



**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

Lic. Química Farmacéutica Biológica

Reporte de Servicio Social

**Título del proyecto: Estimación del efecto del estrés por
restricción de movimiento sobre los mucopolisacáridos
intestinales en ratón BALB/c**

Nombre: Cecilia Gabriela Bravo Pérez

Matricula: 2172032130

Asesoras:

Maria Elisa Drago Serrano - Fabiola Guzmán Mejía

Fecha inicio: 15 de agosto 2022 Fecha fin: 15 de febrero 2023

Índice

1. RESUMEN.....	4
2. ABSTRACT.....	5
3. INTRODUCCIÓN.....	6
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 Estrés y vías neuroendocrinas.....	6
4.2 <i>Mucus</i> aspectos generales.....	7
4.3 Mucinas.....	8
4.4 Mucopolisacáridos.....	8
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	9
6. OBJETIVO GENERAL.....	10
6.1 Objetivos Específicos.....	10
7. MATERIALES y MÉTODOS.....	11
7.1 Animales.....	11
7.2 Procedimiento de estrés por inmovilización.....	11
7.3 Modelo experimental.....	12
7.4 Recolección y procesamiento de muestras.....	12
7.5 Curva estándar de condroitin-4- sulfato.....	13
7.6 Extracción de mucopolisacáridos en los segmentos intestinales.....	14
7.7 Cuantificación de mucopolisacáridos en muestras.....	15
7.8 Análisis estadístico.....	16
8. ACTIVIDADES REALIZADAS.....	16
9. METAS ALCANZADAS.....	16
10. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	17
10.1 Curva estándar de condroitin 4-sulfato.....	17
10.2 Cuantificación de mucopolisacáridos en colon.....	18
10.2 Resumen de datos.....	19
Conclusión.....	20
11. RECOMENDACIONES.....	20
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
13. ANEXOS.....	22
13.1 Preparación de reactivos.....	22
13.1.1 Preparación de acetato sódico 0.05 M pH 5.8.....	22
13.1.2 Preparación de sacarosa 0.16 M en acetato sódico 0.05M pH 5.8.....	22
13.1.3 Preparación de colorante azul alcian 0.1%.....	22

13.1.4 Preparación de la sacarosa 0.25 M.....	22
13.1.5 Preparación de condroitin-4-sulfato	22
13.1.6 Preparación de etanol 70% v/v	22
13.1.7 Preparación de docusato sódico al 30% p/v.....	23
13.2 Equipo	23

1. RESUMEN

Introducción. El *mucus* que recubre el colon es una barrera física con un papel relevante antiinflamatorio, sin embargo, puede ser afectada por el estrés **Justificación.** Este protocolo podría ser un referente experimental para evaluar productos farmacéuticos con potencial terapéutico en enfermedades relacionadas con el estrés en donde el mucus intestinal se vea comprometido **Objetivo.** Estimar el efecto del estrés por restricción de movimiento sobre la concentración de mucopolisacáridos en colon **Material y Métodos.** Un lote de ratones BALB /c machos de 8 semanas de vida, se dividió en un grupo estresado n=6 y un grupo control n=6. Los ratones del grupo estresado por restricción de movimiento fueron introducidos en tubos cónicos de 50 mL horadados en periodos de 30 a 120 minutos, en horarios diferentes, por 8, 16 y 22 días consecutivos. Al terminar el periodo de estrés los ratones fueron sacrificados con isoflurano, se diseco el colon y se cortó longitudinalmente para almacenarlo en solución salina estéril. La muestra se tiño con azul alcian, se lavó con sacarosa y se extrajo el colorante con docusato al 70%. Se recolecto el sobrenadante de las muestras y se analizaron con un método espectrofotométrico por triplicado. La absorbancia de la muestra se leyó a una longitud de onda (λ) de 620 nm y la concentración de mucopolisacáridos, se estimó con base a la curva estándar de condroitin-4-sulfato y se expresó en $\mu\text{g} / \text{g}$ de tejido. Los datos se analizaron con la prueba de Mann Whitney y las diferencias se consideraron significativos a valor de $p < 0.05$ **Resultados.** En comparación con el grupo control, se observó una disminución estadísticamente significativa ($p = 0.0056$) de mucopolisacáridos solo después de 16 días de estrés **Conclusión.** Se logró cuantificar la concentración de mucopolisacáridos en el colon, aunque es necesario pulir el modelo de restricción de movimiento a fin lograr su reproducibilidad.

