



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 : Liza Sofía Pineda Martínez	
Matrícula : 2163026339	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Corregidora #7, Barrio de San Bartolo, Ozumba de Alzate, Ozumba, Estado de México. C.P. 56800	
Teléfono : 5979761603	Celular : 5565362399
Correo Electrónico : lizpin50@gmail.com	CURP : PIML980714MMCNZR09

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto :	Procesamiento de datos sobre la cuantificación de proteína total en liquido intestinal de ratones machos estresados tratados con lactoferrina bovina						
Lugar donde se realizó el Servicio Social :	Laboratorio de Microbiología Molecular						
Dependencia :	Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco						
Entidad Federativa :	Distrito Federal						
Municipio :	Coyoacán			Localidad :	Ciudad de México		
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	8	2	2021		9	8	2021

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector:	1.- Educativo	Tipo:	2.- Interno
Orientación:	10.- Otros		

FIRMAS

María Elena Contreras Garfias

Asesor Interno
No. Económico 17243

Fabiola Guzmán Mejía
Fabiola Guzmán Mejía No. eco 43134

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Liza Sofía Pineda Martínez

Alumno
Nombre, firma

Felipe Mendoza Pérez
Felipe Mendoza Pérez

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza

Ciudad de México., a 9 de agosto 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): **Liza Sofía Pineda Martínez** con matrícula: **2163026339**, concluyó el proyecto de Servicio Social: “**Procesamiento de datos sobre la cuantificación de proteína total en líquido intestinal de ratones machos estresados tratados con lactoferrina bovina**”. Que se realizó en el **Laboratorio de Microbiología Molecular (N-013)** ubicado en la **Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco** del **8 de febrero del 2021** al **9 de agosto del 2021** bajo mi asesoría, cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE



Maria Elisa Drago Serrano
No. Económico 17243

Ciudad de México., a 9 de agosto 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): **Liza Sofía Pineda Martínez** con matrícula: **2163026339**, concluyó el proyecto de Servicio Social: “**Procesamiento de datos sobre la cuantificación de proteína total en líquido intestinal de ratones machos estresados tratados con lactoferrina bovina**”. Que se realizó en el **Laboratorio de Microbiología Molecular (N-013)** ubicado en la **Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco** del **8 de febrero del 2021** al **9 de agosto del 2021** bajo mi asesoría, cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE



Nombre y firma de asesor
Fabiola Guzmán Mejía

Número económico 43134
Cédula profesional 11477397



Casa abierta al tiempo
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

Título: Procesamiento de datos sobre la cuantificación de proteína total en líquido intestinal de ratones machos estresados tratados con lactoferrina bovina

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

Nombre: Liza Sofía Pineda Martínez

Matrícula: 2163026339

Asesores:

Dra. María Elisa Drago Serrano – Dra. Fabiola Guzmán Mejía

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	4
2. Marco teórico	5
2.1 El estrés.....	5
2.2 Efecto del estrés sobre el tracto gastrointestinal.....	5
2.2.1 Efectos sobre la barrera intestinal.....	6
2.2.1.1 Importancia de la albúmina como marcador en la barrera intestinal.....	6
2.3 Lactoferrina en el tratamiento de afecciones gastrointestinales.....	7
2.4 Proteínas.....	7
2.4.1 Clasificación.....	7
2.4.2 Método Bradford para cuantificación de proteínas.....	8
3. Justificación	9
4. Objetivos	9
4.1 General.....	9
4.2 Específicos.....	9
5. Metodología	10
5.1 Procesamiento de los datos.....	10
5.2 Análisis de datos.....	10
6. Resultados	11
6.1 Curva de calibración.....	11
6.2 Proteína Total en región Px en ratones control y con estrés.....	12
6.3 Proteína Total en región Px en ratones tratados con bLf	13
6.4 Proteína Total en ratones con y sin estrés tratados o no con bLf.....	15
6.5 Proteína Total en colon de ratones con y sin estrés.....	15
6.6 Proteína Total en colon de ratones tratados con bLf.....	17
6.7 Proteína Total del colon de ratones.....	19
6.8 Resumen de resultados.....	20
7. Discusión	21
8. Conclusión	22
9. Perspectivas	22
10. Referencias	23

RESUMEN

Introducción: El estrés provoca alteraciones sobre la función de barrera intestinal. La lactoferrina bovina (bLf) es una glicoproteína que tiene efectos moduladores sobre la barrera intestinal. **Justificación:** Hasta la fecha no se ha analizado el efecto de la bLf y/o el estrés sobre la concentración de PT en líquido intestinal. La determinación de proteína total (PT) por el método de Bradford permite ajustar las concentraciones de proteína para normalizar los ensayos inmunoenzimáticos. **Objetivo:** Analizar una base de datos de los resultados obtenidos sobre la cuantificación de PT en líquido intestinal de la región proximal y colon de ratones machos estresados tratados con bLf. **Metodología:** Para la comparación de datos sobre PT entre dos grupos independientes se aplicó la prueba t de Student en tanto que la comparación de datos de cuatro grupos independientes se aplicó el ANOVA y la prueba Tukey. **Resultados:** El estrés y la bLf no tuvieron efectos significativos sobre la concentración de PT. El aumento de la PT observado en los ratones con bLf fue debido a un efecto aditivo de la bLf sobre la concentración total de proteína. **Conclusiones:** No se encontró evidencia de que el estrés y la bLf provocaran un aumento de la concentración de PT, y por ende podrían no afectar la permeabilidad de la barrera intestinal. **Perspectiva:** Este trabajo podría servir como antecedente para futuras investigaciones acerca del efecto del estrés y el mecanismo de acción de la bLf sobre la permeabilidad de la membrana intestinal.

