

Reporte de Servicio Social

Evaluación de los Niveles de Lactoferrina Fecal en Ratones BALB/c Estresados por Inmovilización

Nombre: Edward Alan Vega Bautista

No. Matricula: 2132037053

Nombre del asesor interno:

Dra. Maria Elisa Drago Serrano

Profesora Titular "C" Tiempo completo

Nombre del asesor externo:

Fabiola Guzmán Mejía

Área Producción de Productos Biológicos,

Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco.

Lugar: Laboratorio de Microbiología Molecular Edificio "N" Depto. Sistemas Biológicos

Fecha de inicio: 16 de Diciembre del 2019

Fecha de terminación: 16 de Junio del 2020

Contenido

Resumen.....	4
Abstract	5
1. Introducción.....	6
2. Marco teórico	7
2.1 Estrés.....	7
2.2 Permeabilidad intestinal.....	8
2.3 Lactoferrina fecal	9
3. Justificación.....	10
4. Objetivos	10
4.1 Objetivo general.....	10
4.2 Objetivos específicos	11
5. Material y Métodos.....	11
5.1 Ratones	11
5.2 Protocolo de estrés.....	11
5.3 Obtención de muestras biológicas.....	12
5.4 Preparación de extractos fecales.....	12
5.5 Determinación de proteína total.....	13
5.6 Cuantificación de lactoferrina fecal	13
5.6.1 Sensibilización (coating).....	13
5.6.2 Bloqueo (blocking).....	14
5.6.3 Primer anticuerpo	14
5.6.4 Conjugación (conjugating).....	14
5.6.5 Sustrato (sustrating)	14
5.6.6 Arresto enzimático (stopping).....	14
5.6.7 Lectura de placas y obtención de valores de lactoferrina.....	15
5.7 Análisis estadísticos.....	15
6. Resultados y análisis.....	15
6.1 Efecto del estrés en el peso corporal de los ratones	15
6.2 Efecto del estrés en los niveles de Lf fecal en ratones BALB/C	17
.....	18

.....	18
6.3 Efecto del dimorfismo sexual sobre los niveles de Lf fecal en condiciones de estrés.....	18
7. Conclusión	20
8. Bibliografía	20
9. Anexos	23
Anexo 1. Consumibles.....	23
Anexo 2. Equipo	23
Anexo 3. Material.....	24
Anexo 4. Preparación de Reactivos.....	24
Anexo 4.1 Solución amortiguadora de extracción para heces	24
Anexo 4.2 Preparación del reactivo de Bradford.....	25
Anexo 4.3 Solución amortiguadora de carbonatos.....	25
Anexo 4.4 Solución amortiguadora salina fosfato (PBS).....	25
Anexo 4.5 Solución amortiguadora salina fosfato (PBS) con Tween 20	25
Anexo 4.6 Solución amortiguadora citrato-fosfato	25
Anexo 4.7 Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 2.5 M.....	26
Anexo 5. Curvas estándar	26
Anexo 5.1 Curva estándar de ASB para cuantificación de proteína total mediante el método Bradford.	26
Anexo 5.2 Curva estándar de Lfb para cuantificación de Lf fecal mediante un ELISA indirecto.	28

Resumen

Introducción. La lactoferrina (Lf) fecal proviene de la desgranulación de neutrófilos infiltrados en el lumen intestinal en condiciones de inflamación o bien, de la trasudación de Lf sanguínea hacia el lumen intestinal cuando la permeabilidad intestinal podría ser alterada por mediadores neuroendocrinos liberados durante el estrés. **Justificación.** Se desconoce la relación que existe entre los niveles de Lf fecal y el estrés por inmovilización. **Objetivo.** Evaluar los niveles de Lf fecal en ratones BALB/c estresados. **Material y métodos.** Se aplicó el modelo de estrés por inmovilización 2h/4días consecutivos a un grupo de ratones hembras (n=6) y a uno de machos (n=6), mientras que otros dos grupos (hembras y machos) se incluyeron como controles sin estrés. Al cuarto día se colectaron por duplicado dos pellets fecales de cada ratón para preparar extractos fecales cuya concentración de proteína total se determinó con el método de Bradford. La concentración de Lf se midió con un ensayo inmunoenzimático indirecto. En microplacas forradas con los extractos fecales y bloqueadas con albúmina sérica bovina, se detectó Lf con suero policlonal de conejo contra Lf humana y suero policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa como primer y segundo anticuerpo respectivamente; la cuantificación de Lf se realizó con una curva estándar de Lf bovina y se reportó en ng/mL y en $\mu\text{g}/100\text{mg}$ de proteína total. Dependiendo de la normalidad de los datos, las comparaciones se realizaron con pruebas paramétricas (t-Student, ANOVA de una vía y la prueba de Tukey) o no paramétricas (Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn). Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de $p < 0.05$. **Resultados.** En comparación con su grupo control la concentración de Lf fecal solo aumentó en el grupo de machos estresados. En términos de dimorfismo sexual se encontraron diferencias entre los grupos de ratones estresados macho vs hembra. **Conclusión.** En machos, la cuantificación de Lf fecal permitió identificar un aumento de la permeabilidad intestinal ocasionada por el estrés. **Palabras clave:** estrés por inmovilización, barrera intestinal, lactoferrina fecal, permeabilidad intestinal, dimorfismo sexual

Abstract

Introduction. Fecal lactoferrin (Lf) derives from the degranulation of neutrophils infiltrated into the intestinal lumen under conditions of inflammation, or from Lf transudation from blood to the intestinal lumen when intestinal permeability might be altered by neuroendocrine mediators released during stress. **Justification.** The correlation between fecal-Lf levels and immobilization stress is unknown. **Aim.** To evaluate fecal-Lf levels in stressed BALB/c mice. **Material and methods.** The immobilization stress model was applied for 2h/4 consecutive days to a group of female (n=6) and male (n=6) mice, while two other groups (females and males) were included as unstressed controls. On the fourth day, two fecal pellets were collected in duplicate from each mouse to prepare fecal extracts whose total protein concentration was determined with the Bradford method. Lf concentration was measured with an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. In microplates coated with the fecal extracts and blocked with bovine serum albumin, Lf was detected with rabbit polyclonal anti-lactoferrin and goat anti-rabbit IgG-peroxidase conjugated as first and second antibodies respectively. Lf quantification was done with a bovine Lf standard curve and was expressed in units of ng/mL and $\mu\text{g}/100\text{mg}$ of total protein. Depending on the normality of the data, comparisons were made with parametric (Student's t-test, one-way ANOVA and Tukey's test) or non-parametric (Kruskal-Wallis and Dunn's test) tests. $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference. **Results.** In comparison with their control group, fecal-Lf concentration only increased in the group of stressed male-mice. In terms of sexual dimorphism, significant differences were found between the groups of stressed male vs female mice. **Conclusion.** In males, the quantification of fecal-Lf allowed us to identify an increase in intestinal permeability caused by stress.

Keywords: immobilization stress, intestinal barrier, fecal lactoferrin, intestinal permeability, sexual dimorphism

1. Introducción

El estrés es un conjunto de reacciones fisiológicas que el sistema nervioso central (SNC) desencadena con el fin de proteger al organismo de eventos amenazadores. Estas reacciones modifican a través de mediadores neuroendocrinos la homeostasis intestinal (Campos-Rodríguez et al., 2013) La regulación se da por la vía del eje cerebro-intestino (BGA) que incluye la activación de las rutas nerviosas simpáticas, parasimpáticas y entéricas, así como la activación endócrina del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) (Guzmán-Mejía et al., 2021). Uno de los parámetros que se ve afectado al evaluar el impacto del estrés sobre la homeostasis intestinal es la permeabilidad intestinal. La permeabilidad intestinal es un término cuantitativo que mide la tasa del flujo de moléculas solubles a través del epitelio (Wells et al., 2017). Dicho flujo ocurre desde el lado luminal al vascular o viceversa y se da a través de dos vías: paracélular y transcélular (Wells et al., 2017). La vía de permeabilidad que se utiliza depende de las características del agente que va a cruzar, como son tamaño, carga y polaridad (Molotla-Torres et al., 2023). Una de las formas menos invasivas de medir la permeabilidad intestinal es usar marcadores endógenos que en condiciones saludables están restringidos en el compartimento sanguíneo porque al existir una alteración en la barrera intestinal, estos marcadores se mueven al lumen intestinal donde pueden ser detectados en heces (Wang et al., 2015). La lactoferrina fecal es un biomarcador endógeno de inflamación porque proviene de la desgranulación de los neutrófilos circulantes infiltrados a través de la mucosa intestinal (Logsdon & Mecsas, 2006); sin embargo, su uso para evaluar los efectos que tiene el estrés crónico por inmovilización sobre la barrera intestinal ha sido poco investigado.