Palabras clave: estrés, mucopolisacaridos, *mucus*, colón

2. ABSTRACT

Introduction. The *mucus* that covers the colon is a physical barrier with a relevant anti-inflammatory role, however, it can be affected by stress **Justification.** This protocol may be an experimental reference to evaluate pharmaceutical products with therapeutic potential versus stress on the concentration of mucopolysaccharides in colon **Objective.** To estimate the effect of restraint stress on the concentration of colonic mucopolysaccharides **Material and Methods.** A batch of twelve 8-week-old male BALB/c mice were divided into a stressed group n=6 and a control group n=6. Mice from the stressed group were placed within 50 mL conical tubes with holes for 30 to 120 minutes, during 8, 16 and 22 consecutive days. At the end of the stress period, the mice were sacrificed with isoflurane, the colon was dissected and cut longitudinally. The sample was stained with alcian blue, washed with sucrose, and the dye was extracted with 70% docusate. The supernatant of the samples was collected and analyzed by triplicate. The absorbance of the sample was read at a wavelength (λ) of 620 nm and the concentration of mucopolysaccharides was estimated based on a standard curve of chondroitin 4-sulfate and expressed in μg of alcian blue/g of tissue. Data were analyzed with the Mann Whitney test and the differences were considered significant at a value of $p < 0.05$ **Results.** Compared to the control group, a statistically significant ($O = 0.0056$) decrease in mucopolysaccharides was observed only in the 16-day trial **Conclusion.** It was possible to quantify the concentration of mucopolysaccharides in the colon, although it is necessary to refine the movement restriction model in order to achieve its reproducibility.

Keywords: stress, mucopolysaccharides, *mucus*, colon

3. INTRODUCCIÓN

El *mucus* intestinal, conformado principalmente de mucinas y agua, es la primera barrera física con un papel relevante anti-inflamatorio que impide el contacto directo con la microbiota y del contenido luminal con la superficie de la monocapa del epitelio intestinal y eventualmente con las capas más internas (Viaggiano et al., 2015). El mucus intestinal puede ser alterado por diferentes enfermedades y por la exposición recurrente a estímulos estresores.

El estrés se define como la respuesta de supervivencia de un organismo vivo. El estrés conlleva la percepción en el cerebro de un evento considerado una señal de alarma que duce una respuesta neuroendocrina (Bathia et al., 2011). El estrés puede afectar los componentes del epitelio intestinal, como es el caso del *mucus*.

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

Por lo anterior este protocolo presenta los datos sobre el efecto del estrés por inmovilización sobre la concentración de mucopolisacáridos en el colon.

4. ANTECEDENTES

4.1 Estrés y vías neuroendocrinas

El estrés es la captación sensorial y cognitiva del estímulo ambiental (estresor), percibida como señal de alarma por el sistema nervioso central (percepción) que desencadena a su vez, un efecto fisiológico de lucha y huida en el organismo (respuesta) (Brzozowski et al., 2016).

El estrés activa diversas vías neuroendocrinas como el eje hipotalámico-pituitaria-adrenal (HPA) (Viggiano et al., 2015). El estrés induce la activación del hipotálamo, el cual secreta la hormona liberadora de corticotropina, mejor conocida por sus siglas en inglés como CRF

(*Corticotropin Releasing Factor*) (Dedic et al., 2018). La CRF activa a la glándula pituitaria, dando así, la generación de la hormona adenocorticotropica, conocida también por sus siglas en inglés como ACTH (*adenocorticotropic hormone*). La ACTH va a circular a través de la sangre y al llegar a la corteza de la glándula adrenal, induce la liberación de glucocorticoides como son el cortisol y corticosterona. Asimismo, existe otra vía por la cual el estrés induce en el cerebro la activación de los nervios del sistema simpático, que inervan la médula de la corteza adrenal, segregando catecolaminas tales como la adrenalina y noradrenalina (Jankord, R., & Herman, J. P., 2008). Dicho esto, podemos saber que la interacción entre el cerebro y el tracto gastrointestinal se produce a través de vías neuroendocrinas del HPA, sistema nervioso simpático, sistema nervioso parasimpático y el sistema nervioso intestinal. En conjunto, todos estos componentes forman parte del eje cerebro- intestino. Cabe resaltar, que a través del eje cerebro-intestino, se modulan integrantes de la función de la barrera intestinal como el *mucus* intestinal (Brzozowski et al., 2016).

4.2 *Mucus* aspectos generales

El tracto gastrointestinal posee una gran superficie epitelial que está en contacto constante a agentes fisicoquímicos y biológicos que pueden llegar a causar daño tisular (Pelaseyed, T., & Hansson, G. C., 2020). El epitelio es una barrera anatómica que determina la función de barrera intestinal que hace referencia a los eventos que permiten el transporte de moléculas inocuas y a su vez, impiden la entrada de agentes patógenos y nocivos (Pelaseyed, T., & Hansson, G. C., 2020). El *mucus* consta de una capa en el intestino delgado fácilmente extraíble y en el colon forma una capa doble. En el intestino delgado, el *mucus* es penetrable, pero las bacterias se mantienen alejadas del epitelio por mediadores antibacterianos. Por otra parte, en el colon, la capa interna de *mucus* es impenetrable a las bacterias, mientras que la capa externa del *mucus* se expande y sirve de hábitat para las bacterias (Johansson, M. E., & Hansson, G. C., 2016).

