

ISSN 2410-3551

Volumen 4, Número 10 — Enero — Marzo - 2017

Revista de Ciencias de la Salud

ECORFAN[®]

Indización



ECORFAN-Bolivia

- Google Scholar
- Research Gate
- REBID
- Mendeley
- RENIECYT

ECORFAN-Bolivia

Directorio

Principal

RAMOS-ESCAMILLA, María. PhD.

Director Regional

IGLESIAS-SUAREZ, Fernando. BsC.

Director de la Revista

PERALTA-CASTRO, Enrique. MsC.

Edición de Logística

SERRUDO GONZALES- Javier, BsC

Diseñador de Edición

SORIANO-VELASCO, Jesus.BsC.

Revista de Ciencias de la Salud, Volumen 4, Número 10, de Enero - Marzo 2017, es una revista editada trimestralmente por ECORFAN-Bolivia. Loa 1179, Cd. Sucre. Chuquisaca, Bolivia. WEB: www.ecorfan.org, revista@ecorfan.org. Editora en Jefe: RAMOS-ESCAMILLA, María. ISSN-2410-3551. Responsables de la última actualización de este número de la Unidad de Informática ECORFAN. ESCAMILLA-BOUCHÁN Imelda, LUNA-SOTO, Vladimir, actualizado al 31 de Marzo 2017.

Las opiniones expresadas por los autores no reflejan necesariamente las opiniones del editor de la publicación.

Queda terminantemente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin permiso del Instituto Nacional del Derecho de Autor.

Consejo Editorial

TAVERA-CORTÉS, María Elena. PhD
Instituto Politécnico Nacional, México

MONTERO-PANTOJA, Carlos. PhD
Universidad de Valladolid, España

BLANCO-ENCOMIENDA, Francisco. PhD
Universidad de Granada, España

SÁNCHEZ-TRUJILLO, Magda Gabriela. PhD
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México

AZOR-HERNÁNDEZ, Ileana. PhD
Universidad de las Américas Puebla, México

ALIAGA-LORDEMANN, Francisco Javier. PhD
Universidad de Zaragoza, España

GARCÍA-BARRAGÁN, Luis Felipe. PhD
Universidad de Guanajuato, México

ARANCIBIA-VALVERDE, María Elena. PhD
Universidad Pedagógica Enrique José Varona de la Habana, Cuba

Consejo Arbitral

PSA. PhD

Universidad Autónoma Chapingo, México

VDO. PhD

Universidad Centroamericana, Nicaragua

TGJC. PhD

Instituto Politécnico Nacional, México

ABD. PhD

Instituto Politécnico Nacional, México

GIMR. PhD

Universidad Nacional Autónoma de México, México

MBOM. PhD

Universidad Nacional Autónoma de México, México

SAOH. PhD

Universidad Nacional Autónoma de México, México

CHBM. PhD

Universidad Autónoma Metropolitana, México

Presentación

ECORFAN, es una revista de investigación que publica artículos en las áreas de: Ciencias de la Salud.

En Pro de la Investigación, Docencia, y Formación de los recursos humanos comprometidos con la Ciencia. El contenido de los artículos y opiniones que aparecen en cada número son de los autores y no necesariamente la opinión de la Editora en Jefe.

Como primer artículo presentamos, *Efectos inmunoestimulantes y antibióticos de los bioproductos del caldo de cultivo sumergido de micelio de Ganoderma sichuanense en ratones inoculados con Linfoma Murino L5178Y en fase sólida*, por, OROZCO-BAROCIO, Arturo, ISLAS-RODRIGUEZ, Alfonso Enrique, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELÁZQUEZ-MAGAÑA, Salvador, con adscripción en la Universidad de Guadalajara, como siguiente artículo presentamos, *Análisis de la Absorbancia y Transmitancia Espectral del Mucílago de Salvia hispanica L. para la Fotoprotección de la Piel*, por RAMÍREZ-GRANADOS, Juan Carlos , GÓMEZ-LUNA, Blanca E DÍAZ-PÉREZ, Cesar, GASCA-TIRADO, J. Ramón, con adscripción en la Universidad de Guanajuato, como siguiente artículo presentamos, *Modelo de Linfoma murino L5178Y en Fase Sólida*, por OROZCO-BAROCIO, Arturo, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA Salvador, con adscripción en la Universidad de Guadalajara, como siguiente artículo presentamos, *Una aproximación a las percepciones sobre género de las y los estudiantes de la Unidad Guaymas del Instituto Tecnológico de Sonora*, por MORENO-MILLANES, María Dolores & VALENZUELA-REYNAGA, Rodolfo, con adscripción en el Instituto Tecnológico de Sonora, como s último artículo presentamos, *Evaluación tisular “in vivo” del dimetilsulfóxido (DMSO) en el tejido ovárico y tegumentario de la rata adulta*, por MORÁN-PERALES, José Luis, OLVERA-HERRERA, Jasiel Evani, SÁNCHEZ-GARCÍA, Octavio, y HANDAL-SILVA, Anabella, con adscripción en el Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción, Instituto de Ciencias.

Contenido

Artículo	Pág
Efectos inmunoestimulantes y antibióticos de los bioproductos del caldo de cultivo sumergido de micelio de <i>Ganoderama sichuanense</i> en ratones inoculados con Linfoma Murino L5178Y en fase sólida OROZCO-BAROCIO, Arturo, ISLAS-RODRIGUEZ, Alfonso Enrique, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA, Salvador	1-12
Análisis de la Absorbancia y Transmitancia Espectral del Mucílago de <i>Salvia hispanica</i> L. para la Fotoprotección de la Piel RAMÍREZ-GRANADOS, Juan Carlos , GÓMEZ-LUNA, Blanca E DÍAZ-PÉREZ, Cesar, GASCA-TIRADO, J. Ramón	13-22
Modelo de Linfoma murino L5178Y en Fase Sólida OROZCO-BAROCIO, Arturo, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA Salvador	23-35
Una aproximación a las percepciones sobre género de las y los estudiantes de la Unidad Guaymas del Instituto Tecnológico de Sonora MORENO-MILLANES, María Dolores & VALENZUELA-REYNAGA, Rodolfo	36-45
Evaluación tisular “in vivo” del dimetilsulfóxido (DMSO) en el tejido ovárico y tegumentario de la rata adulta MORÁN-PERALES, José Luis, OLVERA-HERRERA, Jasiel Evani, SÁNCHEZ-GARCÍA, Octavio, y HANDAL-SILVA, Anabella	46-58
<i>Instrucciones para autores</i>	
<i>Formato de originalidad</i>	
<i>Formato de autorización</i>	

Efectos inmunoestimulantes y antibióticos de los bioproductos del caldo de cultivo sumergido de micelio de *Ganoderma sichuanense* en ratones inoculados con Linfoma Murino L5178Y en fase sólida

OROZCO-BAROCIO, Arturo †*, ISLAS-RODRIGUEZ, Alfonso Enrique, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA, Salvador

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, 44600 Zapopan, Jalisco

Recibido Enero 14, 2017; Aceptado Marzo 04, 2017

Resumen

La bioactividad del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* ha sido bien documentada, pero hay poca información sobre las propiedades medicinales de su caldo de cultivo de células suspendidas (también conocidos como cultivos sumergidos), ni de las otras especies del género *Ganoderma*. El objetivo de este estudio fue probar el potencial antimicrobiano y el efecto inmunoestimulador del concentrado del caldo de cultivo sumergido del micelio de *Ganoderma sichuanense*. Se probó la actividad antimicrobiana mediante el método de Daalgard, y el efecto inmunoestimulador fue probado en el modelo de inmunosupresión del Linfoma Murino L5178Y en fase sólida. Los resultados mostraron un aumento de la sobrevivencia de los ratones tratados con 100 mg/kg del Concentrado del caldo de cultivo sumergido de *G. sichuanense*, así como el restablecimiento de la proliferación de los esplenocitos de los ratones inmunosuprimidos con el linfoma, en concordancia a este fenómeno también se vio un aumento en los niveles séricos de IL-2 en estos ratones con linfoma.

Ganoderma, Linfoma, Antimicrobiano, Inmunoestimulador

Abstract

The bioactividad from the fruiting body of *Ganoderma lucidum* has been well documented, but there is little information about the medicinal properties of its breeding ground of suspended cells (also known as submerged crops), nor from the other species of the genus *Ganoderma*. The objective of this study was to test the antimicrobial potential and effect immunostimulatory of concentrate broth of submerged culture of mycelium of *Ganoderma sichuanense*. It proved the antimicrobial activity by using the Daalgard method, and the immunostimulatory effect was tested in the model of immunosuppression of the murine Lymphoma L5178Y in solid phase. The results showed an increase in the survival of mice treated with 100 mg/kg of the concentrate of the submerged culture of *G. sichuanense*, as well as the restoration of the proliferation of Splenocytes of mice immunosuppressed with lymphoma, in accordance to this phenomenon also saw an increase in the sera levels of IL-2 in these lymphoma-bearing mice.

Ganoderma Lymphoma, Antimicrobial, Immunostimulator

Citación: OROZCO-BAROCIO, Arturo, ISLAS-RODRIGUEZ, Alfonso Enrique, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA, Salvador. Efectos inmunoestimulantes y antibióticos de los bioproductos del caldo de cultivo sumergido de micelio de *Ganoderma sichuanense* en ratones inoculados con Linfoma Murino L5178Y en fase sólida. Revista de Ciencias de la Salud. 2017. 4-10: 1-12.

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: arorozcob@prodigy.net.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor

Introducción

El género *Ganoderma* incluye cerca de 80 especies de setas, de las cuales varias se han utilizado durante siglos en la Medicina Tradicional Asiática por sus propiedades medicinales que incluye efectos antibacterianos, inmunomoduladores, anticancerosos, antioxidantes, cardiovasculares, antialérgicos, hepatoprotectores y antidiabéticos, entre otros (Berovič *et al*, 2003; Čilerdžić, *et al* 2016; Suárez-Arroyo *et al*, 2017). Los efectos antitumorales de *Ganoderma* son atribuidos a la interrupción del ciclo celular, la inducción de la apoptosis y citotoxicidad, la inducción de la diferenciación, supresión de angiogénesis y migración celular, e inmunomodulación (Dai, *et al* 2017).

Los principales compuestos bioactivos producidos por *Ganoderma* responsables de sus efectos curativos son los Triterpenos, los Peptidoglucanos y los Polisacáridos (Kao, *et al* 2013; Xu, *et al* 2011; Yue, *et al* 2010). Los cuales son obtenidos a partir del organismo completo o de alguna de sus partes (cuerpo fructífero, estipe o pie, esporas, micelio) (Paterson, 2006; Soccol, *et al* 2016; Zeng, *et al* 2009), mediante diferentes métodos de extracción que van desde la utilización de metanol, etanol, agua, y otros solventes orgánicos (Ofodile, *et al* 2005; Soccol, *et al* 2016; Zeng, *et al* 2009).

Las especies de *Ganoderma* son encontrados en todo el mundo y se caracterizan por distintos rasgos morfológicos y anatómicos que incluyen la forma y el tamaño del basidiocarpo, el color del píleo o sombrero y del estipe o pie, así como el tamaño y la forma del cuerpo fructífero (Gill, *et al* 2015). Debido a su diversidad existen controversias en su clasificación y la mayoría de las especies que se han utilizado en la medicina tradicional pertenecen a la especie *Ganoderma lucidum* (W.Curt. Fr.) P. Karts (Kwon, *et al* 2016; Welti, *et al* 2015).

Actualmente, existe un creciente interés por encontrar fuentes alternativas naturales de antibióticos y antimicóticos debido a la mayor resistencia que presentan los microorganismos a las drogas comerciales. Las setas sintetizan compuestos antimicrobianos como respuesta a su ambiente, que podrían ser utilizados como nuevos fármacos (Čilerdžić, *et al* 2016; Sridhar, *et al* 2011; Yamaç, *et al* 2006). Por otro lado, el cáncer es uno de los males críticos que conducen a la muerte de millones de personas en todo el mundo.

El objetivo de la terapia convencional contra el cáncer es matar las células tumorales sin afectar a las células normales. Sin embargo, la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos no sólo son citotóxicos a las células cancerosas, sino también a las células sanas. El uso clínico de estos agentes es limitado por su toxicidad y daños colaterales. Teniendo en cuenta esto, es necesario el descubrimiento de, nuevos agentes efectivos con pocos o ningún efecto secundario.

El género *Ganoderma* es rico en estas sustancias activas, en particular los polisacáridos, con efectos inmunoestimulantes y antitumorales que han sido aisladas de los extractos acuosos del cuerpo fructífero y los micelios (Kuo, *et al* 2006; Smina, *et al* 2017). Sin embargo, el hecho de que numerosos compuestos biológicamente activos en los hongos son de naturaleza extracelular, se justifica la necesidad de estudios más detallados de los productos bioactivos vertidos por los hongos en el medio de cultivo sumergidos o de células suspendidas (Čilerdžić, *et al* 2016; Paterson, 2006).

Los basidiocarpos o cuerpos fructíferos de *G. lucidum* son comúnmente usados como suplementos alimenticios, pero su cantidad en la naturaleza es limitada y el cultivo tradicional toma demasiado tiempo y es muy difícil controlar el proceso para satisfacer las crecientes demandas del mercado (Ofodile, *et al* 2005; Carrieri, *et al* 2017; Liu, *et al* 2010).

Por lo que, numerosos estudios proponen el cultivo sumergido del micelio, como una forma alternativa de producir metabolitos activos intra y extracelulares (Tang, *et al* 2002). Hoy en día, en el mercado de los alimentos sanos los basidiocarpos son cada vez más sustituidos por el micelio obtenido mediante el cultivo sumergido (o Cultivo de células suspendidas); sin embargo, la bioactividad del caldo de cultivo líquido es casi desconocida (Berovič, *et al* 2003; Li, *et al* 2007). Entre las aproximadamente 250 especies pertenecientes al género *Ganoderma*, *G. lucidum* es la más estudiada debido a su gran potencial medicinal y comercial, mientras que las otras especies de este género no han sido bastante estudiadas (Ćilerdžić, *et al* 2016).

Objetivos

Objetivo General

Investigar el efecto antibacteriano del extracto acuoso del cuerpo fructífero, de *Ganoderma sichuanense* una especie estrechamente relacionada con *G. lucidum* (Ćilerdžić, *et al* 2016; Wang, *et al* 2012; Welti, *et al* 2015), así como la actividad inmunomoduladora del Concentrado de los compuestos extracelulares heterogéneos producidos por el micelio de *G. sichuanense* en el Caldo de Fermentación del Cultivo Sumergido de células suspendidas (CCFCSdeGano).

Objetivos específicos

- Investigar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso del cuerpo fructífero de *G. sichuanense* en bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™), *Eschericia coli* (ATCC® 9637™) y *Candida albicans* (obtenidos por el Instituto Dermatológico de Jalisco, México).
- Determinar el efecto inmunomodulador *in vivo*, en ratones Balb/c inmunosuprimidos por el Linfoma Murino L5178Y mediante el inóculo de 1×10^6 células en el músculo gastrocnemio derecho, por medio de las siguientes pruebas:
 - A) La valoración de la sobrevida de los ratones con el Linfoma tratados y no con 100 mg/Kg de peso corporal del concentrado del caldo de fermentación del cultivo sumergido del micelio de *G. sichuanense* (CCFCSdeGano);
 - B) El estudio del desarrollo o evolución de la masa tumoral del Linfoma inoculado en el músculo gastrocnemio derecho de los ratones tratados y no con 100 mg/Kg del CCFCSdeGano por 20 días diariamente;
 - C) La determinación de la respuesta Inmune Adaptativa de tipo Celular por el Índice de Proliferación de los esplenocitos de ratones tratados y no con la misma cantidad del CCFCSdeGano; y
 - D) La evaluación de las concentraciones de los niveles séricos de las Citocinas: Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), Interferon gamma (IFN γ) e Interleucina 2 (IL-2) de ratones tratados y no con el CCFCSdeGano.

Material y Métodos

Cultivo de Células Suspendidas

El Concentrado de los compuestos extracelulares heterogéneos producidos por el micelio de *G. sichuanense* en el Caldo de Fermentación del Cultivo Sumergido de células suspendidas (CCFCSdeGano) fue proporcionado por el Biol. Sergio Fausto Guerra, encargado de la producción de *Ganoderma*, en el Laboratorio de Biología Aplicada del Departamento de Botánica y Zoología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara (UdeG).

Medición de la Actividad Antimicrobiana

Se efectuaron 12 ensayos biológicos para probar la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos del Cuerpo fructífero de Ganoderma, usando el método de microdilución convencional (Dalgaard, *et al* 1994), seguido de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (mg/ml) usando el ensayo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Ong, *et al* 2002). Cada muestra se ensayó frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™) y *Eschericia coli* (ATCC® 9637™).

Ratones

Los ratones de la cepa Balb/c machos de 6 a 8 semanas de edad y con un peso de 22 a 25 g, fueron alojados y mantenidos en condiciones normales del laboratorio con ciclos de luz-obscuridad de 12/12 h con acceso libre a comida y agua estándar para roedores de acuerdo a las directrices para el uso y cuidado de animales de laboratorio de la World Medical Association (WMA): Declaration of Helsinki (emanada por la 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000).

Los protocolos del uso de animales fueron aprobados por el Comité de Ética del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (U de G).

Línea celular del Linfoma

La línea celular del Linfoma Murino L5178Y fue derivada de un linfoma murino de origen tímico de los ratones de la cepa DBA/2 (h-2D/d), y fue mantenido en forma ascítica por inoculación intraperitoneal (i.p.) de 1×10^6 células semanalmente en ratones singénicos Balb/c (h-2D/d) (Puebla-Pérez, *et al* 1998).

Estimación de la Sobrevida de ratones con Linfoma Murino L5178Y

La actividad del Concentrado del caldo de fermentación del micelio de *G. sichuanense* (CCFCSdeGano) sobre la tasa de sobrevida fue evaluada *in vivo* en 16 ratones inoculados con 1×10^6 células de linfoma en el músculo gastrocnemio derecho; al azar se formaron dos grupos con 8 roedores cada uno. A un grupo se les trató con 100 μ l Solución Balanceada de Hanks's estéril y al segundo grupo se les trató con 100 mg/Kg de peso corporal del CCFCSdeGano disueltos en 100 μ l de Solución Balanceada de Hanks's estéril. Para ambos grupos el tratamiento se inició 48 hrs después de la inoculación del linfoma, diariamente por vía oral.

Los ratones fueron observados diariamente, registrando el día de muerte de cada uno de ellos. El tiempo de sobrevida fue evaluado y representado por las curvas de sobrevida de Kaplan-Meier y la Estimación de Riesgo (ER) fue valorada con la siguiente fórmula (Fernández, 1995):

$$ER = \frac{\frac{\text{Observados del gpo Ctrl}}{\text{Esperados del gpo Ctrl}}}{\frac{\text{Observados del gpo Gano}}{\text{Esperados del gpo Gano}}} \quad (1)$$

Valoración del desarrollo del tumor en fase sólida

Se utilizaron 2 grupos experimentales de 8 ratones cada uno. Todos los ratones fueron inoculados con 1×10^6 células de linfoma suspendidas en 100 μ l de Solución de Hank's estéril en el músculo gastrocnemio derecho. Los ratones fueron tratados 48 hrs después del inóculo con 100 mg/Kg del CCFCSdeGano disueltos en 100 μ l de Solución de Hank's estéril, para el grupo experimental y el grupo control solo recibió 100 μ l de Solución de Hank's estéril. La vía de administración fue oral, con dosis diarias por 20 días.

El volumen del tumor fue medido diariamente usando un vernier electrónico (Digimatic Caliper Mitutoyo Corporation, Japan), iniciando un día antes de la inoculación del linfoma y durante el tiempo del tratamiento. El volumen del tumor (en mm^3) fue estimado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Vol. Tumor (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Largo} \times \text{Ancho}^2}{2} \quad (2)$$

Determinación del Índice de Linfoproliferación *ex vivo*

Para determinar si la Respuesta Inmune de tipo Celular, en este modelo de inmunosupresión por el Linfoma Murino, fue modificada por efecto del CCFCs de Gano, se utilizaron 3 grupos experimentales de 4 ratones cada uno, el grupo de ratones sanos, sin tratamiento y sin tumor; el grupo con linfoma, sin tratamiento y el grupo con linfoma y tratamiento de 100 mg/Kg del CCFCs de Gano, en un volumen de 100 μ l de Solución de Hank's, administrado diariamente, por 20 días.

Al término del tratamiento los doce ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajo el Bazo para realizar un cultivo primario de linfocitos. Estos son separados por un gradiente de densidad de polisucrosa (HISTOPAQUE 1083, SIGMA), mediante centrifugación diferencial.

Los linfocitos se cultivan por 72 hrs, con una densidad de 2×10^5 células por pozo, en placas de cultivo de 96 pozos (CORNING), en una incubadora a 37° C y con el 5% de CO₂; se sembraron 6 pozos por bazo, 3 de ellos se cultivaron con medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA) adicionado con el 10% de Suero Fetal de Ternera, y a los 3 restantes, además del medio de cultivo se les agregó 5 mg de Concanavalina A (SIGMA), un mitógeno que estimula el desarrollo celular.

Al término del tiempo de replicación celular, a cada pozo se les agregaron 40 μ l de 3(4,5-dietildiazol- 2- il) 2, 5 difenil bromuro de tretazolio (MTT) disueltos en solución de buffer de fosfatos (PBS) a una concentración de 5 mg/ml, se incubaron durante 4 horas a 37° C y 5% de CO₂. Enseguida se agregaron 160 μ l de Buffer de Lisis (SDS al 20% en N, N Dimetilformamida al 50% a pH 4.7). Posteriormente, se incubó a 37° C y 5% de CO₂ durante toda la noche y se leyó a 550 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan) (Hansen, *et al* 1989; Mossman, 1983). Se determinó el índice de Proliferación (IP) según el siguiente cociente:

$$IP = \frac{\text{Absorvancia de células con mitógeno}}{\text{Absorvancia de células sin mitógeno}} \quad (3)$$

Determinación de los niveles séricos de Citocinas TNF α , IFN γ e IL-2

Para valorar la producción de las Citocinas en suero, se utilizaron 3 grupos experimentales de 4 ratones cada uno, el grupo de ratones sanos, sin tratamiento y sin tumor; el grupo con linfoma, sin tratamiento y el grupo con linfoma y tratamiento de 100 mg/Kg del CCFCs de Gano, en un volumen de 100 μ l de Solución de Hank's, administrado diariamente, por 20 días. Al término del tratamiento a los doce ratones se les obtuvo sangre por punción cardiaca y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y el suero fue colectado para detectar los niveles de TNF α , IFN γ e IL-2 mediante kits de ELISA de acuerdo a las indicaciones del fabricante (eBioscience).

Análisis Estadístico

Para los experimentos de sobrevida se utilizarán las pruebas de Kaplan – Meier y la Estimación de Riesgo con el estadístico $Ji^2 (X^2)$; para el desarrollo del tumor se utilizó la Comparación de Pendientes con el estadístico *t de Student* y para las pruebas del Índice de Proliferación y los niveles de interleucinas, se utilizó el Analisis de Varianza de una vía (ANOVA).

Y las Diferencia Significativas Mínimas (DSM). Todos los experimentos comparados a una significancia de $p = 0.05$.

Resultados

Actividad Antimicrobiana

Los extractos acuosos del cuerpo fructífero de *G. sichuanense* muestran actividad antimicrobiana consistente en diluciones seriadas probando el efecto dosis-respuesta, contra bacterias Gram Positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™) y Gram Negativas como *Eschericia coli* (ATCC® 9637™), como puede observarse en el grafico 1.

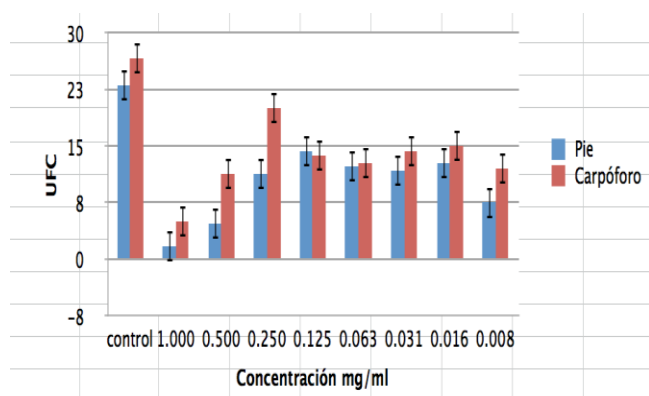


Grafico 1 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de *E. coli* vs diferentes concentraciones del extracto acuoso del carpóforo de *G. sichuanense*.

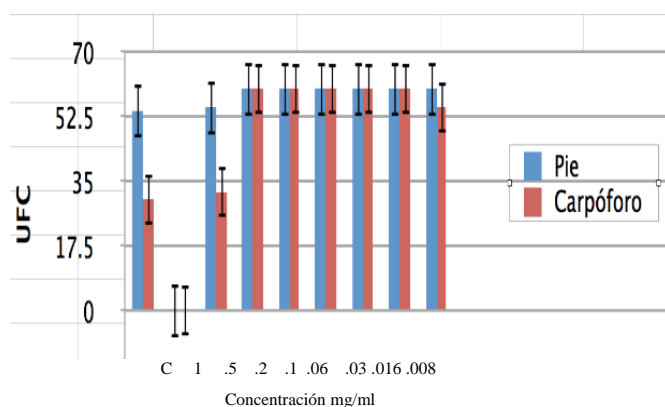


Grafico 2 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de *S. aureus* vs diferentes concentraciones del extracto acuoso del carpóforo de *G. sichuanense*

Estimación de la Sobrevida de ratones con Linfoma Murino L5178Y

La sobrevida de los ratones inoculados con 1×10^6 células de Linfoma Murino L5178Y en el músculo gastrocnemio derecho y tratados y no con 100 mg/Kg de peso corporal de Concentrado del caldo de fermentación del micelio de *G. sichuanense* (CCFCSdeGano), fue significativamente mayor ($p = 0.05$) en los ratones con tratamiento (gpo. Gano) versus los ratones no tratados (gpo Ctrl); el promedio de vida para el grupo tratado fue de 30 días y el del grupo sin tratamiento fue de 28 días. Por otro lado, la Estimación del Riesgo, significa que los ratones sin tratamiento tienen 2.8 veces más riesgo de morir por el tumor que los ratones tratados (Grafico 3).

