de gel, como MUC5AC, MUC5B y MUC6, expresadas en el epitelio glandular gástrico y respiratorio. El monómero de mucina MUC2 tiene más de 5000 aminoácidos y consta de dominios centrales repetidos en tándem ricos en prolina, serina y treonina, la última de las cuales está enlazada O-glicosídicamente a muchas cadenas laterales de oligosacáridos de diferentes longitudes y composiciones (también llamadas "PTS" dominios) (Andrianifahanana, et al., 2006).

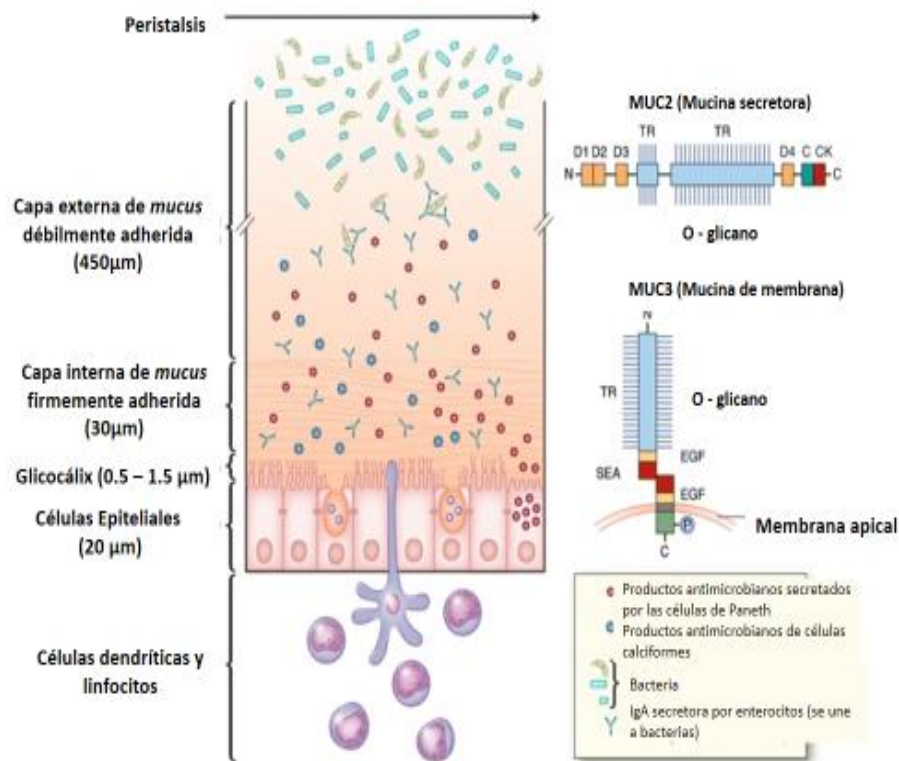


Fig. 2 Representación esquemática de las capas de *mucus* que cubren la superficie de las células epiteliales (izquierda), así mismo se muestran las estructuras de dominio de las mucinas secretoras (MUC2) y mucinas unidas a la membrana (MUC3) (derecha) (Kim y Ho, 2010).

La mucina MUC2, es una piedra angular de la mucosidad intestinal, no solo porque actúa como una barrera física, sino que también proporciona señales antiinflamatorias a las células dendríticas, un tipo de células inmunes que regulan la salud de nuestro intestino y nos ayudan a luchar contra las bacterias y antígenos de los alimentos (Shan, et al., 2013).

4.4 Mucinas y estrés

El estrés puede afectar la integridad funcional y estructural del *mucus*. Favorece el aumento de la permeabilidad intestinal, la interacción de antígenos luminales con la superficie del epitelio intestinal y la inflamación de bajo grado, que en conjunto, alteran la barrera gastrointestinal (**González, et al., 2015**).

Estudios realizados, reportan que la inmovilización en ratas generó estrés, dando como resultado, agotamiento de las células caliciformes encargadas de la secreción de mucinas, teniendo efectos sobre la liberación de moco en ratas (**Castagliuolo, et al., 1998**).

Los cambios en las secreciones, así como en el aumento de la permeabilidad que se da en respuesta al estrés se debe al factor liberador de corticotropina (CRF) liberada por el hipotálamo que coordina las respuestas conductuales, endocrinas, autónomas y viscerales al estrés. Así mismo activa los receptores CRF-R1 el cual estimula la función secretomotora colónica e induce hipersensibilidad visceral y el CRF-R2 inhibe la función motora gástrica (**Tache, et al., 2018**).

4.5 Lactoferrina bovina

Uno de los componentes nutricionales que se propone para el tratamiento de las afecciones producidas por el estrés en el intestino es la lactoferrina bovina.

La lactoferrina bovina es una proteína multifuncional que se encuentra en muchas secreciones biológicas, incluida la leche. Posee propiedades de unión/ transferencia de hierro, antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antiinflamatorias y anticancerígenas (**Wang B., et al., 2017**).

La lactoferrina bovina, es un miembro de la familia de las glicoproteínas transferrinas que se unen al hierro, se encuentra en los leucocitos polimorfonucleares y en una variedad de secreciones exocrinas de vertebrados como leche, saliva, lágrimas, secreciones mucosas y genitales. Muchos tipos de células, incluidos los linfocitos de sangre humana y las células epiteliales intestinales de ratones adultos jóvenes, portan receptores de lactoferrina bovina. In vitro, la lactoferrina bovina estimula el crecimiento de linfocitos y la liberación de interleucina-8 (IL-8) de los neutrófilos. La lactoferrina bovina también regula positivamente la fagocitosis y la citotoxicidad de neutrófilos y macrófagos. Además, la lactoferrina bovina regula a la baja la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos por parte de los macrófagos, la liberación de IL-1, IL-2 y el factor de necrosis tumoral (TNF) de los leucocitos, o la activación del complemento (**Sfeir, et al., 2004**).

La lactoferrina bovina, en el sistema inmune de las mucosas, se reportaron diversos efectos inmunomoduladores en modelos animales y en humanos, suplementados con lactoferrina bovina, observaron un incremento en los niveles de IgA e IgG en el fluido intestinal de ratones, así como la proliferación de placas de Peyer y esplenocitos. La administración de hidrolizados de lactoferrina bovina, provoca un aumento de células NK y de linfocitos T del tipo CD4+ y CD8+, en la sangre y en el intestino delgado de ratones. La molécula intacta, induce la secreción de IL-18, IL-10 y gamma interferón **(Rodríguez Franco, et al., 2005)**.

4.5.1 Estructura

La lactoferrina bovina, es una glicoproteína de unión a hierro, que pertenece a la familia de las proteínas transferrinas, tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kDa y su estructura incluye dos lóbulos, cada uno capaz de quelar reversiblemente dos iones Fe^{+3} por molécula. Ambos lóbulos tienen el mismo pliegue, de acuerdo con su identidad de secuencia de aproximadamente 40%. En cada lóbulo, dos dominios, denominados N1 y N2, o C1 y C2, encierran una fisura profunda que contiene el sitio de unión de hierro conservado **(Fig. 3)**. Por lo general, solo está saturado en un 15% con hierro, lo que indica que los dos lóbulos no están completamente ocupados por hierro; también puede actuar sobre la homeostasis sistémica del hierro modulando la síntesis de las dos proteínas clave hepcidina y ferroportina a través de la regulación a la baja de la interleucina-6 (IL-6) **(Superti, 2020)**.

