

Universidad Autónoma Metropolitana
“Unidad Xochimilco”

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Lic. en Química Farmacéutica Biológica

Título del reporte

**Estandarización del tiempo necesario para
inducir colitis ulcerativa en ratones BALB/c
machos tratados con DSS**

Proyecto Genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

Etapas: Evaluación fármaco toxicológica de compuestos activos

Lugar de realización: Laboratorio de Microbiología Molecular (N-013)

Fecha de inicio: 1 de marzo de 2022

Fecha de término: 1 de septiembre de 2022

Alumna: Montaña Yañez Cinthya Verónica

Matrícula: 2172029320

Asesores



Dra. Maria Elisa Drago Serrano 17243

Nombre, firma y No. Económico del asesor interno



Dra. Fabiola Guzmán Mejía 900050

Nombre, firma y No. Económico del asesor externo

Índice	
Resumen	4
Abstract	4
Introducción	5
Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)	5
Colitis ulcerativa	5
Modelos experimentales de CU	6
Modelo animal con dextrano sulfato de sodio (DSS)	8
Índice de actividad de la enfermedad (DAI)	8
Justificación	9
Objetivo general y específicos	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Metodología utilizada y actividades realizadas	9
Animales	9
Dextrano sulfato de sodio	10
Diseño experimental	10
Evaluación del modelo de colitis ulcerativa inducida por DSS	10
Evaluación macroscópica	11
Análisis estadístico	11
Metas alcanzadas	11
Resultados y conclusiones	12
Primer ensayo ratones BALB/c	12
a) Evaluación del peso corporal en ratones BALB/c	12
c) Evaluación del sangrado en heces en ratones BALB/c	13
d) Consumo de alimento por grupo en ratones BALB/c	13
e) Evaluación del índice de actividad de la enfermedad (DAI) en ratones BALB/c	14
f) Evaluación macroscópica en ratones BALB/c	14
Primer ensayo ratones C57BL/6	15
a) Evaluación del peso corporal en ratones C57BL/6	15
b) Evaluación de la consistencia de heces en ratones C57BL/6	16

c) Evaluación del sangrado en heces en ratones C57BL/6	16
d) Consumo de alimento por grupo en ratones C57BL/6	16
e) Evaluación del índice de actividad de la enfermedad (DAI) en ratones C57BL/6	17
f) Evaluación macroscópica en ratones C57BL/6	17
Conclusión	18
Recomendaciones	18
Bibliografía	18

Resumen

Introducción: La colitis ulcerativa (CU) es una enfermedad crónica inflamatoria que ataca la capa mucosa del colon. El uso de diferentes tipos de modelos experimentales facilita el estudio de los mecanismos implicados en la patología. **Justificación:** La mayoría de los modelos experimentales utilizan el dextrano sulfato de sodio (DSS) para reproducir la CU; en este estudio se implementó el modelo de DSS para evaluar su efecto colitogénico como referente para futuros estudios experimentales que pueden servir para el diseño de fármacos destinados al control de este padecimiento en humanos. **Objetivo:** Evaluar la administración de DSS durante 7 días para inducir colitis ulcerativa en ratones BALB/c machos. **Metodología:** Se trabajó con ratones BALB/c machos de 7 semanas de edad los cuales fueron tratados con DSS al 2.5% p/v durante 7 días. Los grupos experimentales fueron: grupo 1 tratado con agua y grupo 2 tratado con DSS al 2.5%. Durante el tratamiento se hizo la evaluación del índice de actividad de la enfermedad (DAI) que consta de tres parámetros: pérdida de peso corporal, consistencia de heces y sangrado en heces. Al término del tratamiento con DSS los ratones fueron sacrificados. Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis no paramétrico Kruskal-Wallis. **Resultados:** No se observaron diferencias en el DAI con el grupo tratado con DSS en comparación con el grupo tratado con agua. **Conclusión:** El DSS administrado por 7 días, bajo las condiciones experimentales de este protocolo, no induce colitis ulcerativa evaluada mediante el DAI.

Palabras clave: Colitis ulcerativa, dextrano sulfato de sodio, índice de actividad de la enfermedad.

Abstract

Introduction: Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory disease that attacks the mucosal layer of the colon. Different types of experimental models facilitate the study of the mechanisms involved in the pathology. **Justification:** Experimental models apply dextran sodium sulfate (DSS) to reproduce UC; in this study DSS was implemented to evaluate its colitogenic effect as a reference for future experimental studies that can be used for the design of drugs to control this condition in humans. **Objective:** To evaluate the administration of DSS for 7 days to induce UC in male BALB/c mice. **Methodology:** We worked with 7-week-old male BALB/c mice treated with DSS at 2.5% w/v for 7 days. The experimental groups were group 1 treated with water and group 2 treated with 2.5% w/v DSS. The disease activity index (DAI) was evaluated with body weight loss, fecal consistency, and the presence of blood in feces. At the end of DSS treatment, the mice were sacrificed. data obtained were analyzed by Kruskal-Wallis non-parametric analysis. **Results:** No differences were observed in DAI with the DSS-treated group compared to the water-treated group. **Conclusion:** DSS administered for 7 days, under the experimental conditions of this protocol, doesn't induce ulcerative colitis as assessed by DAI.

Keywords: Ulcerative colitis, dextran sodium sulfate, disease activity index.