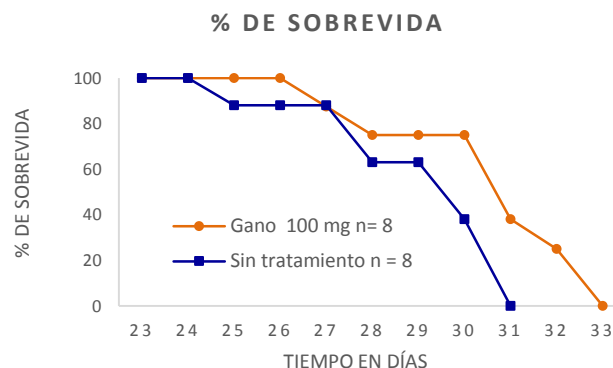


Grafico 3. % Sobrevida de ratones inoculados con 1×10^6 células de Linfoma L5178Y en fase sólida y tratados y no con 100 mg/kg de Concentrado de cultivo sumergido de micelio de *G. sichuanense* ($p=0.05$)

Valoración del desarrollo del tumor en fase sólida

En cuanto al desarrollo del tumor, no hubo diferencia significativa ($p = 0.05$), los tumores crecen al mismo ritmo en ambos grupos de roedores (Grafico 4).

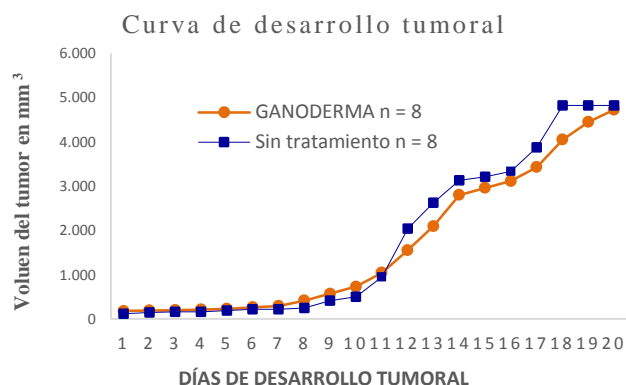


Grafico 4 Curva de desarrollo tumoral de ratones inoculados con 1×10^6 células de Linfoma L5178Y en fase sólida y tratados y no con 100 mg/kg de Concentrado de cultivo sumergido de micelio de *G. sichuanense* durante 20 días ($p=0.05$)

Determinación del Índice de Linfoproliferación *ex vivo*

Al valorar el Índice de Proliferación observamos que el modelo de inmunosupresión del Linfoma murino L5178Y es eficaz, ya que reduce considerablemente la Respuesta Inmune de tipo Celular del ratón con Linfoma, en relación a los datos del IP del grupo de ratones sanos sin tratamiento y sin tumor, en cuanto al efecto del CCFCSdeGano, restituye significativamente ($p=0.05$) esta inmunosupresión a los linfocitos esplénicos de los ratones con tumor (Grafico 5)

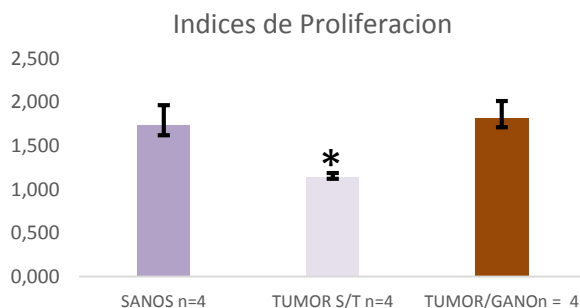


Figura 4 Indices de proliferación de esplenocitos de ratones inoculados con 1×10^6 células de Linfoma L5178Y en fase sólida y tratados y no con 100 mg/kg de Concentrado de cultivo sumergido de micelio de *G. sichuanense* durante 20 días. *Tumor vs Sanos y Gano ($p=0.05$)

Cuantificación de los niveles séricos de Citocinas TNF α , IFN γ e IL-2

La cuantificación de los niveles séricos de las Citocinas en pg/ml, mediante la técnica de ELISA, nos muestra que el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) es significativamente diferente entre los grupos ($p=0.05$), disminuyendo su concentración en los ratones de los grupos con Tumor, tratados y no con el CCFCSdeGano. Por el contrario el Interferón gamma (IFN γ), del grupo de ratones sanos es diferente significativamente con los grupos de Tumor sin tratamiento (Tumor S/T) y Tumor con tratamiento del CCFCSdeGano ($p = 0.05$) y sin tener diferencias significativas entre estos últimos grupos.

Finalmente los niveles de la Interleucina 2 (IL-2) son más elevados en el grupo con tumor y tratados con CCFCSdeGano, siendo diferente significativamente con los otros dos grupos, en cambio, entre el grupo de tumor S/T y el grupo sano, no existen diferencias significativas ($p=0.05$) (Tabla 1).

Citocina	gpo Sano	gpo Tumor S/T	gpo Ganoderma
TNF α	91.6 \pm 2	67.1 \pm 4	39.1 \pm 8
IFN γ	187.6 \pm 6.1	504.3 \pm 177	567.6 \pm 100
IL-2	65.8 \pm 9	68.6 \pm 14	91.5 \pm 14

Tabla 1 Valores séricos en pg/ml de Citocinas Promedio \pm DS

Conclusiones

Las interacciones patológicas entre las células cancerosas y las células inmunes del hospedero en el microambiente tumoral crea una red inmunosupresora que promueve el crecimiento tumoral, protege el tumor del ataque inmune y atenúa la eficacia inmunoterapéutica (Zou, 2005). El Linfoma Murino L5178Y en fase sólida es un buen modelo de inmunosupresión y nos permite evaluar los efectos inmunomoduladores de sustancias con esta actividad.

Nuestros resultados experimentales confirmaron que el concentrado de cultivo sumergido del micelio de *Ganoderma sichuanense* (CCFCSdeGano) tiene efectos inmunoestimulantes en este modelo de Linfoma; así como se ha confirmado en otros estudios donde cultivos sumergidos de género *Ganoderma*, también tienen dicho efecto (Berovič, *et al* 2003; Čilerdžić, *et al* 2016; Carrieri, *et al* 2017). Aunque el desarrollo del tumor no tuvo diferencia entre los ratones tratados con el concentrado del cultivo sumergido del micelio de *G. sichuanense* (fig.3), la esperanza de vida sí se vió favorecida, ya que el riesgo de muerte de los ratones no tratados fue casi tres veces más que los tratados con el concentrado de *Ganoderma*, aumentando la esperanza de vida por 2 días (fig.2).

Por otro lado, el Índice de Proliferación (IP), que es la relación entre la multiplicación de las células en reposo y la multiplicación de las células estimuladas por el mitógeno, se observa que en el grupo inmunosuprimido con el Linfoma está significativamente disminuido comparado con el IP del grupo de los ratones sanos, y que el tratamiento del CCFCSdeGano estimula considerablemente esta respuesta (fig.4); la proliferación celular es una manera de medir la respuesta inmune adaptativa de tipo celular cuya capacidad de reproducción de los linfocitos es una evidencia del efecto inmunoestimulador que tienen los bioproductos del caldo concentrado del cultivo sumergido de micelio de *G. sichuanense*.

Uno de los enfoques importantes para evaluar la actividad inmunomoduladora de una sustancia en particular es mediante la valoración de la síntesis de citocinas. Las citocinas son moléculas de señalización producidas y secretadas, principalmente por las células inmunes activadas. Son esenciales para el mantenimiento de las funciones del organismo y desempeñan un importante papel en el control de la homeostasis del individuo mediante la vigilancia de la proliferación, diferenciación celular y la apoptosis.

Así como las funciones de defensa tales como las respuestas inmunes y las reacciones inflamatorias (Abbas, *et al* 2015; Berovič, *et al* 2003; Ruijun, *et al* 2015). La IL-2 es una importante molécula de la red de citocinas que realiza actividades biológicas como la promoción de la mitosis en los linfocitos, el aumento de la función citolítica de las células Asesinas Naturales (NK) y la ayuda en la generación de anticuerpos (Rosenberg, 2014).

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) es una citocina que deriva de los monocitos activados y tiene varias actividades antitumorales como, la necrosis y apoptosis celular y la activación de otras citocinas (Ohri *et al* 2010; Somintara, *et al* 2016). El INF γ es una de las principales citocinas que regulan el Sistema inmune y su principal función es aumentar la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I (MHC-I) y activar a los Macrófagos contra bacterias y agentes infecciosos exógenos (Alokail, *et al* 2014; Li, *et al* 2016). En el Cáncer, la secreción de las citocinas IL-2, TNF α e IFN γ incrementan la capacidad inmunológica antitumoral del organismo (Gerber, *et al* 2013; Ni, *et al* 2013).

En nuestro estudio valoramos las concentraciones séricas de las citocinas IL-2, TNF α e IFN γ , en los ratones sanos, sin tumor ni tratamiento y en ratones inmunosuprimidos con el Linfoma Murino L5178Y en fase sólida, sin tratamiento y tratados con el concentrado del caldo de cultivo sumergido de micelio de *G. sichuanense* por 20 días de forma oral con 100 mg/kg de peso corporal (Tabla 1). Considerando que la IL-2 tiene efecto sobre la maduración y activación de los linfocitos podemos inferir que esta citocina intervino en que los índices de proliferación (IP) hayan sido restablecidos en la respuesta inmune suprimida de los ratones con tumor, y que los bioproductos del caldo de cultivo sumergido del micelio tienen propiedades estimuladoras de la producción de la IL-2.

Por otro lado, el efecto del IFN γ que estimula toda la maquinaria inmunológica en presencia de antígenos extraños, es estimulado por puro efecto del desarrollo del tumor y el concentrado de Ganoderma no tiene algún efecto directo, en cambio el TNF α se encontró disminuido en los ratones tratados con el concentrado de Ganoderma a diferencia de otros reportes donde esta citocina es estimulada en su producción (Berovič, *et al* 2003; Carrieri, *et al* 2017; Xu, *et al* 2011). Finalmente, podemos concluir que el concentrado del caldo del cultivo sumergido de micelio de *G. sichuanense* tiene un efecto inmunoestimulador en el modelo de inmunosupresión del Linfoma Murino L5178Y, permitiendo a los ratones una sobrevida y una restitución de la respuesta inmune innata de tipo celular. Asimismo la respuesta antimicrobiana observada en los experimentos correspondientes, demuestran que los extractos acuosos del carpóforo y el pie de *G. sichuanense* contienen moléculas capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas de una manera dosis-respuesta, en el experimento de diluciones seriadas (Fig. 1).

Dichas moléculas pueden ser orgánicas como las mencionadas en la introducción, pero también pueden ser péptidos pequeños con actividad antimicrobiana como consta en un reporte (Wang 2006) y en experimentos recién realizados en nuestro laboratorio. Lo anterior refuerza el concepto de que el género Ganoderma posee cualidades antimicrobianas naturales que pueden ser usadas como una alternativa frente a la resistencia bacteriana observada contra los antibióticos convencionales.

Agradecimiento

Este trabajo se realizó con el apoyo del programa de Fortalecimiento de Cuerpos Académicos 2015, de la Subsecretaría de Educación Superior, Dirección General de Educación Superior Universitaria de la SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA. MÉXICO. Y del apoyo de P3E de la Universidad de Guadalajara.

Referencias

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S. (2015). Cellular and Molecular Immunology, 8th ed. Saunders, Elsevier Inc. pp. 199-240.

Alokail, M.S., Al-Daghri, N.M., Mohammed, A.K., Vanhoutte, P. and Alenad, A. (2014). Increased TNF α , IL-6 and ErbB2 mRNA expression in peripheral blood leukocytes from breast cancer patients. *Med Oncol.* 31(8),38. doi: 10.1007/s12032-014-0038-0.

Berovič, M., Habijanič, J., Zore, I., Wraber, B., Hodžar, D., Boh, B. and Pohleven, F. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *J Biotechnol.* (103), 77–86.

Carrieri, R., Manco, R., Sapio, D., Iannaccone, M., Fulgione, A., Papaiani, M., de Falco, B., Grauso, L., Tarantino, P., Ianniello, F., Lanzotti, V., Lahoz, E. and Capparelli, R. (2017). Structural data and immunomodulatory properties of a water-soluble heteroglycan extracted from the mycelium of an Italian isolate of *Ganoderma lucidum*. *Natural Product research.* doi.org/10.1080/14786419.2017.1278593.

Ćilerdžić, J., Kosanić, M., Stajić, M., Vukojević, J. y Ranković B. (2016). Species of Genus *Ganoderma* (Agaricomycetes) Fermentation Broth: A Novel Antioxidant and Antimicrobial Agent. *International Journal of Medicinal Mushrooms,* 18(5), 397–404.

Dai, J., Miller, M. A., Everetts, N. J., Wang, X., Li, P., Li, Y., Xu, J-H. y Yao, G. (2017). Elimination of quiescent slow-cycling cells via reducing quiescence depth by natural compounds purified from *Ganoderma lucidum*. *Oncotarget,* 8(8), 13770-13781.

Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Karina Neumeyer, K. and McMeekin, T.A. (1994). Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology* (23), 391-404.

Fernández, P. (1995) Análisis de Supervivencia. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo.A Coruña (España) *Cad Aten Primaria* 2: 130-135

Gerber, S.A., Sedlacek, A.L., Cron, K.R., Murphy, S.P., Frelinger, J.G. and Lord, E.M. (2013). IFN- γ mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor. *Am J Pathol.* 182(6), 2345-54. doi:10.1016/j.ajpath.2013.02.041

Gill, B.S., Sharma, P., Raj Kumar, R. y Kumar, S. (2015). Misconstrued versatility of *Ganoderma lucidum*: a key player in multi-targeted cellular signaling. *Tumor Biol.* DOI 10.1007/s13277-015-4709-z.

Hansen, M.B., Nielsen, S.E. and Berg, K. (1989). Re-examination and further develop of precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal Immunol Methods.* (119), 203-210.

Kao, Ch.H.J, Jesuthasan, A.C., Bishop, K.S., Glucina, M.P. and Ferguson, L.R. (2013). Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways. *Functional Foods in Health and Disease*, 3(2), 48-65.

Kuo, M.C.H., Weng, CH.Y., Ha, CH.L. and Wu, M.J. (2006). *Ganoderma lucidum* mycelia enhance innate immunity by activating NF-B. *Journal of Ethnopharmacology* (103), 217-222.

Kwon, O.CH., Park, Y.J., Kim, H.I., Kong, W.S., Cho, J.H. y Lee, CH.S. (2016). Taxonomic Position and Species Identity of the Cultivated Yeongji *Ganoderma lucidum* in Korea. *Mycrobiology* 44(1): 1-6.
dx.doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.1.1.

ISSN 2410-3551

ECORFAN® Todos los derechos reservados.

Li, W., Tian, Y.H., Liu, Y., Wang, Z., Tang, S., Zhang, J. and Wang, Y.P. (2016). Platycodin D exerts anti-tumor efficacy in H22 tumor-bearing mice via improving immune function and inducing apoptosis. *J Toxicol Sci.* 41(3), 417-28. doi: 10.2131/jts.41.417.

Li, Y.Q., Fang, L. and Zhang, K.C. (2007). Structure and bioactivities of a galactose rich extracellular polysaccharide from submergedly cultured *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr Polym.* (68), 323-328.

Liu, W., Wang, H., Pang, X., Yao, W. and Gao, X.(2010). Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Int J Biol Macromol.* (46), 451-457.

Mossman, M. (1983). Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: aplication to proliferation and citotoxicity assays. *Journal Immunol Methods.* (65), 55 - 63.

Ni, C., Wu, P., Zhu, X., Ye, J., Zhang, Z., Chen, Z., Zhang, T., Zhang, T., Wang, K., Wu, D., Qiu, F. and Huang, J. (2013). IFN- γ selectively exerts pro-apoptotic effects on tumor-initiating label-retaining colon cancer cells. *Cancer Lett.* 9:336(1):174-84. doi: 10.1016/j.canlet.2013.04.029.

Ofodile, L.N., Kokubum, N.U., Grayer, R.J., Ogundipe, O.T. and Simmonds, M.S. (2005) Antimicrobial activity of some *Ganoderma* species from Nigeria. *Phytother Res.* (19):310-313.

Ohri, C.M., Shikotra, A., Green, R.H., Waller, D.A. and Bradding, P. (2010). Tumour necrosis factor-alpha expression in tumour islets confers a survival advantage in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* (10), 323. doi: 10.1186/1471-2407-10-323.

- Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY. (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 10;347 (15):1151-60
- Paterson, R.R.M. (2006). Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, (67), 1985–2001.
- Puebla-Pérez, A.M., Huacuja-Ruiz, L., Rodríguez-Orozco, G., Villaseñor-García, M.M., Miranda-Beltrán, M.L., Celis, A. and Sandoval-Ramírez, L. (1998). Cytotoxic and antitumor activity from *Bursera fagaroides* ethanol extract in mice with L5178Y lymphoma. *Phytotherapy Research.* (12), 545-548
- Rosenberg, S.A. (2014). IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *J. Immunol.* (192), 5451–5458
- Ruijun, W., Shi, W., Yijun X., Mengwuliji, T., Lijuan, Z, and Yumin, W. (2015). Antitumor effects and immune regulation activities of a purified polysaccharide extracted from *Juglan regia*. *Int J Biol Macromol.* (72), 771-775 doi: 0.1016/j.ijbiomac.2014.09.026.
- Smina, T.P, Nitha, B., Devasagayam, T.P.A. and Janardhanan, K.K. (2017). *Ganoderma lucidum* total triterpenes induce apoptosis in MCF-7 cells and attenuate DMBA induced mammary and skin carcinomas in experimental animals. *Mutation Research* (813), 45–51. Doi: org/10.1016/j.mrgentox.2016.11.010.
- Soccol, C.R., Bissoqui, L.Y., Rodrigues, C., Rubel, R., Sella, S.R.B.R., Leifa, F., Porto de Souza Vandenberghe, L. y Soccol, V.T. (2016). Pharmacological Properties of Biocompounds from Spores of the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes): A Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18(9), 757–767.
- Somintara, S., Leardkamolkarn, V., Suttiarporn, P., and Mahatheeranont, S. (2016). Anti-Tumor and Immune Enhancing Activities of Rice Bran Gramisterol on Acute Myelogenous Leukemia. *PLoS ONE* 11(1): e0146869. doi:10.1371/journal.
- Sridhar, S., Sivaprakasam, E., Balakuma,r R.and Kavitha, D.(2011). Evaluation of antibacterial and antifungal activity of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst fruit bodies extracts. *World J Sci Technol.* 1(6):8–11.
- Suárez-Arroyo, I.J., Loperena-Alvarez, Y., Rosario-Acevedo, R. y Martínez-Montemayor, M.M. (2017). *Ganoderma* spp.: A Promising Adjuvant Treatment for Breast Cancer. *Medicines*, (4)15. doi:10.3390/medicines4010015.
- Tang, Y.J. and Zhong, J.J.(2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microb Tech.*(31,20–8
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D1087-1093. doi:10.1093/nar/gkv1278
- Wang, H., & Ng, T. B. (2006). Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides*, 27(1), 27-30. doi:10.1016/j.peptides.2005.06.009
- Wang, X-C., Xi, R-J., Li, Y., Wang, D-M. and Yao, Y-J. (2012). The species identity of the widely cultivated *Ganoderma*, '*G. lucidum*' (Ling-zhi), in China. *PLoS ONE* 7(7): e40857. doi:10.1371/journal.pone.0040857.
- Welti, S., Moreau, P.A., Decock, C., Danel, C., Duhal, N., Favel, A. y Courtecuisse, R. (2015). Oxygenated lanostane-type triterpenes profiling in laccate *Ganoderma* chemotaxonomy. *Mycol Progress* (14):45. DOI 10.1007/s11557-015-1066-7.

Xu, Z., Chen, X., Zhong, Z., Chen, L., y Wang, Y. (2011). *Ganoderma lucidum* polysaccharides: Immunomodulation and potential anti-tumor activities. *Am. J. Chin. Med.*, (39), 15–27. doi: 10.1142/S0192415X11008610.

Yamaç, M. and Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharm Biol.* 44(9): 660–667.

Yue, Q.X., Song, X.Y., Ma, C., Feng, L.X., Guan, S.H., Wu, W.Y., Yang, M., Jiang, B.H., Liu, X., y Cui, Y.J. (2010). Effects of triterpenes from *Ganoderma lucidum* on protein expression profile of Hela cells. *Phytomedicine*, (17), 606–613.

Zeng, R.Y., Xia Luo, X., Wei, W., Yu, M.Y., Rui-Tao He, R.H., Xiao-Ping Zhang, X.P. and Zheng, L.Y. (2009). Antioxidant properties and antioxidant components of extracts from mushroom *Ganoderma sinensis*. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 7 (1): 75-82.

Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* (5), 263–274. doi:10.1038/nrc1586

Análisis de la Absorbancia y Transmitancia Espectral del Mucílago de *Salvia hispanica* L. para la Fotoprotección de la Piel

RAMÍREZ-GRANADOS, Juan Carlos †*, GÓMEZ-LUNA, Blanca E DÍAZ-PÉREZ, Cesar, GASCA-TIRADO, J. Ramón

Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, Avenida Ing. Javier Barros Sierra 201, 38140 Celaya, Gto

Recibido Enero 04, 2017; Aceptado Febreo 25, 2017

Resumen

En este trabajo analizamos algunas características espectrales del mucílago de semillas de *Salvia hispanica* L. (chía) para evaluar su capacidad para absorber radiación luminosa peligrosa para la piel humana. Para este propósito extrajimos, purificamos y secamos el mucílago de chía. Posteriormente, preparamos varias soluciones con diferentes concentraciones de este extracto soluble en agua. Analizamos las muestras de estas soluciones con un espectrómetro para determinar su absorbancia y transmitancia en el rango de 200 a 1000 nm. También caracterizamos un protector solar químico para propósitos de comparación. A través de estos espectros evaluamos si el mucílago de chía podría proteger a nuestra piel de la radiación ultravioleta. Además, discutimos la posibilidad de utilizar el mucílago de semillas de chía como ingrediente activo de origen orgánico en protectores solares con menos efectos negativos tales como el enrojecimiento, la hipersensibilidad y la intoxicación dado que este mucílago es un material inocuo con capacidad de mantener la piel hidratada por más tiempo.

Absorbancia, Transmitancia, Mucílago, *Salvia hispanica* L., Fotoprotección

Abstract

In this research work, we analyze some spectral characteristics of the mucilage extracted from seeds of *Salvia hispanica* L. (chia) to evaluate its capacity to absorb luminous radiation that is dangerous for the human skin. For this purpose, we extract, purify and dry the mucilage of chia seeds. Then, we prepare several solutions with different concentrations of this water-soluble extract. We analyze the samples of these solutions with a spectrometer to determine their absorbance and transmittance from 200 to 1000 nm. Also, we characterize a chemical sunscreen for comparison purpose. Through these spectra, we assess if the chia mucilage could protect our skin from harmful radiant energy, such as ultraviolet radiation. Also, we discuss the possibility of using the mucilage from chia seeds as an organic active ingredient in sunscreens with less negative effects for our skin such as irritation, hypersensitivity to the product, and intoxication given that this mucilage is an innocuous material capable of keeping the skin hydrated for a longer time.

Absorbance, Transmittance, Mucilage, *Salvia hispanica* L., Photoprotection

Citación: RAMÍREZ-GRANADOS, Juan Carlos, GÓMEZ-LUNA, Blanca E DÍAZ-PÉREZ, Cesar, GASCA-TIRADO, J. Ramón. Análisis de la Absorbancia y Transmitancia Espectral del Mucílago de *Salvia hispanica* L. para la Fotoprotección de la Piel. *Revista de Ciencias de la Salud*. 2017. 4-10: 13-22.

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: jramirez@ugto.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

Las personas estamos expuestas a la radiación luminosa proveniente del sol y de fuentes de radiación artificiales utilizadas en la industria, el comercio y en la vida cotidiana. Sin embargo, son bien conocidos los efectos negativos asociados a la exposición prolongada de la piel a ciertos tipos de radiación luminosa (DeFabo, 2004; González-Púmariega, 2009; Al Mahroos, 2002; Ryckaert, 1998; y Miyamoto, 1989).

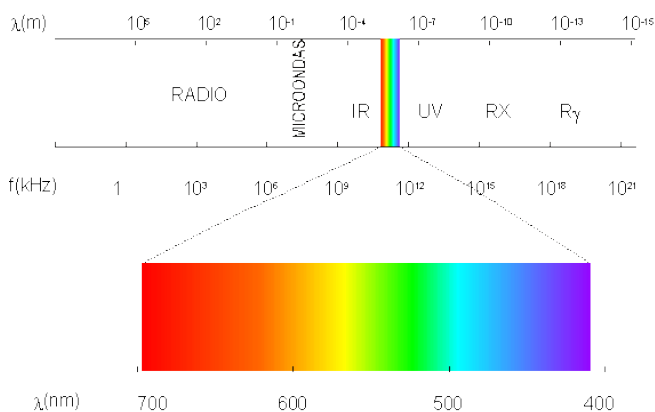


Figura 1 Espectro electromagnético. (Gómez & Olmos, 1999)

El sol emite diferentes tipos de radiación electromagnética que usualmente son clasificados en función de su longitud de onda (λ) o de su frecuencia (f), Fig. 1. El espectro electromagnético emitido por el sol corresponde al de un cuerpo negro e incluye a las ondas de radio, microondas, radiación infrarroja, luz visible, radiación ultravioleta (UV), rayos X, rayos gamma y rayos cósmicos. Cabe mencionar que no toda la radiación solar es peligrosa para nuestra piel. La energía radiante que puede causar daños temporales y permanentes en nuestra piel es la luz UV, los rayos X, los rayos gamma y los rayos cósmicos debido a que pueden ionizar los tejidos vivos. Aunque los rayos X, gamma y cósmicos son muy energéticos y dañinos para la piel, en el área de protección solar son de poca preocupación ya que estos tipos de radiación son absorbidos casi en su totalidad por la atmósfera terrestre.