Palabras clave

Estrés, lactoferrina bovina, proteína total, barrera intestinal, método de Bradford

ABSTRACT

Introduction: Stress causes alters the intestinal barrier function. Bovine lactoferrin (bLf) is a multifunctional glycoprotein with modulatory actions on intestinal gut barrier. **Justification:** At present, the effect of bLf and / or stress on the TP concentration in intestinal fluid samples has not been analyzed. Moreover, Bradford method allows the adjustment of TP concentration necessary to normalize the conditions for the immunoenzymatic assays. **Objective:** To analyze a database obtained over the TP quantification in intestinal fluid samples from the proximal region and colon of stressed male mice treated with bLf. **Methodology:** Data comparison between two independent groups was accomplished by applying Student's *t* test while for the data comparisons among four independent groups the ANOVA test and Tukey post-hoc test were applied. **Results:** Stress and bLf did not have significant effects on TP concentration. The increase in TP observed in the bLf-treated groups was probably due to an additive effect of bLf on total protein concentration. **Conclusions:** Evidence of the stress and/or bLf over the TP increase was not found. **Perspective:** This work may lay foundations about impact of bLf and/or stress over intestinal membrane permeability.

Key words

Stress, bovine lactoferrin, total protein, intestinal barrier, Bradford method.

1. INTRODUCCIÓN

El estrés es una respuesta fisiológica provocada por condiciones percibidas como peligro, causando la movilización de recursos físicos, mentales y conductuales. Un amplio número de evidencias experimentales demuestran que el estrés provoca enfermedades intestinales causadas por un desequilibrio en los factores que sostienen la función de barrera en el intestino. Esta alteración causa la pérdida de la permeabilidad intestinal que, a su vez se refleja en el aumento de proteína en el lumen intestinal. Se ha observado que la lactoferrina bovina tiene efectos reguladores sobre la función de la barrera intestinal.

En el laboratorio de Microbiología Molecular del DSB UAMX se llevó a cabo la cuantificación de la concentración total de la proteína de la región proximal del intestino delgado y colon de ratones machos estresados que fueron tratados con lactoferrina bovina. Esta determinación se realizó mediante el método de Bradford.

De acuerdo a lo anterior, en el presente reporte se muestra el análisis de resultados sobre la cuantificación de proteína en las muestras de líquido intestinal de dichos ratones. Esta determinación permitió ajustar las muestras de líquido intestinal a una concentración de proteína total normalizada. Es importante recalcar que el ajuste de proteína a una concentración óptima es necesario para después, cuantificar la concentración de IgA mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Por lo anterior, el presente trabajo se enfocó en procesar y analizar los resultados sobre la cuantificación de la concentración de proteína total en el líquido intestinal de ratones estresados tratados con lactoferrina bovina.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El estrés

El estrés es una respuesta fisiológica provocada por condiciones o situaciones externas que son percibidas como peligro, causando la movilización de recursos físicos, mentales y conductuales para hacerles frente (Ávila, J., 2014). Involucra como primera instancia la elevación de los glucocorticoides de origen adrenal y de las catecolaminas (Menchén, L., 2009), lo que, a largo plazo, es capaz de causar alteraciones en los sistemas cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal, inmunitario, endocrinológico y muscular (Vieco, G. & Abello, R., 2014).

Las amenazas o estímulos que alejan al individuo de la homeostasis se conocen como agentes estresantes o estresores, estos pueden ser físicos o psicológicos y se pueden clasificar según la duración de la respuesta generada, pudiendo ser agudos (simples y de duración limitada) o crónicos (duración prolongada). Un agente estresante agudo puede pasar a tener una respuesta de estrés crónico si se presenta en forma repetida o cuando su intensidad es anormalmente alta (Odeón, M. & Romera, S., 2017)

2.2 Efecto del estrés sobre el tracto gastrointestinal

En el ámbito médico se reconoce que el estrés, tanto físico como psicológico, sobre todo cuando es de tipo crónico, puede actuar como desencadenante y/o modificador del curso clínico de enfermedades crónicas gastrointestinales. Entre éstas figura, la úlcera péptica que afecta al estómago y porción proximal del intestino delgado, la enfermedad inflamatoria intestinal que incluye a la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, así como, el síndrome del intestino irritable (Menchén, L., 2009). La enfermedad inflamatoria intestinal o IBD (Intestinal Bowel Disease) y el síndrome del intestino irritable o IBS (Irritable Bowel Syndrome) afectan sobre todo al colon.