El dimorfismo sexual tiene un alto impacto en la homeostasis intestinal, razón por la cual fue necesario realizar el estudio en ratones macho y hembra (Sankaran-Walters et al., 2013). Este reporte presenta los datos del impacto del estrés sobre la concentración de lactoferrina fecal, así como los efectos del estrés en términos de dimorfismo sexual sobre la concentración fecal de lactoferrina.

2. Marco teórico

2.1 Estrés

El estrés es una respuesta del sistema nervioso central a estímulos externos percibidos como una amenaza a la homeostasis (Campos-Rodríguez et al., 2013). El impacto del estrés en la homeostasis intestinal se da a través de mediadores neuroendocrinos vía el eje cerebro-intestino (BGA). El BGA está conformado ya sea por una rama nerviosa del sistema nervioso autónomo (SNA) o por una rama endocrina del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) (Guzmán-Mejía et al., 2021). La activación de las rutas nerviosas del SNA producidas por estrés se da a través de tres vías: simpática, parasimpática y entérica (Guzmán-Mejía et al., 2021). La vía simpática se lleva a cabo en la médula de la glándula adrenal a través de la liberación de hormonas asociadas al estrés como son las catecolaminas: epinefrina (adrenalina) y norepinefrina (noradrenalina) (Guzmán-Mejía et al., 2021). En la vía parasimpática la regulación se da a través del nervio vago, siendo este el que transmite la información que contrarresta la inflamación y ayuda en la inmunidad intestinal (Guzmán-Mejía et al., 2021). El sistema nervioso entérico (SNE) está integrado por fibras nerviosas extrínsecas (simpáticas y parasimpáticas) e intrínsecas (nervios del intestino). A través del SNE, el estrés modula la estructura y funciones del intestino (Campos-Rodríguez et al., 2013). En cuanto a la parte endocrina, el estrés promueve la liberación en el hipotálamo del factor liberador de corticotropina (CRF), el cual se dirige hacia la parte anterior de la pituitaria y provoca la liberación de la hormona adrenocorticotropica (ACTH) hacia el flujo sanguíneo; finalmente, la ACTH estimula la generación de glucocorticoides en la corteza de la médula adrenal que son liberados en la sangre (Campos-Rodríguez et al., 2013). Los glucocorticoides junto con las catecolaminas influyen en la generación de interleucinas que participan en la viabilidad y proliferación de células intestinales inmunocompetentes (Campos-Rodríguez et al., 2013).

Las consecuencias que causa el estrés dependen de la frecuencia del estímulo (agudo o crónico), duración e intensidad del estímulo, y la remanencia del efecto que queda después del evento (Guzmán-Mejía et al., 2021). Se ha observado que el estrés crónico modifica la barrera intestinal del colon, provocando un aumento en

la permeabilidad, sobrepoblación de bacterias, infiltración de neutrófilos y disminución del moco intestinal (Machorro-Rojas et al., 2019). Lo anterior se debe a que al activarse el HPA se libera CRF el cual induce la activación y la desgranulación de los mastocitos que se encuentran en el colon. Los componentes liberados por los mastocitos y algunas otras hormonas (corticosteroides) que se liberan al activarse el eje HPA provocan por vías inmunes o neuroendocrinas la regulación de la permeabilidad del colon y la producción de moco intestinal (Machorro-Rojas et al., 2019).

El modelo de estrés por inmovilización es un modelo animal que emula un estímulo crónico tanto físico como mental (Jaggi et al., 2011). Este modelo se ha aplicado abundantemente en el estudio de enfermedades neurodegenerativas, desordenes postraumáticos, y en mecanismos sobre el sistema inmune; sin embargo, el modelo de inmovilización no ha sido utilizado con frecuencia para evaluar la permeabilidad intestinal a través de marcadores no epiteliales como es el caso de la lactoferrina fecal.

2.2 Permeabilidad intestinal

El epitelio intestinal es una monocapa celular polarizada que tiene en su membrana un lado apical y otro basolateral (Molotla-Torres et al., 2023). Este epitelio está formado por células calciformes (secretoras de mucus), células Paneth (secretoras de agentes antimicrobianos), células enteroendócrinas (secretoras de neurotransmisores y neuropéptidos) y enterocitos (involucrados en la absorción de nutrientes) (Mowat & Agace, 2014). La monocapa celular está dispuesta en un arreglo lado a lado de células unidas por complejos de glicoproteínas transmembranales conocidos como proteínas de unión estrecha (Tj). Estos complejos transmembranales están compuestos de proteínas como son las ocludinas, claudinas y las moléculas de adhesión junctional (JAM) (Wells et al., 2017). Las Tj se encuentran en el extremo apical de la membrana basolateral y su función reside en regular la permeabilidad intestinal. Debajo de las Tj se encuentran estructuras laterales conocidas comúnmente como uniones adherentes, *desmosomes* y *gap junctions*, que sirven tanto para la adhesión entre las células como para la comunicación intracelular (Wells et al., 2017).

La permeabilidad intestinal es un término cuantitativo para medir la tasa del flujo de moléculas solubles a través del epitelio (Wells et al., 2017). Dicho flujo ocurre desde el lado luminal al vascular o viceversa y se da a través de dos vías paracélular y transcélular (Molotla-Torres et al., 2023). La vía de permeabilidad que se utiliza depende de las características del agente que va a cruzar como son el tamaño, la carga y la polaridad. La ruta transcelular se refiere al paso de agentes a través de las células epiteliales y es la principal vía de transporte de pequeños compuestos liposolubles (difusión pasiva), compuestos solubles en agua (transporte facilitado por permeasas), partículas (endocitosis y fagocitosis) y macromoléculas solubles (pinocitosis) (Molotla-Torres et al., 2023). La ruta paracélular se refiere al paso de solutos o moléculas a través de los espacios intercelulares del epitelio. En esta ruta las moléculas hidrofílicas menores a 600 Da son las que principalmente son transportadas, ya que moléculas de mayor tamaño o macromoléculas (antígenos, proteínas) son demasiado grandes para cruzar (Molotla-Torres et al., 2023). Durante la homeostasis el epitelio actúa como un filtro selectivo que permite la entrada de nutrientes y moléculas inocuas mientras que bloquea el paso de toxinas y sustancias nocivas al medio interno. Sin embargo, las toxinas y la inflamación intestinal pueden afectar el funcionamiento del epitelio provocando un aumento de la permeabilidad intestinal (Wang et al., 2015). Una de las formas menos invasivas de medir la permeabilidad intestinal es usar marcadores endógenos que en condiciones saludables están restringidos en el compartimento sanguíneo porque al existir una alteración en la barrera intestinal, estos marcadores se mueven al lumen intestinal donde pueden ser detectados en heces (Wang et al., 2015). La lactoferrina fecal se ha usado como un biomarcador de inflamación; no obstante, su uso para evaluar los efectos que tiene el estrés crónico por inmovilización sobre la barrera intestinal ha sido poco investigado.