El *mucus* sirve como una primera línea de defensa innata y está formado por mucopolisacáridos. Los mucopolisacáridos son producidos por las células caliciformes (secretoras del *mucus*), que forman parte de la monocapa del epitelio intestinal. La distribución de los mucopolisacáridos es diferente en el duodeno y en el colon (Johansson, M. E., & Hansson, G. C., 2016). El tracto gastrointestinal se caracteriza por su

regionalización estructural, funcional, neuroendocrina e inmunitaria (Mowat, A.M. & Agace, W.W, 2014). Esta es la razón por la cual, los efectos del estrés van a variar dependiendo de la región proximal, distal y en el colon (Grenham et al., 2011). El mucus consiste en mucinas y mucopolisacáridos como se describen a continuación.

4.3 Mucinas

El estrés puede afectar a la integridad funcional y estructural del *mucus*. Los principales componentes del *mucus* son las glicoproteínas llamadas mucinas (Johansson, M. E., & Hansson, G. C., 2016). Las mucinas son glicoproteínas que tienen un contenido de O-glicanos de más del 50% de su masa. Hay dos tipos principales de mucinas: las mucinas transmembranales y las mucinas formadoras de gel. Los elementos clave de las mucinas formadoras de gel son los dominios que están ampliamente decorados por O-glicanos, altamente higroscópicos y dan al *mucus* propiedades de forma de gel. Las mucinas son resistentes a las proteasas endógenas y a sus dominios centrales de mucina, están protegidos por glucanos, los extremos N-terminales y C-terminales están estabilizados con numerosos enlaces cruzados entre los aminoácidos de cisteína; es por ello que las enzimas digestivas no pueden digerir otros glucanos que no sean almidón y algunos disacáridos, por lo que deja intactas a las mucinas. De acuerdo a sus propiedades estructurales, la función de las mucinas es la protección, así como lubricar el tracto gastrointestinal (Johansson, et al., 2013). Las mucinas pueden contener mucopolisacáridos como se escribe a continuación.

4.4 Mucopolisacáridos

Los mucopolisacáridos originalmente se caracterizaron en las membranas mucosas y los exudados de las mucosas. Los mucopolisacáridos se denominan también glicosaminoglicanos (GAGs) que son polisacáridos lineales cuyos bloques de construcción de disacáridos consisten en un aminoazúcar (D-glucosamina que está N-acetilada o N-sulfatada o N-acetil-D-galactosamina) y ácido urónico (ácido D-glucurónico o L-ácido idurónico) o galactosa. Los GAGs se diferencian entre sí según el tipo de unidad monomérica, la posición de los grupos sulfato y el grado de sulfatación. Según estas características, los GAG se pueden clasificar en diferentes clases (Figura 1): sulfato

heparina, sulfato de heparán (HS), condroitin sulfato (CS), dermatán sulfato (DS), hialuronano (HA) y keratánsulfato (KS) (Morla S, 2019). Algunos colorantes como el azul alcian se unen a mucopolisacáridos o a los polisacáridos que forman parte de la estructura de las mucinas, por tal motivo la tinción con azul alcian ayuda a detectar estas estructuras en el *mucus* intestinal.

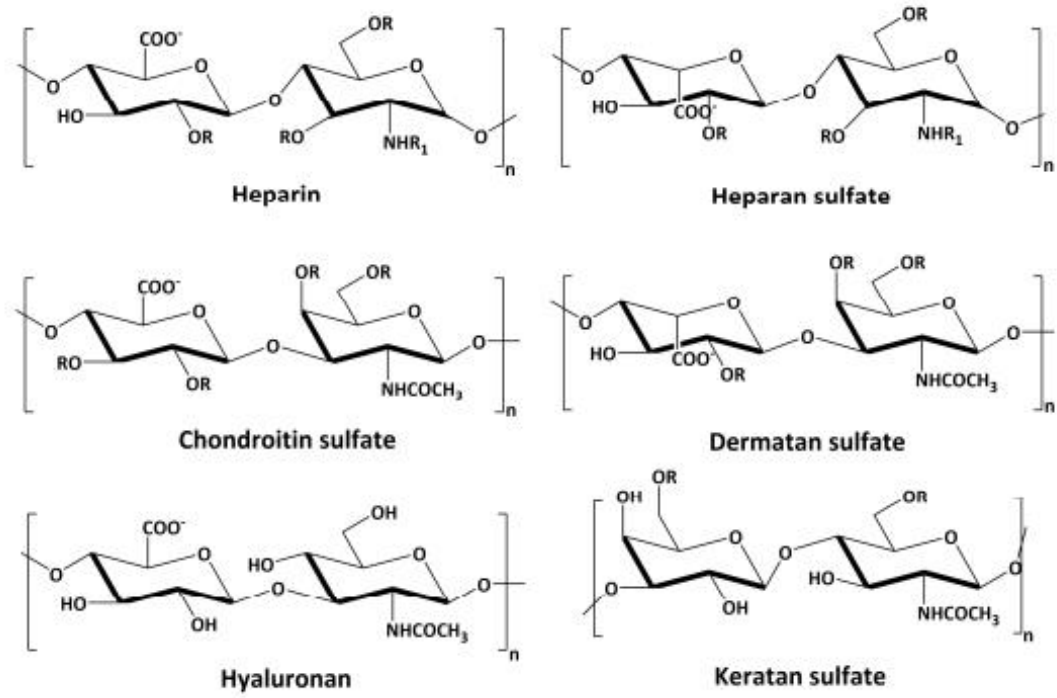


Figura 1 Estructura de los GAGs (Morla S, 2019).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

