

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TRABAJO DE FIN DE GRADO

Mención Biosanitaria

**EFFECTO INDIVIDUAL Y CONJUNTO DE LA
ADMINISTRACIÓN DE DEXAMETASONA Y
KANAMICINA SOBRE *RATTUS NORVEGICUS***

Gonzalo Aedo Martín

2015-2016

Tutor: David Alfaro Sánchez

ÍNDICE:

1. Resumen	2
2. Introducción	3
3. Objetivos	6
4. Material y Métodos	6
4.1. Sujetos y diseño experimental.....	6
4.2. Toma de muestras.....	7
4.3. Índices organosomáticos.....	8
4.4. Análisis bioquímicos.....	8
4.5. Análisis microbiológicos.....	9
4.6. Análisis histológicos del bazo.....	11
4.7. Análisis citogenéticos.....	12
4.8. Análisis estadístico de datos.....	13
5. Resultados	14
5.1. Progresión del peso corporal.....	14
5.2. Pesos e índices organosomáticos.....	14
5.3. Cantidad de glucógeno hepático.....	16
5.4. Valoración de la superficie de PALS.....	16
5.5. Número relativo de Células plasmáticas IgG ⁺	17
5.6. Recuento microbiológico e identificación molecular.....	17
5.7. Concentración sanguínea de glucosa.....	19
5.8. Proteínas plasmáticas totales.....	19
5.9. Proporción relativa de IgGs plasmáticas.....	19
5.10. Concentración de cuerpos cetónicos y glucosa en orina.....	20
5.11. Análisis del cariotipo.....	21
6. Discusión	22
7. Conclusión	28
8. Bibliografía	29
9. Anexo 1 Cariotipo.....	31
10. Anexo 2 Resumen resultados grupos.....	32
11. Anexo 3 Resumen resultados estadísticos.....	33

1. RESUMEN

En este trabajo se analizaron los efectos del tratamiento con el glucocorticoide dexametasona por vía subcutánea y con el antibiótico kanamicina por vía oral, tanto individualmente como de forma conjunta, para valorar las posibles interacciones. Los sujetos experimentales fueron ratas jóvenes macho (*Rattus norvegicus*), estirpe *Wistar*, divididos en cuatro grupos: control, dexametasona, kanamicina y doble tratamiento (dexametasona y kanamicina). Se valoró la progresión del peso corporal; los pesos e índices organosomáticos del hígado, bazo, timo y glándulas suprarrenales; el efecto inmunosupresor sobre la pulpa blanca y la proporción de IgGs plasmáticas; el glucógeno hepático; la glucosa y las proteínas plasmáticas; la presencia de glucosuria y cetonuria; la microbiota gastrointestinal; y el cariotipo. Los resultados mostraron que la dexametasona disminuyó el peso corporal, provocó una atrofia del timo y glándulas suprarrenales, así como una disminución del tejido linfoide esplénico. Además, aumentó el tamaño del hígado y provocó hiperglucemia y glucosuria. La kanamicina sólo mostró efectos a nivel gastrointestinal, reduciendo las poblaciones de microorganismos aerobios mesófilos y enterobacterias, mostrando tendencia a reducir los enterococos. Este antibiótico no mostró ningún otro efecto ni interacción significativa con la dexametasona, probablemente por su casi nula absorción gastrointestinal. No hubo efectos sobre el cariotipo.

Palabras clave: dexametasona, kanamicina, glucocorticoide, antibiótico, aminoglucósido, interacción, *Rattus norvegicus*, *Wistar*.

ABSTRACT

In this study, the effects of subcutaneous administration of glucocorticoid dexamethasone and orally given antibiotic kanamycin were analyzed, individually and together, due to value possible interactions between them. The experimental subjects were male young rats (*Rattus norvegicus*), *Wistar* strain, divided in four groups: control, dexamethasone, kanamycin and double treatment (dexamethasone and kanamycin). The body weight progression in time was evaluated as well as the weight and organosomatic-index of the liver, spleen, thymus and the adrenal glands; Also we investigated the immunosuppressive effect on the white pulp of spleen and on the serum levels of IgG, the effects on the liver glycogen, serum glucose levels and plasmatic proteins, the presence of glycosuria and ketonuria, and some possible disorders in the gastrointestinal microbiota and on the karyotype. The results showed that dexamethasone decreased body weight, and it caused atrophy of the thymus and adrenal glands with a decreased of the splenic lymphoid tissue. In addition, it increased liver size and

caused hyperglycemia and glycosuria. Kanamycin showed only gastrointestinal effects with a decrease of the population of mesophilic aerobic microflora and gastrointestinal enterobacters, and some tendency to reduce the enterococcus. This antibiotic showed no other effect or significant interaction with dexamethasone, probably because of its minimal gastrointestinal absorption. There was no effect on the karyotype.

Key words: dexamethasone, kanamycin, glucocorticoid, antibiotic, aminoglycoside, interaction, *Rattus norvegicus*, Wistar.

2. INTRODUCCIÓN.

Los glucocorticoides son una clase de corticosteroides, sintetizados de forma natural en la zona fascicular de la corteza suprarrenal (Velasco *et al.*, 2003). Están relacionados con el control del metabolismo y de la inflamación, siendo el cortisol el principal representante en el ser humano y la corticosterona en la rata (Hill *et al.*, 2004). Su síntesis se produce a partir del colesterol (Velasco *et al.*, 2003). Este proceso está regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, en el que el hipotálamo libera la hormona liberadora de ACTH (CRH), estimulando la síntesis y secreción de corticotropina (ACTH) por parte de las células corticotropas de la adenohipófisis. En la zona fasciculada de la corteza suprarrenal, la ACTH estimula la producción de cortisol. A su vez, la concentración plasmática de cortisol regula, por retroalimentación negativa, la secreción de la ACTH y CRH (Lorenzo *et al.*, 2008). Para su eliminación, los corticosteroides se metabolizan fundamentalmente en el hígado (Velasco *et al.*, 2003), eliminándose el 90% por vía renal a través de la orina, y el resto por el aparato gastrointestinal (Lorenzo *et al.*, 2008).

Hablando de sus mecanismos de acción, los glucocorticoides atraviesan libremente la membrana celular por difusión simple gracias a su naturaleza lipófila, y se unen con gran afinidad al receptor glucocorticoideo (GR), activándole y provocando un cambio conformacional que permite al complejo esteroide-receptor unirse a segmentos del ADN, provocando la represión de determinados genes mediante la inhibición de diversos factores de transcripción, como AP-1 y NF-kB (Rang *et al.*, 2003), los cuales están implicados en la regulación al alza de determinados genes que desempeñan un papel central en la inflamación y la inmunidad (Velasco *et al.*, 2003).

Es, precisamente esta modulación de la respuesta inflamatoria e inmunitaria, la aplicación clínica y terapéutica más valiosa de los glucocorticoides (Lorenzo *et al.*, 2008). Así, actúan

primeramente inhibiendo la vasodilatación capilar, edema, migración de leucocitos al foco inflamatorio, formación y depósito de fibrina en el área inflamada, y más tarde la proliferación inmunitaria celular y los procesos de remodelado y cicatrización (Lorenzo *et al.*, 2008). Estas propiedades les hacen muy útiles, lo que ha dado lugar a la creación y diseño de variados glucocorticoides sintéticos, con el objetivo de que sean más potentes y tengan una mayor semivida, siendo usados en el tratamiento de numerosas enfermedades inflamatorias crónicas e inmunitarias, tales como el asma, la artritis reumatoide, la enfermedad intestinal inflamatoria o las enfermedades autoinmunes (Barnes, 2010). Además, resultan fundamentales antes del trasplante de órganos, así como posterior a este para evitar el rechazo (Lorenzo *et al.*, 2008). Los corticoides sintéticos se unen en menor proporción a las proteínas transportadoras plasmáticas, incluso algunos no se unen careciendo por completo de afinidad (Lorenzo *et al.*, 2008). Su absorción se da prácticamente por todas las vías de administración, pudiéndose encontrar niveles en sangre tras ser administrada por vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intravítrea, oftálmica, ótica y tópica (Lorenzo *et al.*, 2008).

La Dexametasona, es uno de estos glucocorticoides sintéticos, elaborada a partir del cortisol, mediante la introducción de flúor en C9 y de un grupo metilo en C16, aumentando aún más la actividad glucocorticoide e inhibiendo la mineralocorticoide producida por la fluoración en C9. Así, se consigue una actividad glucocorticoide 25 veces más potente que el cortisol, y una mineralocorticoide prácticamente nula (Lorenzo *et al.*, 2008), con el objetivo de potenciar al máximo sus propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras con fines terapéuticos.

Sin embargo, el tratamiento con glucocorticodes puede ocasionar una gran cantidad de efectos secundarios adversos, tales como la supresión del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, hiperglucemia, hipertensión arterial, retención de líquidos, insuficiencia cardiaca congestiva, úlcera gástrica y osteoporosis (Orduña-Valls *et al.*, 2016), así como el aumento a la predisposición a infecciones (Velasco *et al.*, 2003) e inhibición del crecimiento (Rang *et al.*, 2003), por lo que todos estos riesgos deben ser valorados antes de la administración (Lorenzo *et al.*, 2008).

El otro fármaco a valorar es la kanamicina, un antibiótico elaborado por *Streptomyces kanamyceticus*, perteneciente al grupo de los aminoglucósidos (Hardman *et al.*, 2003). Está constituido por un núcleo aminociclitol central (2-desoxiestreptamina) unido mediante puentes glucosídicos a dos aminoazúcares (Velasco *et al.*, 2003). Estos antibióticos son cationes fuertemente polares, por lo que su absorción es muy escasa en las vías

gastrointestinales tras la administración oral. Para alcanzar niveles terapéuticos en sangre deben administrarse por vía parenteral, intramuscular o intravenosa (Velasco *et al.*, 2003). Estos, se unen en escasa proporción a las proteínas plasmáticas, y se distribuyen fundamentalmente en el líquido extracelular (Lorenzo *et al.*, 2008). Atraviesan con dificultad la barrera hematopoyética (Anglada, 1997), al igual que en los tejidos oculares, la próstata y las secreciones bronquiales y biliares, donde sólo aparecen en concentraciones bajas. Por el contrario, pueden alcanzar concentraciones próximas a las plasmáticas en el hueso y los líquidos sinovial, peritoneal y pleural (Lorenzo *et al.*, 2008). En cuanto a su eliminación, los aminoglucósidos no son metabolizados, sino que se excretan sobre todo por vía renal a través del filtrado glomerular, y mínimamente por la bilis (Velasco *et al.*, 2003).