2.3 Lactoferrina fecal

La lactoferrina es una glucoproteína diférrica que tiene un peso molecular entre 77-80 kDa, consta de 692 aminoácidos, es catiónica (punto isoeléctrico $pI=9.6$) y se une al hierro. Está formada por una cadena polipeptídica simple que tiene dos lóbulos globulares con un extremo carboxilo (C) y amino (N) conectados por una

hélice α . Cada lóbulo contiene dos dominios conocidos como C1, C2, N1 y N2, que forman una hoja β (Karav et al., 2017). La lactoferrina es una glucoproteína que es producida y secretada por células y se encuentra en riñones, pulmones, vesícula biliar, páncreas, intestino, hígado, próstata, saliva, lágrimas, esperma, líquido cefalorraquídeo, orina, secreciones bronquiales, flujo vaginal, líquido sinovial, sangre del cordón umbilical, plasma sanguíneo y células del sistema inmunológico (Kowalczyk et al., 2022). La lactoferrina se encuentra almacenada en los gránulos secundarios de los neutrófilos (Sienkiewicz et al., 2022). Los neutrófilos son células del sistema inmune que viajan a través de la sangre a los sitios donde existen procesos inflamatorios. Para salir del compartimento vascular, los neutrófilos tienen que atravesar el endotelio a través de un proceso en el que las moléculas de adhesión (JAM) son reorganizadas (Reglero-Real et al., 2021). La lactoferrina fecal proviene de la desgranulación de los neutrófilos circulantes infiltrados a través de la mucosa intestinal. Por esta razón se utiliza como un biomarcador de inflamación, ya que los niveles de Lf aumentan en infecciones o en disfunciones crónicas como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). Sin embargo, en algunas enfermedades relacionadas con el estrés como es el caso del síndrome del intestino irritable (IBS) no está claro como varían los niveles de Lf fecal (Zhou et al., 2014).

3. Justificación

La determinación de los niveles de lactoferrina fecal es un parámetro que sirve como un biomarcador para infecciones o enfermedades intestinales crónicas. Sin embargo, se desconoce la relación que existe entre los niveles lactoferrina fecal y el estrés por inmovilización.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto que induce el estrés por inmovilización en la homeostasis intestinal a través de los niveles del biomarcador no epitelial lactoferrina fecal en ratones BALB/c.

4.2 Objetivos específicos

- Cuantificar y comparar los niveles de lactoferrina fecal en ratones machos y hembras sometidos a estrés y en los correspondientes grupos control (sin estresar)
- Comparar la lactoferrina fecal en términos de dimorfismo sexual; es decir en ratones machos contra hembras tanto en los grupos control como en los estresados.

5. Material y Métodos

5.1 Ratones

Ratones BALB/C macho y hembra de 6 semanas de edad fueron facilitados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio. Los ratones estuvieron bajo temperatura regulada a 20°C, humedad relativa del 55% y periodos de luz-oscuridad de 12 horas. Se les dio acceso al alimento (Laboratory Rodent Diet 5001; LabDiet) y agua ad libitum. Estas condiciones controladas se mantuvieron durante dos semanas previas a la experimentación con los animales para aminorar el estrés ocasionado por la manipulación y traslado. El protocolo de estrés se aplicó a partir de las 8 semanas de edad. Los animales se manejaron de acuerdo al protocolo 176 aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la UAM-Xochimilco (CICUAL-UAM-X) y siguiendo las regulaciones federales mexicanas para el cuidado y experimentación animal (NOM-062-ZOO-1999)

5.2 Protocolo de estrés

Un total de 24 ratones (12 hembras y 12 machos) BALB/c de seis semanas de edad se separaron en 4 grupos (n=6), 2 grupos con 6 machos y 2 grupos con 6 hembras. A las ocho semanas de edad todos los ratones fueron pesados (ver equipo en Anexo 2) y posteriormente se inició con el modelo de estrés por inmovilización (Machorro-Rojas et al., 2019) a un grupo de ratones hembras (n=6) y a uno de machos (n=6), mientras que los otros dos grupos restantes (hembras y machos) estuvieron en condiciones control (sin estresar). Para el modelo de estrés, los ratones se

colocaron en posición ventral y se inmovilizaron estirando y sujetando sus extremidades con cinta adhesiva a una plataforma de poliestireno expandido (Unicel®) durante dos horas diarias. La inmovilización se realizó cubriendo con cinta Micropore® la piel de los ratones que iba a estar en contacto con la cinta adhesiva para evitar lesiones durante el desprendimiento de la misma. Primero se inmovilizaron las extremidades anteriores por la parte dorsal, luego las extremidades posteriores por la parte de las almohadillas plantares y al final se inmovilizó la cola por la parte media. Para evitar que los ratones se autolesionaran la piel de las extremidades anteriores, se utilizaron unas tiras de cartón que se colocaron sobre la cinta adhesiva y funcionaron como mordederas. Al transcurrir dos horas, los ratones fueron liberados retirando cuidadosamente las tiras de cartón, la cinta adhesiva y la cinta Micropore®. Este protocolo se aplicó por la misma persona durante 4 días consecutivos en el mismo horario (8:30 a 13:00) con el fin de reducir los efectos del ciclo circadiano sobre los niveles de ACTH y corticosterona. Al cuarto día del protocolo de estrés se recolectaron los pellets fecales de todos los ratones, posteriormente los animales se pesaron y se sacrificaron por exposición a una sobredosis de isoflurano (ver consumibles en Anexo 1) y desangrado por punción cardíaca.

5.3 Obtención de muestras biológicas

Los pellets fecales de los cuatro grupos de ratones se recolectaron en microtubos de centrífuga de 2 mL (dos tubos por cada ratón) que fueron previamente pesados. Una vez recolectados los pellets fecales en los microtubos (ver material en Anexo 3), estos fueron colocados en CO₂ en estado sólido (hielo seco) y posteriormente se pesaron. El peso de las muestras fecales se calculó mediante la diferencia del peso de los tubos antes y después de la recolección de los pellets. Finalmente, las muestras fueron congeladas a -70°C en un ultracongelador vertical.

5.4 Preparación de extractos fecales

Las muestras se trabajaron en hielo seco el mayor tiempo posible para evitar su degradación. Se agregaron 500 µL de solución amortiguadora de extracción [PBS con 0.1% de desoxicolato de sodio y acondicionado con inhibidores de proteasas

(Logsdon & Mecsas, 2006) a los microtubos con pellets para homogeneizar las muestras (ver Anexo 4 para preparación de reactivos). El contenido de los tubos se maceró con un homogenizador hasta obtener un frappe uniforme. Las muestras se descongelaron sobre hielo y después se centrifugaron a 4 °C y 4000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se recolectó en tubos limpios de 1.5 mL. Con el fin de obtener un pool de 500-1000 µL, se mezclaron 50 µL de cada muestra en un tubo limpio de 2 mL. De cada sobrenadante y del pool se apartó una alícuota de 25 µL en tubos de 0.6 mL de las cuales posteriormente se determinó la proteína total de cada muestra.

5.5 Determinación de proteína total

La determinación de proteína total se realizó usando el método Bradford con una curva estándar (ver curva estándar en Anexo 5.1) de albumina sérica bovina (ASB). Usando las alícuotas separadas durante la preparación del extracto, se realizó una dilución 1:4 en solución salina. Posteriormente, tanto los puntos de la curva estándar como cada muestra diluida (5 µl en cada pozo) se colocaron por triplicado en una placa de microtitulación de 96 pozos. Se agregaron 250 µl del reactivo de Bradford previamente preparado y se permitió la unión del colorante con las proteínas de la muestra durante 5 minutos; finalmente, se midió la absorbancia a una longitud de onda $\lambda = 595$ nm en un lector de placas de microtitulación.

5.6 Cuantificación de lactoferrina fecal

La determinación de lactoferrina fecal se realizó a través de un ELISA indirecto (Logsdon & Mecsas, 2006; Xiao, 2013) con una curva estándar (ver Anexo 5.2) de lactoferrina bovina (Lfb).