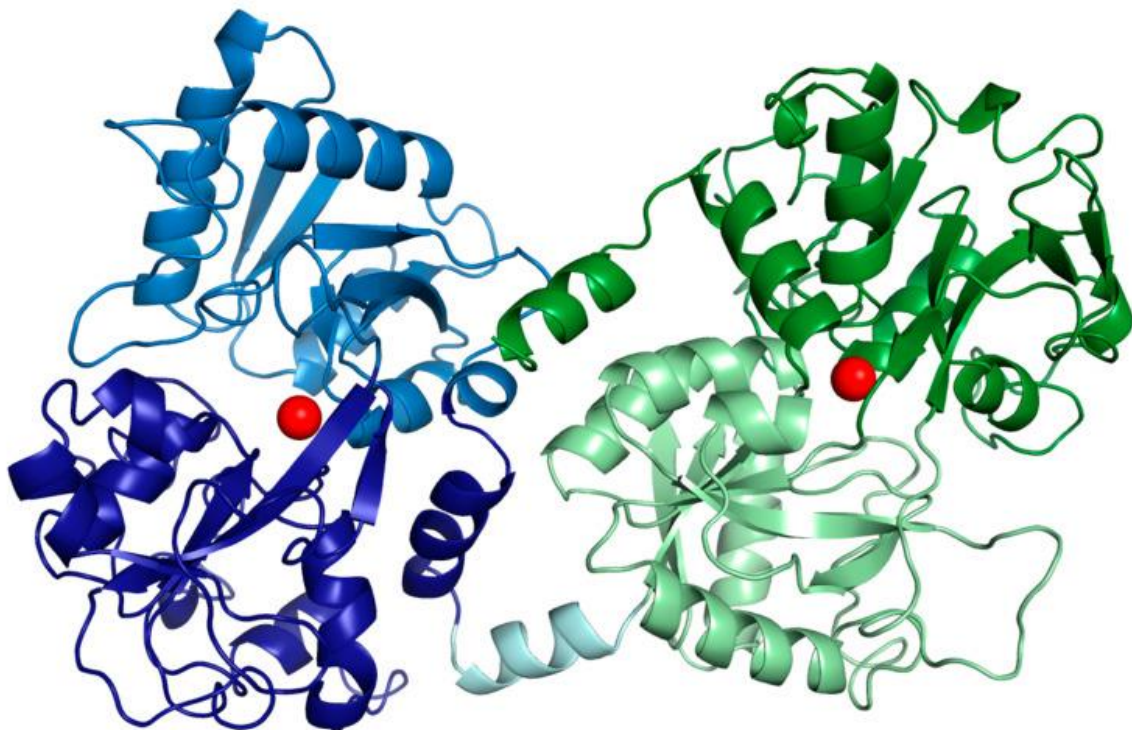


Fig.3 lactoferrina bovina en 3D, en la cual se muestra el lóbulo N en azul (N1 azul pálido y N2 azul oscuro) y el lóbulo C es verde (C1 verde oscuro y C2 verde pálido) y los iones de hierro se representan como esferas rojas (**Superti, 2020**).

4.5.2 Función en el intestino

Como se ha mencionado, el *mucus* intestinal es la primera línea de defensa del huésped que está expuesta a una gran cantidad de antígenos de los alimentos y bacterias. La lactoferrina bovina puede interactuar con las células epiteliales y los linfocitos en el *mucus* intestinal, se ha reportado actividad estimulante sobre la inmunidad del *mucus*, con un aumento de la secreción de IgA e IgG. Recientemente se halló una citoquina proinflamatoria, la interleucina-18 (IL-18), la cual se encontró que esta elevada en los tejidos epiteliales del intestino delgado después del tratamiento con bLf. La IL-18 es producida por diversas células como macrófagos, queratinocitos y células epiteliales intestinales, y actúa sobre varios tipos de células para influir fuertemente en la expresión de varios genes, incluido el gen del interferón-gamma (IFN- γ). La IL-18 también mejora las respuestas de las células T de tipo Th1 y genera células T CD8 + (**Wang W., et al., 2000**).

Se ha estudiado que la lactoferrina bovina induce el desarrollo de *mucus*, por tanto, aumenta la superficie de la mucosa y no solo puede mejorar la absorción de hierro sino también de otros nutrientes (**Superti, 2020**).

Es por eso que el tratamiento con bLf en ratones estresados puede ser importante para la elevación de la inmunidad de la mucosa intestinal (**Superti, 2020**).

4.6 Tinción azul alcian

Para poder realizar la cuantificación de mucopolisacáridos se puede emplear el método colorimétrico de azul alcian. El azul alcian es un colorante catiónico que contiene cuatro residuos de isotiouronio y puede unirse sensiblemente a macromoléculas cargadas negativamente (Ej., Mucopolisacáridos) mediante fuerzas electrostáticas. Los grupos de alta densidad de glicanos ligados a "O" son característicos de las moléculas de mucina. Es por ello que dicha técnica colorimétrica se puede emplear para la determinación de mucopolisacáridos (**Kameyama, et al., 2015**).

Es por eso que las mucinas generalmente se visualizan por tinción con azul alcian, y mucinas ácidas en secciones de tejido y membranas (**Kameyama, et al., 2015**).

El azul alcían soporta al menos dos y hasta cuatro cargas positivas, en las condiciones normalmente utilizadas en la tinción. Por lo tanto, es de esperar que se mantenga fuertemente en el intenso campo electrostático negativo asociado con polianiones tales como condroitín sulfato, ácido hialurónico, heparina, ADN y glicoproteínas ácidas (mucinas). Se cree que este tipo de unión, en la que interviene la atracción de Coulombie entre cargas opuestas, conduce a la formación de un "enlace de sal", es la principal y probablemente la única forma de unión que tiene lugar en la mayoría de las aplicaciones de la tinción de azul alcían, es por ello que la aplicación de esta técnica a los epitelios secretores de mucina es bastante eficaz para discriminar entre glicoproteínas "sulfatadas" y "carboxiladas" **(Quintarelli y Dellovo, 1965)**.

5. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se sabe que el estrés y la lactoferrina bovina por si mismos alteran la producción de *mucus*. En este reporte se analiza por primera vez el impacto del efecto combinado de ambos sobre la generación de *mucus* en la región proximal y del colon de ratones BALB/c.

El presente estudio experimental propone fundamentar el empleo de la lactoferrina bovina como aditivo de terapias farmacológicas aplicadas para tratamiento de enfermedades causadas por el estrés como: GERD, PUD, IBS, IBD.

6. OBJETIVO GENERAL

Procesar datos sobre la cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en ratones BALB/c machos estresados tratados con lactoferrina bovina.

6.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Procesar los datos para elaborar la curva estándar de condroitina 4-sulfato.
2. Cuantificar la concentración de mucopolisacáridos en la región proximal y colon con base en la curva estándar obtenida.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Los resultados obtenidos en base a los métodos de Whiteman y Kitagawa se almacenaron en una base de datos de Excel.

Los datos fueron procesados de acuerdo a lo siguiente:

1. Se calcularon los promedios, las desviaciones estándar de los triplicados.
2. Se utilizaron los promedios calculados de los triplicados para construir el gráfico de la curva estándar; en el eje X se colocó la concentración de condroitin-4-sulfato en $\mu\text{g/ml}$ y en el eje Y la absorbancia, la cual fue medida a una $\lambda= 620 \text{ nm}$.
3. Se realizó una regresión lineal de los valores de la curva estándar condroitin-4-sulfato.
4. Se interpolaron los datos de las muestras de tejido de la región proximal y de colon para obtener los datos en $\mu\text{g/mL}$ de la concentración de mucopolisacáridos en base a los valores de la curva estándar de condroitin -4- sulfato.
5. Se sacaron los promedios, desviaciones estándar, coeficiente de variación y porcentaje de coeficiente de variación de las concentraciones de mucopolisacáridos obtenidas de la región proximal y del colon de cada grupo de estudio.
6. Se utilizó la prueba paramétrica t de Student para comparar los datos de las concentraciones de mucopolisacáridos intestinales en μg por gramo (g) de muestra entre dos grupos independientes; como los datos si cumplieron con los criterios de normalidad de la curva de Gauss, los datos no se compararon con la prueba no paramétrica de Mann Whitney.
NOTA: Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron a valor de $p<0.05$
7. Se utilizó la prueba paramétrica ANOVA de una vía con comparaciones múltiples y la prueba post-hoc de Tukey para analizar los datos de las concentraciones de mucopolisacáridos intestinales en μg por gramo (g) de muestra entre cuatro grupos independientes y determinar las diferencias estadísticas entre los grupos analizados.
NOTA: Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron a valor de $p<0.05$
8. Se realizaron los gráficos de cada grupo de estudio en base al análisis estadístico.