En cambio, la radiación UV si puede propagarse a través de la atmósfera y llegar hasta nuestra piel. Los rayos UV constituyen cerca del 5% de la radiación solar y pueden subdividirse en UVA, UVB y UVC. De la radiación UV, aproximadamente el 97% es UVA, mientras que cerca del 2% es UVB. La radiación UVC representa menos del 1% de la radiación UV emitida por el sol. Existen dos clases de rayos UVA: cortos o UVA-I (320-340 nm) y largos o UVA-II (340-400 nm). La radiación UVA no puede ser filtrada con vidrio común y casi no se modifica con la altitud, ni con las condiciones ambientales.

Cerca del 50% de la radiación UVA que incide sobre la piel penetra hasta la dermis profunda y las células sanguíneas, y puede dañarlas. Además, los rayos UVA son responsables del fotoenvejecimiento, fotosensibilidad e inmunosupresión, aunque en dosis adecuadas también puede favorecer la síntesis de vitamina D (Debska et al., 2013). Por su parte, la radiación UVB, con longitud de onda entre 290 y 320 nm, es responsable de la mayoría de las reacciones fotobiológicas en la epidermis.

Los rayos UVB pueden causar eritemas o quemaduras solares. Más aun, grandes y prolongadas dosis de rayos UVB pueden causar melanomas y carcinomas en la piel, los párpados y los labios (Stoebner, 2007; Thompson, 1993; Wang, 2001; Whitmore, 1995; y Wulf, 1982).

La radiación UVC (<290 nm) usualmente no llega a nuestra piel ya que es absorbida casi en su totalidad por la capa de ozono, aunque ha empezado a tomar importancia en los últimos años debido a la progresiva disminución del espesor de esta capa (Sánchez-Saldaña, 2002). La radiación UVC tampoco es de mucho interés en el área de fotoprotección debido a su baja intensidad y a que es fuertemente absorbida por el ozono atmosférico.

También debemos considerar que la radiación solar que incide sobre nuestra piel es cada vez más intensa debido al adelgazamiento de la capa de ozono causado por la emisión de clorofluorocarbonos al aire libre. Por estas razones es importante proteger a nuestra piel de la radiación ultravioleta mediante el uso de protectores solares que sean eficaces, seguros y accesibles (Reena, 2012; y González-Púmariega, 2009). Es por esto que en este trabajo evaluamos la posibilidad de elaborar protectores solares con ingredientes activos de origen vegetal.

En nuestro caso seleccionamos al mucílago de semillas de *Salvia hispanica* L. como un posible ingrediente activo para elaborar protectores solares orgánicos. Las semillas de chía son ampliamente conocidas en México y el mundo por su inocuidad y beneficios para la digestión. Su mucílago es un polisacárido soluble en agua y con capacidad para retener la humedad; aparte de que contiene antioxidantes que ayudan a regenerar la piel. Además, la extracción de este material es relativamente fácil y de bajo costo. Estas características del mucílago de chía son méritos significativos para considerar su potencial uso como ingrediente activo en protectores solares orgánicos.

Aquí adaptamos e implementamos un método para la extracción del mucílago de semillas de *Salvia hispanica* L. También determinamos la absorbancia y transmitancia de varias soluciones acuosas con diferentes concentraciones de este mucílago con la finalidad de evaluar la factibilidad de emplearlo como ingrediente activo en protectores solares. Además, estudiamos las características espectrales de un protector solar químico con factor de protección solar (FPS) 50 para comparación. Medimos los espectros de transmitancia y absorbancia en el rango de 200 a 1000 nm, cubriendo las regiones UVA, UVB, UVC, visible y una porción del infrarrojo cercano.

Estas mediciones nos ayudan a comprender mejor las características espectrales del mucílago para determinar si es factible usarlo como ingrediente activo de protectores solares.

Justificación

Los protectores solares reflejan, dispersan o absorben la radiación ultravioleta incidente para disminuir sus efectos dañinos en la piel. Es decir, los protectores solares actúan como filtros que bloquean total o parcialmente los rayos UV. Existen dos tipos principales de protectores solares: físicos y químicos (DeBuys, 2000; Diffey, 2011; Latha, 2013; Scherschun, 2001).

Los protectores solares físicos están elaborados con materia mineral particulada. Estas sustancias reflejan o dispersan la radiación luminosa, incluyendo a la UV. Los ingredientes activos de los protectores solares físicos son inertes ya que no reaccionan con otros elementos y por lo tanto son inocuos. Sin embargo, actualmente su uso es limitado debido a los altos costos de producción.

Los protectores solares químicos son compuestos que absorben la radiación UV. La mayoría de ellos absorben rayos UVB y algunos también UVA. Sin embargo, los ingredientes activos de estos protectores son sustancias químicas sintéticas que al ser absorbidas por el cuerpo pueden causar intoxicaciones, alergias y otros problemas de salud (Schlumpf, 2004; Schmutzler, 2007; Al Mahroos, 2002; Bernerd, 2003).

Por lo anterior, consideramos que sería útil tener otras alternativas de fotoprotección que salvaguarden eficazmente a nuestra piel de la radiación UV y que causen menor daño a nuestro organismo (Saewan, 2013; y Stevanato, 2014). Por esta razón, evaluamos la posibilidad de utilizar materiales orgánicos como ingredientes activos de protectores solares que sean más seguros y accesibles en comparación con los protectores químicos y físicos.

Problema

Los protectores solares comúnmente empleados por las personas para proteger su piel están hechos con minerales particulados y compuestos químicos que pueden ser absorbidos por el cuerpo. Cuando estos protectores solares son usados de manera continua y prolongada existe la posibilidad de generar una leve pero progresiva intoxicación del organismo (Ramírez, 2014). Por esta razón, aquí investigamos la factibilidad de elaborar protectores solares hechos con ingredientes naturales de origen vegetal que bloqueen los rayos UVA y UVB, y que sean seguros y accesibles.

Hipótesis

Algunos materiales naturales, tales como el mucílago de semillas de *Salvia hispanica* L., absorben radiación solar con longitudes de onda dañinas para la piel y podrían usarse como ingredientes activos en protectores solares orgánicos que sean más seguros.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la factibilidad de emplear el mucílago de semillas de *Salvia hispanica* L. como ingrediente activo para la absorción de radiación luminosa en protectores solares orgánicos para la piel.

Objetivos específicos

- Extraer el mucílago de semillas de *Salvia hispanica* L. y preparar varias soluciones acuosas con diferentes concentraciones de este material orgánico.
- Medir la absorbancia y transmitancia espectral de las soluciones con mucílago en el rango de 200 a 1000 nm.
- Analizar la dependencia de la absorbancia y transmitancia de las soluciones con mucílago respecto a la longitud de onda y a la concentración.

Marco Teórico

El mucílago de *Salvia hispanica* L. es un polisacárido de alto peso molecular cuyo valor varía entre 0.8×10^6 y 2×10^6 Da (Capitani, 2013). Este mucílago emerge de la semilla de chía al entrar en contacto con el agua, cubriéndola en forma de un halo transparente. Cabe destacar que el contenido de ácido galacturónico es aproximadamente del 25%, lo cual es característico de este tipo de sustancias (Hernández-Gómez, 2008; y Sánchez-Silva, 2015). El mucílago de chía también presenta una elevada viscosidad en agua y tiene más efectos metabólicos benéficos que otras fuentes de fibra de menor viscosidad. Además, posee propiedades de interés para las industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas.

Aquí nosotros implementamos un procedimiento para extraer y purificar el mucílago de *Salvia hispanica* L. Después de obtener el mucílago preparamos varias soluciones con este material para determinar sus espectros de absorbancia y transmitancia (Skoog, 2008). La transmitancia (T) es la relación entre la cantidad de luz que llega al detector después de atravesar la muestra, I_t , y la cantidad de luz que incidió sobre ella, I_0 ; y se representa en porcentaje como:

$$\%T = \left(\frac{I_t}{I_0} \right) 100 \quad (1)$$

La transmitancia nos indica la proporción de radiación que logra atravesar una muestra a cierta longitud de onda (Brown, 2000). Es decir, la transmitancia es una medida física de la proporción entre la intensidad incidente y la transmitida por la muestra. Sin embargo, la relación entre %T y la concentración no es lineal, sino que asume una relación logarítmica inversa que está asociada de manera más estrecha con la absorbancia. La absorbancia (A) es un concepto más relacionado con la muestra puesto que indica la cantidad de luz que absorbe y se define como:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) \quad (2)$$

Cuando la intensidad incidente y la transmitida son iguales, la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a esa longitud de onda, y por lo tanto A es cero. Cabe mencionar que la cantidad de luz absorbida depende tanto del ancho de la muestra, como de la concentración del cromóforo.

Con las ecuaciones (1) y (2) es posible determinar el porcentaje de transmitancia y la absorbancia del mucílago a una cierta longitud de onda. Para determinar los espectros de transmitancia y de absorbancia en el rango de longitudes de onda deseado es necesario repetir las mediciones de manera manual o automática dependiendo del tipo de espectrómetro disponible. En las siguientes secciones presentamos detalles acerca de la preparación de las soluciones con mucílago y de la configuración experimental del espectrómetro que empleamos para realizar las mediciones.

Métodos y Materiales

Medimos la absorbancia y transmitancia espectral de varias soluciones acuosas con diferentes concentraciones de mucílago de *Salvia hispanica* L. para determinar si este material puede funcionar como ingrediente activo para la absorción de energía radiante en protectores solares para la piel. También caracterizamos un protector solar químico en crema con FPS 50 para fines comparativos.

Extracción del Mucílago de Semillas de *Salvia Hispanica* L

Para realizar la extracción y purificación del mucílago de semillas de chía adaptamos e implementamos un procedimiento previamente reportado por Capitani, 2013.

Este método consiste en hidratar las semillas de *Salvia hispanica* L. mediante su inmersión en agua a temperatura ambiente durante una hora y con agitación durante los primeros 15 minutos para evitar su aglomeración. La proporción de semillas de chía y agua que empleamos es 1:10 p/v. Posteriormente calentamos la mezcla a 50 °C durante 40 minutos.

Después, la mezcla es filtrada usando de una bomba de vacío para separar el mucílago acuoso de los tejidos vegetales. Luego precipitamos el mucílago con etanol y eliminamos la fase acuosa mediante filtración. Al final secamos el mucílago en un horno a 40 °C durante 24 horas y lo trituramos hasta obtener un polvo fino y seco.

Preparación y Análisis Espectral de las Muestras

Preparamos cinco soluciones con agua destilada y diferentes concentraciones del mucílago de semillas de *Salvia hispanica* L. La primera de las soluciones fue saturada con mucílago de chía a temperatura ambiente. Las demás soluciones fueron obtenidas diluyendo la primera al 50%, 25%, 12.5% y 6.25% del punto de saturación, respectivamente. Para realizar las mediciones colocamos aproximadamente 2 ml de cada solución en celdas de cuarzo para espectrómetro con 1 cm de ancho.

En el caso del protector solar químico preparamos una muestra que consiste en una capa homogénea de la crema entre dos portaobjetos. El espesor de esta muestra de crema protectora es de 0.05 mm. Luego medimos la absorbancia y transmitancia de las muestras empleando un espectrómetro Jenway 7503, Figura 2.

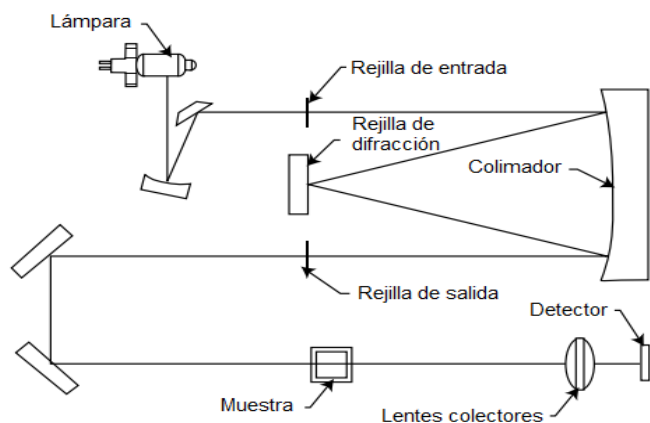


Figura 2. Esquema del espectrómetro empleado para la caracterización del mucílago de *Salvia hispanica* L. Este dispositivo es un espectrómetro de un haz que tiene un monocromador compuesto por una rejilla de difracción y un espejo colimador. (Adaptada de Cole-Parmer, 2010)

Este dispositivo es un espectrómetro de un haz que cuenta con una lámpara de xenón como fuente de luz y un monocromador que consta de rejillas de entrada y salida, un espejo colimador y una rejilla de difracción con 1200 líneas por milímetro. El espectrómetro también tiene un soporte para la muestra, un sistema de lentes colectoras y un fotodiodo como detector.

Medimos la absorbancia y transmitancia de las soluciones con mucílago y de la crema protectora química en el rango espectral de 200 a 1000 nm que incluye a las regiones UV, visible y una parte de la infrarroja cercana. La resolución de las mediciones es de 10 nm. Estas mediciones nos proporcionan un panorama general de las características espectrales de las muestras. A continuación, presentamos los espectros obtenidos.

Resultados

Utilizando un espectrómetro Jenway 7305 analizamos las muestras de mucílago de chía y del protector solar químico. En la Figura 3 presentamos los espectros de absorbancia de las soluciones con mucílago de *Salvia hispanica* L. y del protector solar químico.

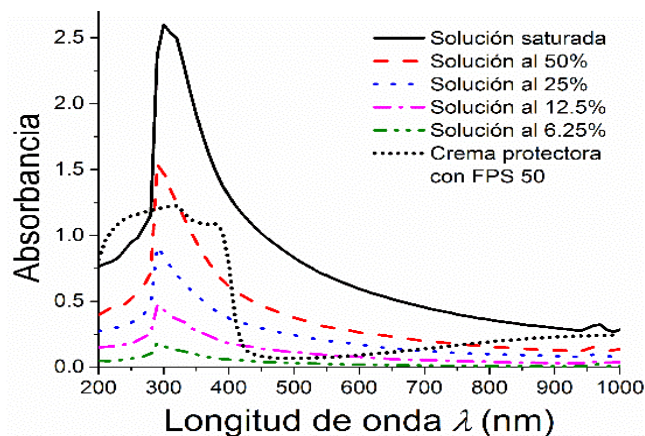


Figura 3 Absorbancia espectral del mucílago de semillas de *Salvia hispanica* L. en solución acuosa y de un protector solar con FPS 50

En esta figura podemos apreciar que el mucílago de chía tiene una fuerte banda de absorbancia en la región ultravioleta. La absorbancia del mucílago alcanza su máximo valor cerca de los 320 nm que es justamente la longitud de onda que separa a la radiación UVA de la UVB. La absorbancia de las soluciones con mucílago de chía disminuye conforme se incrementa la longitud de onda desde los 320 nm hasta los 1000 nm. El ancho de la banda de absorción a la mitad del máximo es aproximadamente de 100 nm para el caso de la solución saturada con mucílago. También es posible apreciar que la intensidad de esta banda de absorción se incrementa con la concentración del mucílago, lo cual es consistente con la Ley de Beer-Lambert.

La muestra del protector solar químico también presenta una banda de absorción en la región UV, como podría esperarse. Esta banda de absorción se extiende al menos desde 200 a los 400 nm. La absorbancia del protector químico es poco significativa para longitudes de onda visibles e infrarrojas cercanas. Cabe mencionar que la absorbancia de la solución saturada con mucílago de chía es mayor que la de la crema protectora química entre los 300 y 400 nm. Sin embargo, esta relación podría cambiar e incluso invertirse si la concentración del mucílago disminuye y/o el espesor de la crema protectora se incrementa.

Por otra parte, la Figura 4 nos muestra los espectros de transmitancia de las muestras. En esta figura podemos observar cinco espectros de transmitancia que corresponden a las soluciones con diferentes concentraciones de mucílago de chía, y un espectro de transmitancia correspondiente a la muestra del protector solar químico que empleamos para fines comparativos.

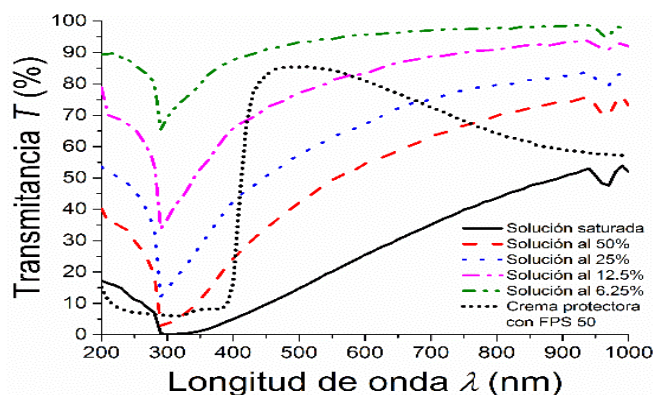


Figura 4 Transmitancia espectral del mucílago de semillas de *Salvia hispanica* L. en solución acuosa y de un protector solar con FPS 50

En los espectros de la Figura 4 es claro que la transmitancia de las soluciones disminuye en todas las longitudes de onda a medida que la concentración de mucílago aumenta. La solución saturada con mucílago es la que presenta menor transmitancia, la cual adquiere un valor cercano a cero para radiación luminosa con longitud de onda entre 290 y 330 nm. El mínimo de transmitancia para las otras soluciones con mucílago de chía se produce en ese mismo rango espectral.

La transmitancia del mucílago se incrementa con la longitud de onda entre los 330 y los 1000 nm. Lo anterior demuestra que el mucílago de chía puede reducir e incluso impedir la transmisión de la radiación UVA y UVB si su concentración es la adecuada. También encontramos que la transmitancia de una solución con mucílago de chía puede ser igual o incluso menor que la transmitancia de un protector solar químico comercial con FPS 50.

Esto puede ser verificado fácilmente si comparamos los espectros de transmitancia de la solución saturada con mucílago (línea negra continua) y de la muestra del protector solar químico (línea negra punteada) en la región UV entre 200 y 400 nm.

Discusiones

Los resultados obtenidos demuestran que el mucílago de *Salvia hispanica* L. es un material orgánico con capacidad para absorber radiación luminosa, en especial luz ultravioleta. Este mucílago presenta una fuerte y amplia banda de absorbancia justo en el límite entre la radiación UVA y UVB. Es decir, que este material tiene la capacidad de bloquear parcial o totalmente la radiación ultravioleta al dificultar y en algunos casos impedir su transmisión hacia la piel.

Estas características espectrales del mucílago de chía son especialmente útiles en el área de fotoprotección donde se busca la filtración de la radiación ultravioleta proveniente del sol o de fuentes artificiales para evitar daños en la piel (Latha, 2013; Reena, 2012; Diffey, 2011; Sánchez-Saldaña, 2002; Scherschun, 2001). Así pues, las características espectrales del mucílago de chía indican que este material de origen vegetal podría ser empleado como ingrediente activo para la absorción de radiación ultravioleta en protectores solares orgánicos para la piel.

Los resultados también indican que si una preparación tiene la concentración adecuada de mucílago de chía, entonces ésta puede llegar a tener igual o mayor capacidad para absorber radiación ultravioleta que un protector solar químico con FPS 50. Esto es importante dado que confirma que un protector solar elaborado con ingredientes orgánicos como el mucílago de chía puede tener un desempeño similar al de los protectores de tipo químico que son predominantemente empleados por las personas, pero con la ventaja de ser más seguros para los usuarios y para el medio ambiente.

Conclusiones

En este trabajo estudiamos la absorbancia y transmitancia espectral del mucílago de semillas de *Salvia hispanica* L. para determinar si puede ser usado como ingrediente activo en protectores solares orgánicos para la piel. Para este propósito preparamos cinco soluciones acuosas con diferentes concentraciones de mucílago de chía y las analizamos con un espectrómetro en el rango de 200 a 1000 nm para obtener una visión amplia de las principales características espectrales del mucílago.

También analizamos una muestra de un protector solar químico comercial con FPS 50 para comparar sus propiedades espectrales con las del mucílago de chía. En nuestros resultados encontramos que el mucílago de chía tiene una banda de absorbancia ancha con valor pico centrado entre las regiones UVA y UVB que es muy útil en fotoprotección dado que absorbe radiación ionizante que puede dañar la piel.

También encontramos que en la región UV, la solución saturada con mucílago de chía tiene absorbancia similar o incluso mayor que la muestra del protector solar químico, lo cual demuestra que el mucílago de chía puede ser tan eficiente como un protector solar químico. Estos resultados indican que el mucílago de *Salvia hispanica* L. es un material inocuo y de origen vegetal con capacidad para absorber radiación UVA y UVB que podría ser empleado como ingrediente activo en protectores solares orgánicos.

Estos protectores tendrían las ventajas de ser seguros para los usuarios por su inocuidad, de mantener hidratada la piel por más tiempo debido a su capacidad para retener la humedad, y de ser amigables con el medio ambiente por su baja huella ecológica.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Universidad de Guanajuato, la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado, y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Los autores también agradecen a Karla V. Solís Pérez y Paola Fernanda Magdaleno Medrano por su valiosa colaboración.

Referencias

Al Mahroos, M.; Yaar, M.; Phillips, T. J.; Bhawan, J. & Gilchrest, B. A. (2002). Effect of Sunscreen application on V-Induced Thymine Dimers. *Archives of Dermatology* 138: 11 1480-1485.

Bernerd, F.; Vioux, C.; Lejeune, F. & Asselineau, D. (2003). The sun protection factor (SPF) inadequately defines broad spectrum photoprotection: demonstration using skin reconstructed in vitro exposed to UV-A, UV-B or UV-solar simulated radiation. *European Journal of Dermatology* 13: 242-249.

Brown, C. (2000). Ultraviolet, visible, and near-infrared spectrophotometers. *Applied Spectroscopy Reviews* 35:3 151-173.

Capitani M. I. (2013). Caracterización y funcionalidad de subproductos de chía (*Salvia hispanica* L.), Aplicación en tecnología de alimentación. (Tesis Doctoral). Universidad de la Plata, Buenos Aires, Argentina, p. 204.

Cole-Parmer (2010). Jenway Spectrophotometer Model 7300 and 7305, Instruction Manual 730 005/REV F/01-17. Staffordshire, UK. p. 52.

Debska, O.; Kamińska-Winciorek, G. & Śpiewak, R. (2013). Does sunscreen use influence the level of vitamin D in the body? *Polski Merkuriusz Lekarski* 34: 368–370.

- DeBuys, H. V.; Levy, S. B.; Murray, J. C.; Madey, D. L. & Pinnell, S. R. (2000). Modern approaches to photoprotection. *Dermatologic Clinics* 18: 577–590.
- DeFabo, E. C.; Noonan, F. B.; Fears, T. & Merlino, G. (2004). Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer Research* 64: 6372–6376.
- Diffey, B. L. (2011). The impact of topical photoprotectants intended for daily use on lifetime ultraviolet exposure. *Journal of Cosmetic Dermatology* 10: 245–250.
- Gómez, J. A. y Olmos, J. J. (1999). Cuestiones y problemas de electromagnetismo y semiconductores. Servicio de Publicaciones de la Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- González-Púmariega, M.; Tamayo, M. V. & Sánchez-Lamar, A. (2009). La radiación ultravioleta: Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Theoria* 18: 69-80.
- Hernández-Gómez, J. A. & Miranda-Colin, S. (2008). Caracterización morfológica de chía (*Salvia hispánica*). *Revista Fitotecnia Mexicana* 31: 105-113.
- Latha, M. S.; Martis, J.; Shobha, V.; Sham Shinde, R.; Bangera, S.; Krishnankutty, B.; Bellary, S.; Varughese, S.; Rao, P. & Naveen Kumar, B. R. (2013). Sunscreening agents: A Review. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* 6: 16–26.
- Miyamoto, C. (1989). Polymorphous light eruption: successful reproduction of skin lesions, including papulovesicular light eruption, with ultraviolet B. *Photo-dermatology* 6: 69–79.
- Ramírez-Granados, J. C.; Gómez-Luna, B. E.; Ramírez-Granados, O. D.; Vargas-Rodríguez, L. & Veloz-García, R. A. (2014). Ultraviolet absorption of opuntia mucilage. En *Biotechnology Summit 2014*. Fabian Fernandez-Luqueño, Fernando López-Valdez y Susana Lozano Muñiz, (eds.), p. 106–109.
- Reena, R.; Sekar, S. C. & Srinivas, C. R. (2012). Update on photoprotection. *Indian Journal of Dermatology* 57: 335-342.
- Ryckaert, S. & Roelandts, R. (1998). Solar urticaria: A report of 25 cases and difficulties in phototesting. *Archives of Dermatology* 134: 71–74.
- Saewan, N. & Jimtaisong, A. (2013). Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3: 129–141.
- Sánchez Saldaña, L.; Lanchipa Yokota, P.; Pancorbo Mendoza, J.; Regis Roggero, A. & Saenz Anduaga, E. M. (2002). Fotoprotectores tópicos. *Revista Peruana de Dermatología* 12:156-163.
- Sánchez-Silva, C. A. (2015). Evaluación técnica comercial del aprovechamiento de la semilla de Chía (*Salvia hispánica* L.) para la elaboración de productos alternos. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias.
- Scherschun, L & Lim, H. W. (2001). Photoprotection by sunscreens. *American Journal of Clinical Dermatology* 2: 131-134.
- Schlumpf, M.; Schmid, P.; Durrer, S.; Conscience, M.; Maerkel, K.; Henseler, M.; Gruetter, M.; Herzog, I.; Reolon, S.; Ceccatelli, R.; Faass, O.; Stutz, E.; Jarry, H.; Wuttke, W. & Lichtensteiger, W. (2004). Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters: An update. *Toxicology* 205: 113–122.

Schmutzler, C.; Bacinski, A.; Gotthardt, I.; Huhne, K.; Ambrugger, P.; Klammer, H.; Schlecht, C.; Hoang-Vu, C.; Grüters, A.; Wuttke, W.; Jarry, H. & Köhrle, J. (2007). The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase. *Endocrinology* 148: 2835–2844.

Skoog, D. A.; Holler F. J. & Crouch S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning Latin America, 6^{ta} Ed. p. 1038.

Stevanato, R.; Bertelle, M. & Fabris, S. (2014). Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 69: 71-77.