Para este ensayo nuevamente se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos. Todos los reactivos fueron utilizados a temperatura ambiente y fueron adicionados en un volumen de 100 µL en cada pozo o 200 µL para los lavados.

5.6.1 Sensibilización (coating)

Para la fase de sensibilización se agregaron por triplicado 100 µL de las siguientes muestras diluidas en buffer carbonato-bicarbonato pH 9.6.

- Extracto fecal ajustada a una concentración final de 50, 5 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de proteína total
- Lactoferrina bovina a una concentración inicial de 2 $\mu\text{g/mL}$ disuelta para la curva estándar.
- Calostro humano con 0.005 $\mu\text{g/mL}$ de proteína total como control positivo.

Las placas se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 4° C, y después se procedió a realizar los lavados (3 veces por cada placa) usando PBST, Tween20 disuelto en PBS.

5.6.2 Bloqueo (blocking)

Se adiciono ASB al 0.5% disuelta en buffer de carbonato-bicarbonato pH 9.6. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a 37°C y después se procedió a realizar los lavados (3 veces por placa) con PBST.

5.6.3 Primer anticuerpo

Como primer anticuerpo se utilizó suero policlonal de conejo contra Lf humana diluido en 0.5% ASB disuelta en PBST. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C y después se procedió a realizar los lavados (3 veces por placa) con PBST.

5.6.4 Conjugación (conjugating)

Como segundo anticuerpo se adiciono suero policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa diluido 1:5000 en 0.5% ASB disuelta en PBST. Las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C y después se procedió realizar los lavados (3 veces por placa) con PBST.

5.6.5 Sustrato (sustrating)

Para el sustrato se utilizó peróxido de H_2O_2 con OPD disueltos en amortiguador cítrico-fosfato pH 5.0. Las placas se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

5.6.6 Arresto enzimático (stopping)

Para detener la reacción enzimática se adiciono ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2.5 M

5.6.7 Lectura de placas y obtención de valores de lactoferrina

Las placas se leyeron en un lector de placas para microtitulación a una longitud de onda $\lambda=492$ nm. Para cuantificar los niveles de lactoferrina fecal en $\mu\text{g}/100$ mg pt o en ng/g de heces se utilizó la curva estándar de Lfb en donde se graficaron los valores de las concentraciones conocidas de Lfb (eje X) contra las absorbancias correspondientes (eje Y).

5.7 Análisis estadísticos

Como se recolectaron dos muestras por cada ratón se obtuvo una $n=12$ en cada grupo. Previo a cada prueba estadística se realizó un análisis de normalidad con el fin de saber si los datos eran aplicables a pruebas paramétricas o no paramétricas. Para las comparaciones de datos que se ajustaban a una distribución normal se aplicaron las pruebas: t-Student para dos grupos independientes, ANOVA de una vía para tres grupos independientes y la prueba post-hoc de Tukey para distinguir diferencias significativas entre estos grupos. Para datos que no se ajustaron a la normalidad se aplicó la prueba Kruskal-Wallis para tres grupos independientes y la prueba post-hoc de Dunn para distinguir diferencias significativas entre grupos. Para las pruebas paramétricas los datos mostrados fueron la media \pm su desviación estándar; para la prueba no paramétrica los datos fueron representados con su mediana, primer cuartil, tercer cuartil, y los valores máximo y mínimo quedaron representados con los bigotes. Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de $p<0.05$. Todos los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism v.8.0.1 software (GraphPad Software Inc, San Diego, USA).

6. Resultados y análisis

6.1 Efecto del estrés en el peso corporal de los ratones

En la Figura 1 se muestra el impacto que tuvo el estrés en el peso corporal de los ratones. Se puede observar en la Figura 1A) y 1B) como el estrés ocasiono que todos los ratones (macho y hembra) bajaran de peso significativamente ($p<0.001$ en macho y hembra) con relación a condiciones sin estrés. Lo anterior sugiere que el estrés es un factor que desgasta energéticamente a los ratones, produciendo así

una variación significativa en su peso (Guzmán-Mejía et al., 2021). En la Figura 1C) se corrobora como el estrés es un factor que redujo significativamente el peso corporal con relación a condiciones sin estrés ($p < 0.001$ macho, $p < 0.01$ hembra). Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los grupos de ratones estresados machos y hembras, por lo cual se puede decir que ambos grupos fueron afectados de la misma manera. Aunque si existió una diferencia significativa ($p < 0.05$) relacionada con el menor peso corporal en hembra que en macho de los grupos controles, esto solo nos indica que los ratones macho son fisiológicamente más pesados que las hembras.

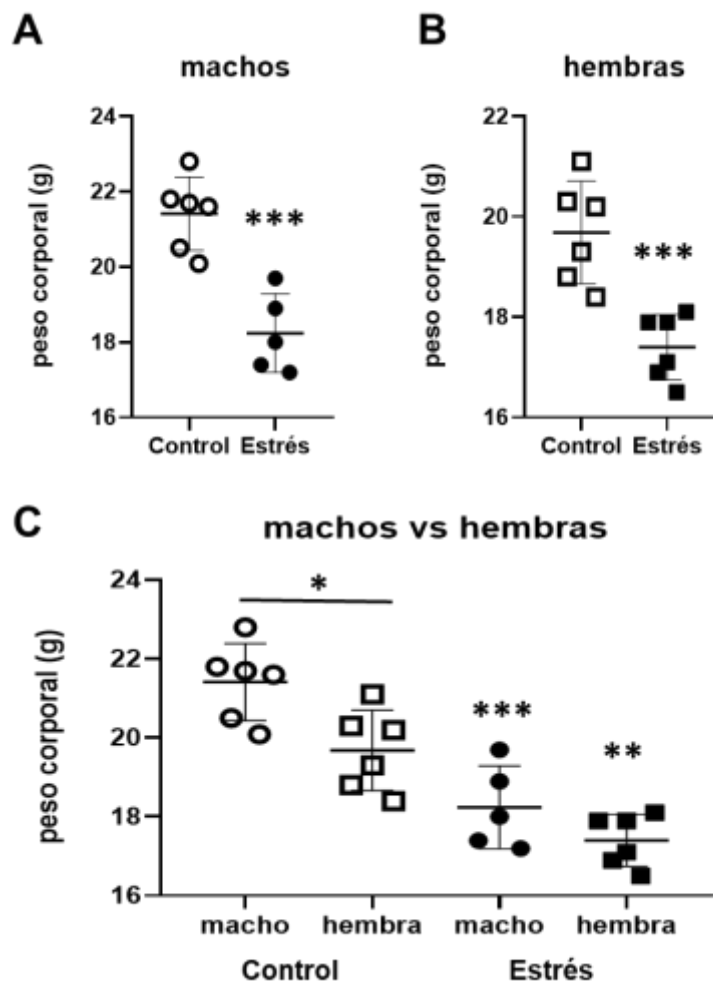


Figura 1. Peso corporal (media y desviación estándar) de ratones control y con estrés A) macho B) hembra. Análisis de t- Student. C) Comparación de peso corporal macho vs hembra de ratones control y con estrés. Análisis de ANOVA de una vía. * sobre línea $p < 0.05$ comparación de ratones control machos vs control hembras; *** $p < 0.001$ y ** $p < 0.01$ vs su respectivo control.