Introducción

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

En la enfermedad inflamatoria intestinal se presenta una inflamación crónica del tubo digestivo, esta enfermedad comprende dos enfermedades las cuales poseen características clínicas y de evolución diferentes: la colitis ulcerativa (CU) que ataca de manera exclusiva la mucosa del colon y la enfermedad de Crohn (EC) que afecta a todo el tracto digestivos, desde la boca hasta el ano; existe una tercer enfermedad que comparte características de ambas enfermedades denominada como colitis indeterminada (CI) afecta sólo al colon y posee características histológicas, clínicas y endoscópicas diferentes a las de la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn.

Colitis ulcerativa

La colitis ulcerativa es una enfermedad crónica que afecta de manera exclusiva la capa mucosa del colon, su curso clínico es impredecible, caracterizándose por episodios de remisión y recaídas (Yamamoto-Furusho et al., 2017). La causa exacta de esta enfermedad aun es desconocida, sin embargo, estudios han establecido factores genéticos, ambientales y de comportamiento que contribuyen a la gravedad de la enfermedad. El estrés psicológico, tabaquismo, uso de antiinflamatorios no esteroideos, la dieta, la lactancia materna y la isotretinoína han sido factores que influyen en la evolución y aparición de la CU. El diagnóstico de la CU está basado en una serie de características que van desde lo clínico hasta lo histológico; en la **Tabla 1** se muestran las características de diagnóstico que pueden presentar los pacientes con CU. El diagnosticar y confirmar a un paciente con CU de manera exitosa lleva a la elección de un tratamiento adecuado, ya que este dependerá de la gravedad de la enfermedad (Gajendran et al., 2019).

Tabla 1. Características de diagnóstico de la colitis ulcerativa

Tipo de manifestación	Descripción
Clínica	Diarrea con moco, dolor abdominal, hematoquecia, cólicos, retorcijón, pérdida de peso y aumento en la probabilidad de padecer cáncer colorrectal
Macroscópica	Inflamación en el recto, se observa eritema, edema, aumento de la granularidad de la mucosa, sangrado espontáneo, pseudopólipos, erosiones y úlceras
Histológica	Abscesos, ramificación y acortamiento y atrofia de las criptas, así como agotamiento de la mucina, metaplasia de las células de Paneth, plasmocitosis basal, agregados linfoides basales y eosinófilos de la lámina propia.

De acuerdo con (Yamamoto-Furusho et al., 2020) en el año 2015 en México se reportaron 33,060 casos de CU los cuales recibieron atención médica con una prevalencia de los casos observados (pacientes atendidos/ 100,000 habitantes) en mujeres es de 27.7 y en el caso de los hombres fue de 26.9; se registraron 1,097 casos de hospitalización teniendo una prevalencia (casos hospitalizados/100,000 habitantes) de 1.76 para mujeres y 1.80 para

hombres con CU y se registraron 453 muertes, con tasas de 4.31 y 3.15 para mujeres y hombres, respectivamente. Para el tratamiento puede requerirse de hospitalización y corticosteroides en dosis altas, este tipo de medicamentos pueden aliviar los síntomas e inducir remisión; debido a los efectos secundarios significativos que presentan este tipo de medicamentos no son usados a largo plazo. Para el tratamiento de primera línea en el manejo de la CU se incluyen medicamentos antiinflamatorios los cuales ayudan a calmar la inflamación del colón, este tipo de medicamentos vienen en presentaciones orales para que se liberen de manera eficaz en colon, si este tipo de medicamentos no es suficiente para controlar la enfermedad se va a requerir de inmunomoduladores. Cuando los medicamentos no controlan de manera adecuada la CU, se requiere de procedimientos quirúrgicos como la extirpación del colon (colectomía) o la extirpación del colón y el recto (proctocolectomía) para curar la CU.

En México los tratamientos para las diferentes etapas de CU en el sector público se clasifican de la siguiente manera:

- Tratamiento de remisión (CU leve o moderada): Mesalazina en un 70.4%
- Tratamiento de remisión (CU severa): Corticoesteroide sistémico en un 76.4%
- Tratamiento de mantenimiento (CU leve a moderada): Mesalazina oral en un 80.3%
- Tratamiento de mantenimiento (CU severa): Azatioprina en un 36.3%

Se debe tener en cuenta que la CU es una enfermedad con tendencia a aumentar a nivel mundial, siendo América Latina una de las regiones con un alza de casos (Yamamoto-Furusho et al., 2020), por lo que esta enfermedad nos lleva a implementar modelos experimentales que nos permitan una mejor comprensión de la enfermedad.

Modelos experimentales de CU

Existen diferentes modelos experimentales de CU que son utilizados para la investigación de la patogenia, así como para descubrir o comprender los mecanismos o vías en las que actúan los fármacos o alimentos en la prevención y/o tratamiento de esta enfermedad (Nascimento et al., 2020). Los principales modelos inducibles de colitis incluyen:

- Inducción por compuestos químicos o aislados: Ácido Trinitrobenceno sulfónico (TNBS), Oxazolona (OXA), Dextrano sulfato de sodio (DSS), ácido acético, carragenina, peptidoglicano A de estreptococos e indometacina
- Animales genéticamente modificados: knockout para IL-10 y MUC2

En la actualidad el TNBS, OXA y DSS en roedores son los modelos más utilizados. En los modelos murinos la CU presenta características similares a la CU en humanos, ya que incluye la pérdida de peso, diarrea grave, sangrado rectal, ulceración y la infiltración de leucocitos. En la **Tabla 2** se describe de manera breve una serie de modelos experimentales que son utilizados para inducir CU.