No se conoce el efecto del estrés por restricción de movimiento sobre la concentración de mucopolisacáridos intestinales. La justificación de este protocolo radica en que podría ser un referente experimental para evaluar, en un futuro, los efectos moléculas con potencial terapéutico sobre la concentración de mucopolisacáridos en condiciones de estrés como ocurre en algunos padecimientos humanos como colitis ulcerativa, gastritis y el síndrome de intestino irritable.

6. OBJETIVO GENERAL

Estimar el efecto del estrés por restricción de movimiento sobre la concentración de mucopolisacáridos intestinales en ratones BALB/c.

6.1 Objetivos Específicos

- Implementar el modelo de estrés por restricción de movimiento en ratones adiferentes tiempos 8, 16 y 22 días.
- Evaluar la concentración de mucopolisacáridos en colón en ratones estresados.

7. MATERIALES y MÉTODOS

7.1 Animales

Se utilizaron ratones macho BALB/c de 6 semanas de edad proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio de la UAM Xochimilco (UPEAL-UAM-X, protocolo No. 229 aprobado el 30 de junio 2022 con 5 años de vigencia DCBS.CICUAL.005.22). Los ratones se dejaron aclimatar a temperatura de 20°C, una humedad relativa de 55% y ciclo de luz/oscuridad 12/12 h con luz encendida de 7:00 am a 7:00 pm. Los ratones fueron provistos con alimento comercial (Laboratory Rodent Diet 5001, LabDiet Saint Louis, MO, USA), y agua a libre demanda durante el periodo de adaptación (1 semana) antes de los ensayos, los cuales se realizaron durante la octava semana de vida.

7.2 Procedimiento de estrés por inmovilización

1. Se utilizaron tubos cónicos de 50 mL con perforaciones para que los ratones tuvieran puntos de ventilación, se hizo una perforación en la tapa de rosca del tubo a fin de poder sacar la cola del ratón durante el proceso de inmovilización.
2. Se hicieron unos tapones de espuma de 5 cm de largo para que, al meterlos en los tubos, en la parte trasera quedaran inmovilizados.
3. El ratón se introdujo orientado hacia el fondo del tubo y se colocó el tapón de espuma en la parte trasera y a través del orificio de la tapa de rosca se sacó la cola del ratón a fin de asegurar la inmovilización. Realizado lo anterior se cerró el tubo con la tapa de rosca.
4. Una vez inmovilizados en los tubos, los ratones se colocaron en una caja con encamado para evitar que los tubos se rodaran. Además, se hicieron separaciones con cartón dentro de la caja para evitar que los ratones tuvieran contacto visual.

5. Durante el tiempo de estrés, los ratones estuvieron en constante vigilancia para observar que estos estuvieran respirando y comportamiento, además era importante ver que no se rodaran los tubos.

7.3 Modelo experimental

1. Los ratones se dividieron en un grupo control (n=6) y un grupo estresado (n=6).
2. El modelo de estrés se aplicó diariamente durante 8 días de la siguiente manera como se muestra en la **Tabla 1**.

Día	Tiempo
Primer día	30 minutos
Segundo día	120 minutos
Tercer día	60 minutos
Cuarto día	90 minutos
Quinto día	30 minutos
Sexto día	120 minutos
Séptimo día	60 minutos
Octavo día	30 minutos

Tabla 1 Tiempo de estrés por semana.

3. Para los modelos de estrés de 16 y 22 días se hizo de la misma manera que la **Tabla 1**, y para el noveno día se repitió el ciclo de la **Tabla 1**, hasta completar los 22 días
4. Los ratones controles se colocaron en una caja limpia sin alimento ni bebida para que estuvieran en igualdad de condiciones de hidratación y alimentación que los ratones estresados.
5. Al concluir el modelo de estrés los ratones se retiraron del tubo y se colocaron en su respectiva caja con su alimento y bebida, de la misma manera sucedía con los ratones control.

7.4 Recolección y procesamiento de muestras

1. Los ratones fueron introducidos en un frasco ámbar de 500 mL, donde se agregaron 300 μ L de isoflurano (Sofloran, Laboratorios PiSa, Guadalajara, Jalisco,

México). Se dejaron hasta observar la pérdida de signos vitales por ejemplo respiración, relajación de esfínteres y se retiraba del frasco.

2. Se colocó boca arriba al ratón en una tabla de unicel, se le aplicó benzal en la región abdominal y se hizo un corte vertical con la tijera. Con mucho cuidado se retiró la membrana peritoneal a fin de diseccionar el tracto intestinal completo.