6.2 Efecto del estrés en los niveles de Lf fecal en ratones BALB/C

La cuantificación de lactoferrina fecal se reportó en dos distintas unidades con el fin de obtener un referente para futuros ensayos. Como se puede ver en la Figura 2 al reportarse en unidades de $\mu\text{g}/100 \text{ mg de pt}$ el estrés generó un aumento en los niveles de lactoferrina fecal, pero solo se encontraron diferencias significativas en ratones macho estresados en comparación con su grupo control ($p < 0.0001$, Figura 2A). En relación a las hembras no se observaron diferencias significativas (Figura 2B). De igual manera se puede observar de la Figura 2 que al trabajar en unidades de ng/g de heces se encontró que el estrés aumentó significativamente la concentración de lactoferrina con relación al control ($p < 0.01$, Figura 2C). Nuevamente, con relación a las hembras no se observaron diferencias significativas (Figura 2D). Estos resultados evidencian que ambas unidades detectaron diferencias significativas, no obstante el valor de p fue más bajo cuando se expresó en $\mu\text{g}/100 \text{ mg de pt}$ que en ng/g de heces en machos. Es por eso que la unidad de $\mu\text{g}/100 \text{ mg de pt}$ fue una medida más eficaz para reportar diferencias al cuantificar los niveles de lactoferrina fecal. Por otra parte, el aumento de los niveles de Lf fecal en ratones macho podría ser el resultado de una inflamación neurogénica; dicha inflamación se caracteriza por una vasodilatación arteriolar y extravasación de proteínas plasmáticas y neutrófilos causada por neuropéptidos intestinales liberados por las terminaciones periféricas de las neuronas aferentes (Feng et al., 2012). Además, estos niveles podrían deberse a alteraciones tanto en la capa mucosa como en las proteínas de unión estrecha implicadas en el mantenimiento de la permeabilidad epitelial causada por la respuesta al estrés de la hormona liberadora de corticotropina circulante (Rodiño-Janeiro et al., 2015).

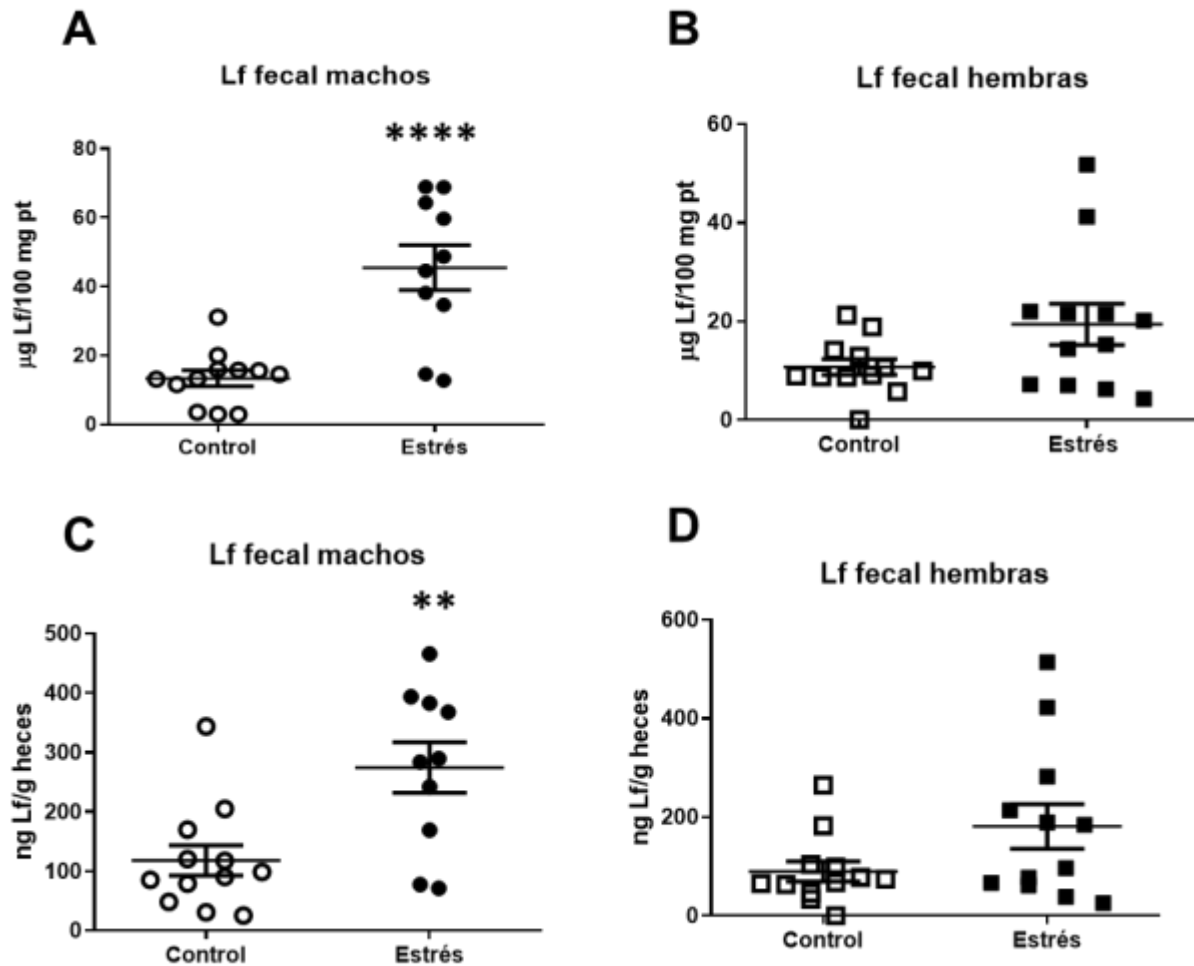


Figura 2. Concentración de Lactoferrina fecal (media y desviación estándar) en μg por cada 100 mg de proteína total (pt) A) macho y B) hembra. Concentración de proteína fecal en ng/g heces (media y desviación estándar) C) macho y D) hembra. **** $p < 0.0001$ y ** $p < 0.01$ vs su respectivo control. Todos los datos anteriores se analizaron con la prueba t- Student.

6.3 Efecto del dimorfismo sexual sobre los niveles de Lf fecal en condiciones de estrés.

En la Figura 3 se muestran los niveles de Lf fecal de ratones macho y hembra con sus respectivos grupos control y estresados. Los datos nuevamente se analizaron con dos diferentes unidades con el fin de generar un referente para futuros ensayos. Se puede observar que en unidades $\mu\text{g}/100$ mg de pt (Figura 3A) se encontraron diferencias significativas entre el grupo machos estresados vs control ($p < 0.0001$). Lo anterior reafirma el impacto que tuvo el estrés sobre la permeabilidad intestinal

en los ratones macho. Además, se pudo observar que la concentración de Lf fue significativamente ($p < 0.001$) más alta en ratones machos que en hembras de los grupos estresados (Figura 3A). Esto podría deberse al efecto protector de los estrógenos sobre la permeabilidad intestinal en los ratones hembras jóvenes que se encuentran en su etapa reproductiva (Machorro-Rojas et al., 2019). En la Figura 3B se muestra como no se obtuvieron diferencias significativas al hacer la comparación entre grupos usando unidades de ng/g de heces. Lo anterior confirma que la expresión de Lf fecal en $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ de pt es más adecuada para las mediciones de este biomarcador en heces.