8. RESULTADOS

8.1 Curva estándar de condroitin-4-sulfato

En la **Tabla 1** se muestran las concentraciones de estándar interno y las absorbancias obtenidas a una longitud de onda (λ) de 620 nm. Los valores de la **Tabla 1** se usaron para realizar el **Gráfico 1** en donde se representa la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación lineal ($r^2 = 0.994$)

Curva Estándar	
[$\mu\text{g/mL}$]	Abs $\lambda=620$
0.00	0.000
2.344	0.029
4.688	0.059
9.375	0.111
18.750	0.199
37.500	0.374
75.000	0.760
150.000	1.576

Tabla 1 Curva estándar de condroitin-4-sulfato.

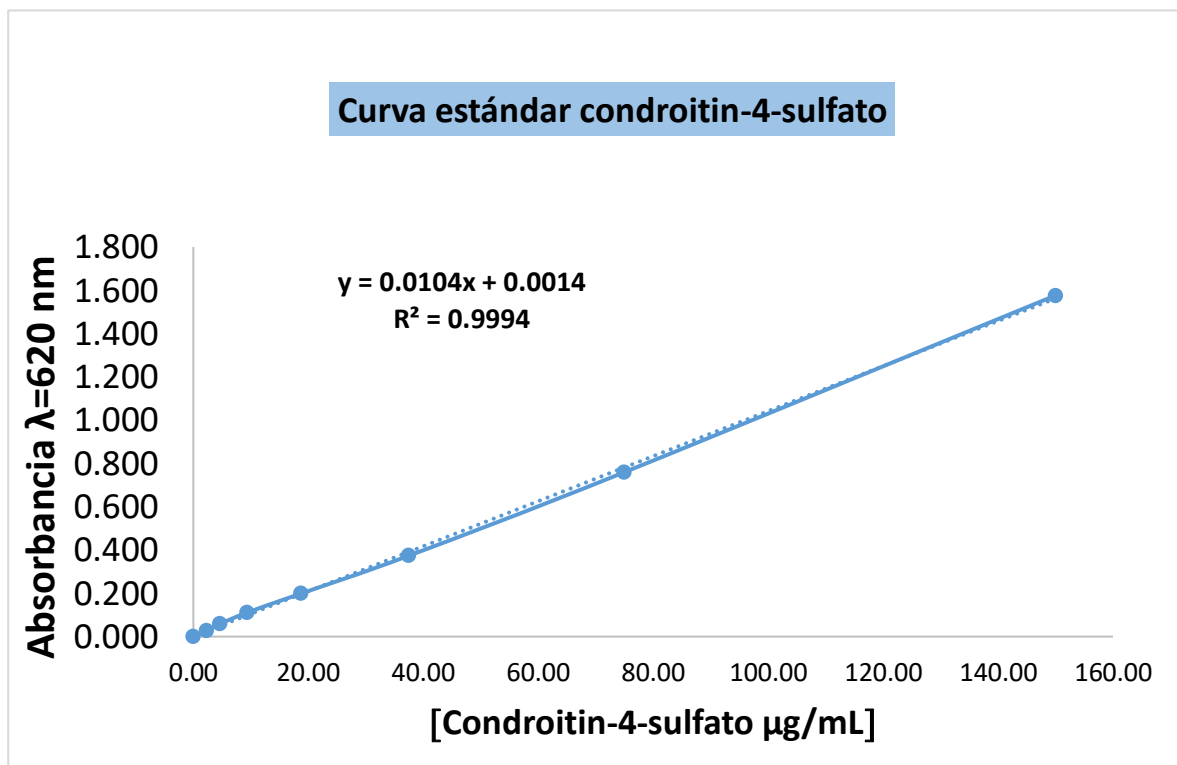


Gráfico 1 Curva estándar de condroitin-4-sulfato.

8.2 Cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en la región proximal sin tratamiento con lactoferrina bovina

En la **Tabla 2** se muestra la concentración de mucopolisacáridos intestinales de la región proximal en ratones machos sin estrés y con estrés; también se muestran los valores del promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y el porcentaje del coeficiente de variación de cada grupo.

N° de ratón	Px sin estrés µg/g	N° de ratón	Px con estrés µg/g
1	8751	1	1592
2	4742	2	4207
3	1708	3	2313
4	1001	4	6349
5	3944	5	2713
6	1912	6	1273
1	5067	1	2453
2	3839	2	3432
3	2248	3	1264
4	3139	4	2277
5	1920	5	2341
6	3504	6	4677
1	5180	1	4012
2	12325	2	3061
3	4661	3	3639
4	5607	4	3521
5	6160	5	2462
6	3806	6	1726

Promedio	4417.511173	Promedio	2961.610753
Desv. Estan.	2728.59638	Desv. Estan.	1307.465249
CV	0.617677301	CV	0.441470996
%CV	61.76773013	%CV	44.14709962

Tabla 2 Concentración de mucopolisacáridos en µg por gramo (g) de muestra de ratones sin estrés y con estrés en la región proximal.

Los valores de la **Tabla 2** se representan en el **Gráfico 2**. Se puede observar que la concentración de mucopolisacáridos en los ratones con estrés es significativamente menor (**p=0.049**) en relación con el grupo control sin estrés.

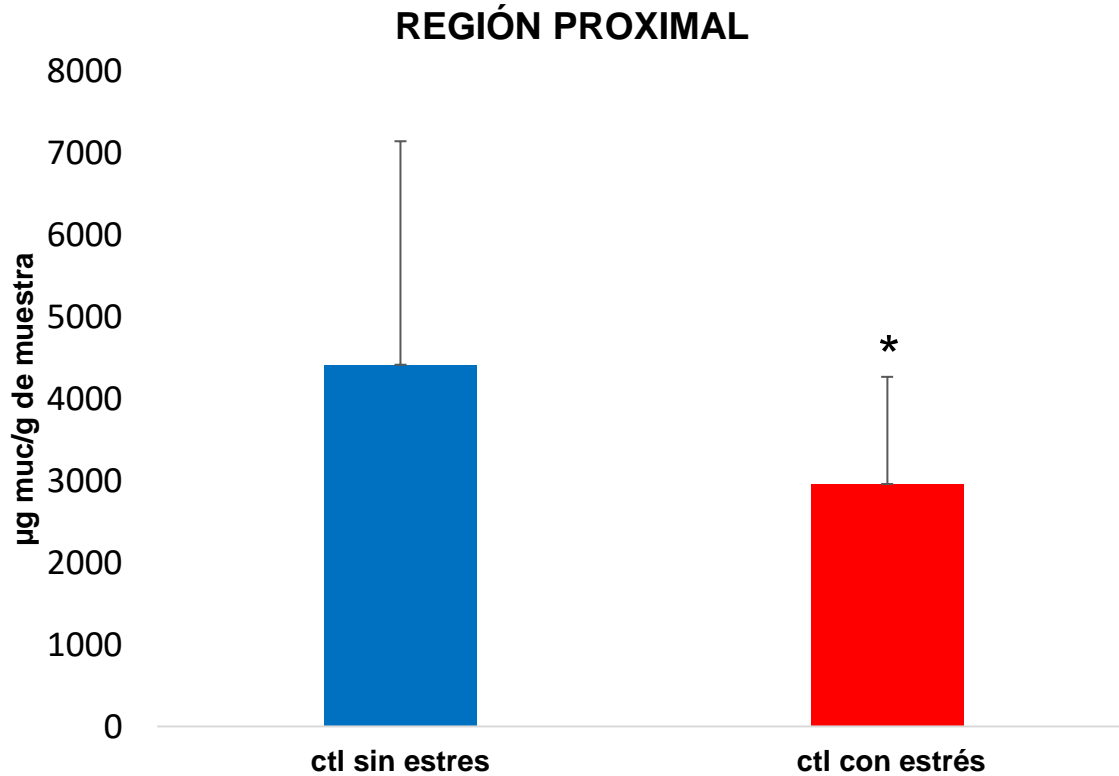


Gráfico 2 Concentración de mucopolisacáridos intestinales en µg por gramo (g) de muestra en la región proximal (Eje Y) y grupos de ratones sin estrés (azul) y con estrés (rojo) sin tratar con lactoferrina bovina (Eje X). * $p < 0.05$ vs grupo control (ctl).