3. Se eliminaron los ganglios mesentéricos y una vez localizado el colon se disecó para después recolectar porciones de 1.0 cm del colon distal (*rectum*).

4. Se lavó el segmento de 1 cm solución salina isotónica (SSI) estéril con ayuda de un punzocát para eliminar totalmente la materia fecal.

5. Se cortó el segmento de 1 cm longitudinalmente con tijeras para dejar expuesto el *mucus* y se colocó en tubos de 2.0 mL con 500 μ L de SSI previamente pesados.

6. Se determinó el peso final de la muestra restando el peso con y sin muestra, la muestra se dejó en congelación hasta analizar los mucopolisacáridos.

7.5 Curva estándar de condroitin-4- sulfato

1. Se prepararon diluciones seriadas 2X del estándar de condroitin-4- sulfato (ver anexo) en agua destilada a un volumen final de 500 μ L. Las concentraciones en μ g/mL fueron las siguientes: 300, 150,75,37.5,18.75,9.374,4.686 y 2.342.

2. En tubos de microcentrifuga de 2 mL se mezclaron, 20 μ L de cada estándar con 980 μ L de solución 0.1% azul alcian en 0.16 M de sacarosa disuelta en 0.05 M de acetato sódico pH 5.8 (anexo), se ajustó a un volumen final de 1000 μ L (dilución final 1:50). Cada estándar se trabajó por triplicado.

3. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente 2 h y se centrifugaron a 12,500 rpm por 10 min.

4. Los tubos se decantaron para eliminar el sobrenadante y se colocaron boca abajo sobre papel filtro para eliminar el exceso.

5. El precipitado azul de cada tubo, se resuspendió en 1.7 mL de sacarosa 0.25 M y se agito a temperatura ambiente por 15 min después se centrifugo a temperatura ambiente a 12500 rpm por 10 min.
6. Los tubos se decantaron para eliminar el sobrenadante y se colocaron boca abajo sobre papel filtro para eliminar el exceso.
7. El precipitado de cada tubo de color azul se resuspendio en 1.7 mL de sacarosa 0.25 M y se agito a temperatura ambiente por 45 min, después se centrifugo a temperatura ambiente a 12500 rpm por 10 min.
8. Los tubos se decantaron para eliminar el sobrenadante y se colocaron boca abajo sobre papel filtro para eliminar el exceso.
9. De cada tubo se extrajo el colorante presente en el precipitado con 1.7 mL de docusato sódico 30% disuelto en etanol 70% (anexo) y se incubó toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente.
10. Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente a 12,500 rpm por 10 min y se recolectó el sobrenadante en microtubos limpios de 1.5 mL y se guardó a -20 °C.
11. Se colocó un volumen de 100 μ L del sobrenadante de cada estándar por triplicado en una placa de microtitulación de 96 pozos. Se determinó la absorbancia de los estándares a una $\lambda = 620$ nm en un lector de microplacas.
12. Para la curva estándar se graficó la concentración en μ g/mL de condroitin 4-sulfato en el eje "X" contra la absorbancia en el eje "Y".

7.6 Extracción de mucopolisacáridos en los segmentos intestinales

1. Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente a 12500 rpm por 10 min para eliminar la salina antes de que se adicionar el colorante.
2. La muestra de colon se mezcló en 1.7 mL de solución 0.1% azul alcian disuelta en 0.16 M de sacarosa amortiguada en 0.05 M de acetato sódico pH 5.8 (anexo),

por 2 h en agitación constante. Es importante que el *mucus* del colon estuviera en contacto constante con el colorante.

3. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente 12500 rpm por 10 min.

4. Los tubos se decantaron para eliminar el sobrenadante y se colocaron boca abajo sobre papel filtro para eliminar el exceso.

5. El precipitado azul de los tubos se lavó por resuspensión en 1.7 mL de sacarosa 0.25 M y se agito por 15 min con agitación constante a temperatura ambiente, después se centrifugo a temperatura ambiente a 12500 rpm por 10 min.

6. Los tubos se decantaron para eliminar el sobrenadante y se colocaron boca abajo sobre papel filtro para eliminar el exceso.

7. El precipitado azul de los tubos se lavó por resuspensión 1.7 mL de sacarosa 0.25 M y se agito por 45 min con agitación constante a temperatura ambiente, después se centrifugo a temperatura ambiente a 12500 rpm por 10 min.

8. Los tubos se decantaron para eliminar el sobrenadante y se colocaron boca abajo sobre papel filtro para eliminar el exceso.

9. Se extrajo el colorante unido al *mucus* presente en el precipitado con 1.7 mL de docusato de sodio al 30% disuelto en etanol al 70%(anexo), se aplicó agitación constante a temperatura ambiente durante toda la noche.

10. Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente a 12500 rpm por 10 min y se recolectaron los sobrenadantes que contenía los mucopolisacáridos de cada tubo en microtubos limpios de 1.5 mL y se guardaron a -20 °C.