Presentan un amplio espectro bactericida, con una acción dependiente de concentración, y son activos frente a una amplia variedad de bacilos aerobios gramnegativos, presentando una buena actividad frente a muchas enterobacterias. Sin embargo, son menos eficaces frente a bacterias grampositivas, siendo su actividad insuficiente si se usa en monoterapia contra enterococos (Velasco *et al.*, 2003). Hablando de su mecanismo de acción, los aminoglucósidos penetran al interior bacteriano atravesando la membrana citoplasmática por transporte activo dependiente del potencial de membrana generado en condiciones aerobias (Anglada, 1997). Tras esto, se unen a los ribosomas en la subunidad 30S y también en la 50S en el caso de la kanamicina, interfiriendo en la síntesis de proteínas bacterianas al provocar errores de lectura del ARNm, con el resultado de una inhibición proteica o síntesis de proteínas defectuosas (Lorenzo *et al.*, 2008).

Entre los posibles efectos secundarios adversos que presentan los aminoglucósidos destacan la nefrotoxicidad y la ototoxicidad, aunque también pueden provocar bloqueo neuromuscular. Cuando es administrado de forma oral, puede provocar náuseas, vómitos o diarreas (Velasco *et al.*, 2003), además de producir síndrome de malabsorción tras administración crónica (Lorenzo *et al.*, 2008).

Como ya se ha mencionado, entre los múltiples efectos secundarios de los glucocorticoides está la de una mayor predisposición a las infecciones debido a la acción antiinflamatoria e inmunosupresora (Velasco *et al.*, 2003), de modo que una infección intercurrente podría llegar a ser muy grave si no se trata rápidamente con antibióticos (Rang *et al.*, 2003), por lo que no es extraño que pacientes inmunodeprimidos por un tratamiento prolongado con glucocorticoides puedan desarrollar algún tipo de infección oportunista. Ante esto, sería

interesante valorar el efecto que un antibiótico de amplio espectro, como el aminoglucósido kanamicina, pudiera provocar en estos pacientes, y observar las posibles interacciones cruzadas adversas que pudiera haber con el glucocorticoide administrado, como la dexametasona.

3. OBJETIVOS.

El objetivo principal del trabajo consiste en determinar los efectos individualizados de la administración subcutánea de dexametasona y de la administración oral de kanamicina, así como las posibles interacciones que puedan darse cuando se administran conjuntamente, estudiando si se produce algún tipo de sinergia o inhibición entre los fármacos. Para ello, se analizarán sus posibles efectos sobre:

- ❖ La progresión del peso corporal durante el tratamiento
- ❖ Los pesos e índices organosomáticos del hígado, bazo, timo y glándulas suprarrenales.
- ❖ La cantidad de glucógeno hepático total y relativo al tamaño del órgano.
- ❖ La superficie ocupada por las vainas linfoides periarteriolas (PALS) de la pulpa blanca del bazo a través del cálculo del porcentaje de su área ocupada.
- ❖ Las células plasmáticas esplénicas productoras de inmunoglobulinas G (IgG⁺).
- ❖ La valoración de la microbiota intestinal.
- ❖ La concentración de glucosa en sangre.
- ❖ La cuantificación de proteínas plasmáticas totales, así como la proporción relativa de las cadenas pesadas (Cadenas H) de las inmunoglobulinas G plasmáticas (IgGs).
- ❖ La concentración de cuerpos cetónicos y glucosa en orina.
- ❖ El cariotipo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. SUJETOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL:

Este diseño experimental se ha planteado de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, y ha sido aprobado por el Comité de Experimentación Animal local (UCM) y la Comunidad de Madrid. En él, los sujetos experimentales fueron machos de ratas albinas de laboratorio (*Rattus norvegicus*), estirpe *Wistar*, de aproximadamente 200 g de peso inicial, utilizándose un total de 28 individuos, distribuidos aleatoriamente entre cuatro grupos experimentales (7 animales por grupo), administrándose durante 10 días un tratamiento diferente:

-Grupo 1: Control, se administró únicamente el vehículo en el que van disueltos los fármacos de los demás grupos.

-Grupo 2: Dexametasona (1mg/Kg de peso corporal) por vía subcutánea en un volumen de administración de 1mL/Kg.

-Grupo 3: Kanamicina, disuelta en el agua del bebedero de los animales, a una concentración de 0,6 g/L. Teniendo en cuenta los pesos intermedios se calcularon las dosis de 0,116 g/Kg/día para los animales del turno de mañana y de 0,165 g/Kg/día para los animales del turno de tarde.

-Grupo 4: Doble (Dexametasona+ Kanamicina), con una dosis de kanamicina de 0,1365 g/kg/día para el turno de mañana y de 0,174 g/Kg/día para el turno de tarde.

Los animales se mantuvieron con libre acceso al alimento y agua. Se registró el peso de los sujetos al inicio (peso inicial), a los 5 días (peso intermedio) y al finalizar el tratamiento (peso final), con el objetivo de estudiar la variación del peso del animal durante estos 10 días de tratamiento. Al finalizarlo, seguidamente se llevó a cabo la toma de muestras a analizar.

4.2. TOMA DE MUESTRAS:

Se anestesió al animal mediante una dosis intraperitoneal de ketamina-xilacina. Seguidamente, se inyectó peritonealmente colchicina (1 mL/Kg peso de una solución que contiene 4 mg/mL), teniendo en cuenta que debe estar en circulación con el animal vivo mínimo 25-30 minutos para que su acción antimitótica pueda tener lugar. Se extrajo sangre de la vena yugular y se midió la glucosa sanguínea con un glucosímetro. A continuación, se aisló el plasma en otro tubo Eppendorf, guardándose a -20 C hasta su posterior procesado. 30 minutos después de la administración del antimitótico, se sacrificó al animal mediante una sobredosis de anestésico. Antes de superar 45 min desde la administración de la colchicina, se extrajo una muestra de médula ósea de ambos fémures, almacenándose en un tubo de KCL calentado a 37 C. Se tomó aproximadamente 1g de muestras de heces, almacenándose en un tubo estéril junto a 9 volúmenes de solución de conservación (10% glicerol en solución salina) y congelándose posteriormente a -80 C. A continuación, se valoró semicuantitativamente los niveles en orina de cuerpos cetónicos y glucosa, utilizando una tira reactiva (Keto-Diastix®, Bayer). Se extrajo y pesó el bazo, para posteriormente almacenar un tercio del órgano en un cilindro de papel relleno con Tissue-Tek, que se sumergió en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 C hasta su posterior procesado y estudio histológico. Se

extrajo las glándulas suprarrenales y el timo, pesándose a continuación. El hígado también se extrajo y se pesó, para posteriormente cortar dos trozos de unos 2 g del lóbulo mayor, congelarlos y almacenarlos a -80 C hasta su posterior procesamiento.

4.3. ÍNDICES ORGANOSOMÁTICOS (IO):

Se calcularon los índices organosomáticos del bazo, timo, glándulas suprarrenales e hígado.

$$\text{Índice Organosomático} = \frac{\text{Peso del órgano (mg)}}{\text{Peso del animal (g)}}$$

4.4. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS:

- VALORACIÓN DE GLUCÓGENO HEPÁTICO.

Se procedió a valorar: la cantidad de glucógeno total (mg) en el hígado entero y la cantidad de glucógeno (mg) relativa a peso (g) de tejido. Para ello, se utilizaron las dos piezas de 2g de hígado congeladas previamente. Se procedió previamente a la extracción del glucógeno del tejido, junto con demás biomoléculas por calentamiento con KOH. A continuación mediante precipitación con Na₂SO₄ como coprecipitante y etanol 66% se separó el glucógeno de otras proteínas solubles. Posteriormente se utilizó ácido tricloroacético (TCA) sobre este precipitado para solubilizar el glucógeno y separarlo de las demás macromoléculas que habían precipitado junto a él, como proteínas y ácidos nucleicos. Se aisló este glucógeno solubilizado en un tubo de plástico graduado de peso conocido, y se reprecipitó con etanol. Finalmente, tras centrifugar se elimina el sobrenadante (etanol), se deja secar y se pesa para despejar el peso del glucógeno precipitado aislado de los 4 g de hígado empleados. Con este dato, se calcula los miligramos de glucógeno en el hígado completo y los miligramos de glucógeno por gramo de hígado.

- VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN PLASMA.

Utilizamos el procedimiento colorimétrico del método de Bradford (Bradford, 1976), en el que el colorante azul de Coomassie, en medio ácido, se une iónica e hidrofobicamente a las proteínas, desplazando su máximo de absorción de 465 nm a 595 nm. De esta forma, y según la Ley de Lambert-Beer, la absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteínas. Utilizamos una curva de calibrado empleando soluciones de concentración conocida, para obtener ajustando por mínimos cuadrados la ecuación de la recta, que se utilizó para calcular la concentración de proteínas de la muestra a partir del valor de absorbancia de las diluciones de plasma 1/64 y 1/128 que se utilizaron para valorar la medida.

- ELECTROFORESIS (PAGE-SDS).

La separación de proteínas del plasma se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida a partir de diluciones de la muestra de 2 mg/mL, utilizando SDS para dar carga negativa y desnaturalizar a las proteínas, de forma que la migración en el gel sea sólo en función de su tamaño. Se ha de tener en cuenta que el tampón de muestras contiene B-mercaptoetanol, que actúa como agente reductor rompiendo los puentes disulfuro de las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas, por lo que tras la electroforesis si hay alguna proteína dimérica, como el caso de las inmunoglobulinas G, aparecerán dos bandas correspondientes a sus dos subunidades. Se cargaron 2 geles con las cuatro muestras de plasma por duplicado en cada uno, aplicando también en el primer pocillo una disolución de proteínas patrón preteñidas, Tras realizar la electroforesis, se realizó con una parte del gel una tinción de las bandas con Azul de Coomassie, tras la cual se realizó una captura de imagen.

- ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.

Tras la separación por electroforesis, una parte del gel se utilizó para realizar una electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa para su reconocimiento por anticuerpos. Para comprobar si la transferencia se ha producido correctamente, se tiñó reversiblemente la nitrocelulosa con rojo Ponceau y se realizó una captura de imagen. Finalmente, se realizó una inmunodetección de IgGs, utilizando anticuerpos policlonales anti-inmunoglobulinas G (anti-IgGs) de rata que se unirán a sus cadenas pesadas y ligeras, en caso de que estas últimas no se hayan salido del gel. Los resultados irán dirigidos a las cadenas pesadas, que son las específicas. Tras la eliminación del anticuerpo no unido, se procedió al revelado de las anti-IgGs unidos con H₂O₂ y diaminobencidina (DAB). Otra vez, se escanearon los resultados.

Tras obtener todas las imágenes digitalizadas, mediante el programa IMAGE J se procedió al densitometrado de la membrana y al cálculo de la proporción relativa que representan las cadenas H de las IgGs respecto al total de la proteína.

4.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS:

- SIEMBRA Y RECUENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS.

Se procedió a realizar un recuento de microorganismos aerobios mesófilos, enterococos y enterobacterias totales, realizando siembras en profundidad en placas petri, a partir de un banco diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁷, preparadas a partir de la muestra de heces

conservada, correspondiente a una dilución 10^{-1} . El objetivo final será valorar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la microbiota intestinal. El recuento se realizó tras dos días de incubación, utilizándose únicamente como valor fiable aquellas placas que presentaron entre 30-300 colonias. A continuación el número de colonias por placa se multiplicó por su factor de dilución correspondiente según el tubo de dilución usado, obteniéndose así el recuento total de unidades formadoras de colonias (u.f.c.) viables/ g de muestra analizada.

-Recuento de microorganismos aerobios mesófilos: Se realizó la siembra en agar nutritivo (TSA), un medio de cultivo general. Para estas siembras se utilizaron desde la dilución 10^{-3} a la 10^{-7} , y en este medio se estimó el número de microorganismos aerobios cultivables totales en las condiciones experimentales de cultivo.

-Recuento de enterococos: Para la valoración de microorganismos del género *Enterococcus* se utilizó el medio Slanetz Bartley (SB), un medio de cultivo selectivo y diferencial, en donde este grupo de bacterias forman colonias de una coloración rojo ladrillo. Se realizaron siembras desde la dilución 10^{-2} a 10^{-6} .

-Recuento de enterobacterias: Se utilizó como medio selectivo y diferencial para estos microorganismos el agar VRBG (cristal Violeta Rojo neutro Bilis Glucosa). Las siembras se realizaron a partir de las diluciones de 10^{-2} a 10^{-5} .

- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR BACTERIANA.

A partir de una colonia aislada crecida en medio TSA, se procedió a su identificación molecular a partir de la secuenciación del ADN ribosómico 16S. Para ello, se sembró la colonia seleccionada en medio LB en condiciones óptimas de incubación para su rápida proliferación. Posteriormente se llevó a cabo el aislamiento y concentración del DNA de dicha colonia presente en el medio, utilizando el Kit de extracción de DNA (**MoBio**). A continuación, se realizó una PCR en un termociclador utilizando el protocolo “BIOSAN” para amplificar la sección del ADN que nos interesa, utilizando los cebadores Y1 (*forward*) e Y2 (*reverse*). Se purificó el producto de amplificación utilizando el “Kit de purificación producto PCR” (**MoBio**). Tras haber purificado el producto de la PCR, este ADN amplificado se envió a la Unidad de Genómica y Proteómica del Parque Científico de Madrid, que llevó a cabo su secuenciación utilizando el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1997). Por su parte, se proporcionaron los archivos que contenían los electroferogramas correspondientes a cada una de las dos secuencias obtenidas con el cebador Y1 y cebador Y2. Con estos datos, se realizó

un análisis bioinformático con el programa “BioEdit Sequence Alignment Editor”, con el que se procedió a la corrección de los posibles errores en ambas secuencias, a su alineamiento y a la creación de una secuencia consenso a partir estas. Obtenida la secuencia consenso, se utilizó la herramienta de búsqueda “*nucleotide blast*” del programa online “BLAST” (*Basic Local Alignment Search Tool*), para determinar la homología de nuestra secuencia con otras de las bases de datos moleculares, e identificar, basándonos en el porcentaje de similitud, la posible especie a la que pertenece la colonia que aislamos del cultivo de TSA.

4.6. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS DEL BAZO:

Se utilizaron los fragmentos del bazo introducidos en Tissue-Tek fijados provisionalmente por congelación y conservados a -80 C. Estas muestras fueron seccionadas con un criostato y adheridas a 8 portaobjetos por órgano, para posteriormente realizar su fijación química con acetona pura. La mitad de ellos se destinó a una tinción histológica de rutina para un valorar la superficie ocupada por las vainas linfoides periarteriolares (PALS) de la pulpa blanca a través del cálculo del porcentaje de su área, mientras que con la otra mitad se realizó una tinción inmunohistoquímica para cuantificar el número relativo de células plasmáticas IgG⁺.

- TINCIÓN CONVENCIONAL.

Se realizó una tinción con el colorante básico azul de toluidina, que tiñe el citoplasma celular de un color azul claro, mientras que el núcleo adquiere un color azul oscuro o morado. Según lo anterior, los linfocitos, al presentar un gran núcleo, se teñirán intensamente. Los macrófagos se teñirán de una intensidad intermedia, y finalmente los eritrocitos, al no poseer núcleo, se teñirán muy débilmente. Así, la región del tejido correspondiente a las PALS de la pulpa blanca, teñirá más intensamente al presentar una gran cantidad de linfocitos. Le seguirá en intensidad la zona marginal de la pulpa blanca, y finalmente, la zona teñida más débilmente corresponderá a la pulpa roja. Con el objetivo x4 del microscopio se seleccionaron 4 campos de la preparación por animal, y empleando el programa *Adobe Photoshop*, se calculó el área total de tejido esplénico de los 4 campos seleccionados y el área de las zonas delimitadas de pulpa blanca, obteniendo el valor medio de las dos áreas en píxeles. A partir de estos dos datos se calculó el porcentaje de pulpa blanca.

- INMUNOTINCIÓN PARA VALORAR CÉLULAS PLASMÁTICAS IgG⁺.

Se utilizó anticuerpos policlonales desarrollados en cabra anti-IgG de rata, conjugados con la peroxidasa HRP. La técnica consiste en, después de haber añadido el anticuerpo y formado el

complejo IgG-Ac-HRP, añadir el sustrato de la enzima (H₂O₂), liberándose O₂. A continuación se añade DAB, que es oxidada por el O₂ liberado, produciéndose un precipitado de color marrón justo en las zonas de los complejos IgG-Ac-HRP, lo que permite localizar los anticuerpos IgG de los linfocitos B. A fin de evitar falsos positivos, se procedió a inhibir la actividad peroxidasa endógena añadiendo, antes del Ac, H₂O₂ como sustrato. Además, antes de añadir los anticuerpos, se utilizó suero sanguíneo de cabra con el fin de bloquear los receptores Fc. También se realizó una incubación con leche desnatada, para evitar las posibles uniones específicas que pudiera haber con el anticuerpo utilizado.

Terminada la inmunodetección, se realizó un conteo de células plasmáticas positivas con el objetivo de 40x, en un total de 10 campos elegidos al azar. Con estos datos se hizo una media aritmética para calcular el valor del número de células plasmáticas positivas/campo 40x.

4.7. ANÁLISIS CITOGÉNÉTICOS:

- REALIZACIÓN DE LAS PREPARACIONES.

Se procedió al análisis del cariotipo y a la elaboración de un cariograma, partiendo de las células en metafase mitótica de las muestras de médula ósea, guardadas el día de extracción de muestras en tubos de centrífuga con KCl. Primeramente, se sometió a las muestras recogidas de médula ósea a un choque hipotónico con KCl a 37 °C, y posteriormente se procedió a su concentración y fijación utilizando metanol: acético 3:1. Para la realización de las preparaciones, se utilizó la “técnica de bombardeo”, con el fin de romper totalmente las células en metafase mitótica y que sus cromosomas queden extendidos y fijados en 8 portas por órgano, siendo la mitad de ellos utilizados posteriormente para una tinción diferencial de bandeado G, y la otra mitad para una tinción no diferencial con Giemsa.

-Tinción no diferencial: Realizamos una tinción no diferencial con Giemsa 2% en tampón fosfato pH 6.8, lavamos y secamos las preparaciones y posteriormente fueron sumergidas en Xileno. Finalmente se cubrieron con un cubreobjetos con unas gotas de resina *Entellan* para su observación al microscopio óptico.

-Tinción diferencial–bandeo g: Se realizó una tinción de bandeado cromosómico, pues es de gran utilidad para la realización de cariotipos. Para ello, antes de seguir el mismo procedimiento que el de la tinción no diferencial, se sometió a las preparaciones a un tratamiento con Tripsina 0,025% a 4 C durante 20 seg, para ser lavada posteriormente con agua destilada.

- ELABORACIÓN DEL CARIOGRAMA Y ANÁLISIS DEL CARIOTIPO.

Se observó las preparaciones al microscopio, para elegir y capturar una imagen de una metafase óptima. A partir de ella, utilizando el programa *Adobe Photoshop*, se midió la longitud total y la longitud del brazo corto de cada uno de los cromosomas, calculándose a partir de ellos la longitud relativa y el índice centromérico.