8.3. Cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en la región proximal tratados con lactoferrina bovina

En la **Tabla 3** se muestra la concentración de mucopolisacáridos intestinales en la región proximal en ratones machos sin estrés y con estrés tratados con lactoferrina bovina; también se muestran los valores del promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y el porcentaje del coeficiente de variación de cada grupo.

N° de ratón	Px s/estrés bLf µg/g	N° de ratón	Px con estrés bLf µg/g
1	6934	1	3993
2	9077	2	6628
3	6985	3	3145
4	5815	4	3754

5	6613	5	3002
6	7228	6	5298
1	6602	1	8886
2	5053	2	3025
3	6611	3	3655
4	4216	4	2616
5	4255	5	3135
6	2646	6	1948

Promedio	6002.792155	Promedio	4090.40533
Desv. Estan.	1714.656951	Desv. Estan.	1956.30444
CV	0.285643232	CV	0.47826665
%CV	28.56432317	%CV	47.8266647

Tabla 3 Concentración de mucopolisacáridos en μg por gramo (g) de muestra de ratones sin estrés y con estrés tratados con lactoferrina bovina en la región proximal.

Los valores de la **Tabla 3** se representan en el **Gráfico 3**. En los ratones tratados con lactoferrina bovina se puede observar que la concentración de los mucopolisacáridos en los ratones estresados es significativamente menor ($p=0.018$) en relación con el grupo control sin estrés.

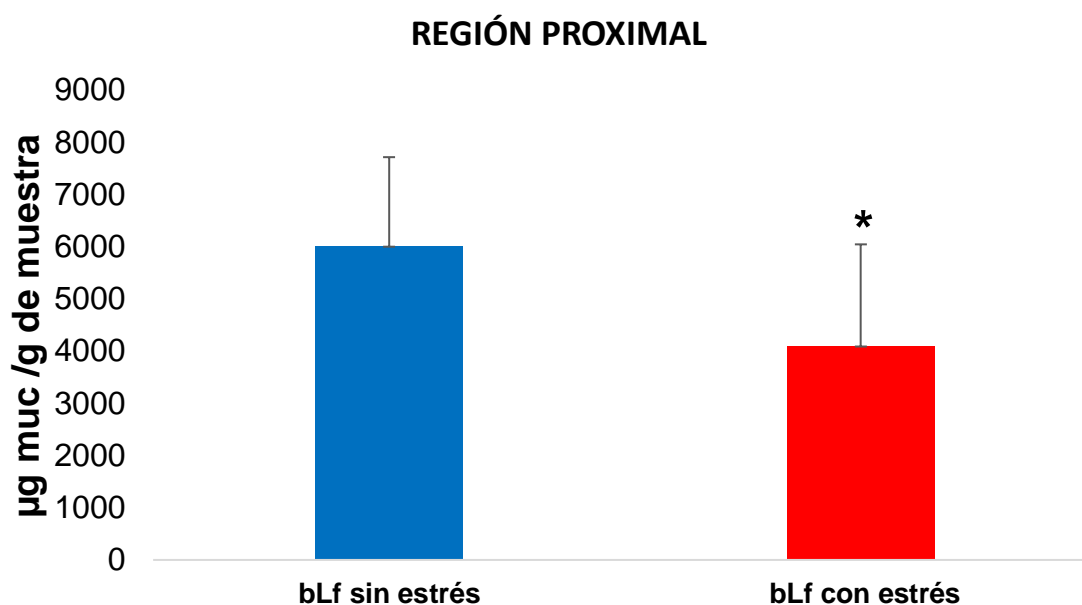


Gráfico 3 Concentración de mucopolisacáridos intestinales en μg por gramo (g) de muestra en la región proximal (Eje Y) y grupos de ratones sin estrés (en azul) y con estrés (en rojo) tratados con lactoferrina bovina (Eje X). * $p < 0.05$ vs grupo control (bLf sin estrés).

8.4 Análisis de los mucopolisacáridos intestinales en la región proximal de ratones tratados y no tratados con lactoferrina bovina.

En la siguiente **Tabla 4** se muestran los datos obtenidos de cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en ratones sin lactoferrina bovina (verde) y tratados con lactoferrina bovina (morado). También se muestran los valores de promedio y desviación estándar de cada grupo.

	Px ctl sin estres	Px ctl con estrés	Px bLf sin estrés	Px bLf con estrés
PROMEDIO	4417.511173	2961.610753	6002.792155	4090.405326
Desv. Estan.	2728.59638	1307.465249	1714.656951	1956.30444

Tabla 4 Análisis de datos de cuantificación de mucopolisacáridos en la región proximal.

Los valores de la **Tabla 4** se representan en el **Gráfico 4**. De acuerdo al **Gráfico 4** se puede observar que la concentración de mucopolisacáridos fue mayor significativamente ($p < 0.01$) en los ratones sin estrés tratados con lactoferrina bovina en comparación con los ratones control sin estrés. No se observaron otras diferencias estadísticas significativas.

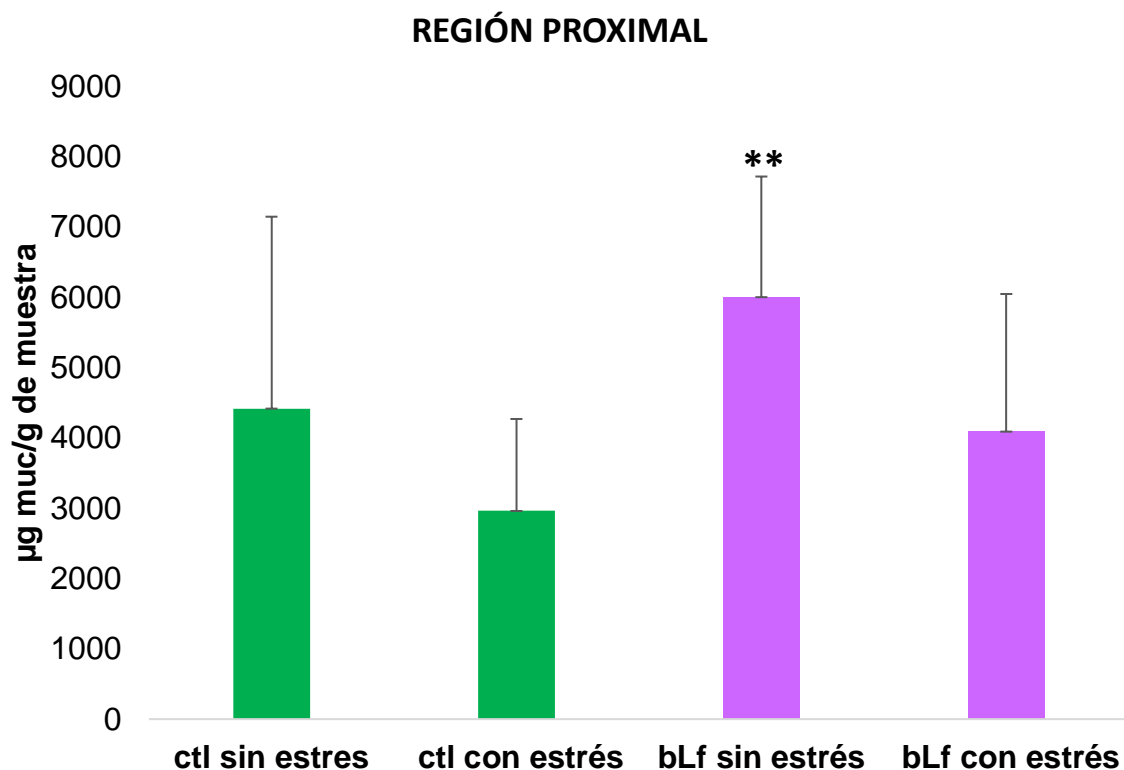


Gráfico 4 Cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en la región proximal. Grupo control sin estrés y con estrés sin tratar con lactoferrina bovina (verde) y grupo sin estrés y con estrés tratados con lactoferrina bovina (morado). ANOVA de una vía con comparaciones múltiples Tukey ** $p = 0.0023$. Se muestran los grupos de estudio (Eje X) y la concentración de mucopolisacáridos intestinales μg por gramo (g) de muestra (Eje Y).