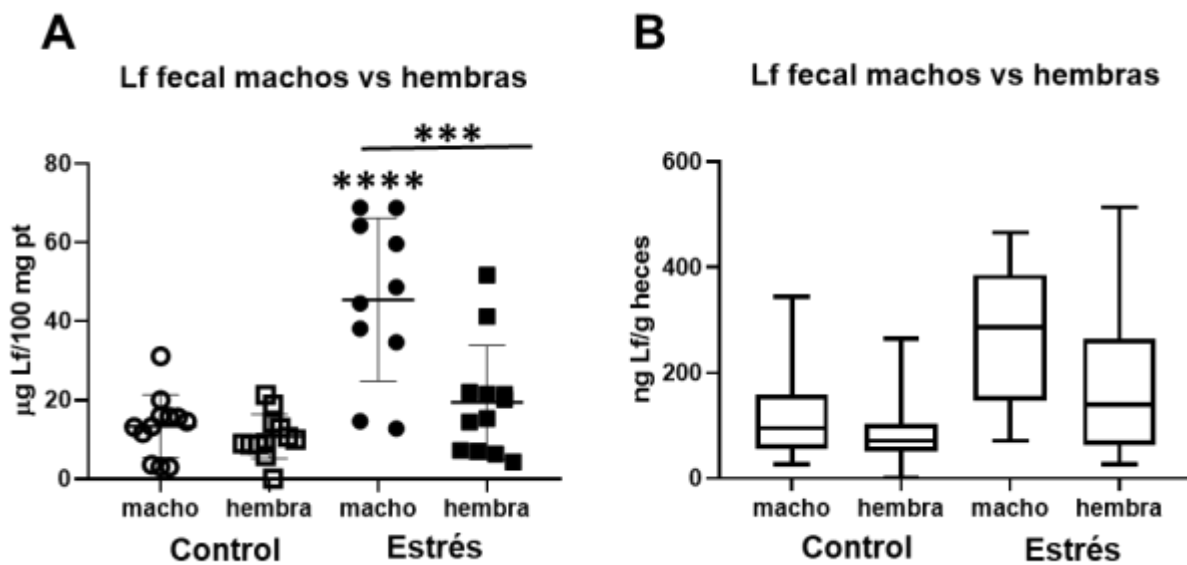


Figura 3. Concentración de Lactoferrina fecal en ratones macho vs hembra. A) μg Lf por cada 100 mg de proteína total (pt). Se representa a los datos con su media (línea media) y desviación estándar analizados con el ANOVA de una vía. B) ng de Lf por gramo de heces. Se representa a los datos con su mediana (línea media en el rectángulo), primer cuartil (línea inferior del rectángulo), tercer cuartil (línea superior del rectángulo), y los bigotes representan a los valores mínimo y máximo. Los datos se analizaron con la prueba Kruskal-Wallis. **** $p < 0.0001$ vs control; *** sobre línea $p < 0.001$ comparación estrés machos vs estrés hembras

7. Conclusión

De acuerdo a los objetivos planteados se pudo observar que el estrés aumento significativamente los niveles de Lf fecal en ratones machos; sin embargo, en ratones hembras no se observó ningún efecto. Estos resultados fueron constantes cuando se expresaron en unidades $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de pt y en ng/g de heces.

En términos de dimorfismo sexual se puede decir que el estrés incremento los niveles de Lf fecal (expresada en $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de pt) en los ratones machos al compararlos con las hembras, lo cual sugiere un efecto protector de los estrógenos sobre la permeabilidad intestinal en ratones hembras. Por último, el trabajar con unidades de $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de pt mostro ser más adecuada para la cuantificación de lactoferrina en heces que cuando se utilizaron las unidades de ng/g de heces.

8. Bibliografía

- Campos-Rodríguez, R., Godínez-Victoria, M., Abarca-Rojano, E., Pacheco-Yépez, J., Reyna-Garfias, H., Barbosa-Cabrera, R. E., & Drago-Serrano, M. E. (2013). Stress modulates intestinal secretory immunoglobulin A. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7(DEC), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00086>
- Feng, B., La, J. H., Schwartz, E. S., & Gebhart, G. F. (2012). Neural and neuro-immune mechanisms of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(10). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00542.2011>
- Guzmán-Mejía, F., Godínez-Victoria, M., Vega-Bautista, A., Pacheco-Yépez, J., & Drago-Serrano, M. E. (2021). Molecular Sciences Intestinal Homeostasis under Stress Siege. *J. Mol. Sci*, 22.
- Jaggi, A. S., Bhatia, N., Kumar, N., Singh, N., Anand, P., & Dhawan, R. (2011). A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurological Sciences*, 32(6), 993–1005. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0770-6>

- Karav, S., German, J. B., Rouquié, C., Le Parc, A., & Barile, D. (2017). Studying lactoferrin N-glycosylation. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms18040870>
- Kowalczyk, P., Kaczyńska, K., Kleczkowska, P., Bukowska-ośko, I., Kramkowski, K., & Sulejczak, D. (2022). The Lactoferrin Phenomenon—A Miracle Molecule. *Molecules*, *27*(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules27092941>
- Logsdon, L. K., & Mecsas, J. (2006). A non-invasive quantitative assay to measure murine intestinal inflammation using the neutrophil marker lactoferrin. *Journal of Immunological Methods*, *313*(1–2), 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.05.001>
- Machorro-Rojas, N., Sainz-Espuñes, T., Godínez-Victoria, M., Castañeda-Sánchez, J. I., Campos-Rodríguez, R., Pacheco-Yepez, J., & Drago-Serrano, M. E. (2019). Impact of chronic immobilization stress on parameters of colonic homeostasis in BALB/c mice. *Molecular Medicine Reports*, *20*(3), 2083–2090. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10437>
- Molotla-Torres, D. E., Guzmán-Mejía, F., Godínez-Victoria, M., & Drago-Serrano, M. E. (2023). Role of Stress on Driving the Intestinal Paracellular Permeability. *Current Issues in Molecular Biology*, *45*(11), 9284–9305. <https://doi.org/10.3390/cimb45110581>
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, *14*(10), 667–685. <https://doi.org/10.1038/nri3738>
- Reglero-Real, N., Pérez-Gutiérrez, L., Yoshimura, A., Rolas, L., Garrido-Mesa, J., Barkaway, A., Pickworth, C., Saleeb, R. S., Gonzalez-Nuñez, M., Austin-Williams, S. N., Cooper, D., Vázquez-Martínez, L., Fu, T., De Rossi, G., Golding, M., Voisin, M. B., Boulanger, C. M., Kubota, Y., Muller, W. A., ... Nourshargh, S. (2021). Autophagy modulates endothelial junctions to restrain neutrophil diapedesis during inflammation. *Immunity*, *54*(9), 1989–2004.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.012>
- Rodiño-Janeiro, B. K., Alonso-Cotoner, C., Pigrau, M., Lobo, B., Vicario, M., & Santos, J. (2015). Role of corticotropin-releasing factor in gastrointestinal

- permeability. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 21(1), 33–50.
<https://doi.org/10.5056/jnm14084>
- Sankaran-Walters, S., Macal, M., Grishina, I., Nagy, L., Goulart, L., Coolidge, K., Li, J., Fenton, A., Williams, T., Miller, M. K., Flamm, J., Prindiville, T., George, M., & Dandekar, S. (2013). Sex differences matter in the gut: Effect on mucosal immune activation and inflammation. *Biology of Sex Differences*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-4-10>
- Sienkiewicz, M., Jaśkiewicz, A., Tarasiuk, A., & Fichna, J. (2022). Lactoferrin: an overview of its main functions, immunomodulatory and antimicrobial role, and clinical significance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(22), 6016–6033. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1895063>
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.12.015>
- Wells, J. M., Brummer, R. J., Derrien, M., MacDonald, T. T., Troost, F., Cani, P. D., Theodorou, V., Dekker, J., Méheust, A., De Vos, W. M., Mercenier, A., Nauta, A., & Garcia-Rodenas, C. L. (2017). Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 312(3), G171–G193.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00048.2015>
- Xiao, Y. (2013). Enzyme-Linked. *J Immunol Methods*, 384, 148–151.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.06.009>.Enzyme-Linked
- Zhou, X. lu, Xu, W., Tang, X. xiao, Luo, L. sheng, Tu, J. feng, Zhang, C. jing, Xu, X., Wu, Q. dong, & Pan, W. sheng. (2014). Fecal lactoferrin in discriminating inflammatory bowel disease from Irritable bowel syndrome: A diagnostic meta-analysis. *BMC Gastroenterology*, 14(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1186/1471-230X-14-121>