2.2.1 Efectos sobre la barrera intestinal

Un amplio número de evidencias experimentales demuestran que el estrés causa disfunciones en la barrera intestinal. La función de barrera se refiere a la capacidad selectiva del epitelio intestinal de permitir la absorción de moléculas inocuas y bloquear la entrada de agentes nocivos (Menchén, L., 2009). La barrera intestinal depende de la microbiota, el mucus, de la monocapa del epitelio intestinal y de componentes del sistema inmune asociado a la mucosa intestinal como la inmunoglobulina A (IgA) (Drago, M., et al, 2008 & Rodríguez, D., et al, 2005).

En una enfermedad intestinal una mayor permeabilidad implica un desequilibrio en los factores que sostienen la función de barrera, y es probable que el sistema inmunológico sea un factor clave. En condiciones normales, el aumento de la permeabilidad no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad intestinal, ya que la barrera epitelial puede recuperarse una vez que cede el estímulo. Sin embargo, en determinadas condiciones patológicas, como en el estrés crónico, esta capacidad de autorregulación puede perderse, contribuyendo al aumento de la permeabilidad y facilitando así la inflamación intestinal crónica (Salvo, E., et al, 2015).

2.2.1.1 Importancia de la albúmina como marcador en la barrera intestinal

El endotelio capilar restringe parcialmente el paso de moléculas hacia la luz intestinal, como la albúmina, una proteína globular de peso molecular de 66,5 kDa que representa aproximadamente la mitad del contenido total de proteínas en la sangre humana, por lo que, habitualmente no se le encuentra en la luz intestinal, a excepción de que exista una disfunción en la barrera, como la ocasionada por las patologías desencadenadas por condiciones de estrés.

Cuando esta proteína difunde desde los vasos sanguíneos a través de la barrera mucosa hacia la luz del intestino sirve como un marcador endógeno, cuyas concentraciones pueden medirse en gránulos fecales y tiene la ventaja de no ser un método invasivo (Wang, L., et al, 2015).

2.3 Lactoferrina: generalidades

Recientemente, la glicoproteína ligadora de hierro perteneciente a las transferrinas denominada lactoferrina ha despertado el interés por sus múltiples funciones moduladoras (Drago, M., et al, 2008). Se ha observado que la lactoferrina, además de actuar como inmunomodulador y antiinflamatorio, tiene también efectos protectores sobre la integridad de la barrera intestinal (Zhao, X., et al, 2019). Gran parte del conocimiento sobre los diversos efectos reguladores de la lactoferrina ha sido logrado gracias a estudios *in vivo* mediante la administración de lactoferrina exógena de origen bovino (bLf) o humano en varias especies de animales de experimentación como ratones, ratas y conejos (Drago, M., et al, 2008 & Aranguren, A., & Medina, C., 2012).

2.4 Proteínas

Las proteínas son polipéptidos unidos mediante enlaces peptídicos, que tienen un número y una secuencia única y definida de residuos de aminoácidos, esta secuencia es denominada estructura primaria. Las moléculas proteicas poseen también un nivel de organización estructural secundario (plegado local mediante un enlace no covalente), uno terciario (plegado global) y cuaternario (asociación de subunidades).

Algunas proteínas contienen dos o más cadenas polipeptídicas que se mantienen juntas mediante fuerzas covalentes (puentes disulfuro) o no covalentes.

Las proteínas desempeñan gran cantidad de funciones: unas transportan y almacenan moléculas pequeñas; otras constituyen gran parte de la organización estructural de las células y los tejidos. (Mathews, C et al, 2013).

2.4.1 Clasificación

Existen dos clases principales de proteínas: las proteínas fibrosas y las globulares. Las proteínas fibrosas tienen forma filamentosa o alargada. Principalmente desempeñan funciones estructurales en las células y los tejidos animales. Las

proteínas fibrosas comprenden las principales proteínas de la piel, del tejido conjuntivo y de las fibras animales.

Las proteínas globulares, por el contrario, están conformadas por cadenas polipeptídicas que se pliegan en estructuras terciarias compactas. Tienen funciones metabólicas, de síntesis y de transporte (Mathews, C., et al, 2013).

2.4.2 Método Bradford para cuantificación de proteínas

El método de Bradford se basa en la aplicación del colorante azul Coomassie G250. Este colorante a pH ácido es catiónico (carga positiva) y de color rojo; a pH neutro es de color verde y a pH básico es aniónico (carga negativa) de color azul.