Stoebner, P. E.; Poosti, R.; Djoukelfit, K.; Martinez & Meunier, J. L. (2007). Decreased human epidermal antigen-presenting cell activity after ultraviolet A exposure: dose-response effects and protection by sunscreens. *British Journal of Dermatology* 156: 1315–1320.

Thompson, S. C.; Jolley, D. & Marks, R. (1993). Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. *The New England Journal of Medicine* 329: 1147–1151.

Wang, S. Q.; Setlow, R.; Berwick, M.; Polsky, D.; Marghoob, A. A.; Kopf, A. W. & Bart, R. S. (2001). Ultraviolet A and melanoma: a review. *Journal of the American Academy of Dermatology* 44: 837–846.

Whitmore, S. E. & Morison, W. L. (1995). Prevention of UVB-induced immunosuppression in humans by a high sun protection factor sunscreen. *Archives of Dermatology* 131: 1128–1133.

Wulf, H. C.; Poulsen, T.; Brodthagen, H. & Hou-Jensen, K. (1982). Sunscreens for delay of ultraviolet induction of skin tumors. *Journal of the American Academy of Dermatology* 7: 194–202.

Modelo de Linfoma murino L5178Y en Fase Sólida

OROZCO-BAROCIO, Arturo, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA Salvador

Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA). Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, 44600 Zapopan, Jal

Recibido Enero 13, 2017; Aceptado 01 Marzo, 2017

Resumen

El ratón de laboratorio es un modelo importante para abordar las preguntas de la Biología del cáncer. En los últimos años, las preguntas se han vuelto más refinadas, y los modelos de ratón se están utilizando cada vez más para desarrollar y probar la terapéutica del cáncer. Así, la necesidad de modelos de ratones más sofisticados y clínicamente relevantes ha crecido, al igual que la necesidad de herramientas innovadoras para analizarlas y validarlas. En este estudio se presenta un modelo de Linfoma sólido a partir del Linfoma Murino L5178Y de origen ascítico, que permite establecer estados de inmunosupresión del ratón y nos permite valorar sus constantes fisiológicas, y parámetros inmunológicos para conocer la biología del Linfoma y probar fármacos de interés con propiedades inmunoestimulantes y quimioterapéuticas.

Modelo de cáncer en ratón, Linfoma, Inmunosupresión, L5178Y

Abstract

The laboratory mouse is an important model for addressing questions in cancer biology. In recent years, the questions have become more refined, and mouse models are increasingly being used to develop and test cancer therapeutics. Thus, the need for more sophisticated and clinically relevant mouse models has grown, as has the need for innovative tools to analyze and validate them. In this study we present a model of solid lymphoma from the Murine Lymphoma L5178Y of ascitic origin, which allows to establish states of immunosuppression of the mouse and allows us to evaluate its physiological constants and immunological parameters to know the biology of lymphoma and to test drugs of interest with immunostimulating and chemotherapeutic properties.

Mouse cancer models, Lymphoma, Immunosuppression, L5178Y

Citación: OROZCO-BAROCIO, Arturo, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA Salvador. Modelo de Linfoma murino L5178Y en Fase Sólida. *Revista de Ciencias de la Salud*. 2017. 4-10: 23-35.

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: arorozcob@prodigy.net.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

El uso de modelos de ratón en la investigación del cáncer ha proporcionado una visión excepcional de la biología y la genética de los cánceres humanos. Los ratones tienen las manifestaciones consistentes de la enfermedad, tienen camadas de buen tamaño y son fáciles de manejar, incluso genéticamente (Frese, et al 2007; Malumbres, 2015). La secuenciación genómica de los ratones ha revelado la magnitud de la similitud con otros mamíferos incluyendo el hombre (Mestas, et al 2004). Estos estudios genómicos, junto con el refinamiento en las técnicas de ingeniería genética, han aumentado grandemente el valor de los modelos del ratón en la investigación sobre cáncer y muchos otros trastornos humanos (Abate-Shen, et al 2014; Malumbres, 2015).

A pesar de su amplio uso en la investigación del cáncer, una cierta cantidad de escepticismo sobre su valor y relevancia para el cáncer humano está presente en la comunidad clínica y científica. Esto es probablemente debido a las diferencias entre los ratones y los seres humanos, los científicos son conscientes de que los modelos de ratón necesitan ser refinados aún más (Haley, 2003; Mestas, et al 2004).

Indudablemente estos sofisticados modelos de ratón alimentarán nuestra comprensión de la iniciación del cáncer, los roles del sistema inmunológico, la angiogénesis, invasión y metástasis tumoral, y la relevancia de la diversidad molecular observada entre los cánceres humanos (López-Lastra, et al 2017; Malumbres, 2015; Zitvogel, et al 2016). Es necesario recordar que los modelos de ratón son sólo eso, modelos. Ellos están destinados a complementar, no a reemplazar, los estudios realizados en humanos.

Sin embargo, estos modelos ofrecen oportunidades únicas para investigar los mecanismos biológicos del cáncer y optimizar el desarrollo de drogas antineoplásicas basadas en sistemas experimentales en los que se puedan estudiar las relaciones entre las células malignas y las células inmunológicas (Drake, 2013; Malumbres, 2015; Zitvogel, et al 2016).

La gran cantidad de investigación hecha en ratones ha permitido generar técnicas, métodos y estrategias para entender más la biología del cáncer, estas incluyen: a) Modelos de ratones genéticamente modificados (GEM), b) Modelos de cáncer trasplantado y c) Modelos de cáncer inducidos por carcinógenos. Cada uno de estos modelos presenta ventajas y desafíos (Zitvogel, et al 2016; Teicher, 2006; Marks, 2015).

Los más comúnmente usados son los modelos de cáncer trasplantado que incluyen diversos sistemas y técnicas para propagar los tejidos tumorales en diferentes hospederos para estudios controlados in vivo. Consisten en la inoculación de células cancerosas que pueden ser originadas del mismo ratón, conocidos como trasplantes allogénicos, o inoculación en ratones de células cancerosas de otra especie, principalmente del humano, a estos se les llaman trasplantes xenogénicos (Frese, et al 2007; Marks, 2015; Zitvogel, et al 2016).

Los primeros modelos de tumores in vivo fueron desarrollados a mediados de los años 60, estos modelos fueron leucemias murinas desarrolladas de forma ascítica. Estos bioensayos permitieron estudiar la distribución anatómica, la proporción de la proliferación de las células leucémica y los efectos de la quimioterapia en ratones con tumor, basados en el principio de que la sobrevivencia de los ratones con leucemia tratados con un fármaco se fundamentaba en la muerte y no en la inhibición del crecimiento de la población de células tumorales (Teicher, 2006; Waud, 1998).

La intención de desarrollar modelos de tumores sólidos en ratones fue para medir la eficiencia de fármacos que retrasaran o inhibieran el crecimiento del tumor, en dosis que produjeran toxicidad tolerable por el tejido normal y que la repuesta del tumor al tratamiento se pudiera observar durante un periodo relativamente largo (Polin et al, 2011; Teicher, 2006).

Los cánceres no sólo consisten en células tumorales, sino que comprenden una variedad de tipos de células que juntos forman el microambiente tumoral. Las células inmunes infiltradas son de especial interés debido a su papel paradójico en la progresión del cáncer. Mientras que algunas poblaciones de células inmunes tienen propiedades pro-tumorigénicas otras contrarrestan la tumorigénesis (de Viser et al, 2015; Polin et al, 2011). Muchos tumores son caracterizados por un microambiente tumoral inmunosupresivo, que lo hace desfavorable para la inmunidad antitumoral. Para establecer la inmunidad antitumoral efectiva, los antígenos asociados al tumor necesitan ser mostrados y procesados por Células Presentadoras de Antígeno (APCs por sus siglas en inglés).

Estos antígenos hacen madurar a las APCs que migran a los órganos linfoides que drenan el tumor donde los antígenos son presentados a las Células T. Estas células activadas, proliferan y migran hacia el tumor donde ellas ejercen su función citotóxica (DeNardo et al 2007; Hannahan et al 2012). Los tumores frecuentemente muestran un reclutamiento y activación disfuncional de las Células Dendríticas (DCs por sus siglas en inglés), que son las APCs más eficaces para iniciar las respuestas inmunitarias. Se ha observado que en algunos tumores las DCs presentan fenotipos inmaduros no activados (Pinzon-Charry et al, 2005).

Los factores derivados del tumor parecidos a Interleucinas 6 y 10 (IL-10, IL-6), Factor Estimulante de Colonias 1 (CSF1) y el Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) interfieren con la maduración de la DCs, causando la falla para migrar a los órganos linfoides que drenan el tumor, impidiendo proporcionar las adecuadas señales Co-estimuladoras necesarias para estimular las Células T (Pinzon-Charry et al, 2005; Kersten et al, 2015). Además de esta obstaculización, las Células T activadas ven interrumpido su acceso a la masa tumoral por la desorganización y deterioro de la vascularización y la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales (Shrimali et al, 2010). Otros factores que promueven la inmunosupresión en individuos con tumor son IL-3, IL-4, Factor de Crecimiento Tumoral beta (TGF β), el Interferón gamma (IFN γ) y la prostaglandina E2 que inhiben las funciones de las Células T, las respuestas humorales y las actividades de las Células Asesinas Naturales (NK) (Aso et al, 1992; Daneri-Navarro et al; Walker et al, 1992).

Objetivos

Objetivo General

Establecer un modelo de inmunosupresión de Linfoma Murino en Fase Sólida con el Linfoma Murino L5178Y que crece de forma ascítica, que nos permita valorar la sobrevida del ratón, las constantes hematológicas y bioquímicas, estimar pruebas inmunológicas y el desarrollo del tumor in vivo, así como evaluar la utilización de nuevas sustancias con propiedades antitumorales e inmunomoduladoras.

Objetivos Específicos

- Establecer la zona más adecuada para implantar el Linfoma murino L5178Y ascítico.
- Conocer el tiempo de sobrevida de los ratones con el linfoma en fase sólida.

- Valorar el desarrollo del tumor en ratones inoculados con el linfoma en fase sólida.
- Estimar la Respuesta Inmune Adaptativa de tipo Celular mediante el Índice de Proliferación de los esplenocitos de ratones sanos y con linfoma en fase sólida.
- Medir las concentraciones de los niveles séricos de la Interleucinas: Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), Interferón gamma (IFN γ) e Interleucina 2 (IL-2) de ratones sanos y con linfoma en fase sólida.
- Establecer los valores de los parámetros bioquímicos en suero de ratones sanos y con linfoma en fase sólida.
- Analizar las diferencias histopatológicas del tejido muscular con el Linfoma murino.

Material y Métodos

Ratones

Los ratones de la cepa Balb/c machos de 6 a 8 semanas de edad y con un peso de 22 a 25 g, fueron alojados y mantenidos en condiciones normales del laboratorio con ciclos de luz-obscuridad de 12/12 h con acceso libre a comida y agua estándar para roedores de acuerdo a las directrices para el uso y cuidado de animales de laboratorio de la World Medical Association Declaration of Helsinki (emanada por la 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000). Los protocolos del uso de animales fueron aprobados por el Comité de Ética del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (U de G).

Línea celular del Linfoma murino L5178Y

La línea celular del Linfoma Murino L5178Y fue derivada de un linfoma murino de origen tímico de los ratones de la cepa DBA/2 (h-2D/d), y fue mantenido en forma ascítica por inoculación intraperitoneal (i.p.) de 1×10^6 células semanalmente en ratones singénicos Balb/c (h-2D/d) (Fischer et al, 1957; McKinzie et al, 2017; Puebla-Pérez, et al 1998).

Establecimiento de la zona anatómica de inoculación del Linfoma en Fase Sólida

Se tomó 1 ml de células del Linfoma Murino L5178Y por punción peritoneal de un ratón con linfoma ascítico, de forma estéril, se lavaron y centrifugaron 3 veces con 5 ml de Solución Balanceada de Hanks's estéril a 1500 rpm. Se concentraron las células de linfoma en una suspensión de 1×10^7 /ml de Solución Balanceada de Hanks's estéril y se inocularon 100 μ l de la suspensión celular en los ratones en distintos lugares anatómicos tanto subcutáneos (espalda, pierna y el costado) como intramusculares (músculo gastrocnemio y sacrocaudal ventral), para valorar la mejor zona que nos permitiera evaluar el desarrollo del tumor y realizar las pruebas fisiológicas e inmunológicas. Para determinar el estado de inmunosupresión de los ratones; por cada zona se utilizaron 4 ratones.

Valoración de la Sobrevida de ratones con Linfoma Murino L5178Y

La tasa de sobrevida fue evaluada in vivo en 16 ratones inoculados con 1×10^6 células de linfoma en el músculo gastrocnemio derecho; al azar se formaron dos grupos con 8 roedores cada uno. A un grupo se les trató con 100 μ l Solución Balanceada de Hanks's estéril y al segundo grupo se les trató con 10 mg/Kg de peso corporal de un extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* (conocido comúnmente como Cuachalalate) disueltos en 100 μ l de Solución Balanceada de Hanks's estéril. Para ambos grupos el tratamiento se inició 48 hrs después de la inoculación del linfoma, y se administró diariamente por vía oral. Los ratones fueron observados diariamente, registrando el día de muerte de cada uno de ellos. El tiempo de sobrevida fue evaluado y representado por las curvas de sobrevida de Kaplan- Meier y la estimación de riesgo (ER) fue valorada con la siguiente fórmula (Fernández, 1995):

$$ER = \frac{\frac{\text{Observados del gpo Ctrl}}{\text{Esperados del gpo Ctrl}}}{\frac{\text{Observados del gpo Gano}}{\text{Esperados del gpo Gano}}} \quad (1)$$

Valoración del desarrollo del tumor en fase sólida

Se utilizaron 2 grupos experimentales de 8 ratones cada uno. Todos los ratones fueron inoculados con 1×10^6 células de linfoma suspendidas en 100 μ l de Solución de Hank's estéril en el músculo gastrocnemio derecho. Los ratones fueron tratados 48 hrs después del inóculo con 10 mg/Kg del extracto acuoso de Amphipterygium adstringens disuelto en 100 μ l de Solución de Hank's estéril, para el grupo experimental y el grupo control solo recibió 100 μ l de Solución de Hank's estéril. La vía de administración fue oral, con dosis diarias por 20 días. El volumen del tumor fue medido diariamente usando un vernier electrónico (Digimatic Caliper Mitutoyo Corporation, Japan), iniciando un día antes de la inoculación del linfoma y durante el tiempo del tratamiento. El volumen del tumor (en mm^3) fue estimado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Vol. Tumor (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Largo} \times \text{Ancho}^2}{2} \quad (2)$$

Determinación del Índice de Linfoproliferación ex vivo

Para determinar si la Respuesta Inmune de tipo Celular, en este modelo de inmunosupresión por el Linfoma Murino, fue modificada, se utilizaron 2 grupos experimentales de 4 ratones cada uno, el grupo de ratones sanos sin tumor, y el grupo con linfoma inoculados con 1×10^6 células de linfoma suspendidas en 100 μ l de Solución de Hank's estéril en el músculo gastrocnemio derecho. Se dejó que creciera el tumor por 20 días, al término del plazo los ocho ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajo el Bazo para realizar un cultivo primario de linfocitos. Estos son separados por un gradiente de densidad de polisucrosa (HISTOPAQUE 1083. SIGMA), mediante centrifugación diferencial.

Los linfocitos se cultivaron por 72 hrs, en una incubadora a 37° C y con el 5% de CO₂, con una densidad de 2×10^5 células por pozo, en placas de cultivo de 96 pozos (CORNING), se sembraron 6 pozos por bazo, 3 de ellos se cultivaron con medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA) adicionado con el 10% de Suero Fetal de Ternera, y a los 3 restantes, además del medio de cultivo se les agregó 5 mg de Concanavalina A (SIGMA), un mitógeno que estimula el desarrollo celular.

Al término del tiempo de replicación celular, se les agregaron 40 μ l de 3(4,5- dietildiazol- 2- il) 2, 5 difenil bromuro de tretazolio (MTT) disueltos en solución de buffer de fosfatos (PBS) a una concentración de 5 mg/ml) a cada pozo, se incubó durante 4 horas a 37° C y posteriormente se agregaron 160 μ l de Buffer de Lisis (SDS al 20% en N, N Dimetilformamida al 50% a pH 4.7). Posteriormente, se incubó a 37° C durante toda la noche y se leyó a 550 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan) (Hansen, et al 1989; Mossman, 1983). Se determinó el índice de Proliferación (IP) según el siguiente cociente:

$$IP = \frac{\text{Absorvancia de células con mitógeno}}{\text{Absorvancia de células sin mitógeno}} \quad (3)$$

Determinación de los niveles séricos de Interleucinas TNF α , IFN γ e IL-2

Para valorar la producción de las Interleucinas en suero, se utilizaron 2 grupos experimentales de 4 ratones cada uno, el grupo de ratones sanos sin tumor, y el grupo con linfoma inoculados con 1×10^6 células de linfoma suspendidas en 100 μ l de Solución de Hank's estéril en el músculo gastrocnemio derecho. Se dejó que creciera el tumor por 20 días, al término del plazo, a los ocho ratones, previamente anestesiados con 0.3 ml de Pentobarbital Sódico al 10%, se les obtuvo sangre por punción cardiaca y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y el suero fue colectado para detectar los niveles de TNF α , IFN γ e IL-2 mediante kits de ELISA de acuerdo a las indicaciones del fabricante (eBioscience).

OROZCO-BAROCIO, Arturo, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA Salvador. Modelo de Linfoma murino L5178Y en Fase Sólida. Revista de Ciencias de la Salud. 2017.

Identificación de los parámetros bioquímicos en suero de ratones sanos y con linfoma en fase sólida

Se utilizaron 2 grupos experimentales de 4 ratones cada uno, el grupo de ratones sanos sin tumor, y el grupo con linfoma inoculados con 1×10^6 células de linfoma suspendidas en 100 μ l de Solución de Hank's estéril en el músculo gastrocnemio derecho. Se dejó que creciera el tumor por 20 días, al término del plazo, a los ocho ratones, previamente anestesiados con 0.3 ml de Pentobarbital Sódico al 10%, se les obtuvo sangre por punción cardíaca (1 ml), se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y el suero fue colectado y almacenado en congelación (-20° C) para determinar los parámetros bioquímicos.

Los índices bioquímicos que se analizaron fueron: Glucosa, Urea Sérica, Creatinina Sérica, Bilirrubinas totales, Proteínas totales (Albumina y Globulina), Alanina transaminasa (ALT) y Aspartato transaminasa (AST), en un analizador UniCel DxC 600, marca Beckman Coulter.

Estudio Histopatológico del Linfoma Murino L5178Y en Fase Sólida

Se realizaron cortes histopatológicos de los tumores con 10, 15 y 20 días de desarrollo, para lo cual se tomó una biopsia de 1 cm³ del tumor y se fijó en Formalina al 30% por 3 días. Luego se incluyeron los tejidos en parafina para enseguida hacer los cortes de 5 micrómetros de espesor, colocarlos en portaobjetos, fijarlos y teñirlos con Hematoxilina y Eosina (H-E), finalmente se observaron a 5x, y 10x de magnitudes en un microscopio de luz Carl Zeiss.

Análisis Estadístico

Para los experimentos de sobrevida se utilizarán las pruebas de Kaplan – Meier y la Estimación de Riesgo con el estadístico $Ji^2 (X^2)$, para el desarrollo del tumor se utilizó la Comparación de Pendientes con el estadístico t de Student y para las pruebas del Índice de Proliferación, los niveles de interleucinas, los valores del recuento diferencial de Leucocitos y los parámetros bioquímicos sanguíneos se utilizó el Análisis de Varianza de una vía (ANOVA), y las Diferencia Significativas Mínimas (DSM). Todos los experimentos comparados a una significancia de $p \leq 0.05$.

Resultados

Establecimiento de la zona anatómica de inoculación del Linfoma en Fase Sólida

En los ratones a los que se les inoculó el tumor de forma subcutánea (espalda, pierna y flanco lateral) no tuvieron un buen desarrollo del tumor que nos permitiera examinar su desarrollo, ya que no se presentaron formación de masa tumoral, sino que a los 10 días \pm 2, los ratones presentaban manifestaciones del tumor ascítico y a los 15 días morían. Por otro lado, los ratones inoculados intramuscularmente, sí formaron una masa tumoral que se puede medir y palpar, solo que los inoculados en el músculo sacrocaudal ventral, a los 8 días se quedan inválidos de los cuartos traseros, parece que hay metástasis a la medula espinal.

Por el contrario, los ratones con la inoculación en el músculo gastrocnemio nos permite evaluar su desarrollo en volumen y valorar el daño sistémico sin que tenga metástasis a peritoneo por un tiempo suficiente (35 días) para su evaluación fisiológica e inmunológica, antes de morir. Por lo que las demás pruebas se realizaron en los ratones inoculados con 1×10^6 células del linfoma en el músculo gastrocnemio.

Estimación de la Sobrevida de ratones con Linfoma Murino L5178Y

La sobrevida de los ratones inoculados con 1×10^6 células de Linfoma Murino L5178Y en el músculo gastrocnemio derecho fue de 31 días, con un promedio de 28 días ($n = 8$), iniciando a morir el día 25 de desarrollo del tumor y muriendo, el último de los ratones, el día 31 (Fig. 1). Este modelo nos permite valorar la sobrevida y la estimación de riesgo de morir de los ratones, y nos permite evaluar los efectos de algún fármaco que quisiéramos probar como anticanceroso.

Para ilustrar esta condición graficamos los datos de sobrevida de ratones tratados con un extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate) una planta utilizada en México en el tratamiento de cáncer gástrico y otros padecimientos, obtenidos en nuestro laboratorio (Próspero –Ponce et al, 2016). La sobrevida de los ratones tratados con 10 mg/Kg de Cuachalalate fue significativamente mayor ($p < 0.05$) versus los ratones no tratados (Tumor S/T); el promedio de vida para el grupo tratado fue de 35 días. Por otro lado, la Estimación del Riesgo, para los ratones tratados es de 3.8, veces menos riesgo de morir por el tumor que los ratones no tratados (grafico 1).

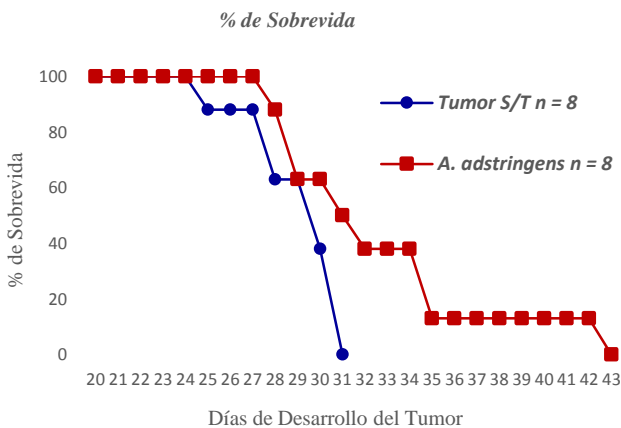


Grafico 1 % Sobrevida de ratones inoculados con 1×10^6 células de Linfoma L5178Y en fase sólida y tratados y no con 10 mg/kg de extracto acuoso de *A. adstringens* ($p < 0.05$)

Valoración del desarrollo del tumor en fase sólida

En cuanto al desarrollo del tumor, se ve claramente que el volumen del tumor crece más lento en los ratones tratados con 10 mg/kg de *A. adstringens* que el tumor de los ratones no tratados, hay una diferencia significativa ($p < 0.05$), en el desarrollo de los tumores de ambos grupos de roedores (grafico 2).

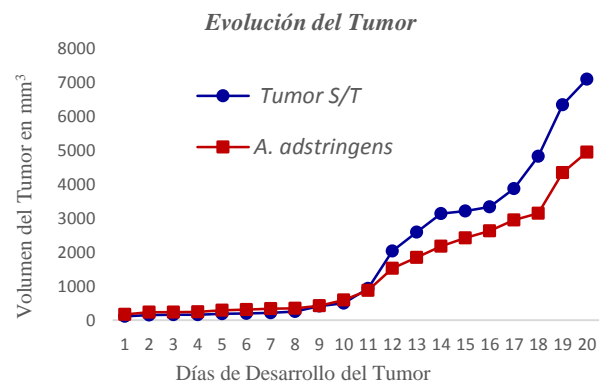


Grafico 2 Curva de desarrollo tumoral de ratones inoculados con 1×10^6 células de Linfoma L5178Y en fase sólida y tratados y no con 10 mg/kg de extracto acuoso de *A. adstringens* durante 20 días ($p < 0.05$), $n = 8$

Determinación del Índice de Linfoproliferación ex vivo

Al valorar el Índice de Proliferación observamos que el modelo de inmunosupresión del Linfoma murino L5178Y es eficaz, ya que reduce considerablemente la Respuesta Inmune de tipo Celular del ratón con Linfoma, en relación a los datos del IP del grupo de ratones sanos sin tratamiento y sin tumor, ($p=0.05$) (grafico 3)

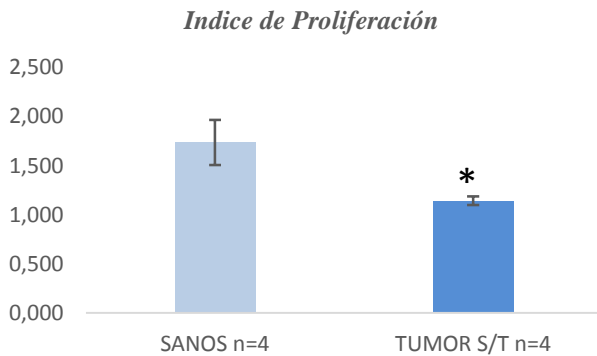


Grafico 3 Indices de proliferación de esplenocitos de ratones sanos e inoculados con 1×10^6 células de Linfoma L5178Y en fase solida con 20 días de evolución del tumor. Se grafican los promedios \pm DS. *Tumor vs Sanos ($p=0.05$)

Cuantificación de los niveles séricos de Citocinas TNF α , IFN γ e IL-2

La cuantificación de los niveles séricos de las Citocinas (pg/ml), mediante la técnica de ELISA, muestra que tanto los valores del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) como los del Interferón gamma (IFN γ) están incrementados significativamente ($p < 0.05$) en los ratones con tumor. Mientras que las concentraciones de la Interleucina 2 (IL-2) son iguales en ambos grupos (Tabla 1).