Tabla 2. Descripción de modelos animales utilizados para inducir colitis ulcerativa

Tipo de animal	Inductor químico/ biológico	Descripción
Rata Wistar	Ácido acético	Se inyectó intrarrectalmente 1 ml de ácido acético al 4% con una profundidad de penetración de 8 cm en el ano. Para el grupo control se inyectó intrarrectalmente 1 ml de solución salina normal. Los grupos experimentales recibieron tratamientos durante 30 s, 5, 10 y 20 min de contacto con la superficie del colon, con un grupo control administrado con 1 ml de solución salina normal durante 20 min de contacto con la superficie del colon (Bahrami et al., 2022).
Ratón C57BL/6	DSS	A los ratones se les administró DSS al 2 % p/v en su agua potable durante 7 días seguidos con 2 días de recuperación. En el sacrificio, se recogieron los colones, se midió su longitud y se dividieron en porciones para aislar las células mononucleares de la lámina propia (Strati et al., 2021).
Rata Sprague-Dawley	TNBS	Las ratas se anestesiaron con éter dietílico anhidro. Posteriormente, una solución de TNBS de 300 µl (5% p / v) en etanol al 50% se inyectó por el ano mediante una cánula que se introdujo a 8 cm de profundidad. El grupo normal se trató con el mismo volumen de solución salina tamponada con fosfato. Posteriormente se midió el peso y la longitud del colon (Ni et al., 2019).
Ratón BALB/c	OXA	Para inducir la colitis ulcerativa los ratones fueron tratados con 150 µL de OXA al 1 % vía intrarrectal (Wu et al., 2016).
Ratones	<i>Salmonella</i>	La infección oral directa causada por <i>S. typhimurium</i> tiene características histopatológicas similares a las de la CU humana, incluida la pérdida de criptas epiteliales, la erosión y la infiltración de neutrófilos. Es de destacar que este modo de inducción de colitis por lo general da como resultado una infección sistémica dentro de los 5 a 7 días posteriores a la infección (Low et al., 2013).
Ratones IL-7 Tg	Expresan el DNA complementario de la IL-7 murina	Este tipo de ratón desarrolla colitis aguda espontáneamente entre las semanas 1 y 3 de edad, caracterizada por una infiltración celular mixta que incluye neutrófilos y linfocitos. Entre las semanas 8–12 de edad, los ratones Tg muestran prolapso rectal y sangrado intestinal remitente, con erosión rectal, pérdida de células caliciformes y abscesos ocasionales (Low et al., 2013).

Modelo animal con dextrano sulfato de sodio (DSS)

En la **Figura 1** se muestra la evolución que han tenido los modelos animales de la CU. Como se puede observar del año 2014 a la fecha el modelo animal con DSS se ha vuelto predominante, al ser un método de estimulación química se busca que el reactivo estimule el organismo del animal de modo que el nivel de quimiocinas en el cuerpo cambie y se logre con éxito la reproducibilidad del modelo (Gao et al., 2022).

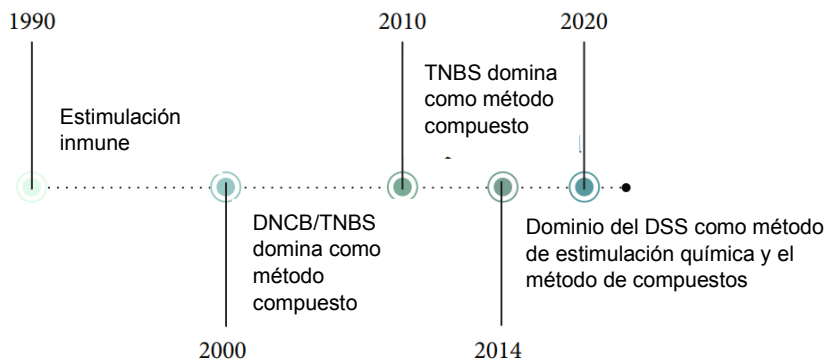


Figura 1. Evolución de los métodos de modelización de la CU en los últimos 30 años.

El modelo puede ser utilizado tanto en ratas como en ratones, el método para poder ser realizado consta de dos maneras: Mediante una solución debida a libre demanda o una solución administrada mediante el uso de una sonda.

Las ventajas que presenta este modelo son diversas, entre ellas destacan: La buena reproducibilidad, es fácil de realizar, tiene una alta tasa de éxito y los síntomas que presenta son similares a los de la CU en humanos. Como desventajas se encuentra que tiene un largo periodo de modelado, así como dificultad para hacerlo estable y puede ser influenciado por muchos factores que generen datos experimentales inestables.

Durante la realización del modelo este es monitoreado mediante el índice de actividad de la enfermedad (DAI) el cual evalúa tres parámetros que dan indicio de que la CU está siendo reproducida en el organismo de los roedores.