El reactivo de Bradford comercial (cat. No. 500-0205 Biorad Hercules CA, USA) es una solución acidificada del colorante Coomassie G-250 de color rojo. El colorante debe estar doblemente protonado para que se una a la proteína; tras dicha interacción, el primer electrón del colorante es donado a los aminoácidos con grupos R básicos (carga positiva) y con grupos R aromáticos de la proteína; como consecuencia de lo anterior, la proteína se desnaturaliza lo que causa la exposición de cavidades hidrofóbicas. El colorante se une a estos huecos mediante la interacción de grupos sulfónicos ácidos con aminas con carga positiva y fuerzas de Vander Walls (**Imagen 1**). El colorante unido a las proteínas ya no está protonado y es de color azul. Estos complejos de color azul pueden detectarse a una $\lambda = 595$ nm mediante espectrofotómetro (Kruger N., 2009 & Instruction manual Quick Start, s.f.).



Imagen 1. Fundamento reacción de Bradford para la cuantificación de proteínas (Tomado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269718301994>)

3. JUSTIFICACIÓN

La determinación de PT por el método de Bradford permite ajustar normalizar las concentraciones de proteína para diversos métodos. En el caso particular del laboratorio N-13, la concentración de PT se ocupa para normalizar los ensayos inmunoenzimáticos para cuantificar la IgA, albúmina e IgG, entre otros. Por ende, este análisis de datos puede servir para la optimización de dichos ensayos de ELISA.

4. OBJETIVOS

4.1 General:

- Analizar una base de datos de los resultados obtenidos sobre la cuantificación de proteína total en líquido intestinal de la región proximal y colon de ratones machos estresados tratados con bLf.

4.2 Específicos:

- Procesar los valores de absorbancia de la curva estándar de albúmina.
- Procesar los valores de absorbancia obtenidos de la cuantificación de proteína total por el método Bradford.

5. METODOLOGÍA

5.1 Procesamiento de los datos

Se procesaron los resultados de proteína total en muestras de líquido de la región proximal del intestino delgado y de colon de ratones machos de los siguientes grupos: ratones sin estrés, ratones estresados, ratones sin estrés tratados con bLf y ratones estresados tratados con lactoferrina bovina. Estos datos fueron necesarios para la cuantificación de IgA total que se realiza en el laboratorio. Es importante señalar que en este estudio sólo se analizaron datos de PT.

Utilizando el software Excel se realizó una curva estándar con diferentes concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ de albumina sérica bovina purificada preparadas por triplicado, para lo cual se graficaron las concentraciones de cada estándar contra el promedio de los triplicados de la absorbancia medida a una $\lambda=595$ nm y se calculó la regresión lineal.

Los valores de la absorbancia de las muestras de líquido intestinal probadas por triplicado se promediaron y los resultados se interpolaron en la curva estándar de albumina sérica bovina para cuantificar la concentración de proteína total.

5.2 Análisis de datos

Con ayuda del software Graphpad Prisma se realizó la prueba de t para grupos independientes con el objetivo de comparar, por separado, los grupos de Ctrl vs Str y bLf vs bLf Str de la región proximal y colon.

Con el mismo programa se realizó una ANOVA para las muestras de la región proximal y colon, por separado, para determinar las diferencias entre los grupos. Posteriormente se llevó a cabo la prueba de Tukey para determinar cuáles grupos tenían una diferencia significativa.

6. RESULTADOS

6.1 Curva de calibración

En la **Tabla 1** se muestran los valores de absorbancia obtenidos mediante el método Bradford para la cuantificación de proteína, con ellos se graficó la curva de calibración que se muestra en la **Figura 1**, obteniendo una regresión lineal de 0.9881 y una ecuación de la recta de $y=0.0008x+0.0287$.

Proteína (µg/mL)(x)	Absorbancia a 595 nm (y)
0	0.000
75	0.076
150	0.148
300	0.295
600	0.516
900	0.683
1200	0.786
1500	0.924