Citocina	gpo Sano	gpo Tumor S/T
TNF α	38.6 \pm 1.4*	64.6 \pm 4.2
IFN γ	199 \pm 6.1*	667.3 \pm 30.6
IL-2	65.8 \pm 9	68.6 \pm 14
* $p < 0.05$ Sanos vs Tumor		

Tabla 1. Valores séricos en pg/ml de Citocinas Promedio \pm DS (n =4)

Identificación los parámetros bioquímicos en suero de ratones sanos y con linfoma en fase sólida

Los resultados de los parámetros bioquímicos se muestran en la Tabla 2. La valoración de estos fue con la intención de ver posibles daños en órganos como Páncreas, Hígado y Riñones como resultado de las posibles metástasis del Linfoma. Como se observa los valores de Glucosa sanguínea no tienen cambios en ambos grupos, ni en los valores de Urea y Creatinina sanguínea, al igual que los valores de Bilirrubinas y Proteínas totales (Albumina y Globulina); en cambio los valores de las enzimas Transaminasas ALT y AST sí se ven alteradas ($p < 0.05$).

Parámetro	gpo Sano	gpo Tumor S/T
Glucosa	56.3 \pm 11	47 \pm 2.8 mg/dl
Urea	74.3 \pm 16	71.8 \pm 14.8 mg/dl
Creatinina	0.115 \pm 0.05	0.118 \pm 0.04 mg/dl
Bilirrubinas	0.38 \pm 0.06	0.30 \pm 0.08 mg/dl
Prot Totales	4.3 \pm 0.93	4.2 \pm 1.1 g/dl
ALT	34.3 \pm 10 *	65.5 \pm 11.1 UI/L
AST	122 \pm 20 *	1585 \pm 229 UI/L
* $p < 0.05$ Sanos vs Tumor		

Tabla 2 Cambios bioquímicos séricos Promedio \pm DS (n =5)

Valoración del estudio Histopatológico del Linfoma Murino L5178Y en Fase Sólida

En los cortes histológicos (Fig. 4 a – c) se observa como las fibras musculares van perdiendo su integridad tisular, conforme avanza el crecimiento del tumor, hasta desaparecer casi completamente (Fig. 4c). Por el contrario, el infiltrado de los linfoblastos del Linfoma crece conforme pasa el tiempo de desarrollo. En la figura 5 se muestra el tejido muscular íntegro de pierna de un ratón sano y la Figura 6 muestra un frotis de Linfoblastos del Linfoma murino L5178Y en estado ascítico.

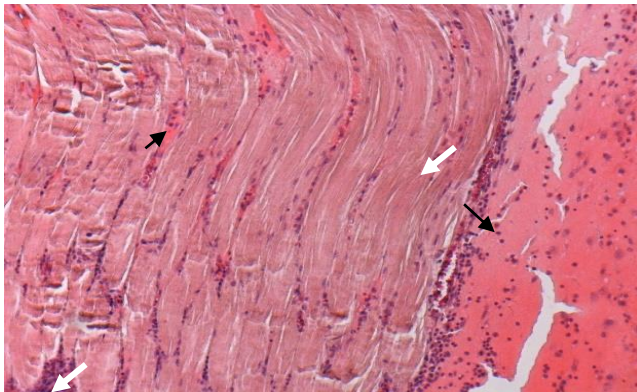


Figura 1 Corte histológico de la pierna con Linfoma L5178Y en fase sólida con 10 días de evolución del tumor (H-E, 10x). Las flechas negras indican el tejido muscular y las flechas blancas, el infiltrado linfoblástico

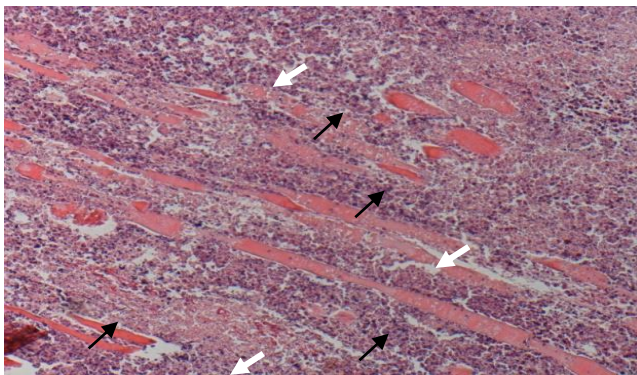


Figura 2 Corte histológico de la pierna con Linfoma L5178Y en fase sólida con 15 días de evolución del tumor (H-E, 10x). Las flechas negras indican el tejido muscular y las flechas blancas, el infiltrado linfoblástico.

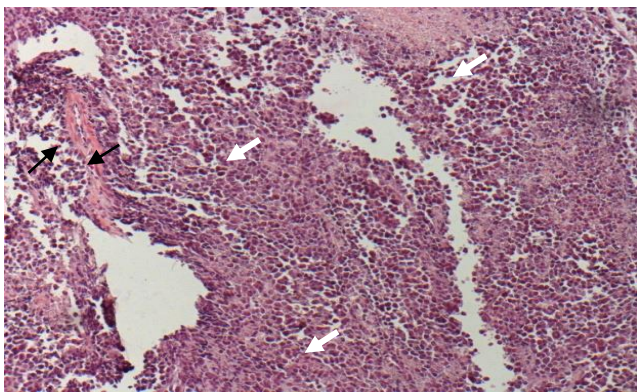


Figura 3 Corte histológico de la pierna con Linfoma L5178Y en fase sólida con 20 días de evolución del tumor (H-E, 10x). Las flechas negras indican el tejido muscular y las flechas blancas, el infiltrado linfoblástico.

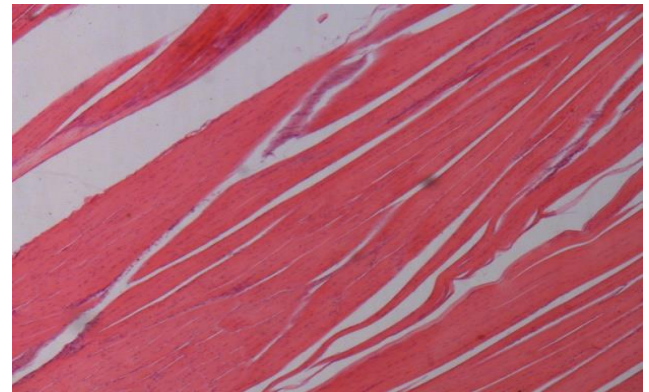


Figura 4 Corte histológico de la pierna de un raton sano (H-E, 10x). Se observan las fibras musculares íntegras

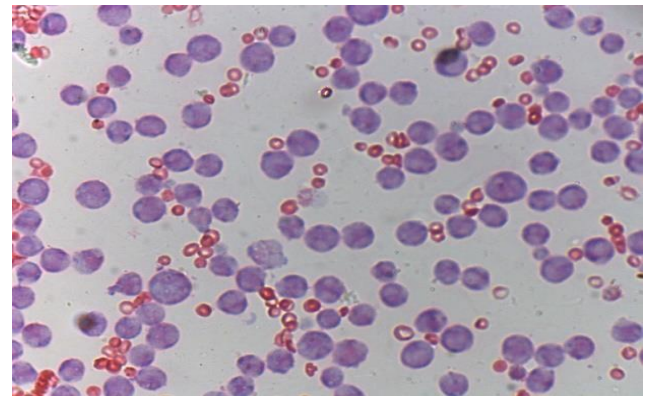


Figura 6 Frotis de linfoblastos del Linfoma Murino L5178Y en fase ascítica (H-E, 40x)

Conclusiones

El progreso en un campo dado a menudo depende en el desarrollo de modelos apropiados y precisos. En estos tiempos, la investigación del cáncer se ha enfocado a la búsqueda de tales modelos por más de 50 años. El problema principal en el desarrollo de estos modelos es que el cáncer son muchas enfermedades que surgen de casi todos los tejidos e invade a muchos más. Un avance importante para el modelo en la investigación del cáncer fue el desarrollo de tumores trasplantables de roedores (Abate-Shen et al, 2014, Malumbres, 2015; Marks, 2015).

Muchas de las primeras líneas tumorales fueron inducidas por carcinógenos, pero otras surgieron naturalmente en animales ancianos de cepas endogámicas de ratones. Estos tumores singénicos crecidos en hospederos endogámicos permitieron que se alcanzara la reproducibilidad del crecimiento del tumor, así como, la de la respuesta a agentes anticancerígenos. Estas líneas tumorales también permitieron el análisis de las metástasis tumorales en el hospedero (Frese et al, 2007; Marks. 2015; Teicher, 2011).

El origen del Linfoma L5178Y se remonta a la década de 1950 cuando sus primeros predecesores ex vivo fueron aislados de una neoplasia de ratones DBA/2 inducida por el 3-methylcholanthrene. La expansión clonal de una única célula de L5178 generó la línea de células en suspensión L5178Y (Fischer et al, 1957, Jaffe et al, 1957; Law et al, 1957; Mckinzie et al, 2017), que se ha mantenido en forma ascítica por inoculación intraperitoneal (i.p.) semanalmente de 1×10^6 células en ratones singénicos Balb/c (h-2D/d) (Daneri-Navarro et al, 1995; Puebla-Pérez et al, 1998).

El modelo ascítico del L5178Y es un buen modelo de inmunosupresión (Orozco-Barocio, 1998), pero su condición soluble permite que invada todos los órganos de la cavidad peritoneal y generar metástasis en estados tempranos, lo que impide que se puedan valorarse parámetros como la sobrevida, el crecimiento directo de la masa tumoral, elucidar el microambiente tumoral y parámetros bioquímicos e inmunológicos. En el presente estudio demostramos que el linfoma L5178Y inoculado en el músculo gastrocnemio es un buen modelo que permite evaluar la sobrevida y el crecimiento del tumor y comparar estos procesos en ratones tratados con algún fármaco de interés.

En los gráficos 1 y 2, se muestran los efectos en la sobrevida y en la disminución del crecimiento del tumor que ofrece la administración del extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens*. Ambos procesos biológicos no se podrían valorar en el modelo ascítico de L5178Y con tanta precisión, ya que, además en este experimento se pudo estimar el riesgo de muerte de 3.8 veces más en los ratones no tratados (Próspero-Poche, 2016).

Asimismo, la valoración del Índice de Proliferación (IP) de los esplenocitos de los ratones con el linfoma L5178Y sólido, al compararlo con el IP de los linfocitos esplénicos de los ratones sanos, mostró una inmunosupresión muy evidente ($p < 0.05$), (Gráfico 3) sin tener problemas de contaminación de linfoblastos en los cultivos celulares, y permite utilizarlo como modelo de inmunosupresión para estudiar los efectos de inmunostimulación de drogas de interés como extractos de plantas medicinales entre otras (Orozco-Barocio et al, 2013; Próspero-Ponce, 2016).

El crecimiento controlado del Linfoma en estado sólido en el músculo gastrocnemio, permite hacer tomas de muestra sanguínea y determinar los valores séricos de citosinas, que muestran el estado inmunológico del individuo. Las citosinas son moléculas de señalización producidas y secretadas, principalmente por las células inmunes activadas (Li et al, 2016). La IL-2 promueve la mitosis de las células T, aumenta la función citolítica de las células asesinas naturales (NK) y ayuda en la generación de anticuerpos (Rosenberg, 2014). En los cánceres, el aumento del IFN γ y el TNF α puede mejorar las funciones inmunes y las actividades antitumorales del cuerpo. El IFN γ puede inhibir la proliferación celular y el TNF α puede inhibir y destruir directamente las células tumorales (Chen et al, 2016). En los ratones con tumor se incrementó significativamente ($p < 0.05$) la producción del IFN γ y el TNF α con respecto a los ratones sanos, por el contrario la IL-2 no tubo diferencia entre ambos grupos.

Lo que indica que las células inmunes tratan de compensar el desarrollo tumoral con la producción de estas citosinas (Tabla 1). Por otro lado, los niveles séricos de las constantes bioquímicas (Tabla 2) muestran que, los ratones con un Linfoma sólido de 20 días de evolución, no presentan daño pancreático, ni renal, en cambio los parámetros que indican un posible daño hepático, tampoco están alterados a excepción de las enzimas Transaminasa, y que tanto la ALT y la AST también son secretadas a la sangre cuando hay un daño muscular. Por otra parte, los análisis histopatológicos muestran que el tejido muscular es completamente degradado, en el tumor de 20 días de evolución (Fig 4c) y que se ve esta gradual privación en los cortes histológicos de 10 y 15 días de crecimiento (Fig 4 a y b). Este daño muscular severo puede justificar las concentraciones séricas elevadas de las Transaminasas (ALT y AST).

Finalmente se puede concluir que este modelo de Linfoma sólido es bueno para estudiar los mecanismos biológicos del desarrollo tumoral y sus interacciones con los sistemas del individuo, además de probar fármacos de interés para valorar sus propiedades inmunoestimuladoras o citotóxicas, así como quimioterapéuticas (Kersten et al, 2015; Próspero-Ponce et al, 2016; Orozco-Barocio et al, 2013).

Agradecimiento

Este trabajo se realizó con el apoyo del programa de **Fortalecimiento de Cuerpos Académicos 2015**, de la Subsecretaría de Educación Superior, Dirección General de Educación Superior Universitaria de la SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA, MEXICO. Y del apoyo de P3E de la Universidad de Guadalajara.

Referencias

Abate-Shen, C. y Politi, K. (Ed). (2014). *Mouse models of Cancer. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Aso, H., Tamura, K., Yoshie, O., Nakamura, T., Kikuchi, S. y Ishida, N. (1992). Impaired NK response of cancer patients to IFN α but not to IL-2: correlation with serum immunosuppressive acidic protein (IAP) and role of suppressor macrophage. *Microbiol Immunol* (36), 1087-97.

Berovič, M., Habijanič, J., Zore, I., Wraber, B., Hodžar, D., Boh, B. and Pohleven, F. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *J Biotechnol*. (103), 77–86.

Chen, Q., Yang, L., Han, M., Cai, E. y Zhao, Y. (2016). Synthesis and pharmacological activity evaluation of arctigenin monoester derivatives. *Biomed Pharmacother*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.093>.

Daneri-Navarro, A., Del Toro-Arreola, A., García-Velazco, J.C., Del Toro-Arreola, S., Orbach-Arbouys, S. y Bravo-Cuellar, A. (1995). L-5178-Y lymphoma associated immunosuppression in Balb/c mice. *Biomed & Pharmacother* (49), 39-44

DeNardo, D.G. y Coussens, L.M. (2007) Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 9(4), 212. doi:10.1186/bcr1746.

De Visser, K.E., Eichten, A. y Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6(1), 24–37. doi:10.1038/nrc1782.

- Drake, A. (2013). Of mice and men: what rodent models don't tell us. *Cellular and Molecular Immunology*, (10), 284–285. doi:10.1038/cmi.2013.21
- Frese, K.K. y Tuveson D.A. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews Cancer*, (7), 645 – 658.
- Fischer, G.A. y Welch, A.D. (1957). Effect of citrovorum factor and peptones on mouse leukemia cells L-5178 in tissue culture. *Science* (126), 1018–1019.
- Gerber, S.A., Sedlacek, A.L., Cron, K.R., Murphy, S.P. et al. (2013). IFN-gamma mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor. *Am. J. Pathol.* (182), 2345–2354.
- Haley, P. J. (2003). Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology*, (188), 49 – 71.
- Hanahan, D. y Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21(3), 309–22. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E. and Berg, K. (1989). Re-examination and further develop of precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal Immunol Methods.* (119), 203-210.
- Jaffe, J.J., Handschumacher, R.E. y Welch, A.D. (1957). Studies on the carcinostatic activity in mice of 6-azauracil riboside (azauridine), in comparison with that of 6-azauracil, *Yale J. Biol. Med.* (30), 168–175.
- Kersten, K., Salvagno, C. y de Visser K.E. (2015). Exploiting the immunomodulatory properties of chemotherapeutic drugs to improve the success of cáncer immunotherapy. *Front. Immunol.* (6), 516. doi: 10.3389/fmmu.2015.00516.
- Law, L.W. y Shacter, B. (1957). Azaguaninedeaminase activity of several lymphocytic leukemias of mice. *J. Natl. Cancer Inst.* (18), 77–81
- Li, W., Tian, Y.H., Liu, Y., Wang, Z., Tang, S., Zhang, J. and Wang, Y.P. (2016). Platycodin D exerts anti-tumor efficacy in H22 tumor-bearing mice via improving immune function and inducing apoptosis. *J Toxicol Sci.* 41(3), 417-28. doi: 10.2131/jts.41.417.
- Lopez-Lastra, S. y Di Santo, J.P. (2017). Modeling Natural Killer Cell Targeted Immunotherapies. *Front. Immunol.* (8), 370. doi: 10.3389/fmmu.2017.00370
- Malumbres, M. (2015). Prefacio. En: Eferl, R. and Casanova, E. (Ed). *Mouse Models of Cancer. Methods and Protocols.* (pp v). Heidelberg Dordrecht, London: Humana Press Springer. ISBN 978-1-4939-2296-3 DOI 10.1007/978-1-4939-2297-0
- Marks, Ch. (2015). eMice electronic Models Information, Communication and Education. USA. National Institutes of Health (NIH). Recuperado de: <https://emice.nci.nih.gov/aam/mouse/transplantati on-mouse-models-1>
- McKinzie, P.B. y Revollo, J.R. (2017). Whole genome sequencing of mouse lymphoma L5178Y-3.7.2C. (TK+/-) reveals millions of mutations and genetic markers *Mutation Research* (814), 1–6.
- Mestas, J. y Hughes, C.W. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol*, (172), 2731-2738. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731
- Mossman, M. (1983). Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: aplication to proliferation and citotoxicity assays. *Journal Immunol Methods.* (65), 55 - 63.

Orozco-Barocio, A. (1998). Modulación de la respuesta inmune en ratones BALB/c con linfoma murino L5178Y tratados con acíbar de Aloe vera. (Tesis de Posgrado en Doctorado en Ciencias Biológicas). Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, Mex.

Orozco-Barocio, A., Paniagua-Domínguez, B.L., Benítez-Saldaña, P.A., Flores-Torales, E., Velázquez-Magaña, S. y Arreola Nava, H.J. (2013). Cytotoxic effect of the ethanolic extract of *Lophocereus schottii*: a mexican medicinal plant. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 10(3):397-404. <http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v10i3.2>

Pinzon-Charry, A., Maxwell, T. y López, J.A. (2005). Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol* 83(5), 451–61. doi:10.1111/j.1440-1711.2005.01371.x.

Polin, L., Corbett, T.H., Roberts, B.J., et al. (2011). Transplantable syngeneic rodent tumors: solid tumors in mice. En: Teicher, B.A. (Ed). *Tumor models in cancer research.* (pp 43 –78). Totowa (NJ): Humana Press, Inc.

Próspero Ponce, D.L. (2016). Estudio del efecto de los extractos acuosos de *Amphipterygium adstringens* (schlecht.) Standl, (Cuachalalate) obtenidos mediante remojo, cocción e infusión; en el modelo de Linfoma Murino L5178Y en fase sólida. (Tesis de Pregrado en Licenciado en Biología). Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, Mex.

Puebla-Pérez, A.M., Huacuja-Ruiz, L., Rodríguez-Orozco, G., Villaseñor-García, M.M., Miranda-Beltrán, M.L., Celis, A. and Sandoval-Ramírez, L. (1998). Cytotoxic and antitumor activity from *Bursera fagaroides* ethanol extract in mice with L5178Y lymphoma. *Phytotherapy Research.* (12), 545-548

Rosenberg, S.A. (2014). Il-2: the first effective immunotherapy for human cancer, *J. Immunol.* (192), 5451–5458

Ruijun, W., Shi, W., Yijun X., Mengwuliji, T., Lijuan, Z, and Yumin, W. (2015). Antitumor effects and immune regulation activities of a purified polysaccharide extracted from *Juglan regia*. *Int J Biol Macromol.* (72), 771-775 doi: 0.1016/j.ijbiomac.2014.09.026.

Shrimali, R.K., Yu, Z., Teoret, M.R., Chinnasamy, D., Restifo, N.P. y Rosenberg, S.A. (2010). Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res.*70(15), 6171–80. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0153

Teicher, B.A. (2011). Prefacio. En Teicher, B.A. (Ed). *Tumor models in cancer research.* (pp v -vi). Totowa (NJ): Humana Press, Inc.

Teicher, B.A. (2006). Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther,* 5(10), 2435-2443
Walker, T.M., Yurochko, A.D., Burger, C.J. y Elgert, K.D. (1992). Cytokines and suppressor macrophages cause tumor-bearing host CD8+ T cells to suppress recognition of allogenic and syngenic MHC class II molecules. *J Leuk Biol* (2)52, 661-69.

Waud, W.R. (1998). Murine L1210 and P388 leukemias. En: Teicher B. (Ed). *Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials and approval.* (pp 59 –74).Totowa (NJ): Humana Press, Inc.

Zitvogel, L., Pitt, J.M., Daillère, R., Smyth, M.J. y Kroemer, G. (2016). Mouse models in oncoimmunology. *Nature Reviews Cancer,* (16), 759 – 753.

Una aproximación a las percepciones sobre género de las y los estudiantes de la Unidad Guaymas del Instituto Tecnológico de Sonora

MORENO-MILLANES, María Dolores †* & VALENZUELA-REYNAGA, Rodolfo

Instituto Tecnológico de Sonora

Recibido Enero 03, 2017; Aceptado Febrero 20, 2017

Resumen

Las Instituciones de Educación Superior (IES) están construyendo planes, programas y proyectos para fomentar la equidad de género y abatir las desigualdades. Este trabajo pretende conocer las percepciones que sobre la perspectiva de género tienen las y los estudiantes de los diferentes programas educativos de la Unidad Guaymas del Instituto Tecnológico de Sonora. Para ello se seleccionaron equipos de estudiantes representativos de todos los programas de nivel licenciatura conformando un grupo general de 34 estudiantes. Se les aplicó un instrumento y se desarrollaron dos actividades plenarios. Los resultados muestran que entre las y los estudiantes existe una percepción generalizada de la importancia de promover la igualdad de género; no hubo discrepancias entre mujeres y hombres con relación a los diferentes aspectos de la vida cotidiana y la equidad de género, con la excepción de los cuestionamientos relacionados con las relaciones afectivas de pareja, en este ámbito los hombres opinaron, en mayor medida que las mujeres, que es conveniente aparentar estar de acuerdo con la pareja para no discutir. Finalmente, es conveniente que las IES continúen fomentando entre los futuros profesionistas y tomadores de decisiones la cultura de la igualdad y equidad de género.

Género, percepciones, igualdad

Abstract

Higher Education Institutions are building plans, programs and projects to promote gender equity and reduce inequalities. This work tries to know the perceptions that the students have of the different educational programs of the Guaymas Unit of the Instituto Tecnológico de Sonora. To this end, teams of students representing all undergraduate programs were selected, forming a general group of 34 students. An instrument was implemented and two plenary activities were carried out. The results show that there is a generalized perception among the students of the importance of promoting gender equality; There were no discrepancies between women and men in relation to the different aspects of daily life and gender equity, with the exception of the questions related to the affective relationships of the couple, in this area, men thought, to a greater extent than women. That it is convenient to appear to agree with the couple not to argue. Finally, it is desirable that Higher Education Institutions continue to promote a culture of gender equality and equity among future professionals and decision makers.

Gender, perceptions, equality

Citación: MORENO-MILLANES, María Dolores & VALENZUELA-REYNAGA, Rodolfo. Una aproximación a las percepciones sobre género de las y los estudiantes de la Unidad Guaymas del Instituto Tecnológico de Sonora. *Revista de Ciencias de la Salud*. 2017. 4-10: 36-45.

*Correspondencia al Autor (mmoreno@itson.edu.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

La Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos (CPEUM) en su artículo primero establece que todas las personas habrán de gozar de igual manera de todos los derechos humanos y garantías individuales reconocidos tanto por esa Carta Magna como por los tratados internacionales de los cuales el país forme parte. Asimismo, el artículo cuarto declara la igualdad de hombres y mujeres ante la ley, por lo cual el Estado mexicano está obligado a garantizar el cumplimiento y protección de estos principios.

Mediante la firma y ratificación de tratados internacionales en los que se reconocen y establecen las obligaciones de respetar, promover, proteger, supervisar y garantizar los derechos de las mujeres México asume el compromiso global con relación a la perspectiva de género. Por citar algunas iniciativas que traspasan las fronteras nacionales, están la Convención Sobre la Eliminación de Todas las Formas de Discriminación Hacia la Mujer, el Pacto Internacional de Derechos Civiles y Políticos, el Pacto Internacional de Derechos Económicos Sociales y Culturales, la Convención Interamericana para Prevenir, Sancionar y Erradicar la Violencia contra la Mujer, entre otros más.

En este trabajo se expone un análisis de ciertas percepciones que las y los estudiantes de la Unidad Guaymas del Instituto Tecnológico de Sonora tienen con relación al ámbito de género. Particularmente dichas apreciaciones se han centrado en la igualdad de derechos y oportunidades entre hombres y mujeres, así como la evolución de estas relaciones a través del tiempo.

Justificación

Conocer cuáles son las percepciones que las y los estudiantes universitarios tienen en materia de igualdad de género habrá de permitir el establecimiento de las brechas existentes, si las hubiese, respecto de la necesidad de impulsar programas de estudios de género tendientes a disminuir las desigualdades entre hombres y mujeres.

Es decir, en la medida en que las y los estudiantes universitarios estuviesen en contacto permanente con políticas públicas orientadas hacia la creación de una cultura de la igualdad habría de esperarse que una vez egresados e insertos en el mercado laboral se presentase un efecto multiplicador con relación a que estos nuevos profesionistas estarían asumiendo decisiones y determinaciones bajo una perspectiva de género creando consecuencias positivas tanto en las empresas como en sus propias familias.

Con el propósito de conseguir el acceso y la visibilización de las mujeres respecto de la educación superior, se han generado propuestas para integrar la equidad de género en las instituciones educativas. Esta perspectiva suponía asegurar que el análisis de género y la aplicación del principio ético de la equidad estarían presentes en todos los procesos de toma de decisiones de las organizaciones Bonder (2004:13).