Índice de actividad de la enfermedad (DAI)

El índice de actividad de la enfermedad (DAI) es utilizado para asignar un puntaje a diferentes características de interés que puede presentar el animal a lo largo del ensayo, para el caso de ensayos con DSS los ratones suelen presentar tres características que nos pueden guiar al desarrollo de la enfermedad, estas características son: pérdida de peso, consistencia de las heces y sangrado en heces; el valor numérico que se les asigna se encuentra conformado por un puntaje entre 0-4. En la **Tabla 3** se muestra el puntaje DAI de acuerdo con los parámetros descritos anteriormente (da Silva et al., 2016)

Tabla 3. Puntaje del índice de actividad de la enfermedad (DAI)

Puntaje	Pérdida de peso	Consistencia de las heces	Sangrado en heces
0	Ninguna	Normal	Normal
1	1-5%	-	-
2	6-10%	Heces sueltas	-
3	11-20%	-	-
4	>21%	Diarrea	Sangrado macroscópico

Justificación

Debido a que la CU va en aumento en la población su estudio es de importancia médica; el uso de diferentes tipos de modelos experimentales facilita el aprendizaje y la comprensión de la enfermedad lo que nos lleva a una mejora en los tratamientos farmacológicos que se requieren. Por lo tanto, en el presente trabajo se llevó a cabo un diseño experimental en el cual se evaluó el efecto del DSS para inducir colitis ulcerativa en ratones el cual puede ser un referente experimental para futuros protocolos de servicio social.

Objetivo general y específicos

Objetivo general

- Evaluar la administración de DSS durante 7 días para inducir colitis ulcerativa en ratones BALB/c machos

Objetivos específicos

- Determinar el índice de actividad de la enfermedad (DAI)
- Medir la longitud del colon al finalizar el tratamiento con DSS
- Evaluar macroscópicamente la aparición de úlceras

Metodología utilizada y actividades realizadas

Animales

Se trabajó con ratones macho de la cepa BALB/c de 6 semanas de edad proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la UAM-Xochimilco. En este protocolo se incluyeron ratones de la cepa C57BL/6 a fin de comparar los efectos del DSS, como se describe en diversos estudios experimentales. Los ratones fueron colocados en 2 grupos mantenidos en condiciones controladas de temperatura a 20 °C, humedad relativa del 55% y ciclo de luz/oscuridad 12/12 h con la luz encendida a las 7:00 am y apagada a las 7:00 pm. Los ratones fueron provistos con alimento comercial (Laboratory Rodent Diet 5001, LabDiet Saint Louis, MO, USA) y agua del bioterio a libre demanda durante el periodo de adaptación a las condiciones del ambiente antes de proceder con las intervenciones experimentales en las semanas 7-9 de vida. Dicho protocolo (protocolo No. 231) fue aprobado por UPEAL BIOTERIO DCBS.CICUAL.006.22 con fecha vigente 30/06/2022 al 30/06/2027.

Dextrano sulfato de sodio

Se utilizó el dextrano de la marca Sigma-Aldrich®, este dextrano es un derivado de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* con un peso molecular promedio de 35,000-45,000 Da.

Se pesaron 5 g de dextrano para ser disueltos en 200 ml de agua estéril, llegando a una concentración del 2.5% p/v. Esa solución se envaso en bebederos estériles para reducir la contaminación.

Diseño experimental

Los grupos experimentales fueron 2; grupo 1 tratado con agua y grupo 2 tratado con DSS al 2.5% p/v. Los ratones BALB/c fueron tratados durante 7 días, debido a que en el primer ensayo no se observó el desarrollo de CU se decidió usar otra cepa de ratones y un mayor tiempo (ratones C57BL/6 durante 10 días). Las intervenciones experimentales dieron inicio el martes de la semana 7 de vida y terminaron el lunes de la semana 8 de vida para los ratones BALB/c (ver **Figura 2A**). Las intervenciones experimentales dieron inicio el martes de la semana 7 de vida y terminaron el jueves de la semana 8 de vida para los ratones C57BL/6 (ver **Figura 2B**). Al finalizar se llevó a cabo la eutanasia con CO₂ para los ratones BALB/c y con isoflurano para los ratones C57BL/6, posteriormente se llevó a cabo la disección del colon para la observación macroscópica

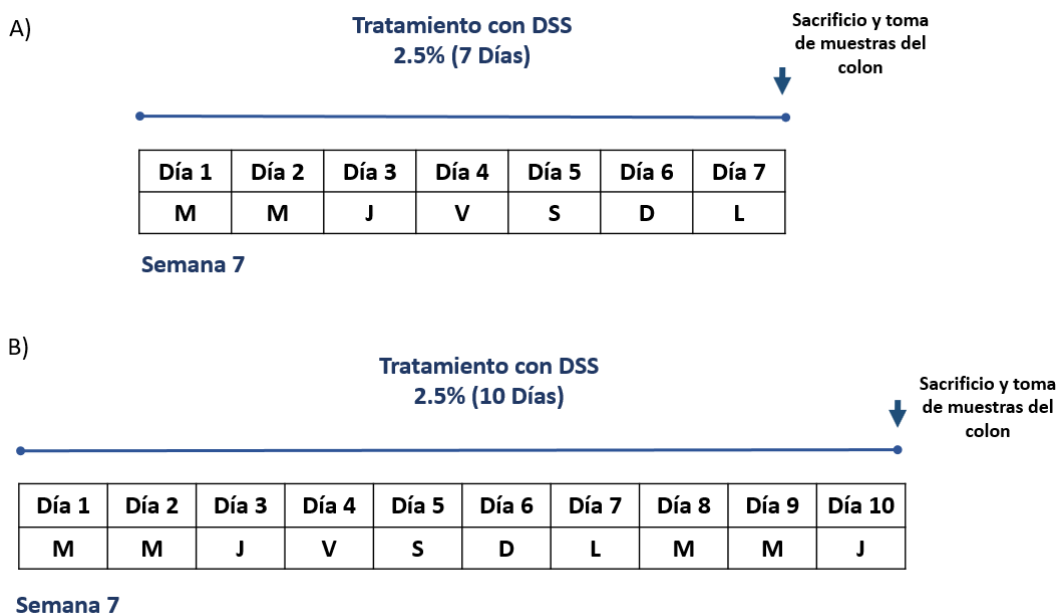


Figura 2. Diseño experimental. Tratamiento con 2.5% p/v de DSS durante 7 días para los ratones BALB/c (**A**) y 10 días para los ratones C57BL/6 (**B**).