8.5 Cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en la región de colon sin tratamiento con lactoferrina bovina

En la **Tabla 5** se muestra la concentración de mucopolisacáridos intestinales de la región del colon en ratones machos sin estrés y con estrés: también se muestran los valores del promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y el porcentaje del coeficiente de variación de cada grupo.

N° de ratón	Colon ctl sin estrés $\mu\text{g/g}$	Colon ctl con estrés $\mu\text{g/g}$
1	4391	1076
2	4499	2591
3	2374	4639
4	4536	895
5	4847	2038
6	1069	718
1	878	1160
2	1684	1366
3	1608	795
4	1314	751
5	2255	633
6	637	3892
1	2234	2048
2	1855	1429
3	1999	2060
4	2018	1405
5	1991	1863
6	2525	959

Promedio	2372.955126	Promedio	1684.396906
Desv. Estan.	1311.929597	Desv. Estan.	1100.746661
CV	0.552867428	CV	0.653496012
%CV	55.28674278	%CV	65.3496012

Tabla 5 Concentración de mucopolisacáridos en μg por gramo (g) de muestra de ratones sin estrés y con estrés en la región del colon.

Los valores de la **Tabla 5** se representan en el **Gráfico 5**. Se puede observar que la concentración de mucopolisacáridos en los ratones con estrés no fue significativamente menor ($p = 0.0971$) en relación con el grupo control sin estrés.

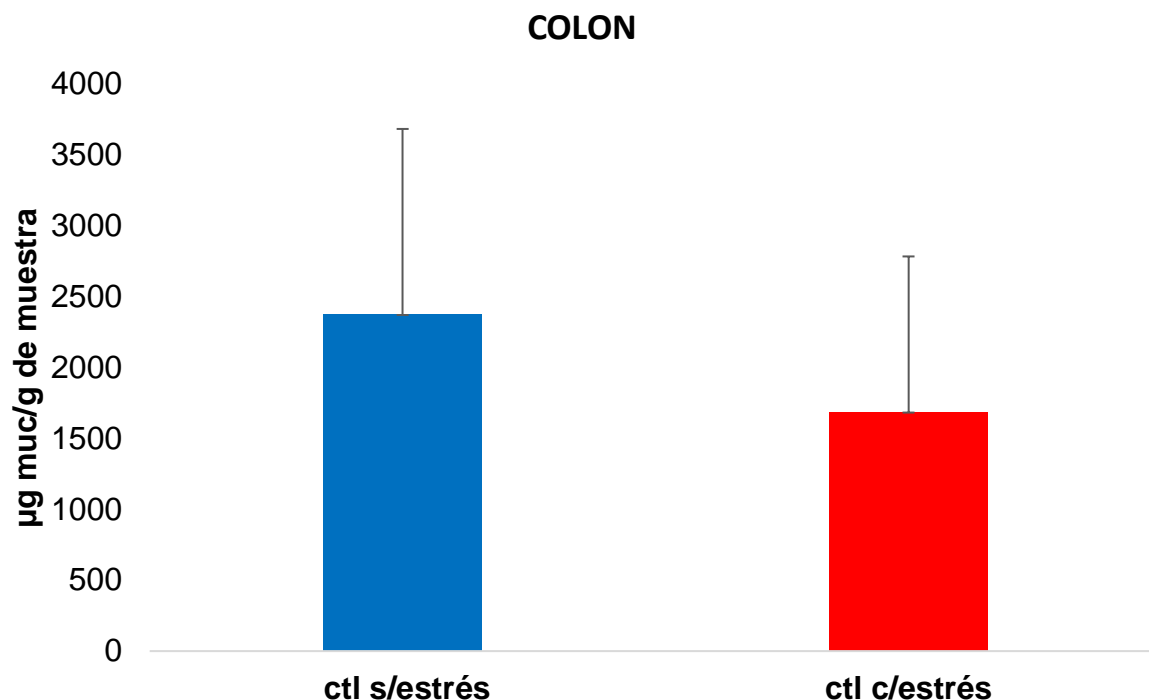


Gráfico 5 Concentración de mucopolisacáridos intestinales en µg por gramo (g) de muestra en la región del colon (Eje Y) y grupos de ratones sin estrés (azul) y con estrés (rojo) sin tratar con lactoferrina bovina (Eje X).

8.6 Cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en la región de colon tratados con lactoferrina bovina

En la **Tabla 6** se muestra la concentración de mucopolisacáridos en el colon en ratones machos sin estrés y con estrés tratados con lactoferrina bovina; también se muestran los valores del promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y el porcentaje del coeficiente de variación de cada grupo.

N° de ratón	Colon s/estrés bLf µg/g	Colon con/estrés µg/g
1	8240	3710
2	5808	2510
3	2859	1393
4	8002	2689
5	4610	1555
6	1748	2618

1	2636		2380
2	2272		2664
3	1919		4159
4	3535		2061
5	3239		1262
6	1897		1861

Promedio	3897.046646	Promedio	2405.162661
Desv. Estan.	2301.768471	Desv. Estan.	876.429276
CV	0.590644321	CV	0.36439501
%CV	59.06443213	%CV	36.4395012

Tabla 6 Concentración de mucopolisacáridos en μg por gramo (g) de muestra de ratones sin estrés y con estrés tratados con lactoferrina bovina en la región del colon.

Los valores de la **Tabla 6** se representan en el **Gráfico 6**. Se puede observar que en los ratones tratados con lactoferrina bovina la concentración de los mucopolisacáridos fue significativamente menor en los ratones estresados ($p=0.047$) en relación con el grupo control sin estrés.

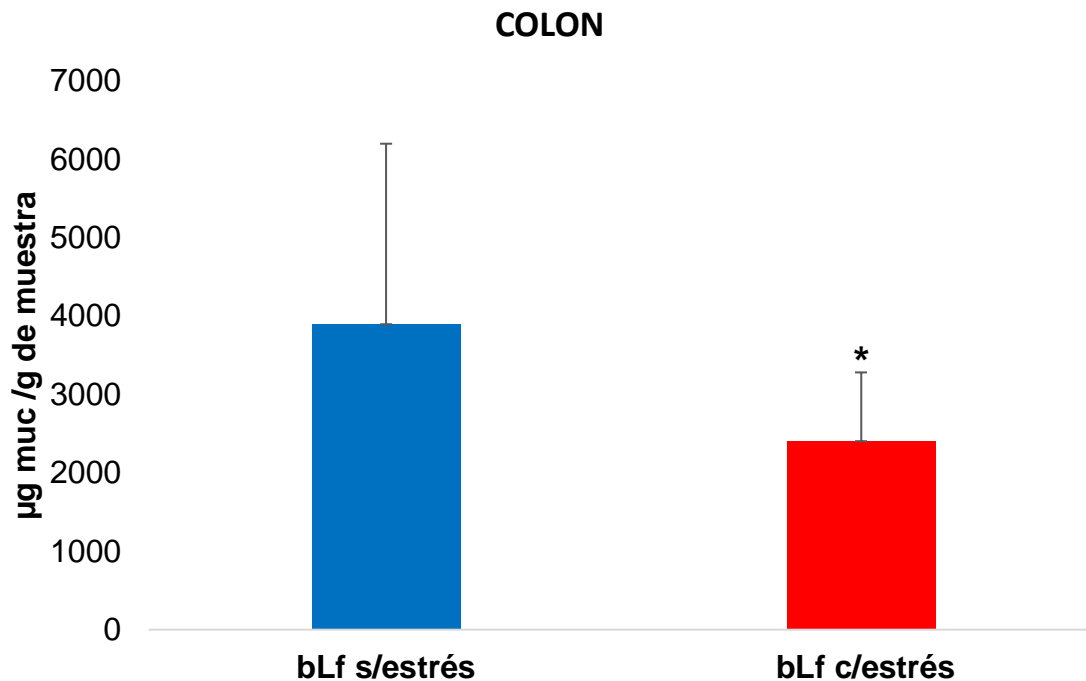


Gráfico 6 Concentración de mucopolisacáridos en μg por gramo (g) de muestra en el colon (Eje Y) de ratones sin estrés (azul) y ratones con estrés (rojo) tratados con lactoferrina bovina (Eje X) * $p < 0.05$ vs grupo control (bLf sin estrés).