VALORES CALCULADOS EN CADA CROMOSOMA	
LONGITUD RELATIVA	$LR = \frac{\text{Longitud de un cromosoma}}{\text{Longitud del complemento haploide (LCH)}} \times 100$
	$LCH = \frac{\sum \text{Longitud de todos los cromosomas}}{2}$
ÍNDICE CENTROMÉRICO	$IC = \frac{\text{Longitud del brazo corto del cromosoma}}{\text{Longitud total del cromosoma}} \times 100$

Con los dos valores obtenidos de cada cromosoma, se elaboró una tabla con la finalidad de emparejar los homólogos e identificar a las parejas dentro del cariotipo. Finalmente, se compararon y analizaron los cariotipos de cada uno de los tratamientos.

4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS:

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa *Statgraphics*, versión *Centurion XVI*. Antes de realizarlos, se comprobó para todos los datos la condición de normalidad, se buscaron valores atípicos y se comprobó la condición de homocedasticidad. Primeramente, se obtuvo el promedio y el error estándar para cada variable con los diferentes tratamientos. Fue necesario transformar los datos del recuento de microorganismos en forma de algoritmo neperiano. Además, se creó un nuevo valor (K_n2) con las dosis de kanamicina calculadas a partir del peso intermedio de los animales, para valorar mejor sus efectos en relación a la dosis. Después de calcular los promedios y error estándar, se realizó un análisis de regresión múltiple (análisis de la varianza de dos factores), en la que se analizó una variable dependiente y los factores, siendo estos los diferentes tratamientos, además del producto de los dos fármacos ($K_n * D_x$) para así comprobar si el efecto combinado es diferente a un efecto aditivo, es decir, para comprobar si hay algún tipo de interacción o sinergia entre los fármacos. Se considero como significativo un p -valor $< 0,05$ para valorar si realmente existen diferencias significativas. Además, si algún valor no cumplió las condiciones de normalidad y homocedasticidad se realizó un estudio mediante la alternativa no paramétrica al análisis de la varianza de Kruskal-Wallis.

5. RESULTADOS

5.1. PROGRESIÓN DEL PESO CORPORAL DURANTE EL TRATAMIENTO:

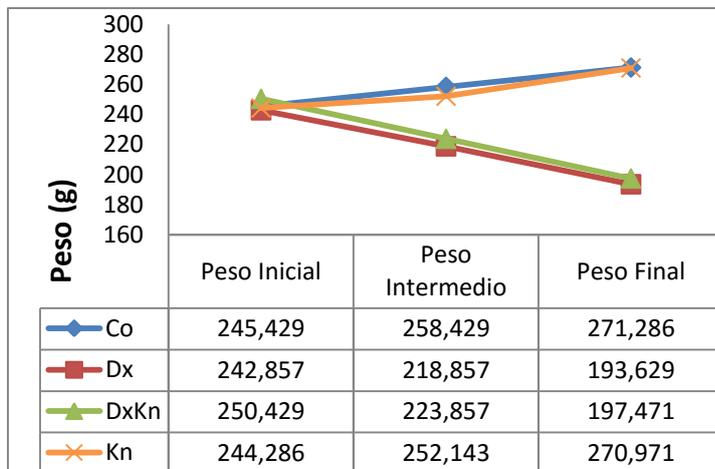


Fig.1. Progresión del peso corporal a tiempo cero (Peso Inicial), a los 5 días (Peso Intermedio) v a los 10 días (Peso Final).

Los resultados de la progresión del peso corporal (Fig.1) mostraron una clara disminución en los tratamientos con Dexametasona y en el tratamiento doble. Por el contrario, los animales del grupo control y a los que se les administró Kanamicina aumentaron su peso de forma

progresiva durante los 10 días.

Atendiendo al estadístico, el efecto de la Dexametasona disminuyó significativamente el peso tanto en los primeros 5 días (Fig.2A), como durante la totalidad de la duración del tratamiento (Fig.2B). No se observó interacción significativa entre los dos tratamientos.

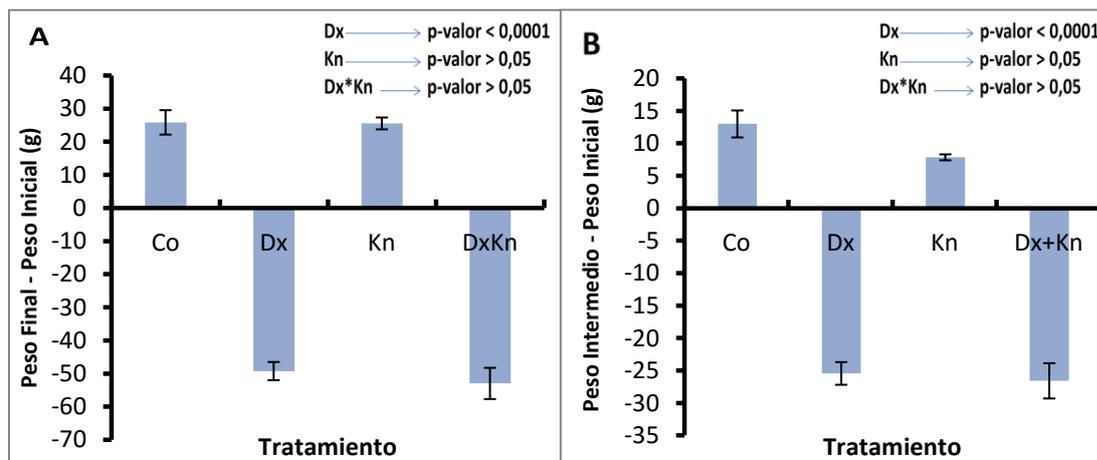


Fig.2. Diferencia entre el peso final (10 días) y el peso inicial (0 días) (A), y entre el peso intermedio y el peso inicial (B).

5.2. PESOS E ÍNDICES ORGANOSOMÁTICOS DE LOS ÓRGANOS VALORADOS:

Los resultados observados indican que la Dexametasona provocó una disminución significativa de los pesos del hígado, timo, bazo y glándulas suprarrenales (Fig.3), siendo este descenso más intenso en el bazo, timo y glándulas suprarrenales. En los valores de índices organosomáticos, de nuevo la Dexametasona indujo una disminución significativa en el bazo, timo y glándulas suprarrenales, pero se vio un aumento significativo en la relación entre el peso del hígado y el peso corporal final con este tratamiento (Fig.4), señal de que aumentó con respecto al animal sometido a Dexametasona.

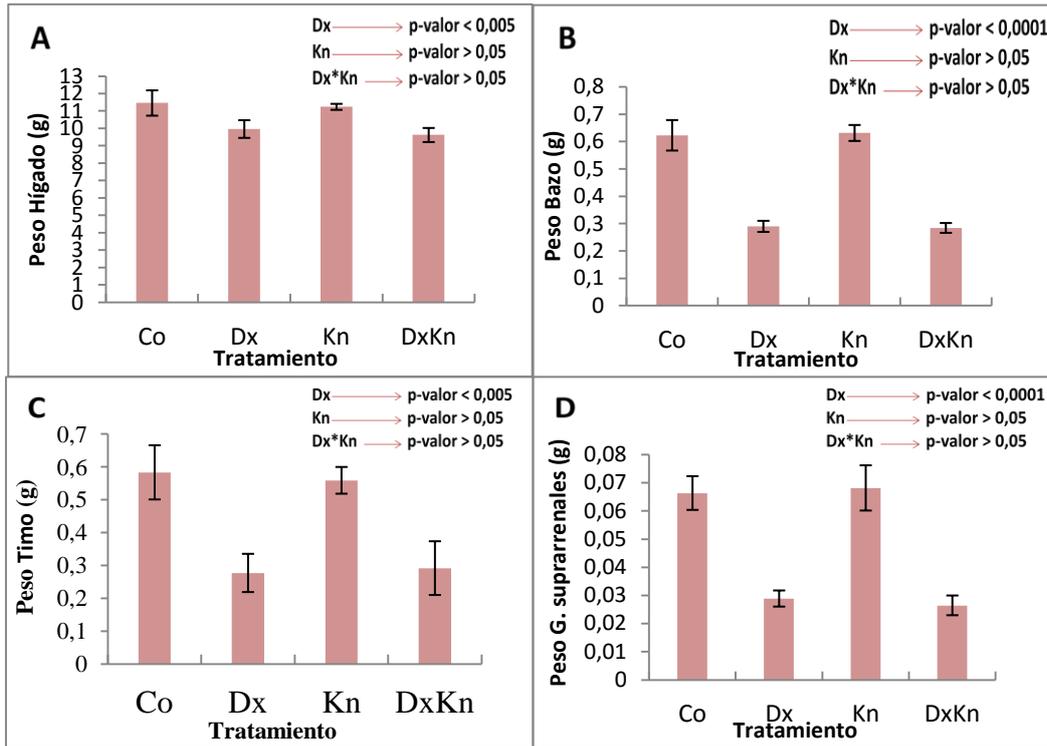


Fig.3. Pesos finales del hígado (A), bazo (B), timo (C) y glándulas suprarrenales (D) tras los diferentes tratamientos. La Dexametasona provocó una disminución significativa en todos ellos, ocurriendo este descenso con mayor intensidad en bazo, timo y glándulas suprarrenales.