7.7 Cuantificación de mucopolisacáridos en muestras

1. Se colocó un volumen de 100 µL en una placa de micro titulación de 96 pozos del sobrenadante de cada muestra sin diluir, diluido 1:2,1:4 y 1:8. Se empleo como diluyente el docusato al 30% disuelto en etanol al 70% (anexo). Las muestras se ensayaron por triplicado.

2. Posteriormente la absorbancia se estimó a una longitud de onda de $\lambda=620$ nm en el lector de microplacas (Epoch 2, BioTeK, California, USA).
3. La concentración de mucopolisacáridos en $\mu\text{g}/\text{mL}$ se estimó con base a la curva estándar y se expresó en μg de azul alcian/g de tejido.

7.8 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con la prueba de Mann Whitney y se utilizó el software Graph Pad Prism versión 8.0.1. San Diego CA, USA. Las diferencias se consideraron significativas a valores de $p < 0.05$.

8. ACTIVIDADES REALIZADAS

Objetivo	Actividad realizada	Ago 2022	Sept 2022	Oct 2022	Nov 2022	Dic 2022	Ene 2023	Feb 2023
Implementar el protocolo de estrés	Implementación del protocolo de estrés	X	X	X				
Estandarizar la curva	Estandarización de la curva estándar de 4-sulfato condroitina		X	X	X			
Procesar muestras	Procesamiento de muestras	X	X	X	X	X		
Analizar los resultados	Análisis resultados			X	X	X	X	
Preparar reporte	Preparación reporte						X	X
Entregar reporte	Entrega reporte							X

Tabla 2 Actividades realizadas durante el periodo del servicio social.

9. METAS ALCANZADAS

Se logro obtener resultados para poder realizar este reporte del servicio social.

10.RESULTADOS Y CONCLUSIONES

10.1 Curva estándar de condroitin 4-sulfato

En la **Tabla 3** se muestran las concentraciones del estándar y las absorbancias obtenidas a una longitud de onda (λ) de 620 nm. Los valores de la **Tabla 3** se usaron para realizar la **Figura 2** en donde se representa la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación lineal ($r^2 = 0.9935$).

Curva Estándar	
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Abs (nm)
300	2.630
150	1.316
75	0.859
37.5	0.462
18.75	0.175
9.374	0.150
4.686	0.052
2.342	0.049

Tabla 3 Curva estándar de condroitin 4-sulfato.

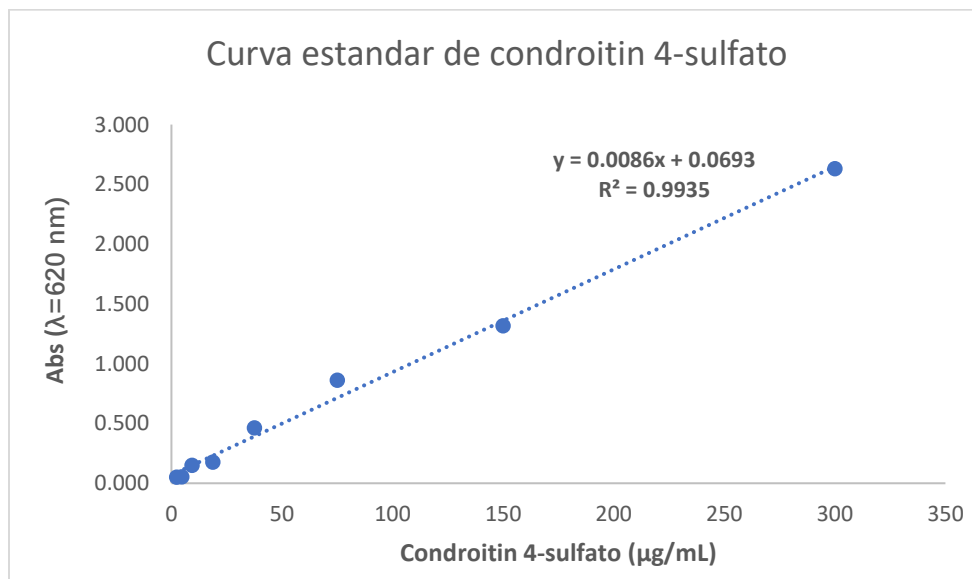


Figura 2 Curva Estándar de condroitin 4-sulfato.

10.2 Cuantificación de mucopolisacáridos en colon

En la **Tabla 4** se muestran los resultados de la concentración de mucopolisacáridos totales en colon en ratones macho sin estrés y con estrés, donde se realizaron 2 ensayos de 8 días, 2 ensayos de 16 días y 1 ensayo de 22 días.