Problema

Azaola (2009) destaca que en el Informe Nacional Sobre Violencia de Género en la Educación Básica en México se expone que el 82.8% de las niñas ayuda a hacer la comida en sus casas, en tanto que sólo el 11.8% de los niños participa en esta tarea del hogar. El 85.8% de niñas lavan y planchan ropa, y esta actividad doméstica solo es atendida por el 14.2% de los niños. En términos más simples por cada ocho niñas que participan en estas labores de la casa hay un niño que también lo hace.

Por otra parte, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2015) 63 de cada 100 mujeres de 15 años y más manifestó haber sufrido algún episodio de violencia, ya sea por parte de su pareja o de cualquier otra persona. Las mujeres más expuestas a la violencia de cualquier son las que tienen una edad que fluctúa entre los 30 y los 39 años, pues de éstas el 68% ha enfrentado al menos una situación de violencia o abuso. Adicionalmente, 47 de cada 100 mujeres de 15 años y más que han tenido al menos una relación de pareja, matrimonio o noviazgo han sido agredidas por su actual o última pareja a lo largo de su relación. La violencia de pareja está más extendida entre las mujeres que se casaron o unieron antes de los 18 años (52.9%) que entre quienes lo hicieron a los 25 años o más (43.4%).

En el caso de las mujeres con dos o más uniones o matrimonios el nivel de violencia es mayor (54.6%), que entre aquellas que solo han tenido una unión o matrimonio (48.7%). Por otro lado, 32% de mujeres han sufrido violencia sexual por parte de agresores. Las tasas de defunciones por homicidio de mujeres más altas se ubican entre 13 y 6 defunciones por cada 100 mil mujeres. En promedio se estima que durante 2013 y 2014 fueron asesinadas siete mujeres diariamente en el país.

En 2016 el mismo INEGI realiza una publicación en la que estima que el 43.8% de las personas ocupadas registradas en la economía nacional en el año 2014 fueron mujeres y que éstas conformaron el 11.0% del total de personal ocupado en el sector construcción, el 34.4% del personal ocupado por la industria manufacturera, en el sector comercio al por menor la fuerza laboral femenina aporta el 51.3% del personal ocupado total. Asimismo, las mujeres participaron con el 47.9% del personal ocupado total en los servicios privados no financieros, tales como restaurantes, hoteles, contabilidad y auditoría, escuelas del sector privado, servicios legales y médicos, entre otros.

Esto representa casi la mitad del total del personal ocupado en estos sectores, el valor del trabajo no remunerado en las labores domésticas y de cuidados fue el equivalente al 18.0% del Producto Interno Bruto (PIB) en el año 2014 y por último cada 10 horas de carga total de trabajo remunerado y no remunerado realizadas por las mujeres, los hombres realizan 8.3 horas.

Desde una perspectiva más amplia, además de los datos estadísticos, se requiere que las instituciones educativas reconozcan los obstáculos y desventajas que viven las mujeres a causa de factores como la desigualdad acumulada históricamente, la doble jornada o los estereotipos de género; así como también la consecuente discriminación de que son objeto, se ésta intencional o no (Buquet, 2011).

En virtud de lo hasta ahora expuesto es conveniente conocer ¿cuáles son las percepciones sobre la perspectiva de género de las y los estudiantes inscritos en los diversos programas educativos de la Unidad Guaymas del Instituto Tecnológico de Sonora?

Hipótesis

Existen diferencias considerables entre las percepciones de las estudiantes y las apreciaciones que los estudiantes tienen con relación al ámbito de género.

Objetivos

Objetivo General

Analizar las percepciones que, sobre el ámbito de género, tienen las y los estudiantes de los distintos programas educativos de la Unidad Guaymas del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON).

Objetivos específicos

- Identificar los posicionamientos de las y los estudiantes con relación a cómo eran, cómo son y cómo serán las relaciones entre hombres y mujeres.
- Analizar las percepciones de las y los estudiantes con relación a los roles naturales y los que la sociedad ha asignado tanto a hombres como mujeres.

Marco Teórico

Es conveniente que los organismos internacionales socialicen con todo el mundo los conceptos, definiciones y alcances de la perspectiva de género para llegar a consensos teóricos y pragmáticos en la materia.

La Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO, 2012) asume por género a las construcciones socioculturales que diferencian y configuran los roles, las percepciones y los estatus de las mujeres y de los hombres en una sociedad. Asimismo, este organismo internacional define a la igualdad de género como la existencia de una igualdad de oportunidades y de derechos entre las mujeres y los hombres en las esferas privada y pública que les brinde y garantice la posibilidad de realizar la vida que deseen. Actualmente, se reconoce a nivel internacional que la igualdad de género es una pieza clave del desarrollo sostenible.

Género es un término derivado del inglés (gender), que entre las personas hispanoparlantes crea confusiones. En castellano género es un concepto taxonómico útil para clasificar a qué especie, tipo o clase pertenece alguien o algo; como conjunto de personas con un sexo común se habla de las mujeres y los hombres como género femenino y género masculino (Lamas, 2000: 2)

Equidad de género se refiere a la justicia en el tratamiento de hombres y mujeres, según sus necesidades respectivas. A partir de este concepto se pueden incluir tratamientos iguales o diferentes aunque considerados equivalentes en términos de derechos, beneficios, obligaciones y oportunidades. En el contexto del trabajo de desarrollo, una meta de equidad de género suele incluir medidas diseñadas para compensar las desventajas históricas y sociales de las mujeres (INSTRAW, 2007:20).

En el caso mexicano, la Ley general para la igualdad entre hombres y mujeres (2006) en su Artículo 5to fracción IV menciona como igualdad de género la situación en la cual mujeres y hombres acceden con las mismas posibilidades y oportunidades al uso, control y beneficio de bienes, servicios y recursos de la sociedad, así como a la toma de decisiones en todos los ámbitos de la vida social, económica, política, cultural y familiar.

Vílchez (2011) expone que igualdad de género es referirse a un objetivo contra una realidad de discriminaciones y segregación social. Éste es un problema universal, pero para comprender mejor los patrones y sus causas, y por lo tanto eliminarlos, conviene partir del conocimiento de las particularidades históricas y socioculturales de cada contexto específico. La igualdad de género es más que un objetivo en sí mismo. Es una condición previa para hacer frente al desafío de reducir la pobreza, promover el desarrollo sostenible y construir una buena gobernanza (NA, P. Ó., 2016).

Esta igualdad debería verse reflejada en cada ámbito de la vida cotidiana; sin embargo, se aprecian a nivel internacional áreas de oportunidad en esta materia. La Ley general de acceso de las mujeres a una vida libre de violencia (2007) define como violencia contra las mujeres a cualquier acción u omisión, basada en su género, que les cause daño o sufrimiento psicológico, físico, patrimonial, económico, sexual o la muerte tanto en el ámbito privado como en el público.

Actualmente las Instituciones de Educación Superior (IES) asumen temas de desigualdad, discriminación y violencia de género en la educación superior, como parte de sus principios fundamentales, dentro de sus estatutos, reglamentos, políticas y lineamientos para alcanzar la equidad de género, encaminados a la creación de valores en la comunidad estudiantil promoviendo actitudes para la homogenización de criterios (Bouquet, Cooper, Mingo & Moreno, 2013).

Un sistema educativo con perspectiva de género habría de impulsar como una de sus principales tareas la de transformar las relaciones de género mediante cambios positivos en actitudes, valores, procesos y normatividades.

Metodología de Investigación

En este apartado se señalan los sujetos de análisis, los materiales utilizados y el procedimiento empleado para el desarrollo del estudio.

Tipo de Investigación

Se trata de una investigación descriptiva y transeccional de carácter no experimental.

Sujetos

Estudiantes inscritos en todos los programas educativos de nivel licenciatura de la Unidad Guaymas. Es decir, Licenciatura en Ciencias de la Educación, Ingeniería en Software, Licenciatura en Administración de Empresas Turísticas, Licenciatura en Diseño Gráfico, Licenciatura en Contaduría Pública, Licenciatura en Psicología, Ingeniería Industrial y de Sistemas así como la Licenciatura en Administración. En total participaron 34 estudiantes, de los cuales 21 fueron mujeres y 13 hombres. Con relación a las edades de los participantes, el promedio es de 19.8 años para las mujeres y de 20.2 años para los hombres.

Materiales

Se utilizó un instrumento adaptado del empleado por Pérez et al. (2010) que consiste en 30 preguntas de tipo likert que se agrupan las categorías: sociocultural, relacional y personal. Además se utilizaron hojas de papel rotafolio, cartulinas, hojas blancas y marcadores para el desarrollo de dos actividades denominadas grupales en las que se plasmaron los pensamientos y apreciaciones de las y los estudiantes.

Procedimiento

Inicialmente, se indagó en los referentes bibliográficos pertinentes para obtener el soporte teórico y metodológico para la investigación.

Posteriormente se convocó a las y los estudiantes de los diferentes programas educativos de la Unidad Guaymas del ITSON.

Enseguida, se realizó un foro en el que, con la ayuda de un moderador, se explicó el propósito del evento con el fin de dar claridad a los participantes de las acciones que se desarrollarían.

A continuación, se aplicó el instrumento de recolección de datos que permitiría conocer el nivel de predisposición de las alumnas y los alumnos hacia la igualdad de género.

Asimismo, se realizó una dinámica en la que las y los participantes tendrían que plasmar sus principales ideas y pensamientos acerca de las relaciones entre los géneros en diferentes contextos en el tiempo (un escenario simulado de hace treinta años, un escenario actual y un escenario futuro a treinta años).

También se desarrolló una actividad por grupos de alumnas y alumnos en la que concluyeron en torno a los roles naturales y los que la sociedad ha impuesto tanto a hombres como a mujeres.

Finalmente, se procesó la información obtenida en el foro para generar los resultados que se exponen a continuación.

Resultados

En este apartado se exhiben los principales hallazgos localizados en la investigación. Cabe señalar que se destacan algunas de las principales percepciones con relación a ciertas afirmaciones que en el instrumento empleado se proponen. En el Gráfico 1 se observa que el 38% de los hombres encuestados se muestra completamente en desacuerdo al planteamiento de que las tareas domésticas las hacen mejor las mujeres, mientras que en un porcentaje menor, un 24% las mujeres se encuentran en completo desacuerdo con esta afirmación; además el 33% de ellas mismas se encuentra medianamente de acuerdo mientras que solo el 8% de los hombres encuestados coincidió absolutamente con tal aseveración.

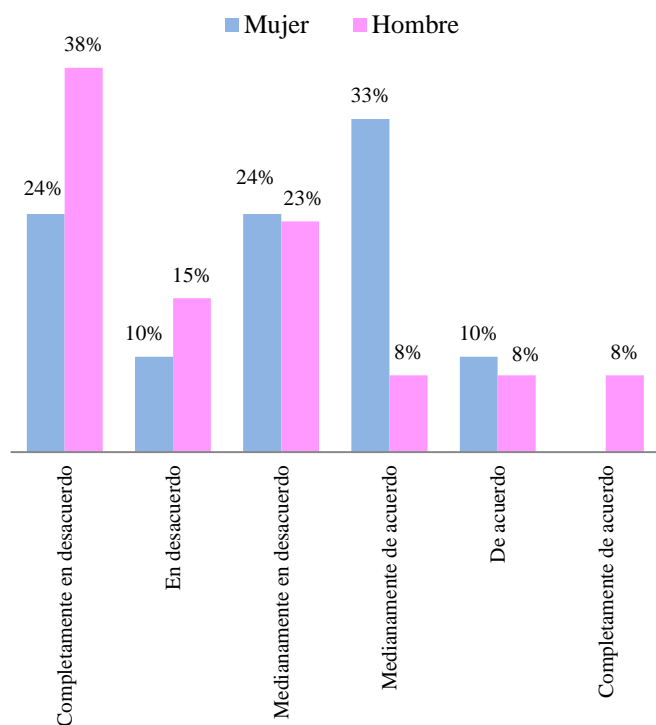


Gráfico 1 Percepción de las y los estudiantes respecto de la afirmación “las tareas domésticas las hacen mejor las mujeres”

Ante la enunciación “las ropas y cosas de color rosa son más para las chicas que para los chicos” en el Gráfico 2 se aprecia que el 31% de los alumnos se encuentra en completo desacuerdo y el 33% de las alumnas mostró el mismo posicionamiento. Esto podría interpretarse como, que a pesar de que la afinidad por los colores son estereotipos ligados desde el nacimiento de una persona, las y los estudiantes creen que no necesariamente esto debe ser así.

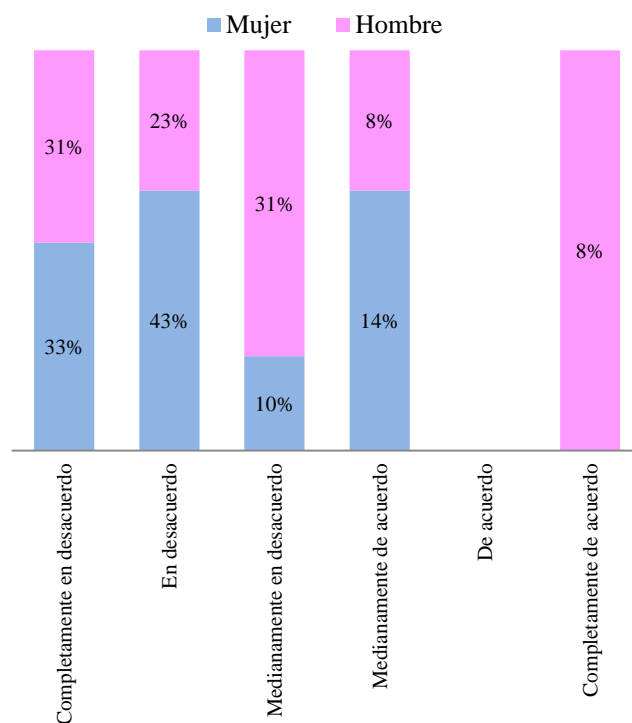


Gráfico 2 Percepción de las y los estudiantes respecto de la afirmación “las ropas y cosas de color rosa son más para las chicas que para los chicos”

En la Gráfica 3 se puede apreciar la afinidad a la aseveración de que el fútbol es un deporte para niños. Como completamente en desacuerdo y en desacuerdo se manifestaron el 92% de los hombres y el 90% de las mujeres. Esto muestra una percepción negativa ante un estereotipo que se consolidó a través de los años con relación a que ciertos deportes son exclusivos para hombres o para mujeres.

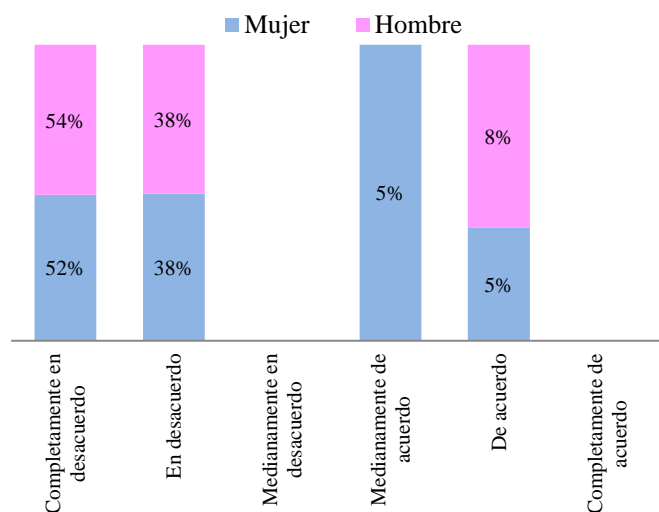


Gráfico 3 Percepción de las y los estudiantes respecto de la afirmación “el futbol es un deporte de niños”

Un 91% de las mujeres encuestadas se encuentra completamente en desacuerdo y en desacuerdo ante la afirmación de que es mejor aparentar estar acuerdo con la pareja para evitar discutir. Por otra parte solo el 68% de los hombres coincidía con las estudiantes. Mientras que el 16% de los hombres se inclinaron a contestar que están de acuerdo con la aseveración. Esto podría reflejar dejar al descubierto ciertos rasgos de machismo al suponer que la mujer debería ser sumisa ante su pareja (ver Grafico 4).

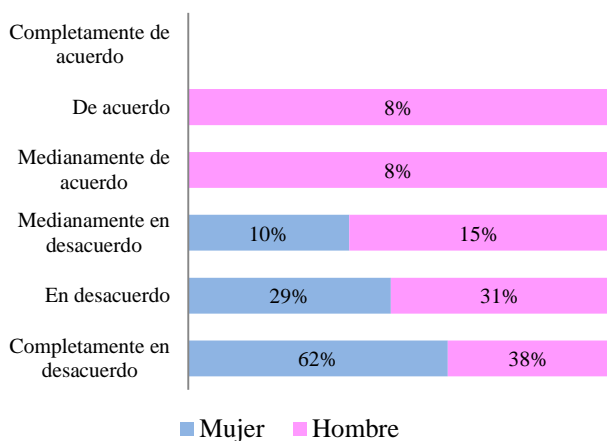


Gráfico 4 Percepción de las y los estudiantes respecto de la afirmación “con la pareja es mejor aparentar estar de acuerdo para no discutir”

Ante el planteamiento “los hombres siempre son más fuertes que las mujeres” en la Gráfico5 se aprecia que poco más del 60% de las y los estudiantes encuestados se muestran completamente en desacuerdo y en desacuerdo, existiendo aun un 16% de hombres que afirman estar de acuerdo con la formulación.

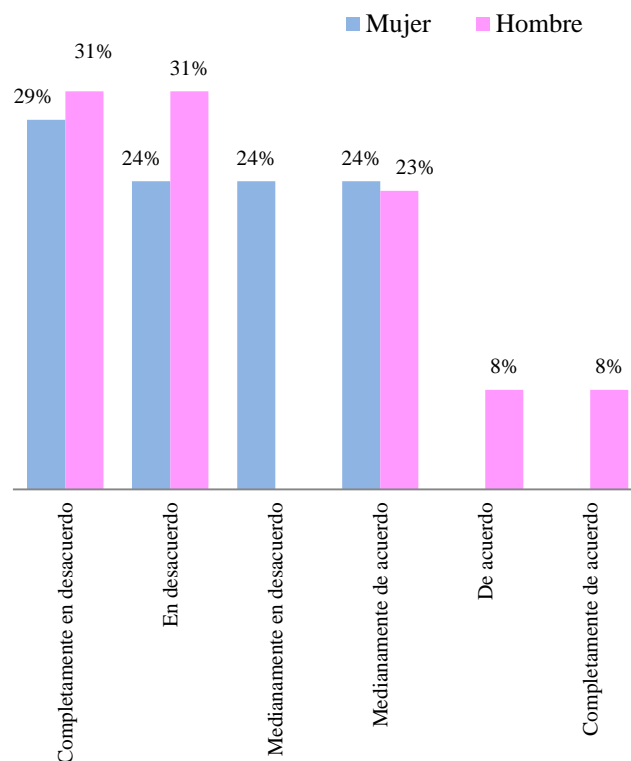


Gráfico 5 Percepción de las y los estudiantes respecto de la afirmación “los hombres siempre son mas fuertes que las mujeres ”

En la grafica 6 se observa que ante el señalamiento “me gusta que solo sea mi padre el que trabaja fuera de casa” el 100% de las y los estudiantes presentan afinidad a respuestas en sentido de desacuerdo ante dicha afirmación, mostrando con ello que tanto hombres como mujeres pueden salir de casa para conseguir los recursos necesarios para el sustento del hogar.

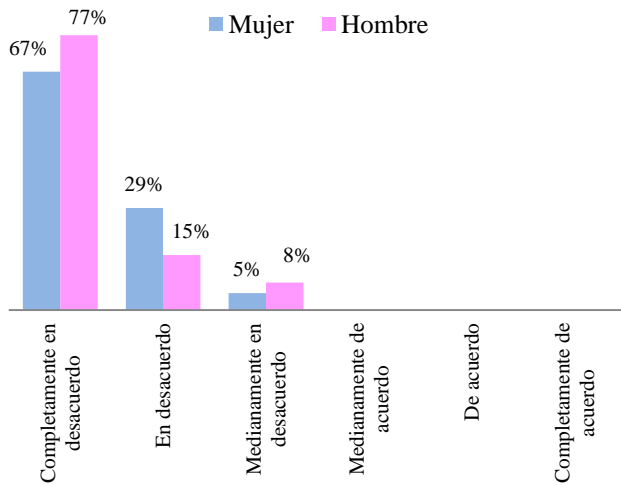


Gráfico 6 Percepción de las y los estudiantes respecto de la afirmación “me gusta que solo sea mi padre el que trabaja fuera de casa”

Con relación al señalamiento “creo que es preferible ser hombre que ser mujer, tiene sus ventajas” en la Gráfico7 se observa que el 100% de las estudiantes señalaron estar, en alguna medida, en desacuerdo y en el caso de los estudiantes las respuestas en el mismo sentido lo dieron el 92% de los encuestados.

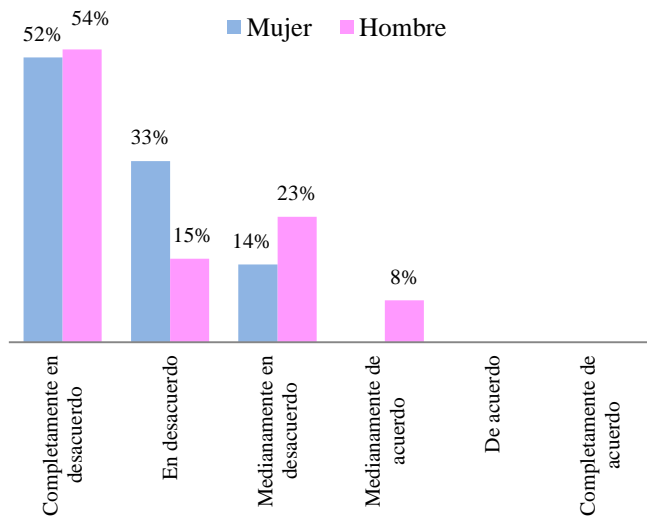


Gráfico 7 Percepción de las y los estudiantes respecto de la afirmación “Creo que es preferible ser hombre que ser mujer, tiene sus ventajas”

En la Tabla 1 se muestran las principales coincidencias de las y los estudiantes con relación a sus percepciones sobre la igualdad de género y su evolución a través del tiempo.

Hace treinta años	Actualmente	Dentro de treinta años
Las mujeres se casaban muy jóvenes	Hay mujeres que deciden no casarse y muchas de quienes lo hacen buscan su desarrollo profesional primero	Las diferencias de género serán casi inexistentes
Una gran cantidad de mujeres no terminaban sus estudios iniciales	Las mujeres tienen acceso y condiciones favorables para obtener grados académicos del más alto nivel	No habrá discriminación laboral
La mayoría de los hombres no realizaban labores domésticas ya que creían que era solo tarea de mujeres	Los hombres participan en las labores del hogar	Extensión de los estereotipos de género
		Mayor inclusión e igualdad
		La violencia y de género será severamente sancionadas
La vestimenta era muy conservadora	Hay discriminación en áreas educativas como ingenierías	La educación infantil se regirá bajo la premisa de concientizar sobre el respeto a los de más
Había mucha más manipulación hacia las mujeres por parte de los hombres	Falta de equidad en el salario pues ante las mismas responsabilidades un hombre puede percibir un sueldo mayor que una mujer	
Las preferencias sexuales diferentes a la heterosexual se consideraba una enfermedad mental	La vestimenta se rige más por las modas que por las costumbres	
	Aunque aun hay discriminación, ésta es menor con relación a la diversidad sexual	

Tabla 1 Avance de la igualdad de género desde la perspectiva de las y los estudiantes

Adicionalmente, las y los estudiantes expresaron lo que, de acuerdo a sus percepciones, son características y cualidades tanto de mujeres como de hombres (ver Tabla 2).

Características y cualidades naturales	
Hombres	Fuerza física, autoritarios, reservados, practicidad, directos, mayor tolerancia al estrés, ególatras, emocionalmente reprimidos, valientes, infieles.
Mujeres	Detallistas, vanidosas, leales, celosas, creativas, sensibles, madurez de pensamiento, perseverante, tímida, independientes

Tabla 2. Aspectos que caracterizan a hombres y mujeres según la percepción de las y los estudiantes

Conclusiones

Las percepciones que, en materia de género, tienen las y los estudiantes son semejantes entre sí. En ciertos casos aun se conservan estereotipos relacionados con observar la desigualdad como un aspecto natural.

Por otra parte, hay opiniones que permiten visionar un futuro mucho más equitativo e igualitario entre hombres y mujeres.

Finalmente, estos resultados afianzan la necesidad de que las IES continúen esforzándose en la transversalización de la perspectiva de género con el propósito de contribuir, positivamente, en la construcción de una sociedad que se aproxime, cada vez más, a principios de justicia y de eliminación de cualquier tipo de discriminación.

Referencias

Azaola, E. (2009). Informe nacional sobre violencia de género en la educación básica en México. *México, SEP/UNICEF*

Bonder, G. (2004). Equidad de género en ciencia y tecnología en América Latina: bases y proyecciones en la construcción de conocimientos, agendas e institucionalidades. *Washington DC: Oficina de Ciencia y Tecnología de la Organización de los Estados Americanos y la Comisión Interamericana de la Mujer de las Naciones Unidas.*

Buquet, C., (2011). *Transversalización de la perspectiva de género en la educación superior. Problemas conceptuales y prácticos.* Perfiles Educativos, 33.

Buquet, A., Cooper, J. A., Mingo, A., & Moreno, H. (2013). *Intrusas en la universidad.* Universidad Nacional Autónoma de México. Programa Universitario de Estudios de Género: Instituto de Investigaciones sobre la Universidad y la Educación.

De Diputados, C. (2006). Ley General para la igualdad entre hombres y mujeres.