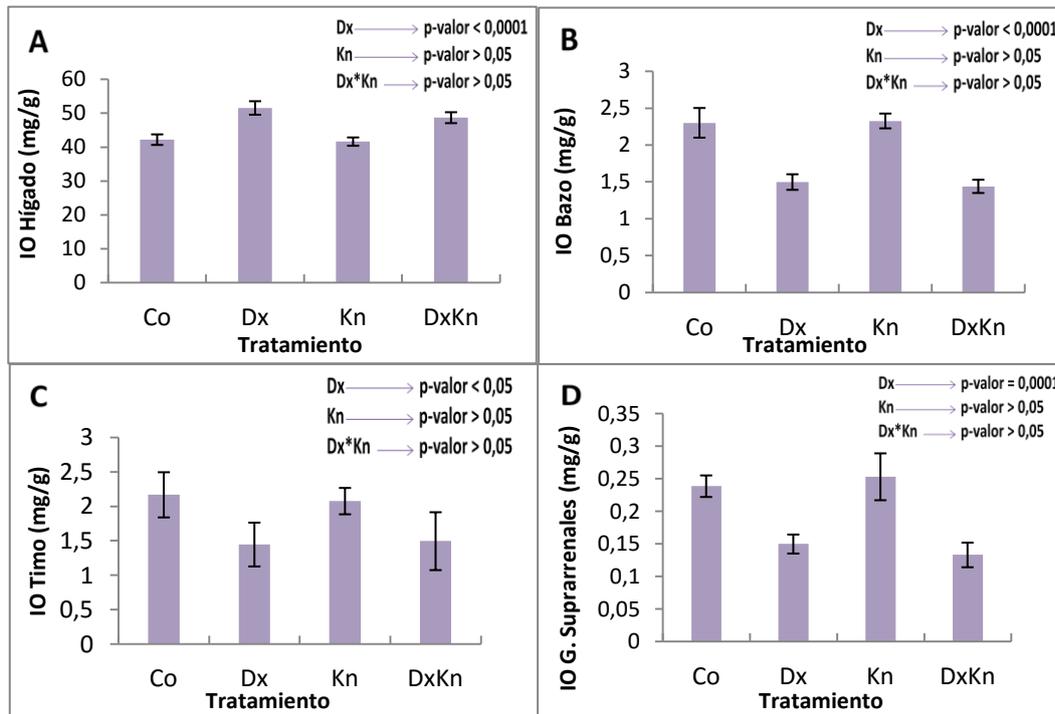


Fig.4. Índices organosomáticos (IO) del hígado (A), bazo (B), timo (C) y glándulas suprarrenales (D) tras los diferentes tratamientos. La Dexametasona provocó una disminución significativa en el bazo (B), timo (C) y glándulas suprarrenales (D). En cambio, el tamaño del hígado con respecto al tamaño total del animal es mayor con el tratamiento de dexametasona (A).

5.3. CANTIDAD DE GLUCÓGENO HEPÁTICO:

Los valores de glucógeno hepático total y respecto al peso del órgano completo, no mostraron diferencias significativas en ningún tratamiento, aunque en aquellos individuos en los que fue administrada Dexametasona presentaron una pequeña tendencia a aumentar (Fig. 5).

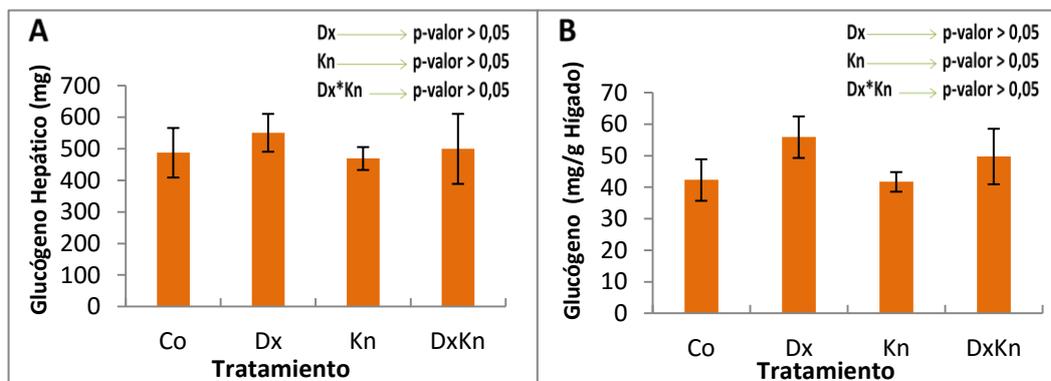


Fig. 5. (A) Cantidad de glucógeno total (mg) en el hígado completo. (B) cantidad de glucógeno (mg) relativa al peso (g) del órgano. No se apreciaron diferencias significativas para ningún tratamiento, aunque la Dexametasona mostró una tendencia a aumentar los valores de glucógeno hepático.

5.4. VALORACIÓN DEL PORCENTAJE DEL ÁREA DE LAS PALS DEL BAZO:

Los resultados mostraron, bajo el efecto de la Dexametasona, una disminución significativa de la superficie de pulpa blanca respecto al total de tejido esplénico (Fig. 6). No se observó interacción entre los dos fármacos.

Las tinciones de los cortes histológicos pertenecientes a los grupos tratados con Dexametasona, mostraron que el área de las vainas linfoides periarteriolares (PALS), teñidas de una tonalidad más oscura e intensa por el azul de Toluidina debido a su riqueza

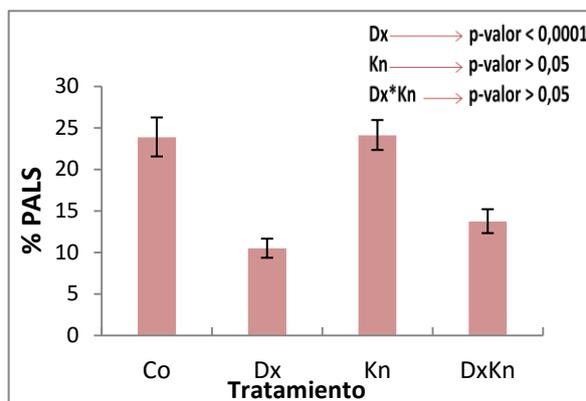


Fig. 6. La Dexametasona provoca una disminución significativa del porcentaje del área de las PALS. La gráfica muestra el porcentaje de pulpa blanca en relación al total de tejido esplénico, bajo la influencia de los diferentes tratamientos.

en linfocitos, habían sufrido una clara reducción y retroceso, observándose únicamente en las zonas más próximas a sus arteriolas centrales (Fig. 7). Por lo tanto, se produjo una clara reducción del número y de la superficie ocupada por los linfocitos del tejido linfóide esplénico.

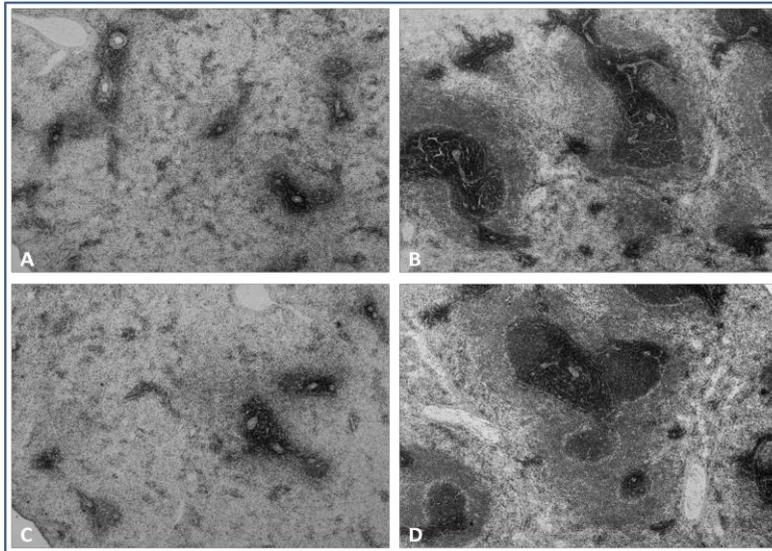
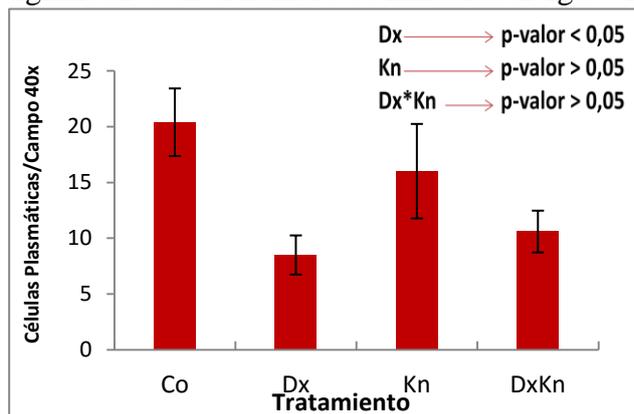


Fig. 7. Cortes histológicos de bazo teñidos con azul de Toluidina. (A)Dexametasona, (B) Kanamicina, (C) Doble, (D) Control. Las zonas oscuras teñidas más intensamente corresponden a las superficies ocupadas por las PALS de la pulpa blanca del tejido esplénico. Los tratamientos con administración de Dexametasona (A, C) provocaron una disminución y retroceso del área de las PALS de la pulpa blanca, concentrándose únicamente en zonas cercanas a las arteriolas centrales que rodean.

5.5. NÚMERO RELATIVO DE CÉLULAS PLASMÁTICAS IgG⁺/ CAMPO 40X:

Los grupos a los que se les administró Dexametasona mostraron una disminución significativa en el número de linfocitos B IgG⁺. No se observaron diferencias significativas en



el conteo de células positivas en el grupo control ni con la administración de Kanamicina, mostrando esta última un mayor error estándar que el resto, pudiéndose explicar por la subjetividad del observador a la hora de seleccionar y contar células con marcaje positivo.

Fig. 8. Valoración del número de células plasmáticas IgG⁺ por campo 40X.

5.6. RECUENTO MICROBIOLÓGICO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR:

Los recuentos de u.f.c. de microorganismos aerobios mesófilos cultivados en agar nutritivo TSA (Fig. 9), mostraron que la Kanamicina inhibió significativamente el crecimiento bacteriano, siendo esta reducción algo menor en el tratamiento doble pero sin llegar a ser significativa la interacción entre fármacos. El recuento de colonias de enterobacterias totales en agar VRBG (Fig. 9) mostró que la administración de Kanamicina redujo significativamente el número de colonias de estos microorganismos, no observándose tampoco interacción de los tratamientos ni efecto de la Dexametasona que fueran significativos. El recuento de enterococos en el agar Slanetz Bartley (SB) fue complicado, ya

que hubo problemas a la hora de realizar las siembras e incubaciones de las diferentes diluciones debido a que el medio, por motivos desconocidos, no solidificó correctamente, por lo que a la hora de voltear las placas para su incubación muchos medios se perdieron, realizándose el recuento a partir de las diluciones de las pocas placas que fueron viables, cuyos resultados (Fig. 9) mostraron que la Kanamicina mostró tendencia a disminuir el crecimiento con un p-valor muy cercano al significativo (p-valor 0,0596). Tampoco hubo interacción entre fármacos ni efecto de la Dexametasona significativos en este medio.