8.7 Análisis de los mucopolisacáridos intestinales en el colon de ratones tratados y no tratados con lactoferrina bovina

En la siguiente **Tabla 7** se muestran los datos obtenidos de cuantificación de mucopolisacáridos en el colon de ratones sin lactoferrina bovina (azul) y tratados con lactoferrina bovina (morado). También se muestran los valores del promedio y desviación estándar de cada grupo.

	Colon ctl s/estrés	Colon ctl c/estrés	Colon bLf s/estrés	Colon bLf c/estrés
PROMEDIO	2372.955126	1684.396906	3897.046646	2405.162661
Desv. Estan.	1311.929597	1100.746661	2301.768471	876.4292761

Tabla 7 Comparación de datos de cuantificación de mucopolisacáridos en el colon.

Los valores de la **Tabla 7** se representan en el **Gráfico 7**. De acuerdo al **Gráfico 7** se puede observar que la concentración de mucopolisacáridos fue mayor significativamente ($p < 0.05$) en los ratones sin estrés tratados con lactoferrina bovina en comparación con los ratones control sin estrés. No se observaron otras diferencias estadísticas significativas.

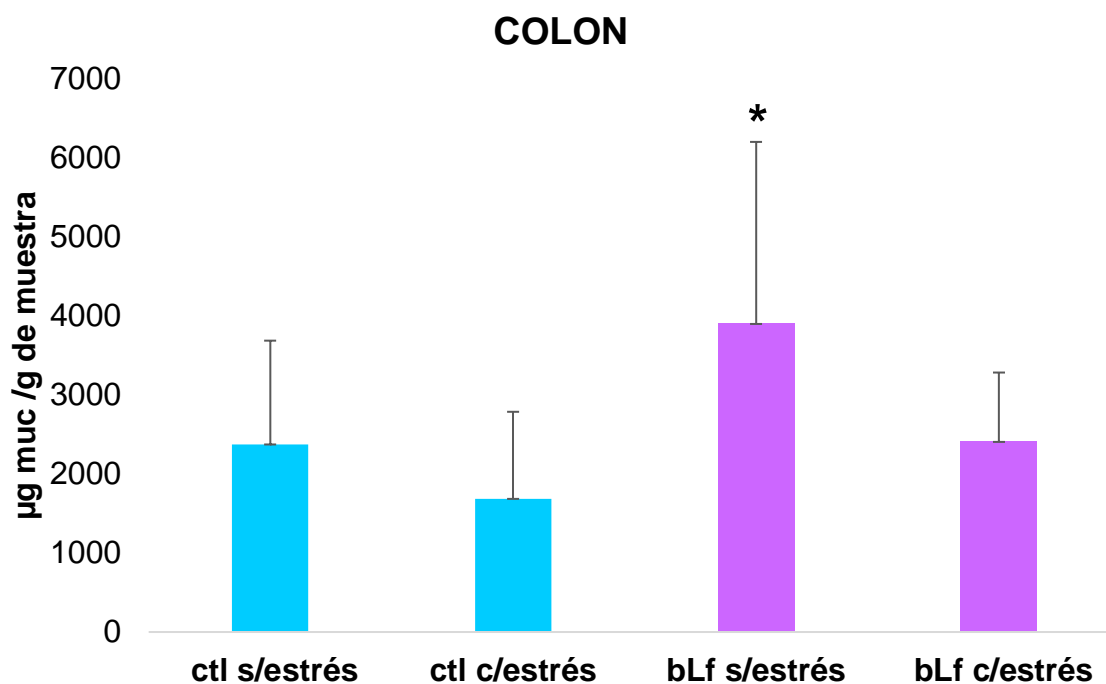


Gráfico 7 Cuantificación de mucopolisacáridos intestinales en la región del colon. Grupo basal sin estrés y con estrés sin tratar con lactoferrina bovina (azul) y grupo sin estrés y con estrés tratados con lactoferrina bovina (morado). ANOVA de una vía con comparaciones múltiples Tukey * $p = 0.0017$. Se muestran los grupos de estudio (Eje X) y la concentración de mucopolisacáridos intestinales µg por gramo (g) de muestra (Eje Y).

8.8 Resumen de datos

En la **Tabla 8** se muestra el resumen de los datos obtenidos del análisis estadístico de los grupos ratones tratados y sin lactoferrina bovina de la región proximal y del colon. Se muestra que los valores de $p < 0.05$ presentan un nivel de significancia menor con respecto al grupo control.

Región Proximal	"p"	Significativo	Colon	"p"	Significativo
Ctl s/estrés vs c/estrés	0.049	SI	Ctl s/estrés vs c/estrés	0.097	NO
bLf s/estrés vs bLf c/estrés	0.018	SI	bLf s/estrés vs bLf c/estrés	0.047	SI

Tabla 8 Datos estadísticos de cada grupo de estudio, en el cual se muestra su significancia y el valor de $p < 0.05$.

En la **Tabla 9** se muestra el resumen de los datos mediante el análisis estadístico ANOVA de una vía con comparaciones múltiples Tukey para la región proximal (verde) y del colon (azul) de los ratones tratados con lactoferrina bovina (sin y con estrés) y de los ratos sin tratamiento con lactoferrina bovina (sin y con estrés)

Región proximal	Significativo	Colon	Significativo
s/estrés vs c/estrés	NO	s/estrés vs c/estrés	NO
s/estrés vs bLf s/estrés	NO	s/estrés vs bLf s/estrés	SI
s/estrés vs bLf c/estrés	NO	s/estrés vs bLf c/estrés	NO
c/estrés vs bLf s/estrés	SI	c/estrés vs bLf s/estrés	SI
c/estrés vs bLf c/estrés	NO	c/estrés vs bLf c/estrés	NO
s/estrés bLf vs bLf c/estrés	NO	s/estrés bLf vs bLf c/estrés	NO

Tabla 9 Resumen de datos obtenidos del análisis estadístico ANOVA de una vía con comparaciones múltiples Tukey.

9. DISCUSIÓN

El análisis de dos grupos independientes como se muestra en los **Gráficos 2 y 5**, indico que el estrés redujo la cantidad de mucopolisacáridos, en la región proximal y en colon. Estos datos son semejantes a estudios reportados en ratas sometidas a estrés por evitación del agua durante 10 días, en los cuales se observó el aumento en la depleción de *mucus*, adherencia y penetración bacteriana en enterocitos, así como infiltración de neutrófilos (**Söderholm, et al., 2002**). El mecanismo probable inducido por el estrés, se atribuyó al agotamiento y apoptosis de las células caliciformes. Así mismo los efectos que conlleva la afección de las células caliciformes son: la sensibilidad visceral, alteraciones en la motilidad intestinal, la mucosa gastrointestinal pierde capacidad de regeneración, depleción de mucinas ileales y colónicas, permeabilidad macromolecular, aumento de la adherencia bacteriana, entre otras afecciones (**Enck, et al., 2016**).

En el análisis de dos grupos independientes como se muestra en los **Gráficos 3 y 6**, se observó que la lactoferrina bovina no contrarrestó el efecto del estrés sobre la reducción del *mucus* en la región proximal y del colon. Estos resultados podrían deberse a que la lactoferrina bovina no alteró las vías neuroendocrinas del estrés sobre la producción del *mucus*.