Evaluación del modelo de colitis ulcerativa inducida por DSS

Se llevó a cabo el desarrollo del modelo de colitis ulcerativa inducida por DSS de acuerdo con lo descrito previamente por Boeing et al., 2018.

De manera diaria se hizo la evaluación del peso corporal, la consistencia de heces y sangrado en heces. Con estos parámetros se hizo el puntaje del DAI como se muestra en la **Tabla 3**. Los parámetros anteriores se evaluaron de la siguiente manera:

Pérdida de peso

Para la medición de este parámetro de manera diaria se pesaban a los ratones mediante el uso de balanza analítica

Consistencia de las heces

Los ratones eran depositados en una caja la cual contaba con divisiones por grupo y por ratón, a los ratones se les dejaba dentro de la caja aproximadamente 30 minutos, de manera que, todos defecaran al mismo tiempo, transcurrido el tiempo los animales se sacaban y se regresaban a sus cajas para poder hacer la evaluación de las heces

Sangrado en heces

Durante la defecación se observó si existía presencia de sangre en las heces.

Consumo de alimento

Este parámetro se realizó como un control, no fue considerado para la evaluación del DAI. El consumo de alimento se evaluó diariamente en los dos grupos, se pesaron 200 g de alimento y el consumo de alimento se evaluó por la diferencia en el peso inicial.

Evaluación macroscópica

La evaluación macroscópica no se realizó en los ratones BALB/c debido a que no presentaron ningún signo del DAI, solo en los ratones C57BL/6 al término del tratamiento. Al diseccionar el colon se visualizó el tamaño y la presencia de úlceras.

Análisis estadístico

Los resultados de los tres grupos independientes de ratones se analizaron mediante análisis no paramétrico Kruskal Wallis. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Metas alcanzadas

A pesar de haber usado dos cepas de ratones y probado dos diferentes tiempos de administración de DSS no se logró estandarizar el tiempo adecuado para inducir colitis, será necesario hacer otras aproximaciones experimentales. Sin embargo, logramos desarrollar habilidades en el uso y manejo de animales de laboratorio, así como diferentes habilidades en el laboratorio que nos ayudaran en nuestro desempeño profesional.

Resultados y conclusiones

Primer ensayo ratones BALB/c

a) Evaluación del peso corporal en ratones BALB/c

El peso corporal de los ratones fue el primer parámetro DAI que se evaluó, para ello se hizo el pesaje de cada ratón durante 7 días continuos. Como se puede observar, en la **Tabla 4** los valores del peso corporal no cambiaron significativamente entre los ratones del grupo 1 tratados con agua y los ratones del grupo 2 tratados con DSS al 2.5%.

Tabla 4. Peso corporal en gramos de los grupos de ratones. Grupo 1 tratados con agua y grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 7 días continuos

Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1R1	18.5	17.7	18.2	18.1	17.7	18.0	17.8
1R2	18.3	18.3	18.7	18.9	18.5	18.4	18.5
1R3	17.5	17.2	17.5	17.7	17.2	17.5	17.4
1R4	16.5	16.7	16.7	17.1	17.0	17.1	17.1
2R1	16.7	17.2	17.4	17.5	17.5	17.7	17.1
2R2	18.5	18.9	18.9	18.7	18.6	18.9	18.5
2R3	16.5	17.5	17.3	17.3	17.2	17.0	17.5
2R4	19.0	19.4	19.2	19.4	19.4	19.8	19.8

De acuerdo con los datos de peso corporal de la **Tabla 4**, en la **Figura 3** se muestra el promedio de los pesos obtenidos de los grupos de ratones tratados con agua estéril y DSS al 2.5% durante 7 días.

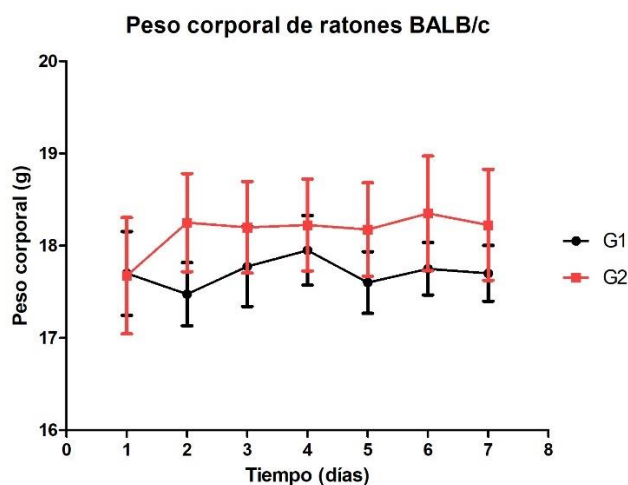


Figura 3. Promedio del peso corporal en gramos (eje Y) durante 7 días (eje X) en ratones BALB/c. Grupo tratado con agua estéril (G1) y grupo tratado con DSS al 2.5% (G2)

b) Evaluación de la consistencia de heces en ratones BALB/c

En la **Tabla 5** se muestra la evaluación diaria por ratón de la consistencia de heces, en los ratones del grupo 1 tratados con agua y los ratones del grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 7 días. No se observó ningún cambio que pudiera considerarse como heces semisueeltas o incluso sueltas, las heces siempre se tornaron firmes y con muy poca humedad.