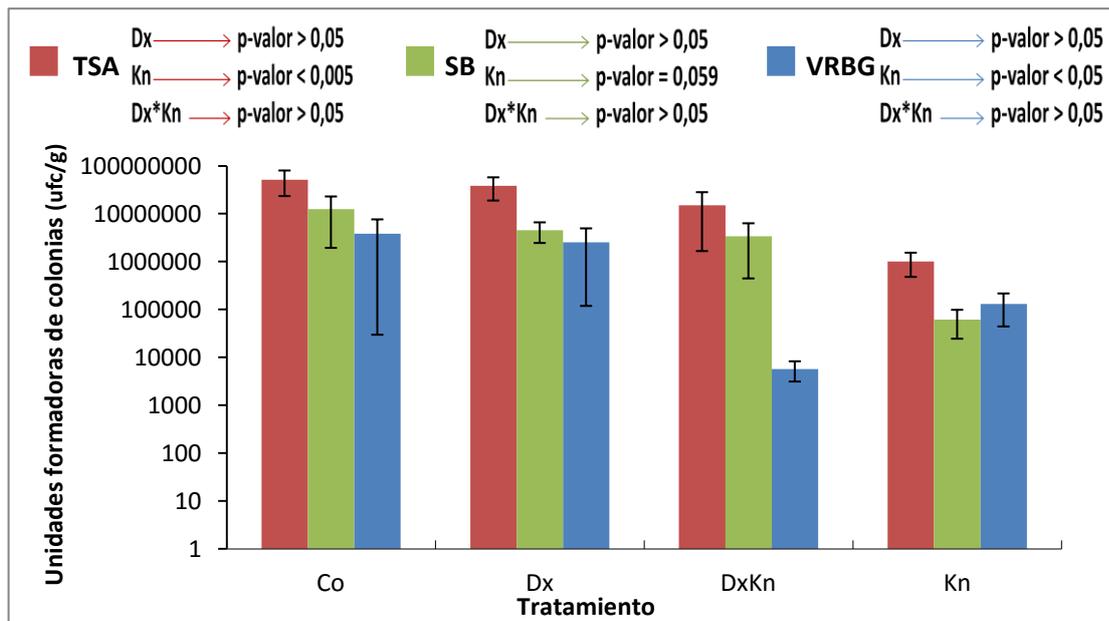


Fig. 9. Recuento de unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g) en escala logarítmica. La gráfica muestra el recuento de ufc/g en cada tratamiento, para los microorganismos aerobios mesófilos cultivados en medio TSA (barras rojas), los enterococos cultivados en medio SB (barras verdes) y las enterobacterias totales cultivadas en medio VRBG (barras azules).

Para elaborar la secuencia consenso de la colonia aislada y cultivada en TSA, se utilizaron las primeras 315 pares de bases obtenidas con del cebador Y1 (forward) y 318 pares de bases del cebador Y2 (reverse). Tras esto, la identificación de la secuencia con el programa BLAST dio como especie cultivable más probable para esa colonia a *Escherichia coli*, con un 98% de coincidencia.

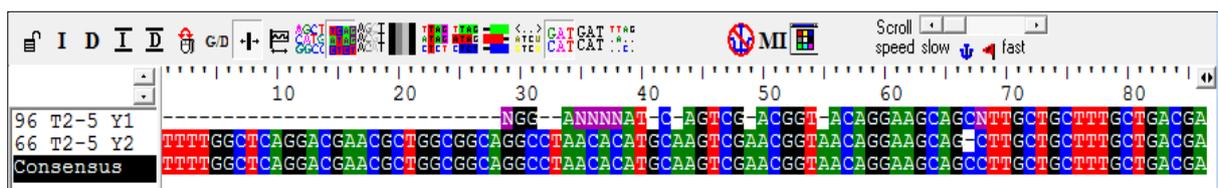


Fig. 10. Primeras 85 pares de bases de la secuencia consenso, elaborada a partir de las secuencias obtenidas con los cebadores Y1 (forward) e Y2 (reverse).

5.7. CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA DE GLUCOSA:

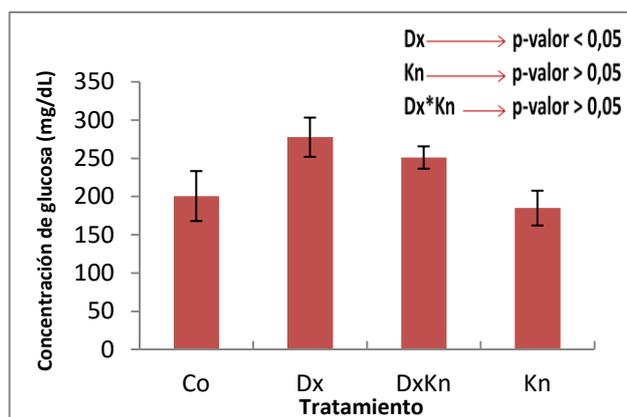


Fig. 11. Concentración de glucosa en sangre

Los resultados mostraron que la Dexametasona aumentó significativamente la concentración de glucosa (mg/dL), no observándose alteraciones significativas con la administración de Kanamicina ni interacción entre los dos fármacos (Fig. 11).

5.8. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTALES:

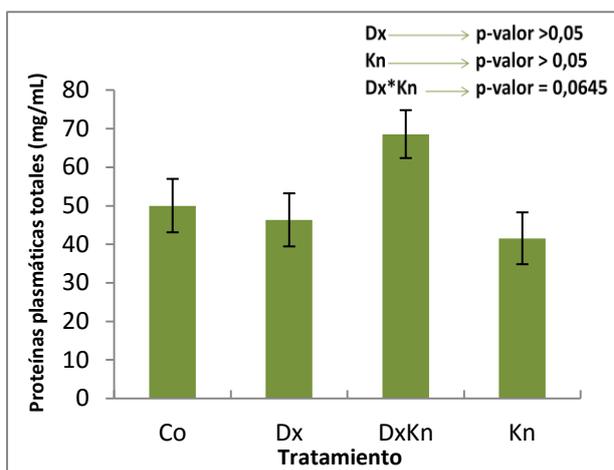


Fig. 12. Proteínas plasmáticas totales (mg/dL) en cada tratamiento.

Se observó que la interacción entre los dos fármacos provocó un aumento casi significativo (p-valor 0,0645) en la concentración de proteínas plasmáticas totales. Tanto la Dexametasona como la Kanamicina por separado no produjeron cambios significativos en dicha concentración (Fig. 12).

5.9. CUANTIFICACIÓN Y PROPORCIÓN RELATIVA DE IgGs PLASMÁTICAS:

El procedimiento para valorar este parámetro no pudo realizarse correctamente, debido a que los geles de poliacrilamida preparados no se formaron correctamente, creándose burbujas entre las dos fases y no formándose todos los pocillos de carga de forma correcta. Además, algunas bandas de ciertos grupos no corrieron correctamente durante la electroforesis, apareciendo cortadas alguna de las calles. Por todo esto, aunque se realizó densitometrado y cuantificación de IgGs con los geles que estaban correctos (Fig. 13), el número de datos fue insuficiente para realizar la comparación de promedios y el análisis estadístico por falta de significación.

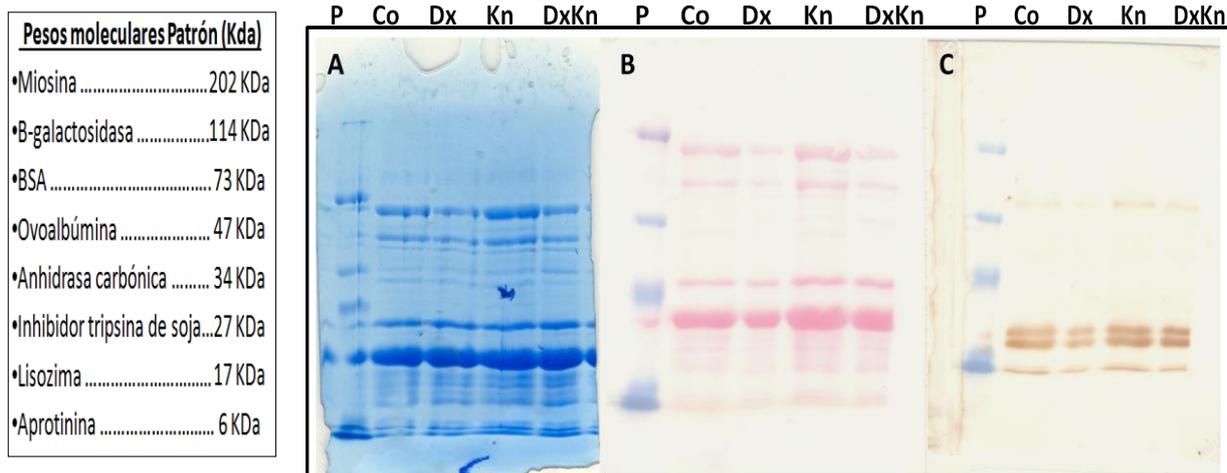


Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE teñida con Azul de Coomassie (A), membrana de nitrocelulosa tras la electrotransferencia teñida con rojo Ponceau (B), Inmunodetección de IgGs (C). Puede observarse en cada una de ellas, de izquierda a derecha, las bandas correspondientes al patrón, el tratamiento control, el grupo Dexametasona, el grupo Kanamicina y el grupo doble. La flecha roja indica las bandas correspondientes a las dos cadenas pesadas de las IgGs a las cuales se han unido los anticuerpos.

5.10. CONCENTRACIÓN DE CUERPOS CETÓNICOS Y GLUCOSA EN ORINA:

Los resultados del análisis de cuerpos cetónicos con las tiras reactivas dieron un resultado negativo (0) en todos los grupos excepto en tres de ellos, siendo dos los correspondientes al tratamiento doble y uno al control. Ante esto, asumimos que los datos distintos a cero no se acercaban a la realidad del estudio y que habrían dado esos valores por diferentes motivos, siendo uno de ellos el posible fallo de las tiras reactivas o su incorrecto uso, ya que además se trata de un método semicuantitativo. Se dio valor cero a estos tres resultados y se aplicó la regresión múltiple. Los resultados estadísticos mostraron que ninguno de los fármacos producía diferencias significativas en los valores de cuerpos cetónicos en orina y que tampoco existe interacción entre los fármacos.