En los **Gráficos 4 y 7**, muestran el análisis ANOVA entre los cuatro grupos de estudio. De acuerdo a dicho análisis se observó que la lactoferrina bovina incremento significativamente la concentración de mucopolisacáridos en ratones sin estrés en comparación con los ratones control sin estrés, en la región proximal y del colon. A pesar de que se no observó una diferencia significativa, la lactoferrina bovina aumento la producción de *mucus* en los ratones estresados en comparación con las ratones estresados sin lactoferrina bovina, esto probablemente se debió a que hubo dispersión de datos, ya que el número de datos fue diferente en cada grupo de estudio. El incremento del *mucus* fue reportado previamente (**Vega, et al., 2019**). Un mecanismo probable que explica estos resultados, podría implicar el efecto de la lactoferrina bovina sobre la proliferación de algunos miembros de la microbiota intestinal que favorecen la producción del *mucus*.

10. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se logró cumplir el objetivo de procesar los datos sobre la cuantificación de mucopolisacáridos intestinales de ratones sin y con estrés (tratados con y sin lactoferrina bovina), tanto de la región proximal como del colon.

Se pudo observar que el tratamiento con lactoferrina bovina ayudo a contrarrestar los efectos producidos por el estrés sobre la reducción del *mucus* en la región proximal como en el colon, contribuyendo al manteniendo la homeostasis intestinal.

11. PERSPECTIVA

El presente estudio experimental propone fundamentar el empleo de la lactoferrina bovina como aditivo de terapias farmacológicas aplicadas para tratamiento de enfermedades causadas por el estrés.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Andrianifahanana M., Moniaux N. y Batra SK. *Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases*. Biochim Biophys Acta. 2006 Apr; 1765(2):189-222. doi:10.1016/j.bbcan.2006.01.002.
- Bansil R. y Turner BS., *Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications*, Current Opinion in Colloid & Interface Science, Volume 11, Issues 2–3, 2006, pp. 164-170, ISSN 1359-0294, doi:https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.001.
- Caldara M., Friedlander RS., Kavanaugh NL., Aizenberg J., Foster KR. y Ribbeck K. *Los biopolímeros de mucina previenen la agregación bacteriana al retener las células en el estado de natación libre*. Biología actual: CB, 2012, 22 (24), 2325–2330, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.028>.
- Carabotti M., Scirocco A., Maselli MA. y Severi C. *The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems*. Ann Gastroenterol. 2015 Apr-Jun; 28(2):203-209. PMID: 25830558; PMCID: PMC4367209.
- Castagliuolo I., Wershil BK., Karalis K., Pasha A., Nikulasson ST. y Pothoulakis C. *Colonic mucin release in response to immobilization stress is mast cell dependent*. Am J Physiol. 1998 Jun; 274(6):G1094-1100. doi:10.1152/ajpgi.1998.274.6.G1094. PMID: 9696710.
- Enck P., Aziz Q., Barbara G., Farmer AD., Fukudo S., Mayer EA., Niesler B., Quigley EM., Rajilić-Stojanović M., Schemann M., Schulle-Kiuntke J., Simren M., Zipfel S. y Spiller RC., *Irritable bowel syndrome*. Nat Rev Dis Primers. 2016 Mar 24; 2:16014. doi: 10.1038/nrdp.2016.14. PMID: 27159638; PMCID: PMC5001845.
- Ermund A., Schütte A., Johansson ME., Gustafsson JK. y Hansson GC. *Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2013 Sep 1; 305(5):G341-7. doi: 10.1152/ajpgi.00046.2013
- González RT., Gonzalez AS., Madiedo PR., Mata AM., Muñiz MP., Alonso EB. y Sierra EM., *Síndrome de Intestino Irritable; papel de la microbiota y probiótico-terapia*. Nutrición Hospitalaria, 2015; 31 (Supl. 1): 83-88. doi:http://www.aulamedica.es/nh/pdf/8713.pdf
- Guzmán-Mejía F., Godínez-Victoria M., Vega-Bautista A., Pacheco-Yépez J. y Drago-Serrano ME., *Homeostasis intestinal bajo estrés*. Revista Internacional de Ciencias Moleculares. 2021; 22 (10):5095. <https://doi.org/10.3390/ijms22105095>
- Johansson ME., Sjövall H. y Hansson GC., *The gastrointestinal mucus system in health and disease*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013 Jun;10(6):352-61, doi: 10.1038/nrgastro.2013.35.
- Kameyama A., Dong W. y Matsuno YK., *Succinylation-Alcian Blue Staining of Mucins on Polyvinylidene Difluoride Membranes*. Methods Mol Biol. 2015; vol 1314:325-31, doi: 10.1007/978-1-4939-2718-0_33. PMID: 26139280.

- Kim YS. y Ho SB., *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. Curr. Gastroenterol Rep. 2010 Oct; 12(5):319-30, doi: 10.1007/s11894-010-0131-2. PMID: 20703838; PMCID: PMC2933006.
- Kitagawa H., Takeda F. y Kohei HA., *Simple method for estimation of gastric mucus and effects of antiulcerogenic agents on the decrease in mucus during water-immersion stress in rats*. Arzneimittelforschung. 1986; 36(8):1240-4.
- Konturek PC., Brzozowski T. y Konturek SJ., *Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options*. J Physiol Pharmacol, 2011 Dec; 62(6):591-9. PMID: 22314561.
- Pelaseyed T., Bergström JH., Gustafsson JK., Ermund A., Birchenough GM., Schütte A., Van der Post S., Svensson F., Rodríguez-Piñero AM., Nyström EE., Wising C., Johansson ME. y Hansson GC., *The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system*. Immunol Rev. 2014 Jul; 260(1):8-20. doi: 10.1111/imr.12182.
- Quintarelli G. y Dellovo MC., *The chemical and histochemical properties of Alcian blue*. Histochemie 5, 196–209, 1965. <https://bidi.uam.mx:6990/10.1007/BF00306128>
- Ramos Frausto VM., Caudillo Ortega L., De la Roca Chiapas JM., Hernández González MA., Barbosa Sabanero G. y García Rocha M., *Correlación entre estrés, niveles de cortisol y estrategias de afrontamiento en pacientes con cáncer sometidos a tratamiento*. Enfermería Global, 2020,19(4), 196–207. <https://doi.org/10.6018/eglobal.410951>
- Rodríguez-Fernández JM., García-Acero M. y Franco P., *Neurobiología del estrés agudo y crónico: su efecto en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y la memoria*. Universitas médica, vol. 54, núm. 4, octubre-diciembre, 2013, pp. 472-494. doi: <https://www.redalyc.org/pdf/2310/231029998005.pdf>
- Rodríguez-Franco DA., Vázquez-Moreno L., Ramos-Clamont MG., *Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales*, Revista Latinoamericana de Microbiología, Vol. 47, Nos. 3-4 Julio - Septiembre. 2005 Octubre - Diciembre. 2005 pp. 102–111.
- Romero Romero EE., Young J. y Salado-Castillo R., *Fisiología del estrés y su integración al sistema nervioso y endocrino*. Rev Med Cient. 6 de mayo de 2020 ,32(1):61-70.
- Sfeir RM., Dubarry M., Boyaka PN., Rautureau M. y Tomé D., *The Mode of Oral Bovine Lactoferrin Administration Influences Mucosal and Systemic Immune Responses in Mice*, *The Journal of Nutrition* , Volumen 134, Número 2, febrero de 2004, páginas 403 –409, <https://doi.org/10.1093/jn/134.2.403>
- Shan M., Gentile M., Yeiser JR., Walland A., Cooper VU., Bornstein CK., He B., Cassis L., Bigas A., Cols M., Comerma L., Huang B., Blander JM., Xiong H., Mayer L., Berin C., Augenlicht LH., Velcich A. y Cerutti A., *El mucus mejora la homeostasis intestinal y la tolerancia oral al transmitir señales inmunorreguladoras*, Science, Vol. 342, Número 6157, págs. 447-453, 25 de octubre de 2013, DOI: 10.1126 / science.1237910.