Tabla 5. Evaluación de la consistencia de heces en los ratones del grupo 1 tratados con agua y grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 7 días. Puntuación DAI: Normal (0 puntos), semisueeltas (2 puntos) y diarrea (4 puntos)

Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1R1	0	0	0	0	0	0	0
1R2	0	0	0	0	0	0	0
1R3	0	0	0	0	0	0	0
1R4	0	0	0	0	0	0	0
2R1	0	0	0	0	0	0	0
2R2	0	0	0	0	0	0	0
2R3	0	0	0	0	0	0	0
2R4	0	0	0	0	0	0	0

c) Evaluación del sangrado en heces en ratones BALB/c

En la **Tabla 6** se muestra la evaluación diaria por ratón del sangrado en heces en los ratones del grupo 1 tratados con agua y del grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 7 días. Al observar las heces de manera macroscópica no se percibieron rastros de sangre; las heces fueron maceradas para asegurarse de que no existiera sangre dentro de ellas, sin embargo, siguió sin percibirse sangre.

Tabla 6. Evaluación del sangrado en heces en los ratones del grupo 1 tratados con agua y en los ratones del grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 7 días. Puntuación DAI: Normal (0 puntos) o sangrado macroscópico (4 puntos)

Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1R1	0	0	0	0	0	0	0
1R2	0	0	0	0	0	0	0
1R3	0	0	0	0	0	0	0
1R4	0	0	0	0	0	0	0
2R1	0	0	0	0	0	0	0
2R2	0	0	0	0	0	0	0
2R3	0	0	0	0	0	0	0
2R4	0	0	0	0	0	0	0

d) Consumo de alimento por grupo en ratones BALB/c

La **Figura 4** muestra la representación del consumo de alimento por grupo en los ratones del grupo 1 tratados con agua y en los ratones del grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante

7 días. Se puede observar que para el día 3 el grupo G1 tuvo un consumo de alimento alto comparado con el grupo G2, sin embargo, no se encontró una diferencia significativa ($p>0.05$).

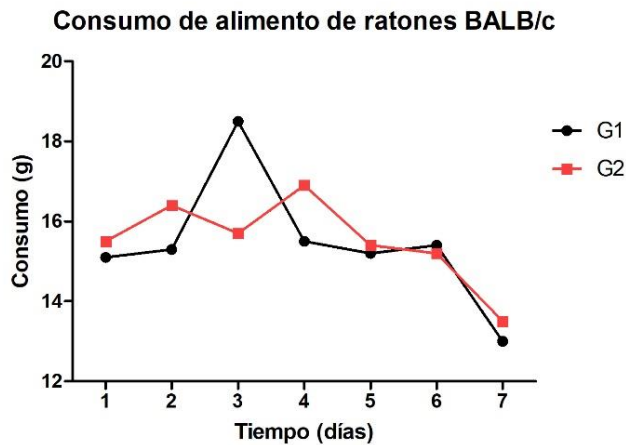


Figura 4. Consumo de alimento en gramos (eje Y) durante 7 días (eje X) en ratones BALB/c. Grupo tratado con agua estéril (G1), grupo tratado con DSS al 2.5% p/v (G2) durante 7 días continuos

e) Evaluación del índice de actividad de la enfermedad (DAI) en ratones BALB/c

Evaluación de los parámetros del DAI en los ratones del grupo 1 tratados con agua y del grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 7 días. No se observaron las manifestaciones clínicas descritas previamente, durante el tratamiento el puntaje que se obtuvo en cada parámetro fue constante y permaneció en 0, en la **Tabla 7** se muestra el puntaje obtenido.

Tabla 7. Puntaje DAI obtenido en los ratones del grupo 1 tratados con agua y en los ratones del grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 7 días

Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1R1	0	0	0	0	0	0	0
1R2	0	0	0	0	0	0	0
1R3	0	0	0	0	0	0	0
1R4	0	0	0	0	0	0	0
2R1	0	0	0	0	0	0	0
2R2	0	0	0	0	0	0	0
2R3	0	0	0	0	0	0	0
2R4	0	0	0	0	0	0	0

f) Evaluación macroscópica en ratones BALB/c

En los ratones del grupo 1 tratados con agua estéril y del grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 7 días no se llevó a cabo la disección debido a que no se reprodujo la enfermedad, por lo tanto, su sacrificio fue mediante cámara de CO₂.

Primer ensayo ratones C57BL/6

a) Evaluación del peso corporal en ratones C57BL/6

La medición del peso corporal de los ratones se realizó diariamente durante 10 días, como se muestra en la **Tabla 8**. Se puede observar que los valores del peso corporal no cambiaron significativamente en los ratones del grupo 1 tratados con agua y los ratones del grupo 2 tratados con DSS al 2.5%.

Tabla 8. Peso corporal en gramos de los grupos de ratones. Grupo 1 tratados con agua y grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 10 días.

Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
1R1	25.0	25.4	26.0	25.7	25.5	25.5	25.5	25.7	25.8	26.7
1R2	20.9	21.3	21.3	20.9	21.4	20.4	27.0	28.0	21.9	21.4
1R3	22.3	23.1	22.6	22.2	22.3	22.1	22.1	22.2	22.3	22.3
1R4	23.5	23.3	22.8	22.2	22.2	22.1	22.3	22.3	22.5	22.7
2R1	25.4	26.6	25.9	22.5	25.7	25.7	25.1	25.7	25.9	25.8
2R2	24.5	24.9	24.6	21.3	24.1	24.0	23.8	24.0	24.1	24.3
2R3	18.2	18.7	18.8	16.7	18.9	19.0	19.4	19.5	19.5	19.9
2R4	25.8	26.0	26.2	24.1	26.6	27.0	27.3	27.4	27.7	27.4

De acuerdo con los datos de peso corporal de la **Tabla 8**, en la **Figura 5** se muestra el promedio de los pesos obtenidos de los grupos de ratones.

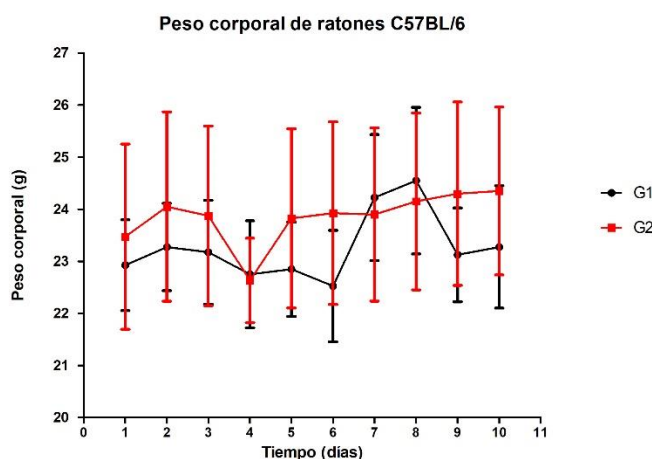


Figura 5. Promedio del peso corporal en gramos (eje Y) durante 10 días (eje X) en ratones C57BL/6. Grupo tratado con agua estéril (G1) y grupo tratado con DSS al 2.5% (G2).

b) Evaluación de la consistencia de heces en ratones C57BL/6

En la **Tabla 9** se muestra la evaluación diaria de la consistencia de heces en el grupo 1 de ratones tratado con agua y el grupo 2 de ratones tratado con DSS al 2.5% durante 10 días. Se observó que las heces conservaron su forma y consistencia.

Tabla 9. Evaluación de la consistencia de heces en los grupos de ratones. Grupo 1 tratado con agua y grupo 2 tratado con DSS al 2.5% durante 10 días. Puntuación: Normal (0 puntos), semisueitas (2 puntos) y diarrea (4 puntos).

Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
1R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1R4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2R4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

c) Evaluación del sangrado en heces en ratones C57BL/6

En la **Tabla 10** se muestra la evaluación diaria del sangrado en heces en los ratones del grupo 1 tratados con agua y en los ratones del grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 10 días. Mediante la observación macroscópica las heces no presentaron ninguna señal de sangre, a pesar de deshacer las heces con ayuda de una espátula seguía sin observarse la presencia de sangre.

Tabla 10. Evaluación del sangrado en heces en los grupos de ratones. Grupo 1 tratados con agua y grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 10 días. Puntuación: Normal (0 puntos) o sangrado macroscópico (4 puntos)

Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
1R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1R4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2R4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

d) Consumo de alimento por grupo en ratones C57BL/6

En la **Figura 6**, se realizó la representación del consumo de alimento en los ratones del grupo 1 tratados con agua y en los ratones del grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 10 días. El análisis de los datos no encontró una diferencia significativa ($p > 0.05$).

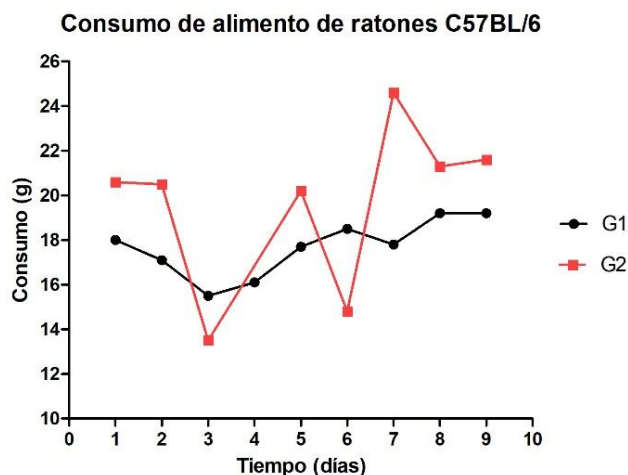


Figura 6. Consumo de alimento en gramos (eje Y) durante 10 días (eje X) en ratones C57BL/6. Grupo tratado con agua estéril (G1) y grupo tratado con DSS al 2.5% (G2) durante 10 días continuos

e) Evaluación del índice de actividad de la enfermedad (DAI) en ratones C57BL/6

Evaluación del DAI en los ratones del grupo 1 tratados con agua y en los ratones del grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 10 días. Para evaluar el DAI se tomaron los datos del peso corporal, consistencia y sangrado en heces. Con base en el puntaje de DAI no hubo ninguna manifestación clínica que diera pauta a la inducción de CU en los ratones, en la **Tabla 11** se muestra el puntaje obtenido de DAI.