En el análisis estadístico de la concentración de glucosa en orina, debido a la gran cantidad de ceros en los resultados de los grupos en los que no se administró Dexametasona, no se podían alcanzar las condiciones de normalidad y homocedasticidad para esta variable, por lo que se realizó la prueba alternativa no paramétrica de Kruskal-Wallis, dando un P-valor de 0,044, por lo que se rechazó la hipótesis de igualdad de las medias

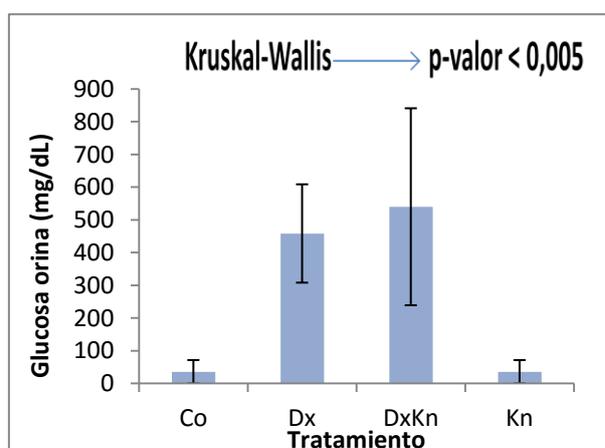


Fig.14. Concentraciones de glucosa en orina (mg/dL).

entre tratamientos. Sabiendo que había diferencia de medias entre los grupos, se procedió a realizar la prueba de comparación de dos muestras independientes de Mann-whitney (Fig.15), en la que se compararon los diferentes tratamientos dos a dos para determinar entre cuales había diferencias significativas. Según los resultados, los grupos Dx y DxKn mostraron diferencias significativas con los grupos Co y Kn, por lo que se concluyó que la Dexametasona aumentó significativamente la concentración de glucosa en orina, y no hubo interacción de fármacos ya que no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos Dx y DxKn.

Co	X	
Kn	X	
Dx		X
DxKn		X

Fig.15. Prueba de Mann-whitney. Los grupos Co y Kn no presentan diferencias significativas entre sí, al igual que los grupos Dx y DxKn entre ellos. Se deduce que la dexametasona ha provocado este aumento significativo en los valores de glucosa en orina.

5.11. ANÁLISIS DEL CARIOTIPO:

PAR	BC	LT	LR	IC
1	24,52	170,24	10,709	0,144
	24,05	159,15	10,011	0,15
2	0	155,44	9,77	0
	0	156	9,813	0
3	0	97,12	6,109	0
	0	100	6,291	0
4	0	94,44	5,941	0
	0	95	5,976	0
5	0	92,76	5,835	0
	0	92,39	5,812	0
6	0	84,61	5,32	0
	0	80	5,284	0
7	0	82,3	5,177	0
	0	81	5,095	0
8	0	75,33	4,738	0
	0	76,53	4,814	0
9	0	68,94	4,33	0
	0	71,77	4,514	0
10	0	67,2	4,22	0
	0	59,845	3,764	0
11	16	73	4,592	0,219
	15,89	61,72	3,882	0,257
PAR	BC	LT	LR	IC
12	16,142	42	2,642	0,384
	16,92	40,78	2,565	0,414
13	21	59	3,711	0,355
	29,7	60,022	3,77	0,494
14	29	59	3,711	0,491
	31,31	58	3,648	0,539
15	22,98	60,14	3,783	0,382
	28,99	59,02	3,716	0,49
16	27,06	60,08	3,779	0,45
	29,5	63,789	4,012	0,462
17	28	53,28	3,351	0,525
	26	53,9	3,39	0,482
18	30,45	60,11	3,781	0,506
	27,02	56,54	3,55	0,477
19	15,03	46,85	2,947	0,32
	22,77	47,61	2,99	0,47
20	19,91	38,16	2,4	0,52
	22,3	45	2,83	0,495
X	0	70,26	4,419	0
Y	0	46,6	2,931	0

Fig.16. Tabla de la posición de cada pareja cromosómica (PAR), realizada a partir de las medidas obtenidas y de los índices calculados. Longitud brazo corto (BC), Longitud total del cromosoma (LT), Longitud relativa (LR) e Índice centromérico (IC).

El cariotipado se realizó a partir de la tinción no diferencial, y mostró un número normal de cromosomas (21 parejas) para una rata macho de la especie *Rattus norvegicus*, con sus respectivos cromosomas X e Y. Además, su morfología, tamaño e índices centroméricos están dentro de lo normal. El cariotipo completo se encuentra adjuntado en el Anexo 1.

Los resultados individuales de cada uno de los animales de los grupos de cada laboratorio se adjuntan en el Anexo 2.

6. DISCUSIÓN

Analizando la progresión de los pesos corporales durante el tratamiento (Fig.1), el grupo control lo incrementó de forma progresiva durante los 10 días hasta ganar 25,8g (Fig. 2A). Esto se acerca a lo esperado, ya que se trata de ejemplares jóvenes que, a juzgar por su peso inicial aproximado de 200 g, rondaban la edad de 7-8 semanas (Cossio-Bolaños *et al.*, 2013), por lo que progresaron con su crecimiento y aumento de peso normal, ajustándose este incremento dentro de las curvas de referencia elaboradas por otros trabajos para valorar el crecimiento físico de ratas macho Wistar en condiciones no invasivas (Cossio-Bolaños *et al.*, 2013). El efecto de la Kanamicina no ha provocado diferencias apreciables en este valor, siendo la progresión del peso muy similar al tratamiento control (Fig.1). Se sabe que este antibiótico, administrado de forma oral, puede provocar reacciones adversas como náuseas, vómitos o diarreas (Velasco *et al.*, 2003), además de producir síndrome de malabsorción tras administración crónica (Lorenzo *et al.*, 2008), con la consiguiente pérdida de peso que conlleva. Sin embargo, nuestros resultados nos muestran que el crecimiento y ganancia de peso de los animales no ha sido afectado por la Kanamicina, quizá debido a que los animales no consumieron la cantidad de líquido esperada, o bien porque la concentración del antibiótico en el agua de los bebederos fuera inferior a la correcta o a la necesaria para provocar un efecto visible en 10 días. En el caso de la Dexametasona, sí provocó una significativa disminución del peso corporal (Fig. 1), efecto posiblemente debido a las propiedades catabólicas de los glucocorticoides, como el aumento del nivel de aminoácidos en plasma a expensas de una mayor desintegración de proteínas en el músculo, con la consiguiente disminución de la masa muscular (Brunton *et al.*, 2009), la activación de la lipólisis y liberación de ácidos grasos y glicerol del tejido adiposo, o la disminución de la formación ósea con aumento de la actividad osteoclástica (Lorenzo *et al.*, 2008). Además, la administración de glucocorticoides en altas dosis durante la niñez y la adolescencia bloquea la acción de algunos estímulos sobre la hormona del crecimiento (GH) (Lorenzo *et al.*, 2004),

por lo que las ratas Wistar de nuestro experimento, al ser jóvenes, podrían haber sufrido en este sentido una inhibición de su crecimiento normal. Este resultado se asemeja a los obtenidos en otros trabajos, donde las ratas Wistar tratadas con Dexametasona mostraron un peso corporal así como un consumo de alimentos inferior al grupo control (Cruz *et al.*, 2011), aunque en nuestro caso no pudimos comprobar la cantidad de alimento ingerido durante el tratamiento. No se observaron interacciones entre los tratamientos, comportándose el grupo doble de una forma muy similar al del grupo Dexametasona (Fig. 1).

En el hígado, la administración de Dexametasona ha provocado una disminución significativa del peso del órgano (Fig. 3A) y un aumento significativo de su índice organosomático (IO) (Fig. 4A). Es decir, su tamaño con respecto al tamaño total del animal tratado con Dexametasona es mayor. Esto queda reflejado en las gráficas, donde por un lado es el órgano cuyo peso ha disminuido en menor medida por el efecto de la Dexametasona (Fig. 3A,B,C,D), y por otro es el único que ha aumentado significativamente su IO en relación al resto de órganos y tratamientos (Fig. 4A,B,C,D). Se debe al efecto del glucocorticoide administrado: la Dexametasona provoca la estimulación de la gluconeogénesis mediante la síntesis y activación de las enzimas implicadas, el aumento de la glucogenogénesis por activación de la glucógeno-sintetasa hepática y la movilización de los aminoácidos obtenidos del catabolismo proteico, que servirán como sustrato para la formación de glucosa en el tejido hepático (Velasco *et al.*, 2003). De esta forma, se produce un incremento de glucosa y almacenamiento de glucógeno en el hígado, así como una entrada de los sustratos necesarios para su síntesis, con el consiguiente aumento de peso.

Esto anteriormente descrito está relacionado con otros parámetros analizados, tal como la cantidad de glucógeno hepático total y en relación al peso del órgano. Como se ha mencionado, esta activación de las enzimas que participan en la glucogenogénesis trae consigo el incremento de la síntesis hepática de glucógeno (Lorenzo *et al.*, 2008). En los resultados de glucógeno total (Fig. 5A) se observa que, a pesar de que la Dexametasona provocó un pequeño incremento, no hubo diferencias significativas de ningún fármaco ni interacción entre ellos. Esto podría tener su explicación en que el hígado tratado con Dexametasona ha disminuido su tamaño con respecto a los de los demás tratamientos. Sin embargo, analizando la cantidad de glucógeno en relación al peso del hígado (Fig. 5B), donde cabría esperar el aumento de su almacenamiento por efecto del glucocorticoide, observamos que, aunque la Dexametasona tiene tendencia a producir un aumento, no llega a ser significativo, por lo que no podemos afirmar que el fármaco este provocando este aumento.

Una posible explicación de que este incremento del almacenaje no llegue a ser significativo, es que los glucocorticoides producen también una acción permisiva de otras hormonas, como el glucagón (Lorenzo *et al.*, 2008), por lo que podría contribuir de esta forma en el catabolismo del glucógeno hepático acumulado.