Mucopolisacáridos totales en colon ($\mu\text{g/g}$)					
Ensayos 1 y 2		Ensayos 3 y 4		Ensayo 5	
8 días		16 días		22 días	
Control	Estrés	Control	Estrés	Control	Estrés
2156.784	1013.714	5423.153	3632.914	3363.99	4661.27
7154.600	2149.996	12799.310	3175.556	8997.51	3859.40
3321.575	1816.482	5296.209	4095.766	4678.17	3760.22
2071.849	5270.087	19229.710	1401.890	4373.41	3130.67
4475.971	3052.813	6604.254	1151.221	6038.29	6469.29
7861.272	4945.735	5752.484	5492.000	4761.57	8456.57
3534.700	3713.120	4693.976	2734.026		
5231.950	1884.650	6141.439	4761.708		
5226.510	5411.210	6802.386	5308.901		
7074.650	3847.430	4399.079	5539.701		
1926.470	6636.320	5461.118	6118.731		
6273.200	11652.94	5654.804			

Tabla 4 Concentración de mucopolisacáridos en $\mu\text{g/g}$ de muestra de ratones sin estrés y con estrés en la región del colon en 8, 16 y 22 días.

Los valores de la **Tabla 4** se muestran en la **Figura 3** los resultados de los mucopolisacáridos totales de la región de colon, de cada ensayo. Se muestra que en comparación del grupo control, en el grupo estresado hubo una disminución de mucopolisacáridos estadísticamente significativa ($p=0.0056$) en el protocolo de 16 días. Se observó que la concentración de mucopolisacáridos no fue diferente en los días 8 y 22 días de estrés.

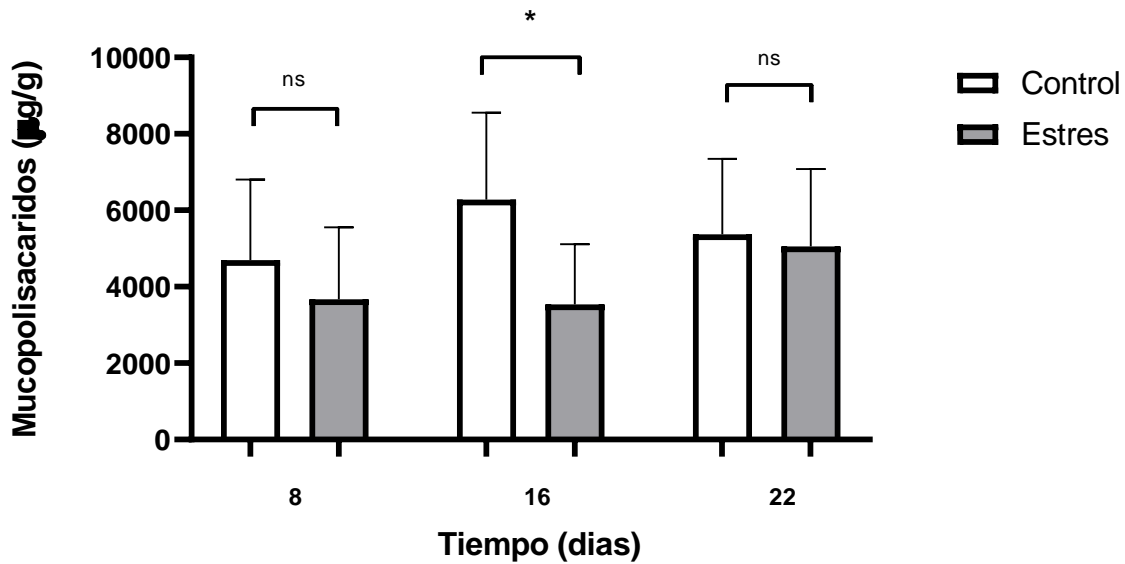


Figura 3 Cuantificación de mucopolisacáridos en la región del colon en diferentes tiempos.

10.2 Resumen de datos

En la **Tabla 5** se muestra el resumen de los valores de p del grupo estresado en comparación del grupo control obtenidos del análisis estadístico de cada grupo de ensayo en la región del colon. El número de datos analizados por grupo fue de 12 en el protocolo de días 8 y 16 de estrés y de 6 en el protocolo de 22 días de estrés. Como podemos ver en la **Tabla 5**, para los días 16 el valor de p fue estadísticamente significativo $p=0.0239$.

Días	Gpo. control	Gpo. estrés	estrés vs control	Significativo
	n	n	p<0.05	
8	12	12	0.4428	No
16	12	12	0.0056	Si
22	6	6	0.5887	No

Tabla 5 Resumen de los valores de p de todos los ensayos, el cual muestra el valor de $p<0.05$

Conclusión

En el presente trabajo se logró cumplir el objetivo de estimar la concentración de mucopolisacáridos en el colon con ratones sin estrés y con estrés. Además, se logró obtener una capacitación sobre el manejo adecuado de los ratones, se logró la capacitación en el método de la determinación de los mucopolisacáridos, el manejo de datos estadísticos, preparación de reactivos, protocolo de sacrificio de animales y trabajar en equipo con todos los compañeros del laboratorio y otros.

Falta contemplar la repetición del ensayo de 16 días de estrés, a fin de evaluar la reproducibilidad, ya sea mejorando el modelo de estrés por restricción de movimiento.