Tabla 1. Valores de la curva estándar

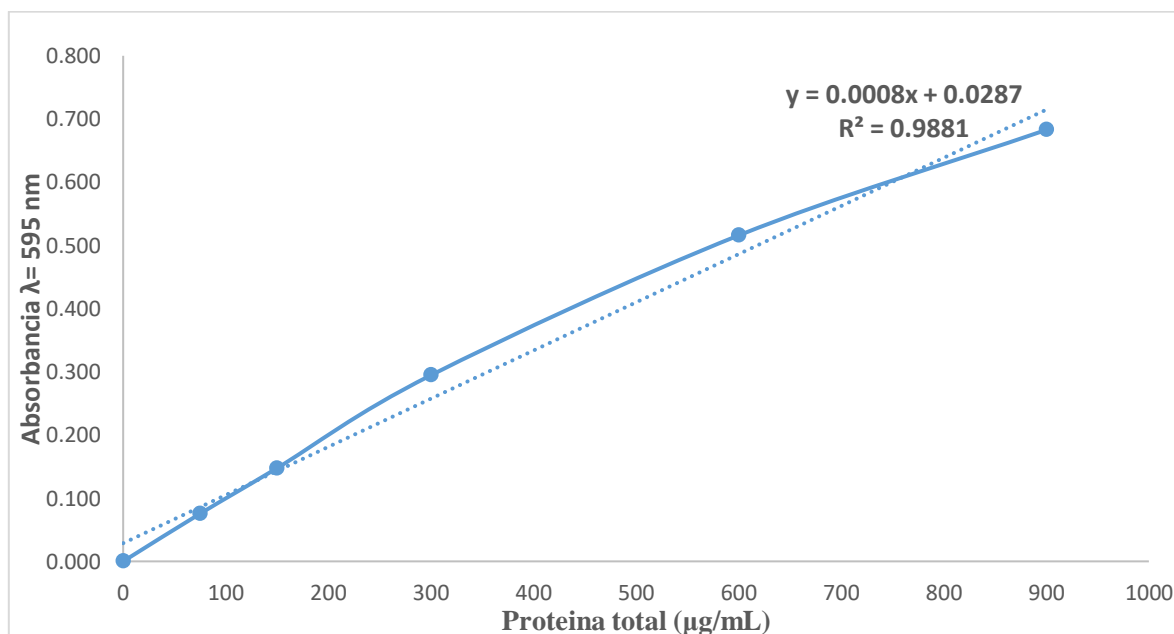


Figura 1. Curva de calibración estándar de proteína

6.2 Proteína Total en región Px en ratones control y con estrés

Una vez obtenida la ecuación de la recta, se calculó la cantidad de PT en las muestras de líquido intestinal en la región proximal del intestino delgado de los ratones con y sin estrés. Los valores se muestran en la **Tabla 2** y estos se encuentran graficados en la **Figura 2**. Al realizar la prueba de t de Student para dos grupos independientes, el valor de $P= 0.5422$ indicó que esta diferencia no era significativa.

	Px ctl sin estrés	Px estrés
	µg/100 mg PT	µg/100 mg PT
	164.13	133.71
	298.29	129.13
	185.79	142.46
	187.04	191.21
	160.38	117.88
	294.13	308.71
	531.21	163.71
	447.88	368.71
	136.21	164.54
	263.29	421.63
	227.04	314.54
	231.63	311.21
	117.25	231.42
	83.92	71.00
	77.67	88.92
	68.92	76.42
	101.42	46.42
	254.75	112.25
Promedio	212.83	188.55
Desviación Estándar	128.22	113.20

Tabla 2. Valores de PT obtenidos en la región Px de ratones con y sin estrés

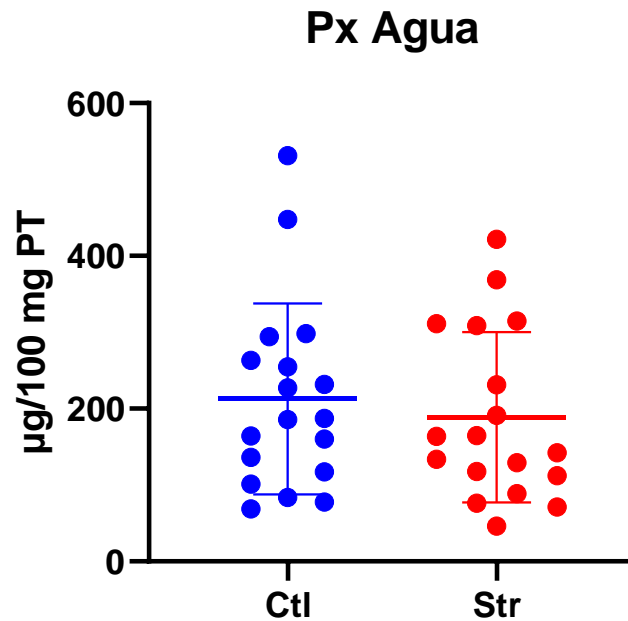


Figura 2. PT encontrada en la región proximal de ratones macho con y sin estrés

6.3 Proteína Total en región Px en ratones tratados con bLf

En la **Tabla 3** se muestran las concentraciones de PT en la región proximal de los ratones que fueron tratados con bLf. Como se aprecia en la **Figura 3**, las concentraciones de PT tanto en ratones estresados como en los que no lo estuvieron, fueron muy cercanas entre sí pero no hubo diferencias significativas pues el valor $P=0.7711$.

	Px sin estrés bLf	Px estrés bLf
	µg/100 mg PT	µg/100 mg PT
	334.750	218.500
	433.917	306.417
	258.083	347.250
	291.417	275.167
	263.083	503.917
	325.583	386.417
	536.417	221.417
	372.250	435.167
	369.333	382.667
	320.583	390.583
	443.917	334.333
	151.000	434.333
Promedio	341.69	353.01
Desviación Estándar	100.63	87.16

Tabla 3. Valores de PT obtenidos en la región Px de ratones con y sin estrés tratados con bLf

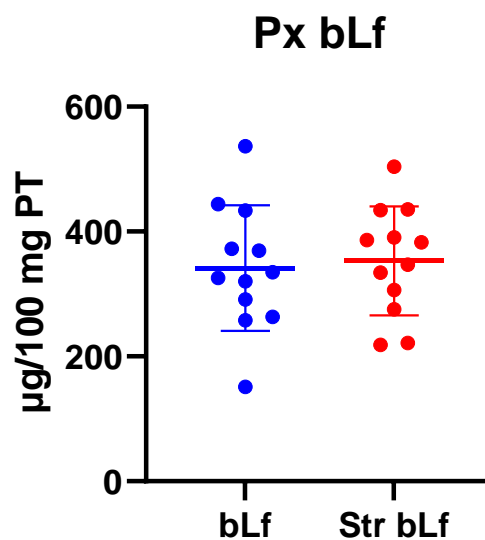


Figura 3. Concentración de PT en la región proximal del intestino delgado de ratones con y sin estrés tratados con bLf.