De la Federación, D. O. (1917). Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. *México, recuperado de <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/doc/1.doc> (2007, 27 de mayo).*

De la Federación, D. O. (2007). Ley general de acceso de las mujeres a una vida libre de violencia. *February 1st, Mexico: Secretariat of Government.*

INEGI, (2015). *Estadísticas a propósito del día internacional de la eliminación de la violencia contra la mujer (25 de noviembre).* Datos nacionales, recuperado de <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/violencia0.pdf>

INEGI, (2016). *Estadísticas a propósito del día internacional de la mujer (8 de marzo).* Datos económicos nacionales, recuperado de http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/mujer2016_0.pdf

INSTRAW (2007), *Agenda desde lo local: descentralización estratégica para el desarrollo de lo local con enfoque de género,* Santo Domingo, Instituto Internacional de Investigaciones y Capacitación de las Naciones Unidas para la Promoción de la Mujer.

Lamas, M. (2000). Diferencias de sexo, género y diferencia sexual. *Cuicuilco*, 7(18).

NA, P. Ó. (2016). Igualdad de género

OFICINA, D. Naciones Unidas Para Los Derechos Humanos [ACNUDH] (2006). *Preguntas frecuentes sobre el Enfoque de Derechos Humanos en la cooperación para el desarrollo. Nueva York–Ginebra: Publicación de Naciones Unidas.*

Pérez, R. G., Catalán, M. A. R., García, O. B., González-Piñal, R., Sánchez, R. B., & Pinto, E. R. (2010). Actitudes del alumnado hacia la igualdad de género. *Revista de Investigación Educativa*, 28(1), 217-232.

UNESCO (2012). *Gente resiliente en un planeta resiliente*. 25 de mayo de 2017, de Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura Sitio web: <http://www.un.org/gsp/sites/default/files/attachments/Overview%20-%20Spanish.pdf>

Vílchez, J. J. G. (2011). *Igualdad de género*. Edutedis Formación.

Evaluación tisular “in vivo” del dimetilsulfóxido (DMSO) en el tejido ovárico y tegumentario de la rata adulta

MORÁN-PERALES, José Luis †*, OLVERA-HERRERA, Jasiel Evani, SÁNCHEZ-GARCÍA, Octavio, y HANDAL-SILVA, Anabella

Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción, Instituto de Ciencias / Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 4 Sur #104; Col. Centro C.P. 72000; Puebla de Zaragoza, Puebla, México

Recibido Enero 17, 2017; Aceptado Marzo 01, 2017

Resumen

Se evaluaron los efectos citotóxicos o inflamatorios del DMSO inyectado sobre el tejido ovárico de 14 ratas hembra adultas de la cepa CII-ZV o en la dermis de 2 ratas alopecicas hipotímicas. Se probaron soluciones de DMSO al 100%, 50%, 25%, 5% y 0%, inyectando 20µL en una de las bursas ováricas de los animales CII-ZV y 50 µL de las mismas soluciones en la piel dorsal de los animales alopecicos. Las necropsias se realizaron a las 24, 48 o 96h posteriores al tratamiento en el ovario y a las 2 o 24h en los grupos con inyección subcutánea. Los ovarios y la piel se procesaron para histología con hematoxilina-eosina. En los cortes se registraron todos los signos de alteración tisular o necrosis. El DMSO indujo signos de distensión en el sistema linfático y venoso solo al nivel de la médula ovárica, pero ninguno en los compartimentos de la corteza ovárica: folículos (teca y granulosa), cuerpos lúteos y gándula intersticial. La inyección subcutánea del DMSO tampoco mostró signos de inflamación ni de necrosis en la dermis. Aparentemente, el DMSO es un vehículo adecuado para la infiltración de fármacos insolubles en el tejido ovárico y en la piel de la rata.

DMSO, Necrosis, Inflamación, Dermis, Tejidos ováricos

Abstract

We evaluated cytotoxic or inflammatory effects of DMSO injected on ovarian tissue in 14 CII-ZV adult female rats or in dermis tissue of 2 alopecic hypothyroid mutant rats. We test 100%, 50%, 25%, 5% and 0% DMSO solutions interjecting 20µL into an ovarian bursa of CII-Zv rats and 50µL of same solutions in dorsal skin of alopecic rats. Necropsies were performed at 24, 48, or 96h after on ovarian treatments or at 2 and 24h after subcutaneous injections in alopecic animals. The ovaries and skin were processed by histologic hematoxylin-eosin stain. We registered all the alteration or necrosis signs in histological cuts. DMSO induced distention signs on lymphatic and venous vessels just in ovarian medulla but none cortical compartments: follicles (teca and granulosa), corpora lutea or interstitial gland. The subcutaneous injection of DMSO either showed none inflammation or necrosis signs in dermis. Apparently, DMSO is an optimal vehicle for insoluble pharmacologic drugs infiltration in rat ovarian tissues or skin.

DMSO, Necrosis, Inflammation, Dermis, Ovarian tissues

Citación: MORÁN-PERALES, José Luis, OLVERA-HERRERA, Jasiel Evani, SÁNCHEZ-GARCÍA, Octavio y HANDAL-SILVA, Anabella. Evaluación tisular “in vivo” del dimetilsulfóxido (DMSO) en el tejido ovárico y tegumentario de la rata adulta. *Revista de Ciencias de la Salud*. 2017. 4-10: 46-58.

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: moranperales@yahoo.com.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

Las membranas biológicas se caracterizan por su extremada selectividad, por lo que diversos solutos no pueden atravesarla libremente e incluso, ni siquiera alcanzan a interactuar con los lípidos y proteínas que la integran (Alberts et al, 2008). Muchos fármacos experimentales y de uso clínico certificado, debido a sus propiedades polares, tienen dificultad para realizar sus acciones al nivel de la membrana lo que obliga al incremento de las dosis y a tiempos de espera prolongados para que estos fármacos tengan las acciones y efectos esperados (Brunton et al, 2012). Por otra parte, se sabe que la matriz extracelular juega un papel preponderante en los mecanismos de reconocimiento y de inmunidad biológica (Alberts et al, 2008).

De acuerdo a lo anterior ¿Cómo se puede resolver el problema de la acción rápida de un fármaco activo para resolver un problema de salud? El vehículo que se utiliza como medio de transporte del fármaco puede ser la solución, pero también puede ser un problema.

El dimetilsulfóxido (DMSO; $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) es un líquido sin color, se ha usado como disolvente orgánico e industrial, criopreservante (Pegg, 2007), como un medicamento en la medicina veterinaria y humana (Parkin et al, 1997; Pope & Oliver, 1966) y en los últimos veinte años, en la innovación de tecnologías en Biología Molecular y Celular (Chakrabarti & Schutt, 2001). Descubierta por Alexander Saytzeff en 186, se obtiene como subproducto durante el procesamiento de la pulpa de madera para la fabricación de papel (Shirley et al, 1978). El gran potencial del DMSO como agente infiltrante lo hace una excelente opción para el uso en conjunto con fármacos activos cuya solubilidad en agua sea difícil.

Por ejemplo, existe un creciente interés en analizar el papel funcional de la matriz extracelular y de su extraordinaria selectividad; en este contexto el DMSO puede resultar de utilidad por sus propiedades anfipáticas. El presente trabajo muestra los efectos biológicos *in vivo* del DMSO en diferentes tejidos de la rata. Se analizaron sus efectos tóxicos directos cuando se aplica en tejidos vivos y se estimó su citotoxicidad por medio de histología convencional con microscopía de campo claro.

Justificación

Muchos fármacos y herramientas farmacológicas con actividad fisiológica y fisioterapéutica presentan problemas en su administración, debido particularmente a su insolubilidad. Frecuentemente, deben ser administrados en un vehículo irritante o tóxico. El DMSO es un solvente muy apropiado para esta clase de agentes insolubles en agua y que además presenta propiedades biológicas aún no estudiadas que podrían colocarlo como un disolvente adecuado para infiltrar fármacos que actúen directamente a nivel de la matriz extracelular.

Problema

¿Por qué aparentemente el DMSO que es significativamente menos tóxico y que puede ser utilizado comoreemplazo de otros disolventes, ya sea puro o en mezclas de disolventes seguros, es infrutilizado? Quizás la utilidad del DMSO no ha sido totalmente comunicada a aquellos en posiciones capaces de tomar decisiones sobre la selección de disolvente comercial, o tal vez se debe a "mitos de bioseguridad" que han rodeado DMSO durante varios años (Vignes, 2000). Las dosis más altas, soluciones más concentradas, una mayor frecuencia de exposición, o un período de exposición más largo puede producir uno o más de los efectos tóxicos observados en algunos estudios de laboratorio y clínicos, que incluyen:

La ampliación dermatitis eritematosa, el daño a la tejido epitelial de los pulmones después de la inhalación, efectos teratogénicos, aumento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas, cambios lenticulares en el ojo, hemólisis, y las indicaciones bioquímicas de hepatotoxicidad y nefrotoxicidad posiblemente, aunque este último podría ser un efecto secundario de la hemólisis inducida por DMSO (Smith et al, 1983).

Sin embargo, los límites de tolerancia del DMSO, no se han establecido para todas las condiciones de exposición. Además, existen documentos y reportes científicos que muestran datos que recomiendan su uso terapéutico en animales domésticos e incluso en humanos.

Hipótesis

La administración local del DMSO no tendrá efectos citotóxicos en la piel y tejido ovárico de la rata adulta.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar los efectos del DMSO aplicado localmente en diferentes concentraciones en la piel y tejido ovárico de la rata adulta.

Objetivos específicos

- Evaluar la citotoxicidad del DMSO aplicado localmente en diferentes concentraciones sobre los tejidos ováricos en ratas adultas.
- Evaluar la citotoxicidad del DMSO aplicado localmente en diferentes concentraciones en la piel de ratas adultas.

Marco Teórico

El DMSO es una molécula anfipática con un dominio altamente polar y dos grupos metilo apolares, por lo que es soluble tanto en los medios acuosos como en los orgánicos (Santos et al, 2002). La mayoría de las propiedades fisiológicas de DMSO parecen estar relacionadas con sus propiedades de penetración, su potencial para inhibir o estimular enzimas, para actuar como un eliminador de radicales libres, y su capacidad de causar la liberación de histamina. Estas propiedades se basan en gran medida en las características químicas de DMSO, incluyendo su afinidad a las uniones de hidrógeno, afinidad por el agua, la capacidad de intercambio con agua entre las membranas celulares, y la capacidad de reaccionar con moléculas orgánicas (Wexler et al, 2005).

Por su propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y las membranas celulares, el DMSO se ha propuesto como excelente acarreador de drogas o venenos, lo cual podría representar múltiples ventajas para el ensayo de los efectos de fármacos insolubles o hidrofóbicos. Se han documentado numerosos estudios de laboratorio que versan sobre las acciones farmacológicas primarias del DMSO, entre las que cabe mencionar: la penetración de la membrana celular, efectos sobre tejido conectivo, acción antiinflamatoria, analgesia, diuresis, mejora o reducción de la eficacia de otros medicamentos, inhibición de la colinesterasa, vasodilatación, relajación muscular, el antagonismo a la agregación plaquetaria, entre otras (Jacob & Herschler, 1983; 1986). El DMSO es uno de los disolventes más comunes para la administración in vivo de varias sustancias insolubles en agua. No está claro cómo la respuesta a una sustancia particular se ve alterada por el DMSO, pero en general se cree que actúa como un portador penetrante de sustancias a través de las membranas en todos los niveles de organización biológica.

Comunmente, el DMSO es usado en Medicina Veterinaria como linimento, sólo o en combinación con otros ingredientes, en este último caso el DMSO es usado como solvente para acarrear los otros ingredientes a través de la piel. Además, en caballos DMSO es usado vía intravenosa sin combinación o en combinación con otras drogas, para el tratamiento en el incremento de la presión intracraneal y/o edema cerebral (Schleining & Reinertson, 2007a; Schleining & Reinertson, 2007b).

Una de las preguntas más importantes acerca de cualquier terapia medicinal, es la seguridad. Las reacciones adversas a DMSO son relativamente leves y pueden producirse en relación con su concentración y su modo de administración (Jacob & De la Torre, 2009).

La toxicidad aguda de DMSO generalmente es baja en los animales. La DL50 en humanos es de 1800 mg/kg en piel y de 606 mg/kg por vía intravenosa. La DL50 por vía oral en la Rata va desde 14.5 a 28 g/kg y la DL50 dérmica por encima de 40 g/kg, por vía intraperitoneal e intravenosa la DL50 en ratones, ratas y perros supera los 15 g/kg. Se ha demostrado que dosis letales agudas en animales de experimentación pueden producir respiración rápida, inquietud, coma, hipertermia, y muerte rápida, o puede ocasionar la muerte después de varios días causada por insuficiencia renal. DMSO es un teratógeno experimental y también causa otros efectos reproductivos en animales de experimentación (Wexler et al, 2005).

No hay mayores antecedentes que puedan explicar la influencia de DMSO en acción como agente teratógeno debido a la diversidad en los procedimientos experimentales empleados y los tipos de anomalías que esos estudios indican (Smith et al, 1983).

Numerosos estudios han demostrado que el DMSO aumenta la permeabilidad de la piel en los seres humanos y animales (Astley & Levine, 1976; Baker, 1968; Malten & Den Arend, 1978; Mitryukovskii, 1970; Scheuplein & Ross, 1970; Sweeney et al, 1966). La concentración de DMSO determina el grado de cambio en la permeabilidad y la eliminación del disolvente en la recuperación parcial o completa (Astley & Levine, 1976).

DMSO es un solvente polar, fuertemente higroscópico, que muestra capacidad de solubilidad en agua y lípidos. La aplicación de esta sustancia a la piel resulta en la hiperhidratación de la capa córnea con el subsiguiente aumento de la permeabilidad. Mientras que no tiene efectos conocidos sobre las membranas plasmáticas, puede causar cambios en los filamentos de queratina, sus efectos in vivo son de corta duración (Brisson, 1974).

Metodología de Investigación

Material Biológico

Se utilizaron catorce ratas hembras adultas (90-120 días de edad; peso corporal 200-250 g) de la cepa CII-ZV y dos del mutante alopecico hipotímico, ambas cepas criadas y alojadas en el Bioterio Claude Bernad de la BUAP. Estos animales se mantuvieron en condiciones de iluminación controlada (14 h luz/10 h oscuridad) y con libre acceso al agua y al alimento (Figura 1).



Figura 1 Rata mutante alopecica hipotímica (Izquierda) y Rata CII-ZV (Long-Evans; Derecha); ambas cepas se crían en el Bioterio Claude Bernard de la BUAP

Soluciones de DMSO y Anestésicos

Preparación de las Soluciones de DMSO

A partir de un frasco de DMSO puro (100%) se realizaron diluciones en solución salina (NaCl 0.9%) al 50%, 25%, 5% y 1%.

Preparación del Anestésico (Ketamina-Xilacina)

Para preparar 10 ml de una mezcla de anestésico se utilizaron 3.75 ml de ketamina (100 mg/ml), 0.5 ml de xilacina (100mg/ml) y 5.75 ml de solución salina (NaCl 0.9%) (Gourdon, 2006). Los animales de los diferentes grupos experimentales recibieron una dosis con 0.2 ml de la mezcla o la dosis media con 0.1 ml de la mezcla por cada 100 gramos de peso corporal.

Grupos Experimentales

Inyección de las soluciones de DMSO

Con el fin de observar los efectos de la inyección local del DMSO sobre la citología del tejido infiltrado por el disolvente, animales intactos recibieron una inyección única de DMSO con cada una de las soluciones problema (100%, 50%, 25%, 5%) de la siguiente forma. Microinyección de las soluciones de DMSO dentro de la bursa del ovario: Para ello, se realizó una laparotomía dorso lateral en el ovario y se infiltraron 20 μ L de la solución en cada grupo experimental; esta inyección se realizó con una bomba automatizada de perfusión nanomolar (Figura 2).

Antes de iniciar el abordaje quirúrgico, se realizó la tricotomía en la zona a intervenir, una vez rasurada el área y llevado a cabo el proceso de asepsia, se realizó la antisepsia en la zona a incidir con gases impregnadas en una solución antiséptica. Se colocó al animal en decúbito lateral y se realizó una incisión de 1-1.5 cm paralela a la espina dorsal a una distancia de 1.5-2 cm caudales de la 13^o costilla.

La pared de músculo subyacente fue perforada 1.5 cm lateral a la espina. El ovario a tratar se localizó bajo el músculo dorsal, se exteriorizó y se aplicó la microinyección, el ovario fue reintroducido en la cavidad y se dio lugar a la sutura iniciando con la capa muscular y posteriormente la piel (Figura 2).

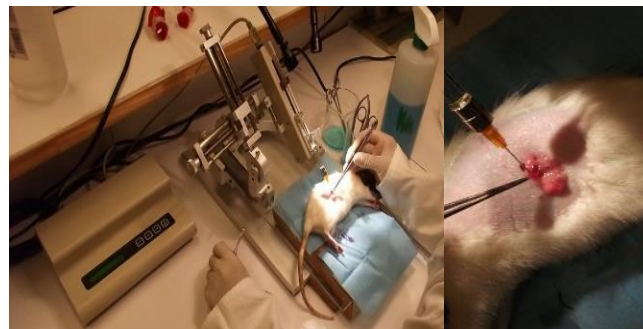


Figura 2 Imágenes que muestran cómo se realizó la técnica de la microinyección de 20 μ L diferentes disoluciones de Dimetil Sulfóxido (DMSO) dentro de la bursa ovárica

Con el objetivo de analizar los efectos agudos de DMSO a diferentes concentraciones los animales fueron repartidos en tres diferentes grupos experimentales, se realizó la disección de los tejidos a las 24, 48hrs y 96hrs después del tratamiento.

Inyección Subcutánea de DMSO

La inyección subcutánea es el método preferido para la administración de sustancias en la rata, esto se debe a la facilidad de la técnica de inyección y a una mayor posibilidad de elección del sitio de aplicación. En general las áreas dorsolaterales del cuello y hombros son los sitios de elección, otros sitios recomendados son los flancos y la espalda (CCAC, 1980).

Se usaron dos ratas de la cepa mutante alopecico hipotímico para la aplicación de las soluciones de DMSO por vía subcutánea, el tejido fue diseccionado a las 2 y 24 horas posteriores al tratamiento.

Inyección subcutánea de 50 μ L de las soluciones de DMSO en la piel del dorso en cada grupo experimental; la inyección subcutánea de las soluciones se realizó de acuerdo a la técnica de Wells y colaboradores (2000) (Figura 3).

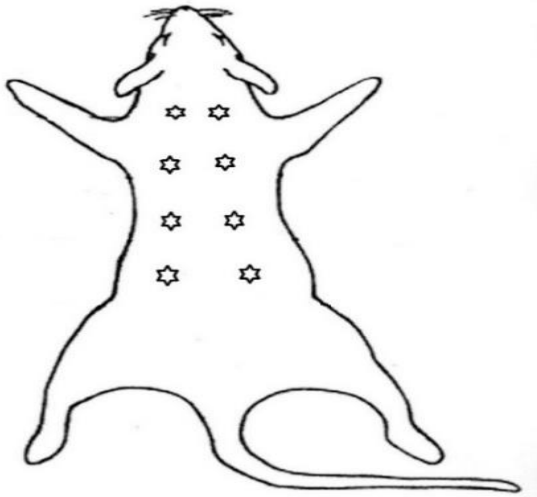


Figura 3 Ubicación de los sitios de la inyección subcutánea de DMSO de acuerdo al protocolo de Wells y colaboradores (2010)

Eutanasia, Autopsia y Fijación de Órganos

Todos los animales recibieron una dosis letal con pentobarbital sódico (80 mg/kg peso; i.p.). A la autopsia se disecaron la piel del dorso y los ovarios en los diferentes grupos experimentales. Los tejidos fueron colocados en solución de böuin y posteriormente procesados para histología en bloque de parafina. Todos los cortes fueron observados al microscopio.

Preparación para Inclusión de los Ovarios y Piel en Parafina

La preparación de los ovarios y la piel dorsal de los animales se realizó de modo convencional en bloques de parafina (Gaviño et al, 1992). Los bloques fueron cortados en serie a 10 μ m de grosor en un micrótopo de rotación RM-2125RT (LEICA Inc., USA) y extendidos en baño de flotación a 45°C.

Los cortes se colocaron en portaobjetos gelatinizados (Solución de gelatina para inclusión 3%) y numerados. Los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente en una cámara hermética de vapores de formol 37% durante 24 horas (Figura 4). Los cortes fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina (Luna, 1975) y montados en resina sintética. Los portaobjetos numerados permanecieron en una superficie plana dejándose secar a temperatura ambiente durante una semana. Al cabo de este periodo de secado, a cada portaobjetos se le eliminan los residuos de resina con un paño de algodón embebido con xilol.

Análisis Histológico

Los cortes histológicos de piel y de ovario se analizaron en microscopía de campo claro a 100X, utilizando un microscopio óptico *Leica CME*. Las fotografías que se muestran en el apartado de los resultados fueron obtenidas con una cámara digital conectada a una computadora.



Figura 4 Equipamiento para el corte histológico y el montaje de los cortes de la piel y del ovario de los animales utilizados en los experimentos

Análisis Estadístico

Se registraron todos los signos de necrosis, inflamación o cualquier indicio de daño tisular en los tejidos infiltrados con las soluciones del DMSO o el vehículo (testigo: solución de NaCl 0.9%).

Los datos de los signos de alteración tisular fueron analizados con la prueba de Probabilidad Exacta de Fisher, comparando al grupo testigo contra los demás tratamientos con DMSO. En todas las pruebas, se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad sea igual o menor al 5%.

Resultados

Histología del Tejido Ovárico

Para analizar los efectos de las distintas disoluciones con DMSO, se utilizó el modelo de la rata CII-ZV (Figura 1). La microinyección de solución NaCl 0.9% dentro de las bursas ováricas no indujo cambios al nivel de los componentes anatómicos de la gónada. Los capilares y vasos linfáticos y sanguíneos en los grupos control no mostraron signos de alteración notable respecto a un ovario intacto (Figura 5).

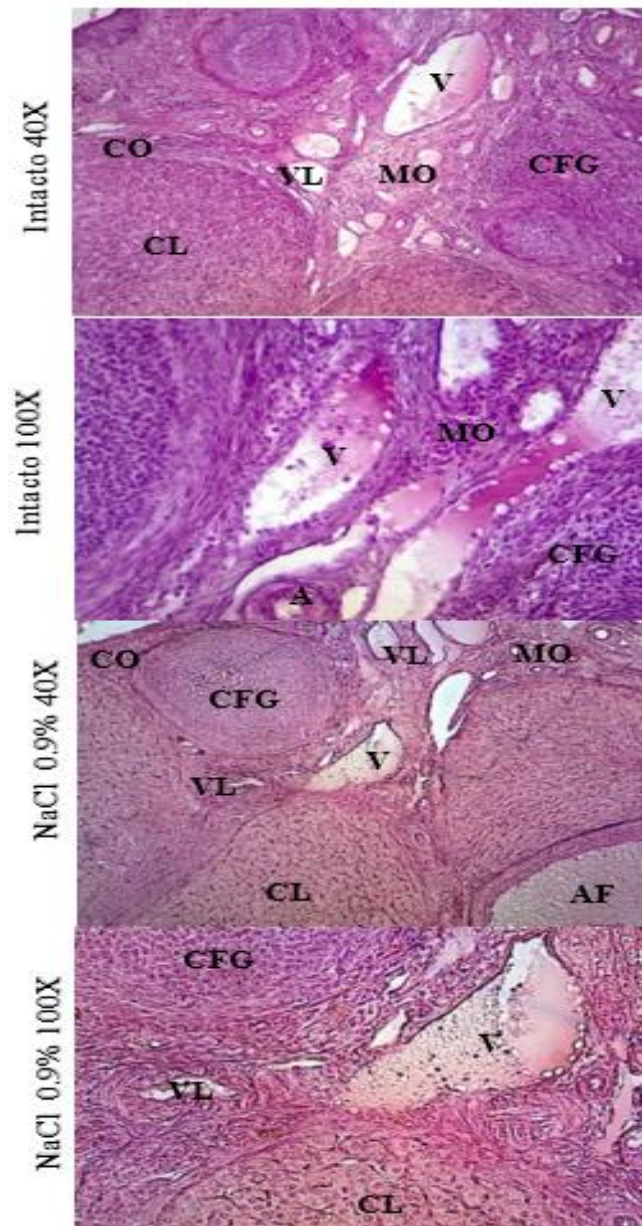


Figura 5 Efectos de la microinyección de 20 μ L de solución salina (NaCl 0.9%) dentro de las bursas del ovario de la rata CII-ZV comparado con el ovario de un animal intacto. MO: médula ovárica; CO: corteza ovárica; VL: vaso linfático; V: vena; A: arteriola; CL: cuerpo lúteo; CFG: células de la granulosa; AF: antro folicular.

En cambio, la microinyección con DMSO 100%, 50% y 25% mostró efectos sobre el sistema vascular y linfático que drena al ovario.

El tejido medular, mostró signos de distensión, sobretodo en el sistema venoso, mismos que indican una exacerbación en los mecanismos de limpieza y drenaje, pero sin alteraciones al nivel de las estructuras en la corteza ovárica; ni los folículos ni los cuerpos lúteos mostraron signos de alteración estructural ni necrosis. Estos efectos prevalecen incluso a las 96 h posteriores a la microinyección (Figura 6).