11.RECOMENDACIONES

El estudio experimental es muy sencillo y práctico, además el modelo es amigable en el manejo de los ratones y tiene la ventaja de poder ajustar el número de días para evaluar la efectividad del modelo. Esto es importante el establecimiento de la efectividad de este modelo a fin de evaluar fármacos a nivel experimental a futuros ensayos.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bhatia, N., Partha, P. M., Abhinit, C., Atul, T., Daljit, M., Mohd, M., Uzzaman, K., Tasneem, A., Amteshwar, S.J. (2011). Animal models in the study of stress: A review. *NSHM Journal of Pharmacy & Healthcare Management*; 2:42-50
- Brzozowski, B., Mazur-Bialy, A., Pajdo, R., Kwiecien, S., Bilski, J., Zwolinska-Wcislo, M., Mach, T., & Brzozowski, T. (2016). Mechanisms by which Stress Affects the Experimental and Clinical Inflammatory Bowel Disease (IBD): Role of Brain-Gut Axis. *Current neuropharmacology*, 14(8), 892–900. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666160404124127>
- Dedic, N., Chen, A., & Deussing, J. M. (2018). The CRF Family of Neuropeptides and their Receptors - Mediators of the Central Stress Response. *Current molecular pharmacology*, 11(1), 4–31. <https://doi.org/10.2174/1874467210666170302104053>
- Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J.F., Dinan, T.G. (2011). Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol*; 2:94.
- Jankord, R., & Herman, J. P. (2008). Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148, 64–73. <https://doi.org/10.1196/annals.1410.012>
- Johansson, M. E., & Hansson, G. C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature reviews. Immunology*, 16(10), 639–649. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.88>
- Johansson ME., Sjövall H. y Hansson GC. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(6):352-61, doi:10.1038/nrgastro.2013.35.
- Morla S. (2019). Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan Mimetics in Cancer and Inflammation. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1963.
- Mowat, A.M. & Agace, W.W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol.*; 14(10):667-85. doi: 10.1038/nri3738.
- Pelaseyed, T., & Hansson, G. C. (2020). Membrane mucins of the intestine at a glance. *Journal of Cell Science*, 133(5), jcs240929. doi:10.1242/jcs.240929
- Viggiano, D., Ianiro, G., Vanella, G., Bibbò, S., Bruno, G., Simeone, G. *et al.* (2015). Gut barrier in health and disease: focus on childhood. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*; 19(6): 1077-85.

13. ANEXOS

13.1 Preparación de reactivos

13.1.1 Preparación de acetato sódico 0.05 M pH 5.8

Se pesaron 2.05 g de acetato sódico (82.034 g/mol, 3470 JT BAKER) y se disolvieron en un volumen final de 50 mL para preparar acetato sódico 0.5 M.

Se tomaron 5 mL del acetato 0.5 M y se disolvieron en 35 mL de agua, a dicha solución se ajustó el pH de 5.8 con ácido clorhídrico antes de aforar a un volumen final de agua 50 mL, la cual tiene una molaridad de 0.05 M.

13.1.2 Preparación de sacarosa 0.16 M en acetato sódico 0.05M pH 5.8

Se pesaron 2.7384 gramos de sacarosa (342.297 g/mol, 11240 PQF) los cuales se disolvieron en acetato sódico 0.05 M con pH 5.8 a un volumen final de 50 mL.

13.1.3 Preparación de colorante azul alcian 0.1%

Se pesaron 0.05 g de azul alcian (C9819- Sigma) y se disolvieron en 50 mL de sacarosa 0.16 M disuelta en acetato sódico 0.05 M pH 5.8, el colorante se dejó agitando durante 20 minutos para disolverlo totalmente y evitar precipitados antes de ocuparlo.

13.1.4 Preparación de la sacarosa 0.25 M

Se pesaron 8.5575 g de sacarosa (342.3 g/mol) y se disolvieron en agua a un volumen final de 100 mL.

13.1.5 Preparación de condroitin-4-sulfato

Disolver 15 mg de condroitin-4-sulfato (15 mg/mL) en 1.0 mL de agua destilada.

13.1.6 Preparación de etanol 70% v/v

Se midieron 700 mL de etanol absoluto (E7148 Sigma) y se diluyó con agua destilada a un volumen final de 1000 mL.

13.1.7 Preparación de docusato sódico al 30% p/v

Se pesaron 300 g de docusato sódico (D1685 Sigma) y se mezclaron con 300 mL de etanol al 70%, el recipiente se tapó con un plástico y se dejó en agitación hasta su disolución total. Una vez disuelto el docusato se aforo a un volumen final de 1000 mL.

13.2 Equipo

Equipo	Marca	Modelo
Microcentrifuga	Corning	LSE 6765-HS
Vortex	Scientific Industries	0100108
Parrilla de calentamiento	Lab-Tech	0103942
Roto shake	Scientific Industries	1-87110
Epoch 2	BioTek	0102052

Tabla 6 Equipo utilizado para realizar el reporte de servicio social



Dra. María Elisa Drago Serrano
Asesor interno
No. Eco. 17243



Dra. Fabiola Guzmán Mejía
Asesor externo a cargo
Posdoctorante ID: 900050