6.4 Proteína Total en ratones con y sin estrés tratados o no con bLf

En la **Figura 4** se muestran las concentraciones de PT en el líquido intestinal de la región proximal de los cuatro grupos experimentales de ratones. Se observa que en los grupos tratados con bLf con ($P < 0.001$) y sin estrés ($P < 0.05$) la concentración de PT fue significativamente mayor en comparación con sus respectivos controles. También se observó que la concentración de PT en los ratones sin bLf con y sin estrés no hubo diferencias significativas con $P = 0.9096$. En la **Tabla 9** se muestra el resumen de los valores de p en la región Px.

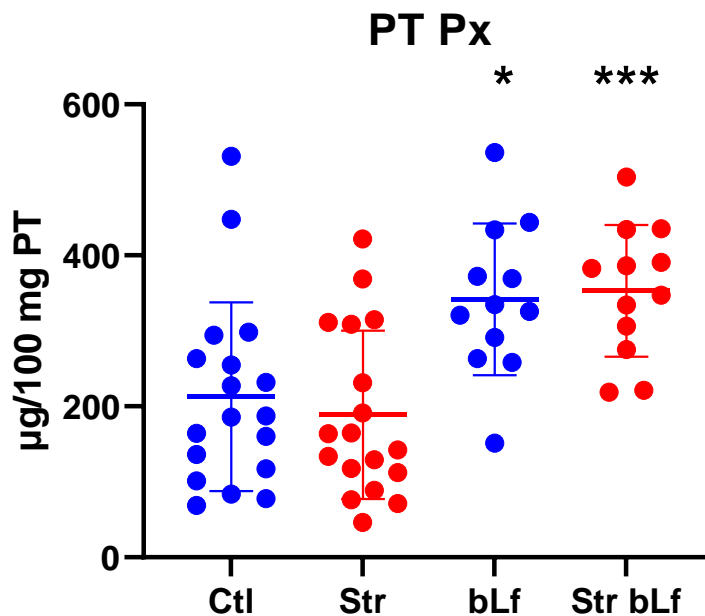


Figura 4. PT en el líquido intestinal de la región proximal de ratones macho de los cuatro grupos experimentales. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ en relación a sus respectivos grupos control sin bLf.

6.5 Proteína Total en colon de ratones con y sin estrés

Los valores de PT de líquido intestinal de colon se muestran en la **Tabla 5** y estos se encuentran graficados en la **Figura 5**. Al realizar la prueba de t de Student para dos grupos independientes, el valor de $P = 0.0627$ indicó que esta diferencia no era significativa.

	Col sin estrés	Col estrés
	µg/100 mg PT	µg/100 mg PT
	36.21	99.13
	63.29	14.13
	313.71	9.12
	89.13	51.63
	154.54	27.04
	168.29	153.71
	247.46	143.71
	157.46	186.83
	134.54	146.63
	282.04	128.71
	161.63	202.04
	231.21	315.58
	130.17	44.75
	123.50	10.17
	40.17	74.33
	192.67	83.50
	143.92	149.75
	122.25	33.92
Promedio	155.12	104.15
Desviación Estándar	76.92613566	81.92652228

Tabla 5. Valores de PT obtenidos en colon de ratones con y sin estrés

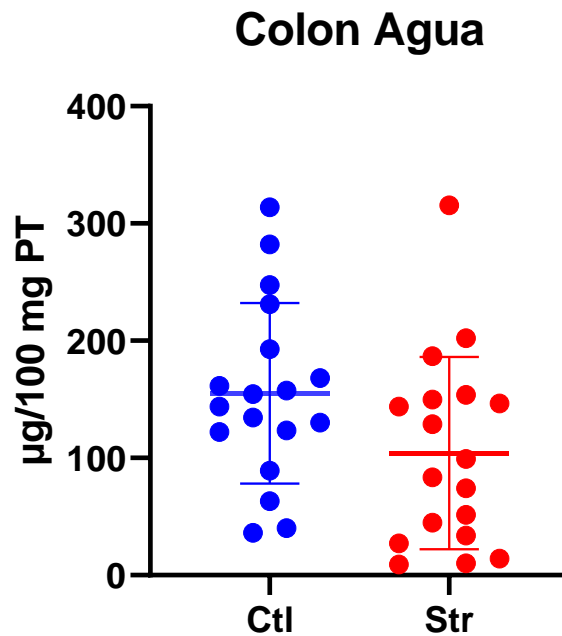


Figura 5. PT encontrada en el colon de ratones macho con y sin estrés

6.6 Proteína Total en colon de ratones tratados con bLf

En la **Tabla 6** se muestran las concentraciones de PT en líquido intestinal de colon de ratones que fueron tratados con bLf con y sin estrés. Como se aprecia en la **Figura 6**, las concentraciones de PT tanto en ratones estresados como en los que no lo estuvieron, fueron muy cercanas entre sí. Lo anterior se confirmó con el valor de $P=0.6612$, indicando que no hay diferencias significativas en los grupos.