- Söderholm JD, Yang PC, Ceponis P, Vohra A, Riddell R, Sherman PM, Perdue MH, *El estrés crónico induce la adherencia bacteriana dependiente de los mastocitos e inicia la inflamación de las mucosas en el intestino de la rata*. *Gastroenterology*, 2002 , 123 , 1099-1108
- Superti F., *Lactoferrina de la leche bovina: un compañero protector de por vida*. *Nutrientes* , 2020, 12 (9), 2562. <https://doi.org/10.3390/nu12092562>
- Tache Y., Larauche M., Yuan PQ. y Million M., *Señalización de CRF cerebral e intestinal: acciones biológicas y papel en el tracto gastrointestinal*, *Farmacología molecular actual*, 2018, 11:51.
- Torrades S., *Estrés y burn out. Definición y prevención*, Elsevier, Offarm. 2007; 26:104-7.
- Vanhooren V., Vandenbroucke RE., Dewaele S., Van Hamme E., Haigh JJ., Hochepped T. y Libert C., *Mice Overexpressing β -1,4-Galactosyltransferase I Are Resistant to TNF-Induced Inflammation and DSS-Induced Colitis*. *PLoS One*. 2013; 8(12):e79883. doi: 10.1371/journal.pone.0079883.
- Vega Bautista A., Carrizales Luna JE., Cruz Hernandez TR., Rodríguez Campos R., Drago Serrano ME., *Gut Mucopolysaccharide Levels. in Stressed Mice Treated with Bovine Lactoferrin*, *Mucosal Immunology Symposium*, México, 2019.
- Viggiano D., Ianiro G., Vanella G., Bibbò S., Bruno G., Simeone G., et. al, *Gut barrier in health and disease: focus on childhood*. *Eur. Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19(6): 1077-85.
- Wang B., Timilsena YP., Blanch E., Adhikari B., *Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion*. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(4):580-596. doi:10.1080/10408398.2017.1381583. Epub 2017 Oct 17. PMID: 28933602.
- Wang WP., Ligo M., Sato J., Sekine K., Adachi I. y Tsuda H., *Activación de la inmunidad de la mucosa intestinal en ratones portadores de tumores por lactoferrina*. *Revista japonesa de investigación del cáncer: Gann*, 91 (10), 1022–1027. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2000.tb00880.x>
- Whiteman P., *The quantitative measurement of Alcian Blue-glycosaminoglycan complexes*. *Biochem J*. 1973; 131(2):343-50.

13. ANEXOS

Procesamiento y preparación de pool y muestras.

1. Se recolectaron porciones de 1.0 cm de la región proximal (inmediata al estómago), la distal (unida a la válvula íleo-cecal) y colon distal (*rectum*).
2. Se lavaron los segmentos recoletados con solución salina isotónica (SSI) estéril para eliminar totalmente la materia fecal
3. Se cortaron los segmentos longitudinalmente con tijeras para dejar expuesto el mucus.
4. Se depositaron las muestras en tubos de 2.0 mL con 500 μ L de SSI previamente pesados.
5. Se determinaron los pesos de las muestras.
6. Se centrifugaron los tubos a 12500 rpm por 10 min antes de que se adicionara el colorante.

Curva estándar de condroitin-4-sulfato

Todos los pasos procedieron a temperatura ambiente

1. Se disolvieron 15 mg de condroitin 4-sulfato (15 mg/mL) en 1.0 mL de H₂O destilada.
2. Se prepararon diluciones seriadas 2X del estándar en agua destilada a un volumen final de 500 μ L (**Whiteman P., 1973**).
3. Se mezclaron en tubos de microcentrifuga (de 2.0 mL), 20 μ L de cada estándar con 980 μ L de solución 0.1% azul alcian en 0.16 M de sacarosa disuelta en 0.05 M de citrato sódico pH 5.8, se ajustó a un volumen final de 1000 μ L (dilución final 1:50)
4. Se incubó por 2 h y después se centrifugó a 12,500 rpm por 10 min.
5. Se decantó el sobrenadante y se invirtió el tubo sobre papel filtro para eliminar el exceso del sobrenadante y evitar la resuspensión del precipitado causada por turbulencias.
6. Se lavó el precipitado azul por resuspensión en 1.7 mL de sacarosa 0.25 M disuelta en agua destilada.
7. Se incubaron las muestras por 15 min y se centrifugó a 12500 rpm 10min.

8. Se repitió el paso 5.
9. Se lavó el precipitado azul por resuspensión en 1.7 mL de sacarosa 0.25 M disuelta en agua destilada
10. Se incubaron las muestras por 45 min y se centrifugaron a 12500 rpm por 10 min.
11. Se repitió el paso 5.
12. Se extrajo el colorante presente en el precipitado de cada tubo de la curva estándar con 1.7 mL de docusato sódico 30% en Et-OH 70% y se incubó toda la noche con agitación constante (**Kitagawa H, et al., 1986**).
13. Se centrifugaron las muestras a 12,500 rpm por 10 min.
14. Se recolectó el sobrenadante en microtubos limpios de 1.5 mL y se guardó a -20 °C.
15. Se colocó un volumen de 100 µL del sobrenadante de cada estándar por triplicado en una placa de microtitulación de 96 pozos. Se determinó la absorbancia de los estándares a una $\lambda = 620$ nm en un lector de microplacas. Microplate reader EPOCH2TC BioTek Instruments Winooski VT, USA.

Para la curva estándar se graficó la concentración en µg/mL de condroitin 4-sulfato en el eje "X" contra la absorbancia en el eje "Y".

Extracción de mucopolisacáridos en los segmentos intestinales.

La estimación de mucopolisacáridos intestinales se basó en métodos descritos previamente [**Kitagawa H, et al., 1986; VanHooren V, et al., 2013**].

Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente, de acuerdo a lo siguiente:

1. Se sumergió cada sección intestinal por 2 h con agitación constante en 1.7 mL de solución 0.1% azul alcian disuelta en 0.16 M de sacarosa amortiguada en 0.05 M de acetato sódico pH 5.8. **NOTA:** En este paso la muestra estuvo en contacto constante con el colorante.
2. Se centrifugo a 12500 rpm por 10 min.
3. Se decantó el sobrenadante y se invirtió el tubo sobre papel filtro para eliminar el exceso del sobrenadante y se evitó la resuspensión del precipitado.
4. Se lavó la muestra por resuspensión en 1.7 mL de sacarosa 0.25 M y se incubó por 15min con agitación constante.

5. Se centrifugaron las muestras a 12500 rpm por 10 min.
6. Se repitió el paso 3.
7. Se lavó la muestra por resuspensión en 1.7 mL de sacarosa 0.25 M e incubó 45 min con agitación constante.
8. Se centrifugaron las muestras a 12500 rpm por 10 min.
9. Se repitió el paso 3.
10. Se extrajo el colorante unido al *mucus* presente en el precipitado con 1.7 mL de docusato de sodio al 30% disuelto en etanol al 70%, se aplicó agitación constante durante toda la noche.
11. Se centrifugó a 12500 rpm por 10 min y se recolectó el sobrenadante de cada muestra en microtubos limpios de 1.5 mL.
10. Se tomaron 100 μ L de los sobrenadantes de cada región y se mezclaron a fin de preparar un pool. Tanto los sobrenadantes de cada muestra individual como el pool de cada región fueron congelados a -20 °C.

Cuantificación de mucopolisacáridos en muestras.

1. Se colocó en una placa de micro titulación de 96 pozos las diluciones seriadas 2x en docusato al 30% disuelto en etanol al 70% por triplicado del sobrenadante de muestras individuales de cada región intestinal a volumen final de 100 μ L.
2. En la misma placa se colocaron diluciones 2x por triplicado a un volumen final de 100 μ L del pool sobrenadante de alguna región intestinal con una concentración conocida de mucopolisacáridos. La absorbancia se estimó a una longitud de onda de $\lambda=620$ nm.

La concentración de mucopolisacáridos se expresó en microgramos (μ g) de azul alcian/g de tejido y se estimó con la curva obtenida con el pool de cada región.

Vo. Bo. del (la) o los (las) asesores (as) respecto a los contenidos académicos.

Maria Elisa Drago S.

Dra. Maria Elisa Drago Serrano
Nombre y firma del asesor interno
Cargo: Profesor Titular C
No. económico: 17243



Dra. Fabiola Guzmán Mejía
Nombre y firma del asesor interno
Cargo: Profesor Asociado D
No. económico: 43134