Tabla 11. Puntaje DAI obtenido en los ratones del grupo 1 tratados con agua y en los ratones del grupo 2 tratados con DSS al 2.5% durante 10 días

Grupo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
1R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1R4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2R4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

f) Evaluación macroscópica en ratones C57BL/6

Se pudo corroborar que no existieron cambios en el tamaño del colon en el grupo G2 tratado con DSS al 2.5% en comparación con el grupo G1 tratado con agua (ver **Figura 7A**). Al observar de manera macroscópica el tejido del colon no se percibió la aparición de úlceras en el grupo G2 tratado con DSS al 2.5% en comparación con el grupo G1 tratado con agua (ver **Figura 7B**).



Figura 7. Aspecto macroscópico del colon. Tamaño del colon del grupo tratado con agua estéril G1 y grupo tratado con DSS al 2.5% G2 durante 10 días (A). Tejido a nivel macroscópico del colon del grupo tratado con agua estéril G1 y grupo tratado con DSS al 2.5% G2 durante 10 días (B).

Conclusión

El DSS administrado por 7 o 10 días, bajo las condiciones experimentales de este protocolo, no induce colitis ulcerativa evaluada mediante el DAI en ratones BALB/c y C57BL/6

Recomendaciones

Para futuros estudios se puede evaluar alguna otra vía de administración del DSS, así como un mayor tiempo de administración.

Bibliografía

- Bahrami, G., Malekshahi, H., Miraghaee, S., Madani, H., & Babaei, A. (2022). Improving Animal Model of Induced Colitis by Acetic Acid in Terms of Fibrosis and Inflammation Incidence in the Colon. *Journal of Investigative Surgery*, 35(1), 214–222. <https://doi.org/10.1080/08941939.2020.1821844>
- Boeing, T., de Souza, P., Bonomini, T. J., Mariano, L. N. B., Somensi, L. B., Lucinda, R. M., Malheiros, A., da Silva, L. M., & de Andrade, S. F. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory effect of plumieride in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 99, 697–703. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.142>
- da Silva, L. M., Farias, J. A. M., Boeing, T., Somensi, L. B., Beber, A. P., Cury, B. J., Santin, J. R., & Faloni De Andrade, S. (2016). Hydroalcoholic Extract from Inflorescences of *Achyrocline satureioides* (Compositae) Ameliorates Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis in Mice by Attenuation in the Production of Inflammatory Cytokines and Oxidative Mediators. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/3475356>

- Gajendran, M., Loganathan, P., Jimenez, G., Catinella, A. P., Ng, N., Umopathy, C., Ziade, N., & Hashash, J. G. (2019). A comprehensive review and update on ulcerative colitis. In *Disease-a-Month* (Vol. 65, Issue 12). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2019.02.004>
- Gao, X., Li, J., Pang, X., Cong, K., Jiang, C., Han, B., Gao, J., Wang, Z., Hu, J., Wen, K., Ye, X., & Dou, L. (2022). Animal Models and Pathogenesis of Ulcerative Colitis. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2022, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2022/5927384>
- Low, D., Nguyen, D. D., & Mizoguchi, E. (2013). Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 7, pp. 1341–1356). <https://doi.org/10.2147/DDDT.S40107>
- Nascimento, R. de P. do, Machado, A. P. da F., Galvez, J., Cazarin, C. B. B., & Maróstica Junior, M. R. (2020). Ulcerative colitis: Gut microbiota, immunopathogenesis and application of natural products in animal models. In *Life Sciences* (Vol. 258, pp. 1–22). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118129>
- Ni, Y., Liu, M., Yu, H., Chen, Y., Liu, Y., Chen, S., Ruan, J., Da, A., Zhang, Y., & Wang, T. (2019). Desmethylbellidifolin from *Gentianella acuta* Ameliorate TNBS-Induced Ulcerative Colitis through Antispasmodic Effect and Anti-Inflammation. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01104>
- Strati, F., Pujolassos, M., Burrello, C., Giuffrè, M. R., Lattanzi, G., Caprioli, F., Troisi, J., & Facciotti, F. (2021). Antibiotic-associated dysbiosis affects the ability of the gut microbiota to control intestinal inflammation upon fecal microbiota transplantation in experimental colitis models. *Microbiome*, 9(1), 2–15. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00991-x>
- Wu, W., Wang, F., Gao, X., Niu, T., Zhu, X., Yan, X., & Chen, H. (2016). Synergistic effect of κ -carrageenan on oxazolone-induced inflammation in BALB/c mice. *BMC Gastroenterology*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12876-016-0459-7>
- Yamamoto-Furusho, J. K., Bosques-Padilla, F., de-Paula, J., Galiano, M. T., Ibañez, P., Juliao, F., Kotze, P. G., Rocha, J. L., Steinwurz, F., Veitia, G., & Zaltman, C. (2017). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: Primer Consenso Latinoamericano de la Pan American Crohn's and Colitis Organisation. In *Revista de Gastroenterología de Mexico* (Vol. 82, Issue 1, pp. 46–84). Asociacion Mexicana de Gastroenterologia. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2016.07.003>
- Yamamoto-Furusho, J. K., Bosques-Padilla, F. J., Charúa-Guindic, L., Cortés-Espinosa, T., Miranda-Cordero, R. M., Saez, A., & Ledesma-Osorio, Y. (2020). Inflammatory bowel disease in Mexico: Epidemiology, burden of disease, and treatment trends. *Revista de Gastroenterología de Mexico*, 85(3), 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.07.008>

Maria Elisa Drago S.

Dra. Maria Elisa Drago Serrano 17243
Nombre, firma y No. Económico del
asesor interno



Dra. Fabiola Guzmán Mejía 900050
Nombre, firma y No. Económico del
asesor externo