	Col sin estrés bLf	Col stress bLf
	$\mu\text{g}/100 \text{ mg PT}$	$\mu\text{g}/100 \text{ mg PT}$
	113.92	341.00
	228.92	162.25
	266.00	243.50
	258.50	219.75
	174.75	208.08
	242.67	131.42
	178.083	186.000
	178.917	246.417
	118.500	190.167
	177.667	178.500
	293.083	255.583
	218.500	207.250
Promedio	204.13	214.16
Desviación Estándar	56.68991836	53.93846403

Tabla 6. Valores de PT obtenidos en región Px en ratones tratados con bLf con y sin estrés.

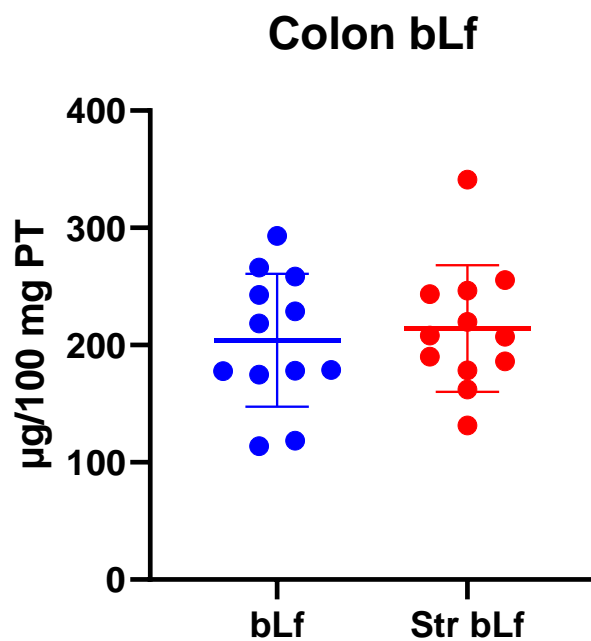


Figura 6. Concentración de PT en colon de ratones con y sin estrés tratados con bLf

6.7 Proteína Total en colon de ratones

En la **Figura 7** se muestran las concentraciones de PT en el líquido intestinal de colon de los cuatro grupos experimentales de ratones. Se observa que en el grupo con estrés tratado con bLf con ($P < 0.001$) la concentración de PT fue significativamente mayor en comparación con sus respectivos controles. En la **Tabla 9** se muestra el resumen de los valores de P en colon.

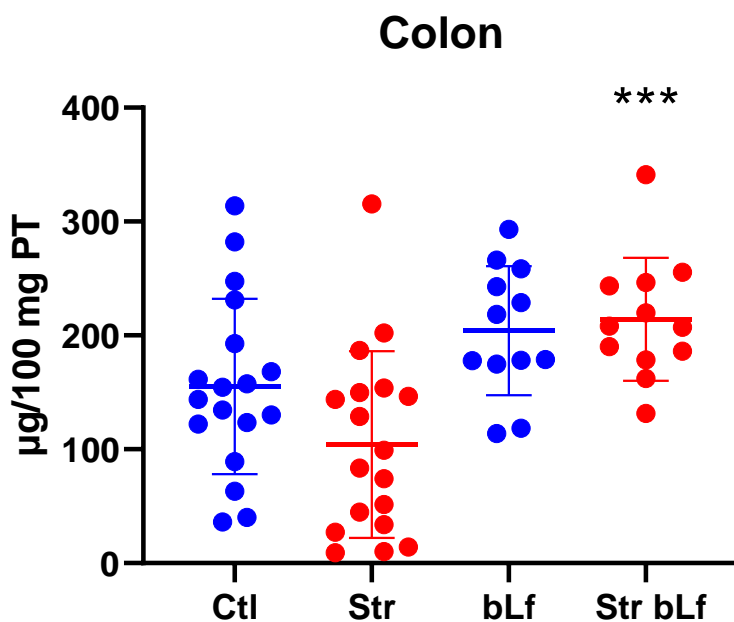


Figura 7. PT encontrada en colon de ratones de los cuatro grupos experimentales.
*** $P < 0.001$ con respecto al grupo control de estrés sin bLf

6.8 Resumen de resultados

Tratamiento	Proximal		Colon	
	Valor de p	Significancia	Valor de p	Significancia
Agua sin estrés vs Agua con estrés	0.5422	No	0.0627	No
bLf sin estrés vs bLf con estrés	0.7711	No	0.6612	No

Tabla 8. Comparación de la pruebas de t Student para dos grupos independientes.