9. Anexos

Anexo 1. Consumibles

- Isoflurano [Sofloran ® Laboratorios Pisa, Guadalajara Jalisco, México]
- Bovine lactoferrin [NutriScience Innovations Trumbull Connecticut USA]
- Albúmina sérica bovina [A2934 Sigma St. Louis MO, USA]-Bloqueo
- Albúmina sérica bovina [A1933 Sigma]-Bradford
- Primer anticuerpo: suero policlonal de conejo anti-lactoferrina [L3262 Sigma]
- Segundo anticuerpo: suero policlonal de cabra anti-IgG de conejo peroxidado [ab 97080 Cambridge MA, USA]
- Inhibidor de proteasas Complete mini™ [Cat 11836153001 Roche Diagnostics Mannheim Germany]
- Ortofenilendiamina (OPD) (C₆H₈N₂) [P9029 Sigma]
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) densidad 1.11 g/mL pureza 30% w/v [H1009]
- Desoxicolato sódico [D 5670 Sigma-Aldrich]
- Tween®20 [P9416 Sigma-Aldrich]
- Cloruro de sodio (NaCl) [S9888 Sigma Chemicals]
- Cloruro de potasio (KCl) [9541 Sigma]
- Fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄) [71640 Sigma]
- Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) [P9791 Sigma].
- Carbonato de sodio (Na₂CO₃) [71345 Sigma]
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) [S7277 Sigma]
- Ácido cítrico (C₆H₈O₇) [27487 Sigma];
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) [320501 Sigma-Aldrich]

Anexo 2. Equipo

- Balanza (ratones) modelo
- Balanza Analítica CESLAB Mod. CE-FA2204N, Jalisco México
- Ultracongelador vertical Revco™
- Micropipeta 100-1000 µL [4500 120 Finnpipette, Vantaa, Finland]
- Micropipeta 20-200 µL [40270290 Finnpipette]

- Agitador Scientific Industries Genie Mod. Roto-shake 1-87110, New York, USA.
- Balanza analítica Ohaus Pioneer PA214C, New Jersey, USA.
- Lector de ELISA EPOCH 2, Biotek Instruments, Vermont, USA.
- Microcentrífuga Corning LSE 6765-HS, New York, USA.
- Parrilla Thermolyne Mod. SP46925, Iowa, USA.
- Potenciómetro Beckman Φ 50, California, USA. Electrodo Sensorex S450C, Illinois, USA.
- Vortex Scientific Industries Genie Mod. G560, New York, USA.
- Incubadora Shel Lab, MOD. no. EI2, Oregon U.S.A.

Anexo 3. Material

- Puntas amarillas 1-200 μ L [T-200-Y, AXYGEN Corning Life Sciences, Tewksbury Massachusetts, USA]
- Puntas azules 100-1000 μ L [T-1000-B, AXYGEN]
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL [MCT-150-C, AXYGEN]
- Tubos de microcentrífuga de 2.0 mL [MCT-200-C, AXYGEN]
- Placas de microtitulación de 96 pozos [3590 Costar Corning, New York, USA]

Anexo 4. Preparación de Reactivos

Anexo 4.1 Solución amortiguadora de extracción para heces

Mezclar

- PBS 1X 50 mL
- Desoxicolato sódico 0.05 g
- Inhibidor de proteasas*

* Adicionar 1 tableta en 50 mL de PBS ó en 25 mL en caso de que la muestra tenga alta actividad enzimática inmediatamente antes de su uso y mantener en hielo. Desechar el remanente después de usar

Anexo 4.2 Preparación del reactivo de Bradford

Disolver

- Colorante Azul de Coomassie G250 10 mg
- Etanol absoluto (de C₂H₅OH) 5 mL

posteriormente adicionar

- Ácido fosfórico (H₃PO₄) al 85% 10 mL

Finalmente, aforar a 100 mL con agua destilada

Anexo 4.3 Solución amortiguadora de carbonatos

- Solución A: 0.1M de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 4.2 g disueltos en un volumen final de 50 mL con agua destilada.
- Solución B: 0.1 M de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 5.3 g disueltos en un volumen final de 50 mL con agua destilada.

Mezclar solución A 11.32 mL + solución B 4.55 mL, ajustar el pH a 9.6.

Anexo 4.4 Solución amortiguadora salina fosfato (PBS)

Mezclar

- 8 g de NaCl + 0.2 g de KCl + 1.44 g de Na₂HPO₄ + 0.24 g de KH₂PO₄

Posteriormente, aforar a 100 mL con agua destilada.

Anexo 4.5 Solución amortiguadora salina fosfato (PBS) con Tween 20

Mezclar

- PBS 100 mL
- Tween 20 0.05 mL

Anexo 4.6 Solución amortiguadora cítrato-fosfato

- Ácido cítrico 0.1 M: 0.96 g disueltos en un volumen final de 50 mL con agua destilada.
- Fosfato disódico anhidro 0.2 M: 1.42 g disueltos en un volumen final de 50 mL con agua destilada.

Mezclar. 0.1M ácido cítrico 24.3 mL + 0.2 M fosfato disódico 25.7 mL, y ajustar pH 5.0

Anexo 4.7 Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2.5 M

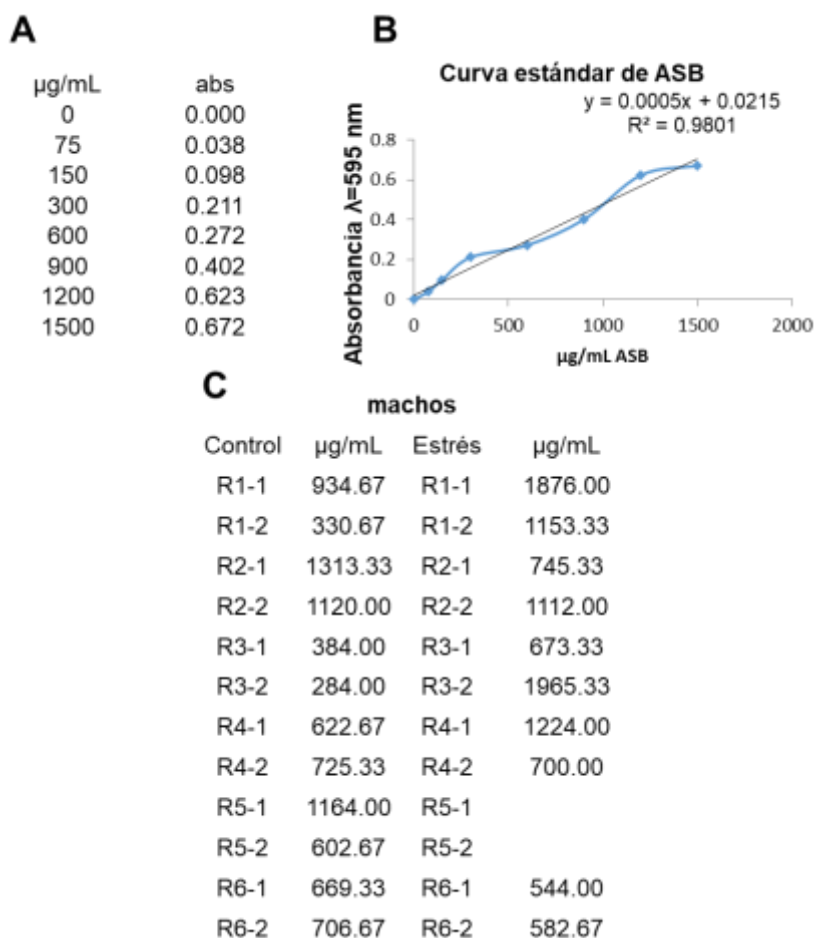
Aforar a 100 mL

- 14 mL de H₂SO₄ (pureza del 95%, peso específico 1.84 g/mL) con agua destilada

Anexo 5. Curvas estándar

Anexo 5.1 Curva estándar de ASB para cuantificación de proteína total mediante el método Bradford.

Se muestran las concentraciones de ASB y sus respectivas absorbancias, la curva que resulto de graficar las concentraciones vs la absorbancia, y la proteína total que se calculó de cada muestra de ratones machos.