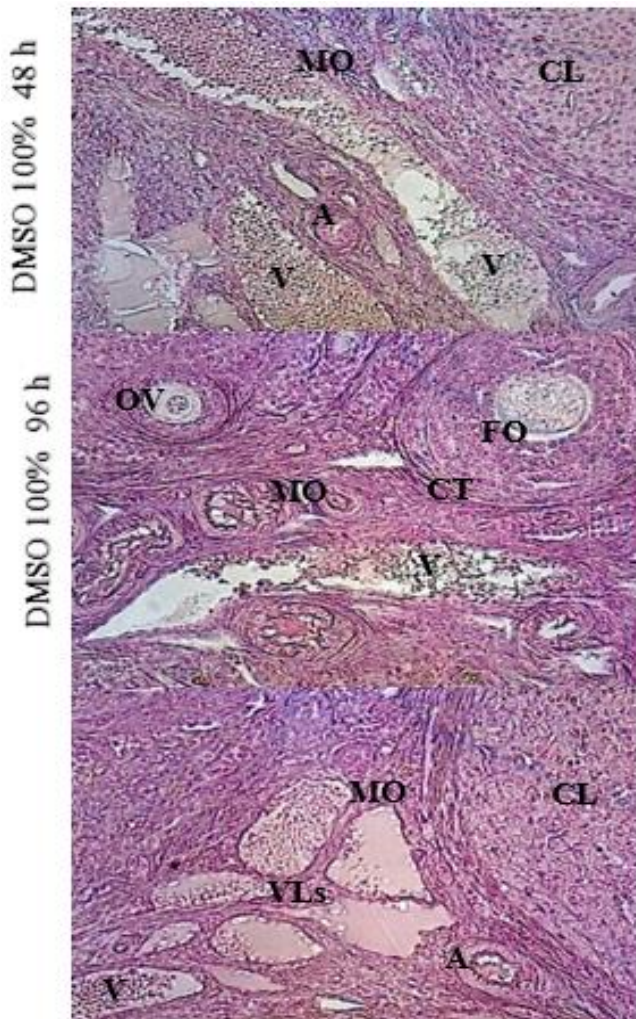


Figura 6 Imágenes a 100X de los efectos de la microinyección con 20 μ L de DMSO 100% en el tejido ovárico de la rata de la cepa CII-ZV. No se aprecian signos de alteración estructural ni de necrosis en la corteza ovárica. MO: médula ovárica; CT: céls. de la teca; VLs: vasos linfáticos; A: arteriola; V: vénula; CL: cuerpo lúteo; FO: folículo ovárico; OV: ovocito

La inyección de las disoluciones con DMSO 100%, 50% y 25%, tanto a las 2 horas como a las 24 horas posteriores a la inyección subcutánea, no mostraron signos de irritación, distensión o necrosis en diferentes órganos de la piel. En la Figura 7, se muestran algunas imágenes del tratamiento con el DMSO al 100%.

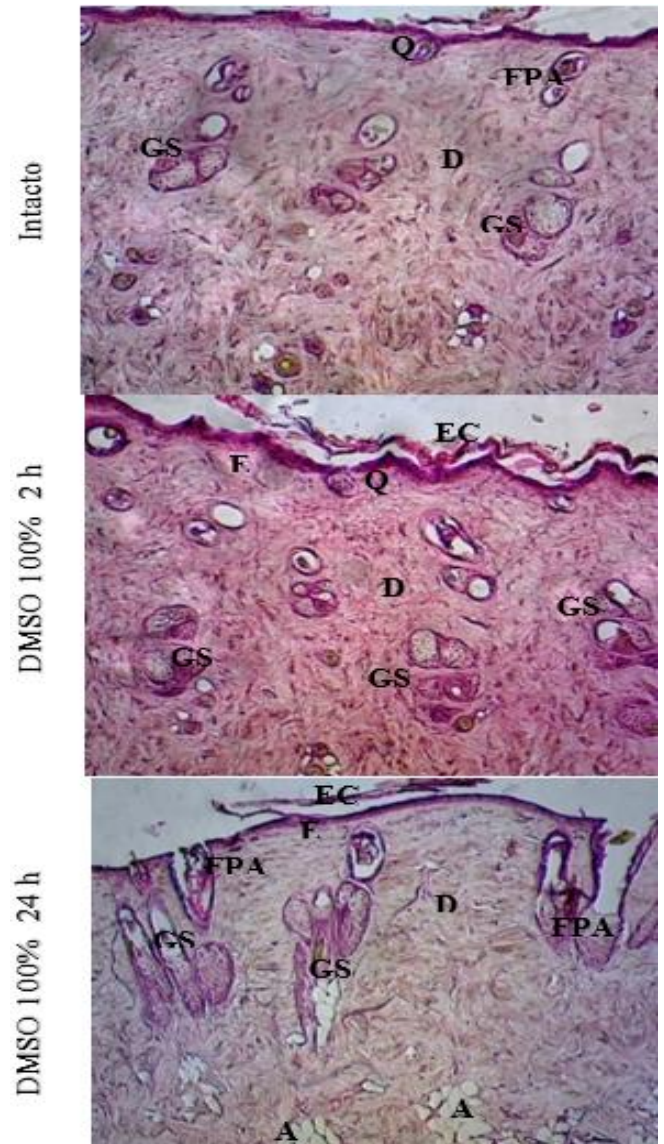


Figura 7 Imágenes de la piel de la rata alopecica hipotímica a 40X que muestran el efecto de la inyección subcutánea de 50 μ L de DMSO al 100% 2 y 24 horas después del tratamiento. GS: glándula sebácea; FPA: folículo piloso atrofiado; E: epidermis; D: dermis; EC: estrato corneo; A: adipocitos; Q: queratinocito. GS: glándula sebácea

Discusión de Resultados

Los resultados del presente trabajo muestran que tanto la inyección subcutánea como y la microinyección del DMSO dentro de las bursas ováricas no indujo alteraciones significativas en la estructura tisular de la piel ni en los tejidos anatómico-funcionales de los ovarios. No obstante, la utilización de soluciones con diferentes concentraciones de DMSO dentro de la bursa ovárica mostró algunos signos de distensión al nivel de la médula ovárica, particularmente en el sistema vascular que irriga a la gónada. Sin embargo, los compartimentos anatómicos y funcionales ubicados en la corteza del órgano no mostraron ningún cambio físico o alteración estructural en las células foliculares (teca y granulosa), ni en cuerpos lúteos o en la glándula intersticial, comparados con los cortes histológicos de un ovario intacto.

Al nivel del sistema vascular sanguíneo o linfático que irriga y drena la glándula, se lograron observar signos de inflamación o distensión que no involucraron procesos de muerte o necrosis celulares aparentes. Por ejemplo, cuando ocurre una infección, traumatismo o uso de agentes químicos citotóxicos, el tejido responde rápidamente con inflamación (distensión de vasos) e incluso con infiltración linfocitaria que termina con la remoción del tejido dañado (Dixon et al, 2014).

Recientemente, Dixon y colaboradores (2014) propusieron todo un protocolo de análisis histopatológico para la identificación de alteraciones tisulares producidas ante una lesión experimental o daño colateral ante ciertas manipulaciones quirúrgicas o toxicológicas en diferentes órganos del tracto genital de la rata y ratón hembra (entre los que se incluyen: ovarios, útero, cérvix y vagina), comparando cambios fisiológicos normales respecto a diversas lesiones patológicas.

Yoshida y colaboradores (2009), sugieren una metodología fundamentada en el análisis histológico del ovario de la rata cuando se empleen agentes farmacológicos potencialmente tóxicos para la gónada. En este estudio se analizó la morfología típica de la estructura ovárica en condiciones normales y en diferentes momentos del ciclo estral de 143 animales intactos. Los autores ponen de manifiesto que los tejidos ováricos y el propio ovocito son estructuras altamente sensibles a la manipulación farmacológica con sustancias potencialmente tóxicas y que por medio de métodos inmunohistoquímicos se pueden detectar alteraciones en la expresión de un antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, por sus siglas en inglés) como biomarcador bioquímico en células del cuerpo lúteo, en células foliculares de la granulosa y de la teca, así como en el propio ovocito.

Nuestros resultados muestran que la aplicación de soluciones de DMSO en diferentes concentraciones no indujo alteraciones tisulares en los tejidos ováricos clave para la recepción de las señales adenohipofisarias: células de la teca y de la granulosa, ni en el compartimento luteal ni en el ovocito de folículos sanos.

La corteza del ovario de la rata es un órgano en constante recambio, ya que cada cuatro o cinco días presenta evento ovulatorio. La misma ovulación ha sido descrita como un evento “inflamatorio” que dispara mecanismos de alerta que activan al sistema inmunológico (Juengel et al, 1999). Por ejemplo, la ruptura de la pared folicular se inicia con la emisión de colagenasas que debilitan las uniones que delimitan al folículo y la posterior ruptura lesiona vasos con la subsecuente respuesta que conduce a la formación del cuerpo lúteo. Por otra parte, la atresia folicular es un evento apoptótico programado y altamente controlado a lo largo de la etapa reproductiva de la rata, que sin embargo no pareció verse alterado con la administración del DMSO.

La inyección subcutánea del DMSO tampoco alteró la organización tisular al nivel de la piel, sin mostrar signo alguno de posible inflamación y mucho menos necrosis. En este sentido, algunos autores incluso lo utilizan y promueven como un agente antiinflamatorio, para uso veterinario y como agente infiltrante de fármacos (Balakin & Ivanenkov, 2004; Balakin et al, 2006; Schleining & Reinertson, 2007a; Schleining & Reinertson, 2007b).

Mecklenburg y colaboradores (2013) han propuesto un protocolo de análisis histopatológico para la identificación de alteraciones tisulares producidas ante una lesión experimental o daño ante manipulaciones quirúrgicas o toxicológicas en el tejido tegumentario de la rata y ratón, comparando cambios fisiológicos normales respecto a diversas lesiones patológicas.

Wells y colaboradores (2010), mostraron que la inyección subcutánea de solución salina puede inducir hiperplasia en el tejido subcutáneo de la rata hembra y macho, a cuyos efectos aparentemente las hembras se reponen más fácilmente que los machos pero que también dependen de la edad del animal. En el presente trabajo, la aplicación de soluciones de DMSO en diferentes concentraciones no resultó en alteraciones claras de la morfología de la piel en ratas sanas adultas, lo que indica que este disolvente puede ser utilizado como agente infiltrante de medicamentos tópicos para el tratamiento de algunas enfermedades de la piel, como dermatitis, infecciones, inflamaciones, entre otras patologías (Bertelli et al, 1995; Guerre et al, 1999; Kingery, 1997; Swanson, 1985).

Por todo lo anterior, el DMSO pudiera ser propuesto como un disolvente de fármacos activos (drogas y antibióticos), insolubles o poco solubles en agua, que requieran de un efecto local rápido y eficaz en la terapia y manejo de lesiones o infecciones en la clínica veterinaria o para la administración de fármacos con uso potencial en la biología o la medicina experimental.

Conclusiones

A microinyección del DMSO, aplicado localmente en diferentes concentraciones, no produjo alteraciones histológicas significativas en los compartimentos anatómico-funcionales clave en el ovario de la rata adulta.

La inyección subcutánea del DMSO, aplicado localmente en diferentes concentraciones, tampoco indujo alteraciones histológicas significativas en los tejidos funcionales y estructurales de la piel de la rata adulta.

Agradecimientos

Nuestro Cuerpo Académico (CA-090) agradece al MVZ Franciso Ramos Collazo, director del Bioterio *Claude Bernard* de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, médico asignado al cuidado del bienestar de nuestros animales de experimentación, todas las facilidades y atenciones para el desarrollo del proyecto

Referencias

Alberts, B., Jhonson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts K. Walter, P. (2008). Membran Estructure. En: Molecular Biology of the Cell. 5th Edition. Eds. Alberts, B. Jhonson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts K. Walter, P. Garland Science, New York. Pp. 617-650.

Astley, J.P. & Levine, M. (1976). Effect of dimethyl sulfoxide on permeability of human skin in vitro. J. Pharm. Sci. Vol. 65. Pp. 210-215.

Baker, H. (1968). The effects of dimethyl sulfoxide, dimethyl formamide, and dimethylacetamide on the cutaneous barrier to water in human skin. J. Invest. Dermatol. Vol.50. Pp. 283-288.

- Balakin, K.V. & Ivanenkov, Y.A. (2004). In Silico Estimation of DMSO Solubility of Organic Compounds for Bioscreening. *Journal of Biomolecular Screening*. Vol. 9. Pp. 22-31.
- Balakin, K.V., Savchuk, P. & Tetko, V. (2006). In silico approaches to prediction of aqueous and DMSO solubility of drug-like compounds: trends, problems and solutions. *Curr. Med. Chem*. Vol.13. Pp. 223–241.
- Bertelli, G., Gozza, A. Forno, G.B. Vidili, M.G. Silvestro, S. Venturini, M. Del Mastro, L. Garrone, O. Rosso, R. & Dini, D. (1995). Topical dimethyl sulfoxide for the prevention of soft tissue injury after extravasation of vesicant cytotoxic drugs: a prospective clinical study. *J. Clin. Oncol*. Vol. 13. Pp. 2851-2855.
- Brisson, P. (1974). Percutaneous absorption. *CMA Journal*. Vol. 110. Pp.1182-1185.
- Brunton, L., Chabner, B. & Knollman, B. (2012). Transportadores de membrana y respuesta a los fármacos. En: Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª Ed. Eds. Giacomini, K. M. & Sugiyama, Y. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México, D.F. Pp. 89-123.
- CCAC (Canadian Council on Animal Care). (1980). En: Guide to the care and use of experimental animals. Vol. 1. Pp.53-54. Ottawa, CCAC.
- Chakrabarti R. & Schutt E. (2001). The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nucleic Acids Research*. Vol.29. Pp.2377-2381.
- Dixon, D., Alison, R. Bach, U. Colman, K. Foley, G. I. Harleman, J. H. Haworth, R. Herbert, R. Heuser, A. Long, G. Mirsky, M. Regan, K. Van Esch, E. Westwood, F. R. Vidal, J. & Yoshida, M. (2014). Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Female Reproductive System. *J Toxicol Pathol*. Vol. 27. Pp.1-107.
- Gaviño, G. Juárez, J. & Figueroa, T. H. H. (1992). Estudios Postmortem. En: Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo. Capítulo VIII. LIMUSA. México. Pp. 57-80.
- Gourdon J. (2006). Rodent Anesthesia. CARE 101.01. Cornell Center for Animal Resources and Education. Cornell University.
- Guerre, P., Burgat, V. & Casali, F. (1999). Le diméthylsulfoxyde (DMSO) usages experimentaux et toxicité. *Rev. Méd. Vét*. Vol. 150. Pp. 391-412.
- Jacob, S. & De la Torre, C. (2009). Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. *Pharmacological Reports*. Vol.61. Pp.225-235.
- Jacob, S.W. & Herschler, R. (1983). Dimethyl sulfoxide after twenty years. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. Vol. 411. Pp. 13-17.
- Jacob, S.W. & Herschler, R. (1986). Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*. Vol.23. Pp.14-27.
- Juengel, J.L., E. Melntush & G. D. Niswender (1999). The corpus luteum. En: Encyclopedia of Reproduction. Tomo 1. Eds. Knobil, E. & Neill, J.D. Raven Press, New York. Pp. 703-708.
- Kingery, W.S. (1997). A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain*. Vol. 73. Pp. 123-139.
- Luna, L.G. (1975). Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Company. New York. Pp. 21 y 52.

- Malten, K.E. & Den Arend, J. (1978). Topical toxicity of various concentrations of DMSO recorded with impedance measurements and water vapor loss measurements. Recording of skin's adaptation to repeated DMSO irritation. *Contact Dermat.* Vol. 4. Pp. 80-92.
- Mecklenburg, L., Kusewitt, D. Kolly, C. Treumann, S. Adams, E.T. Diegel, K. Yamate, J. Kaufmann, W. Müller, S. Danilenko, D. & Bradley A. (2013). Proliferative and Non-Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Integument. *J Toxicol Pathol.* Vol.26. Pp. 27-57.
- Mitryukovskii, L.S. (1970). Permeability of the hematocutaneous barrier for radioactive iodine-131 under the effect of dimethyl sulfoxide and dimethylformamide (in Russian). *Tr. Perm. Gos. Med. Inst.* Vol. 99. Pp. 353-355.
- Parkin, J., Shea, C. & Sant, G.R. (1997). Intravesical dimethyl sulfoxide (DMSO) for interstitial cystitis a practical approach. *Urology.* Vol. 49. Pp. 105-107.
- Pegg, E. (2007). Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* Vol. 368. Pp. 39-57.
- Pope, D.C. & Oliver, T. (1966). Dimethyl Sulfoxide (DMSO). *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* Vol. 30. Pp. 3-8.
- Santos, N.C., Figueira-Coelho, J. Saldanha, C. & Martins-Silva, J. (2002). Biochemical, biophysical and haemorheological effects of dimethyl sulphoxide on human erythrocyte calcium loading. *Cell Calcium.* Vol. 31. Pp. 183-188.
- Scheuplein, R.J. & Ross, I. (1970). Effects of surfactants and solvents on the permeability of epidermis. *J. Soc. Cosmetic. Chem.* Vol.21. Pp.853-873.
- Shirley, S.W., Steward, B.H. & Mirelman, S. (1978). Dimethyl sulfoxide in treatment of inflammatory genitourinary disorders. *Urology.* Vol. 11. Pp. 215-220.
- Schleining, J.A. & E.L. Reinertson (2007a). Evidence for dimethyl sulfoxide (DMSO) use in horses. Part 1: DMSO as a topical and intra-articular anti-inflammatory agent. *Equine Veterinary Education.* Vol. 19. Pp. 545-546.
- Schleining, J.A. & E.L. Reinertson (2007b). Evidence for dimethyl sulfoxide (DMSO) use in horses. Part 2: DMSO as a parenteral anti-inflammatory agent and as a pharmacological carrier. *Equine Veterinary Education.* Vol. 19. Pp. 598-599.
- Smith L.H., Opresko D.M., Holleman, J. W. & R.H. Ross (1983). Problem definition study of dimethyl sulfoxide (DMSO) and interactive health effects with other chemicals. En: "Oak Ridge National Laboratory (ORNL)". Union Carbide Corporation for the United States Department Energy / U.S. Army Medical Research and Development Command. Fort Detrick, Fredrick. MD. Pp. 1-164.
- Swanson, B.N. (1985). Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Rev. Clin. Basic Pharm.* Vol. 5. Pp. 1-33.
- Sweeney, T.M., Downes, A.M. & Matoltsy, A.G. (1966). The effect of dimethyl sulfoxide on the epidermal water barrier. *J. Invest. Dermatol.* Vol. 46. Pp. 300-302.
- Vignes, R. (2000). Dimethyl sulfoxide (DMSO) A "new" clean, unique, superior solvent. ASC Presentation National Meeting 8/20-8/24/00. Memories of Annual Meeting for American Chemical Society annual. August 20-24, Washington, DC.

Wells, Y., Voute, H. Bellingard, V. Fisch, C. Boulifard, V. George, C & Picaut, P. (2010). Histomorphology and Vascular Lesions in Dorsal Rat Skin Used as Injection Sites for a Subcutaneous Toxicity Study. *Toxicologic Pathology*. Vol. 38. Pp. 258-266.

Wexler, P., Anderson, B. de Peyster, A. Gad, S. Hakkinen, P. J. Kamrin, M. Locey, B. Mehendale, H. Pope, C. & Shugart, L. (2005). Dimethyl Sulfoxide. En: *Encyclopedia of toxicology*. 2th Edition. Eds. Gad, S.E. Academic Press. Pp.51-52.

Yoshida, M., Sanbuissyo, A. Hisada, S. Takahashi, M. Ohno, Y. & Nishikawa, A. (2009). Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *The Journal of Toxicological Sciences (J. Toxicol. Sci.)* Vol.34. Pp.189-197.

[Título en Times New Roman y Negritas No.14]

Apellidos en Mayúsculas -1er Nombre de Autor †, Apellidos en Mayúsculas -2do Nombre de Autor

Correo institucional en Times New Roman No.10 y Cursiva

(Indicar Fecha de Envío: Mes, Día, Año); Aceptado (Indicar Fecha de Aceptación: Uso Exclusivo de ECORFAN)

Resumen

Título

Objetivos, metodología

Contribución

(150-200 palabras)

Abstract

Title

Objectives, methodology

Contribution

(150-200 words)

Keyword

Indicar (3-5) palabras clave en Times New Roman y Negritas No.11

Citación: Apellidos en Mayúsculas -1er Nombre de Autor †, Apellidos en Mayúsculas -2do Nombre de Autor. Título del Paper. Título de la Revista. 2015, 1-1: 1-11 – [Todo en Times New Roman No.10]

† Investigador contribuyendo como primer auto

Introducción

Texto redactado en Times New Roman No.12, espacio sencillo.

Explicación del tema en general y explicar porque es importante.

¿Cuál es su valor agregado respecto de las demás técnicas?

Enfocar claramente cada una de sus características

Explicar con claridad el problema a solucionar y la hipótesis central.

Explicación de las secciones del artículo

Desarrollo de Secciones y Apartados del Artículo con numeración subsecuente

[Título en Times New Roman No.12, espacio sencillo y Negrita]

Desarrollo de Artículos en Times New Roman No.12, espacio sencillo.

Inclusión de Gráficos, Figuras y Tablas-Editables

En el *contenido del artículo* todo gráfico, tabla y figura debe ser editable en formatos que permitan modificar tamaño, tipo y número de letra, a efectos de edición, estas deberán estar en alta calidad, no pixeladas y deben ser notables aun reduciendo la imagen a escala.

[Indicando el título en la parte inferior con Times New Roman No.10 y Negrita]

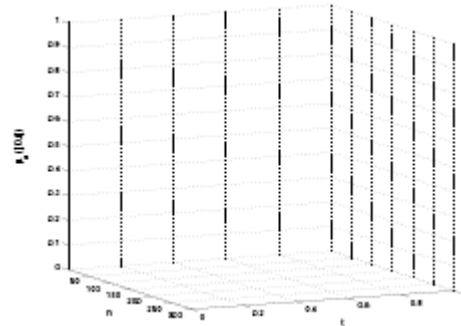


Gráfico 1 Titulo y Fuente (en cursiva).

No deberán ser imágenes- todo debe ser editable.

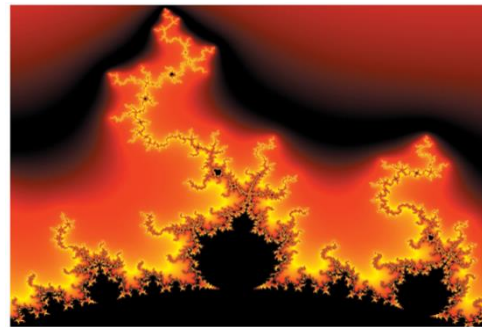


Figura 1 Titulo y Fuente (en cursiva).

No deberán ser imágenes- todo debe ser editable.

Tabla 1 Titulo y Fuente (en cursiva).

No deberán ser imágenes- todo debe ser editable

Cada artículo deberá presentar de manera separada en **3 Carpetas**: a) Figuras, b) Gráficos y c) Tablas en formato .JPG, indicando el número en Negrita y el Título secuencial.

Instrucciones para autores

Para el uso de Ecuaciones, señalar de la siguiente forma:

$$Y_{ij} = \alpha + \sum_{h=1}^r \beta_h X_{hij} + u_j + e_{ij} \quad (1)$$

Deberán ser editables y con numeración alineada en el extremo derecho.

Metodología a desarrollar

Dar el significado de las variables en redacción lineal y es importante la comparación de los criterios usados

Resultados

Los resultados deberán ser por sección del artículo.

Anexos

Tablas y fuentes adecuadas.

Agradecimiento

Indicar si fueron financiados por alguna Institución, Universidad o Empresa.

Conclusiones

Explicar con claridad los resultados obtenidos las posibilidades de mejora.

Referencias

Utilizar sistema APA. **No** deben estar numerados, tampoco con viñetas, sin embargo en caso necesario de numerar será porque se hace referencia o mención en alguna parte del artículo.

Ficha Técnica

Cada artículo deberá presentar un documento Word (.docx):

Nombre de la Revista

Título del Artículo

Abstract

Keywords

Secciones del Artículo, por ejemplo:

1. *Introducción*
2. *Descripción del método*
3. *Análisis a partir de la regresión por curva de demanda*
4. *Resultados*
5. *Agradecimiento*
6. *Conclusiones*
7. *Referencias*

Nombre de Autor (es)

Correo Electrónico de Correspondencia al Autor

Referencia.

Formato de Originalidad



Sucre, Chuquisaca a ____ de ____ del 20

Entiendo y acepto que los resultados de la dictaminación son inapelables por lo que deberán firmar los autores antes de iniciar el proceso de revisión por pares con la reivindicación de ORIGINALIDAD de la siguiente Obra.

Artículo (Article):

Firma (Signature):

Nombre (Name)

Formato de Autorización



Sucre, Chuquisaca a ____ de ____ del 20 ____

Entiendo y acepto que los resultados de la dictaminación son inapelables. En caso de ser aceptado para su publicación, autorizo a ECORFAN-Bolivia a difundir mi trabajo en las redes electrónicas, reimpresiones, colecciones de artículos, antologías y cualquier otro medio utilizado por él para alcanzar un mayor auditorio.

I understand and accept that the results of evaluation are inappealable. If my article is accepted for publication, I authorize ECORFAN-Bolivia to reproduce it in electronic data bases, reprints, anthologies or any other media in order to reach a wider audience.

Artículo (Article):

Firma (Signature)

Nombre (Name)

Revista de Ciencias de la Salud

“Efectos inmunoestimulantes y antibióticos de los bioproductos del caldo de cultivo sumergido de micelio de *Ganoderama sichuanense* en ratones inoculados con Linfoma Murino L5178Y en fase sólida”

OROZCO-BAROCIO, Arturo, ISLAS-RODRIGUEZ, Alfonso Enrique, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA, Salvador
Universidad de Guadalajara.

“Análisis de la Absorbancia y Transmitancia Espectral del Mucílago de *Salvia hispanica* L. para la Fotoprotección de la Piel”

RAMÍREZ-GRANADOS, Juan Carlos, GÓMEZ-LUNA, Blanca E DÍAZ-PÉREZ, Cesar, GASCA-TIRADO, J. Ramón
Universidad de Guanajuato

“Modelo de Linfoma murino L5178Y en Fase Sólida”

OROZCO-BAROCIO, Arturo, PEREGRINA-SANDOVAL, Jorge y VELAZQUEZ-MAGAÑA Salvador
Universidad de Guadalajara.

“Una aproximación a las percepciones sobre género de las y los estudiantes de la Unidad Guaymas del Instituto Tecnológico de Sonora”

MORENO-MILLANES, María Dolores & VALENZUELA-REYNAGA, Rodolfo
Instituto Tecnológico de Sonora

“Evaluación tisular “in vivo” del dimetilsulfóxido (DMSO) en el tejido ovárico y tegumentario de la rata adulta”

MORÁN-PERALES, José Luis, OLVERA-HERRERA, Jasiel Evani, SÁNCHEZ-GARCÍA, Octavio, y HANDAL-SILVA, Anabella
Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción, Instituto de Ciencias