Tratamiento	Proximal		Colon	
	Valor de p	Significancia	Valor de p	Significancia
Agua sin estrés vs agua con estrés	0.9096	No	0.1488	No
Agua sin estrés vs bLf sin estrés	0.0132	Sí	0.2601	No
bLf sin estrés vs bLf con estrés	0.9942	No	0.9856	No
Agua con estrés vs bLf con estrés	0.0009	Sí	0.0006	Sí

Tabla 9. Comparación de la prueba ANOVA para la muestras de líquido intestinal de la región px y colon de los cuatro grupos experimentales

7. DISCUSIÓN

Se ha descrito anteriormente que el estrés es un factor que contribuye al desarrollo de enfermedades gastrointestinales debido al deterioro que causa sobre la función de la barrera intestinal (Menchén, L., 2009). Después de haber analizado los resultados de PT obtenidos de las muestras analizadas de la región proximal y colon de los ratones, se observó que el estrés no tuvo un impacto significativo sobre la concentración de PT. Estos resultados indican que bajo las condiciones experimentales de este trabajo el estrés no alteró la permeabilidad intestinal. Lo anterior podría confirmarse al analizar la concentración de albúmina en el líquido intestinal. Como se sabe la albúmina es un marcador de permeabilidad intestinal, según Wang, et al (2015).

Estudios experimentales previos demuestran que la bLf tiene efectos moduladores sobre la permeabilidad intestinal (Zhao, X., et al, 2019). En este trabajo los resultados indicaron que la bLf con o sin estrés aumentó la concentración de PT en ambas regiones intestinales analizadas. Estos datos indican que la bLf contribuyó al incremento de la concentración de PT en el lumen intestinal. Por lo anterior, es necesario que se realicen a futuro ensayos inmunohistoquímicos, ensayos de biología molecular a fin de evaluar otros parámetros que demuestren el efecto sustantivo del estrés y de la bLf sobre permeabilidad de la barrera.

8. CONCLUSIONES

En esta investigación se cumplió el objetivo de analizar la base de datos de las concentraciones de PT en las muestras de líquido intestinal de la región proximal y colon de ratones sometidos a estrés tratados con lactoferrina. Estos resultados servirán posteriormente para normalizar los ensayos inmunoenzimáticos para cuantificar la IgA, albúmina e IgG en el laboratorio de Microbiología Molecular del DSB UAMX.

No se encontró evidencia de que el estrés y la lactoferrina bovina provocaran una alteración de la permeabilidad de la barrera intestinal.

9. PERSPECTIVA

Este trabajo puede servir como antecedente para futuras investigaciones acerca del efecto del estrés y el mecanismo de acción de la bLf sobre la permeabilidad de la membrana intestinal.

10. REFERENCIAS

- Aranguren, A., & Medina, C. (2012) Papel de la respuesta inmune innata y el estrés oxidativo en la mastitis bovina. *Boletín Médico de Postgrado*. UCLA. Venezuela. 23(3). 189-197
- Ávila, J. (2014). El estrés un problema de salud del mundo actual. *Revista ConCiencia*, 2(1), 117-125.
- Drago, M., Flores, L., Oliver, G., Jarillo, R., Reina, H., Barbosa, E., & Campos, R. (2008). La lactoferrina como modulador de la respuesta inmunitaria. *Bioquímica*, 33(2), 71-82.
- Instruction manual Quick Start, (s.f.) Bradford Protein Assay. Biorad Hercules CA USA.
- Kruger, N. (2009) The Bradford Method For Protein Quantitation. In: Walker, J. (eds). The Protein Protocols Handbook. *Springer Protocols Handbooks*. Humana Press.
- Odeón, M., & Romera, S. (2017). Estrés en ganado: causas y consecuencias. *Revista veterinaria*, 28(1), 69-77.
- Mathews, C., Holde, K., & Ahern, K. (2013). Bioquímica Editorial Pearson.4 ed. Madrid,
- Menchén, L. (2009). Bases celulares y moleculares de la disfunción de la barrera intestinal inducida por estrés experimental. *Gastroenterología y Hepatología*, 32, 5561.
- Rodríguez, D., Vázquez, L., & Montfort, G. (2005). Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Revista latinoamericana de Microbiología*, 47(3-4), 102-111.
- Salvo, E., Alonso, C., Pardo, C., Casado, M., & Vicario, M. (2015). Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 107(11), 686-696.
- Vieco, G. & Albello, R. (2014) Factores psicosociales de origen laboral, estrés y morbilidad en el mundo. *Psicología desde el Caribe*, 31(2), 354-385.
- Wang, L., Llorente, C., Hartmann, P., Yang, A. M., Chen, P., & Schnabl, B. (2015). Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *Journal of immunological methods*, 421, 44-53.
- Zhao, X., Xu, X., Liu, Y., Xi, E., An, J., Tabys, D., & Liu, N. (2019). The in vitro protective role of bovine lactoferrin on intestinal epithelial barrier. *Molecules*, 24(1), 148.

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