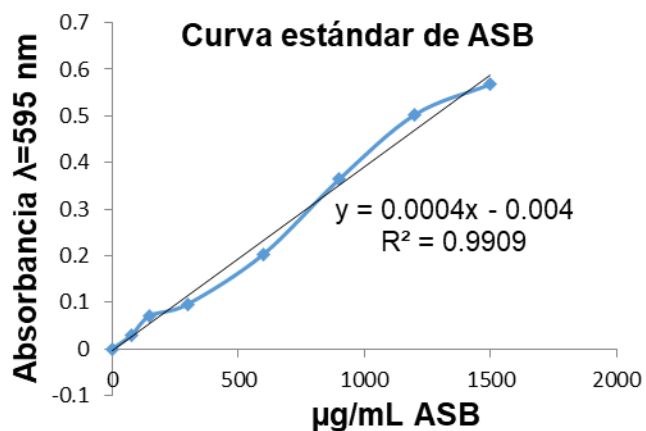
Valores de absorbancia y curva estándar de proteína total en heces de ratones machos por el método de Bradford. A) Valores de absorbancia de la curva estándar de ASB. B) Curva estándar con la ecuación de la línea recta y valor de R². C) Proteína total de extractos fecales de ratones control y estresados.

Se muestran las concentraciones de ASB y sus respectivas absorbancias, la curva que resulto de graficar las concentraciones vs la absorbancia, y la proteína total que se calculó de cada muestra de ratones hembras.

A

µg/mL	abs
0	0.000
75	0.029
150	0.071
300	0.096
600	0.203
900	0.364
1200	0.502
1500	0.568

B



C

hembras

Control	µg/mL	Estrés	µg/mL
R1-1	360.00	R1-1	1060.00
R1-2	450.00	R1-2	1160.00
R2-1	930.00	R2-1	650.00
R2-2	1680.00	R2-2	890.00
R3-1	680.00	R3-1	850.00
R3-2	650.00	R3-2	470.00
R4-1	2490.00	R4-1	3580.00
R4-2	3060.00	R4-2	2230.00
R5-1	1590.00	R5-1	1120.00
R5-2	2150.00	R5-2	1000.00
R6-1	1240.00	R6-1	1310.00
R6-2	890.00	R6-2	870.00

Valores de absorbancia y curva estándar de proteína total en heces de ratones hembras por el método de Bradford. A) Valores de absorbancia de la curva estándar de ASB. B) Curva estándar con la ecuación de la línea recta y valor de R^2 . C) Proteína total de extractos fecales de ratones control y estresados.

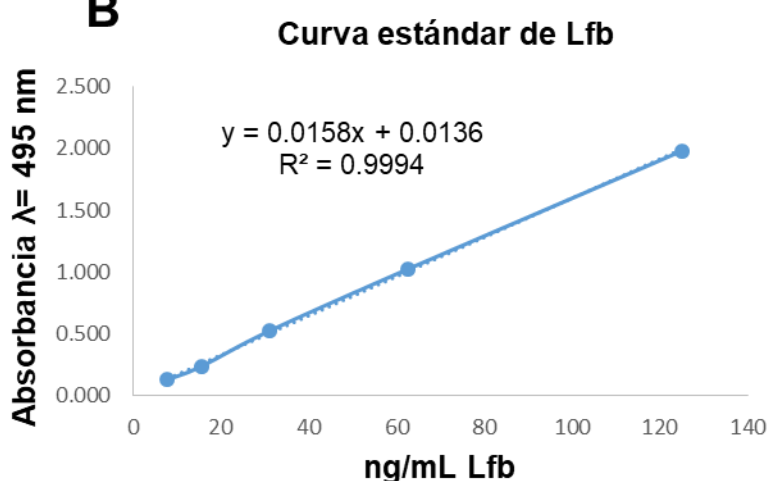
Anexo 5.2 Curva estándar de Lfb para cuantificación de Lf fecal mediante un ELISA indirecto.

Se muestran las concentraciones de Lfb y sus respectivas absorbancias, la curva que resulto de graficar las concentraciones vs la absorbancia, y la concentración de Lf fecal que se calculó de cada muestra de ratones machos.

A

ng/mL	abs
125	1.980
62.5	1.023
31.25	0.528
15.625	0.240
7.8125	0.130

B



C

machos

	ng/g	$\mu\text{g}/100 \text{ mg pt}$		ng/g	$\mu\text{g}/100 \text{ mg pt}$
Control			Estrés		
R1-1	344.03	31.17	R1-1	283.80	48.70
R1-2	170.24	13.28	R1-2	383.02	64.27
R2-1	117.78	15.64	R2-1	169.33	34.71
R2-2	120.55	15.77	R2-2	393.89	59.71
R3-1	48.69	3.57	R3-1	289.91	38.15
R3-2	31.22	2.94	R3-2	368.28	68.87
R4-1	99.14	13.15	R4-1	465.88	68.86
R4-2	25.59	3.02	R4-2	242.14	44.55
R5-1	85.45	14.56	R5-1		
R5-2	90.56	11.63	R5-2		
R6-1	205.17	20.02	R6-1	77.58	12.74
R6-2	79.31	15.97	R6-2	71.47	14.64

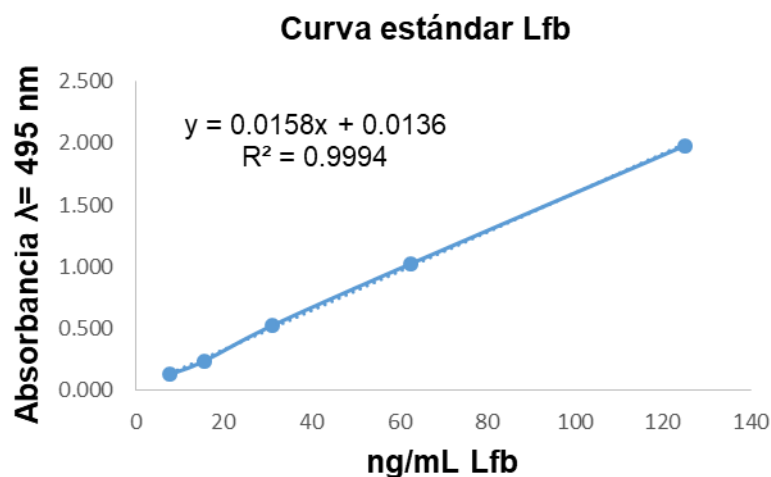
Valores de concentración de Lf en heces de ratones machos control y con estrés A) Valores de absorbancia y B) curva estándar de Lf fecal con la ecuación de la línea recta y valor de R^2 . C) concentración de Lf fecal en ng/g y en $\mu\text{g}/100 \text{ mg pt}$

Se muestran las concentraciones de Lfb y sus respectivas absorbancias, la curva que resulto de graficar las concentraciones vs la absorbancia, y la concentración de Lf fecal que se calculó de cada muestra de ratones hembras.

A

ng/mL	abs
125	1.980
62.5	1.023
31.25	0.528
15.625	0.240
7.8125	0.130

B



C

hembras

Control	ng/g	$\mu\text{g}/100$ mg pt	Estrés	ng/g	$\mu\text{g}/100$ mg pt
R1-1	104.00	8.99	R1-1	513.70	51.78
R1-2	182.03	18.86	R1-2	422.46	41.23
R2-1	99.16	9.96	R2-1	184.36	21.57
R2-2	77.83	8.73	R2-2	213.57	21.53
R3-1	0.36	0.05	R3-1	282.48	22.03
R3-2	264.74	21.28	R3-2	189.20	15.32
R4-1	63.33	10.65	R4-1	77.35	14.42
R4-2	65.19	12.97	R4-2	96.54	20.18
R5-1	46.02	8.75	R5-1	66.94	7.20
R5-2	74.40	14.20	R5-2	61.72	6.30
R6-1	67.28	9.07	R6-1	38.24	7.01
R6-2	33.72	5.80	R6-2	25.82	4.29

Valores de concentración de Lf en heces de ratones hembras control y con estrés A) Valores de absorbancia y B) curva estándar de Lf fecal con la ecuación de la línea recta y valor de R^2 . C) concentración de Lf fecal en ng/g y en $\mu\text{g}/100$ mg pt