En la periferia, los glucocorticoides disminuyen la utilización de glucosa, aumentan la desintegración de proteínas y activan la lipólisis, proporcionando aminoácidos y glicerol para la gluconeogénesis (Hardman *et al.*, 2003). Además, aumentan la resistencia a la insulina hepática y periférica (McMahon *et al.*, 1988; Midvedt *et al.*, 2004), reduciendo aún más la captación de glucosa. Todo esto trae como resultado una hiperglucemia, que concuerda con nuestros resultados (Fig. 11), en los que la administración de Dexametasona ha producido un aumento significativo de la concentración en glucosa en sangre. Sin embargo, los valores promedios del grupo control y del grupo tratado sólo con Kanamicina son anormalmente altos, llegando a 200 mg/dL en las ratas a las que no se les ha suministrado tratamiento alguno. En la rata, la glucemia en ayunas tiende a ser más alta que en el hombre, con una variación considerable en el valor medio (98-152 mg/dL), debiéndose gran parte de esta variación a factores ambientales, el muestreo empleado y las diferencias analíticas existentes entre laboratorios (Bolani *et al.*, 1990). Además. Los métodos de recogida de la sangre en la rata pueden ejercer un efecto significativo sobre los niveles de glucosa, variando su concentración según la duración de la manipulación del animal, el método de anestesia, el procedimiento, la duración de la inmovilización y el ayuno de 24 h, así como el método de extracción de sangre (Bolani *et al.*, 1990). Aún así, los valores de glucosa en el control siguen siendo demasiado elevados, sobretodo en el laboratorio 1 de tarde (T1) (Anexo 2), pudiendo ser en parte debido a que las ratas tomaran alimento momentos antes de la toma de muestras, añadiéndole el factor estresante que pudieran sufrir, o bien a un fallo en los glucosímetros.

Las glándulas suprarrenales han sufrido un significativo descenso de peso tras la administración de Dexametasona (Fig.3.D), que también ha provocado una reducción significativa de su IO (Fig.4.D). Interpretamos que se ha producido una disminución de su tamaño relacionado con el efecto lipolítico que ha afectado también a todo el individuo, y a la vez, ha disminuido su peso relativo respecto al del animal por un proceso de atrofia, ya que el glucocorticoide ha provocado la supresión del estímulo que la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona corticotropina (ACTH) producen sobre la glándula adrenal (Orduña-Valls *et al.*, 2016). Es decir, la Dexametasona produce una supresión del eje hipofisocorticosuprarrenal, en el que frena la síntesis y liberación de ACTH por

retroalimentación negativa, disminuyendo secundariamente la producción de corticoides endógenos por las propias glándulas suprarrenales, provocando su atrofia (Velasco *et al.*, 2003), tal como muestran nuestros resultados.

Entre sus acciones inmunosupresoras, los glucocorticoides producen la muerte de los timocitos inmaduros en concentraciones bajas, así como la apoptosis de ciertos subtipos de células T maduras en concentraciones más elevadas (Velasco *et al.*, 2003), mostrándose estas células más sensibles a la acción de los glucocorticoides que los linfocitos B (Ansar & Sriranganathan, 1994). Así, los órganos linfoides primarios, como el timo, parecen ser altamente sensibles a la glucocorticoides, que a dosis elevadas provoca su involución y disminución de tamaño (Tresguerres, 1989). Esto se ha comprobado en numerosos estudios, donde la dexametasona provocó la atrofia del órgano (Ansar & Sriranganathan, 1994). Nuestros resultados reflejan lo anteriormente expuesto, donde la Dexametasona también ha provocado significativamente la disminución del peso y del IO del timo, no observándose efecto de la Kanamicina ni interacción entre fármacos (Fig.3.C y Fig.4.C).

Esta acción inmunosupresora de los glucocorticoides también afecta al tejido linfoide del bazo. Se ha comprobado que la Dexametasona induce la inmunosupresión de las células T en los órganos linfoides periféricos, entre los que se encuentra el bazo, mediante la inhibición de la transcripción y secreción de citoquinas, como la interleuquina-1 (IL-1) y la interleuquina IL-2 (Cohn, 1991; Boumpas *et al.*, 1991). Aunque el efecto sobre los linfocitos B es menor, estos también poseen receptores para los glucocorticoides, provocando en dosis farmacológicas una disminución de su multiplicación así como su muerte (Tresguerres, 1989). Esto concuerda con nuestros resultados, donde el bazo ha disminuido significativamente tanto su peso como su IO (Fig.3.B y Fig.4.B) bajo el efecto de este fármaco esteroideo. Además, también se explica la notable reducción de la superficie ocupada por las PALS (Fig. 6 y Fig. 7) consecuencia directa del efecto inmunosupresor. La valoración del número de células plasmáticas IgG⁺, a su vez, también ha mostrado una disminución significativa en su número (Fig. 8). Esto puede explicarse tanto por la disminución de linfocitos B, como por la reducción de la síntesis de inmunoglobulinas G en su superficie. En dosis fisiológicas, el cortisol aumenta la síntesis de inmunoglobulinas, pero si las dosis pasan a ser farmacológicas, disminuye su síntesis (Tresguerres, 1989). Así, la elevada acción glucocorticoide provocada por la administración de dexametasona explica la reducción observada en el número de linfocitos b IgG⁺ positivos en el bazo. Por otro lado, no parece haber interacción de la Kanamicina en los parámetros medidos en este órgano ni interacción con la Dexametasona.

En la cuantificación de proteínas plasmáticas totales (Fig.12), no parece haber efecto de ninguno de los dos fármacos por separado. Sin embargo, los resultados muestran un aumento de proteínas casi significativo causado por la interacción conjunta. Esto no se ajusta del todo a lo esperado, ya que los glucocorticoides producen, en ratas, un aumento de la síntesis de proteínas hepáticas (Tresguerres, 1989), tales como la albúmina (Cruz *et al.*, 2011); (Savary *et al.*, 2001), la α -1 glicoproteínas ácida o la α -2 macroglobulina, y una disminución en el fibrinógeno sólo significativo en ratas longevas (Savary *et al.*, 2001). Además, también se cuantificó en este último trabajo mencionado un aumento de proteínas plasmáticas totales en ratas no longevas tras la administración de dexametasona respecto al control, alcanzando unos valores de 69,2 mg/ml (Savary *et al.*, 2001). Nuestras ratas control, al ser individuos jóvenes, deberían haber tenido una respuesta al glucocorticoide administrado y haber aumentado la expresión de proteínas con el consecuente aumento de su concentración sanguínea, pero sin embargo, los resultados muestran que incluso el grupo Dx ha descendido la concentración. En principio, nada lleva a pensar que la interacción entre los fármacos haya sido el responsable del aumento de concentración en el grupo doble, por lo que nos guiamos por los resultados no significativos del estadístico para descartar un posible efecto sinérgico.

No se pudo calcular la proporción relativa de IgGs plasmáticas. La administración de dosis farmacológicas de glucocorticoides disminuyen la síntesis de inmunoglobulinas, así como la multiplicación de linfocitos B, pudiendo llegar a su apoptosis (Tresguerres, 1989). Según lo anterior, los resultados podrían haber mostrado una disminución de la proporción relativa de IgGs respecto al total. Esto quedaría reflejado en el gel de poliacrilamida y en la nitrocelulosa de inmunodetección (Fig. 13), como una menor densidad de las bandas correspondientes a las cadenas H de las IgGs en los carriles de los grupos Dx y DxKn.

Ningún fármaco ha provocado la aparición de cetonuria. La aparición de cuerpos cetónicos en orina implica que están también presentes en la sangre (Montero & Jiménez, 2015), por lo que parece que estos fármacos no afectan en el metabolismo de estos compuestos. En cuanto a la posible presencia de glucosa en orina, los resultados muestran que la presencia de dexametasona provoca claramente un estado de glucosuria en los animales (Fig. 14). Cuando los niveles de glucemia son normales, el túbulo renal es capaz de reabsorber toda la glucosa que se filtra en los glomérulos, por lo que no aparece en orina, pero si se produce un estado de hiperglucemia, se produce una saturación de los mecanismos de reabsorción tubular y la glucosa comienza a aparecer en orina (Montero & Jiménez, 2015). Esto concuerda con nuestros resultados, ya que la hiperglucemia provocada a causa de la administración de

dexametasona (Fig. 11) es causa directa de la glucosuria producida en los grupos Dx y DxKn (Fig. 14), por saturación de la reabsorción tubular. Otro dato más que ayuda a contrastar esto, es que los grupos del laboratorio T1, donde se obtuvieron los valores más elevados de glucosa en sangre, también poseen los valores más elevados de glucosuria (Anexo 2). Los valores de glucosuria en el grupo DxKn han sido más elevados (Fig.14), y se podría pensar en un primer momento en que la kanamicina estuviera provocando cierto grado de nefrotoxicidad, debido al acumulamiento del antibiótico en las células de la corteza renal, que provocaría daños en las células del túbulo renal (Velasco *et al.*, 2003) y que podría reducir la eficacia de la absorción de glucosa, principalmente en un estado de hiperglucemia debido a la dexametasona. Sin embargo, los resultados de la interacción no llegan a ser significativos, por lo que no podemos afirmar que haya efecto sinérgico, hecho que se consolida con la prácticamente nula absorción por vía oral que tiene la kanamicina (Velasco *et al.*, 2003), por lo que los efectos en este sentido, en caso de tenerlos, serían poco perceptibles.

Precisamente esta escasa absorción por vía oral es lo que permite a la kanamicina actuar a lo largo del tracto intestinal. Se trata de un antibiótico aminoglucósido con un amplio espectro bactericida (Velasco *et al.*, 2003), estando su acción principalmente dirigida contra los bacilos Gram-negativos (Anglada, 1997) y presentando una buena actividad frente a las enterobacterias (Velasco *et al.*, 2003), razón por la cual nuestros resultados han mostrado un descenso significativo del número de unidades formadoras de colonias de enterobacterias (Fig. 9). Este tipo de antibióticos penetran al interior bacteriano a través de un sistema de transporte activo dependiente del potencial de membrana generado en condiciones aerobias (Anglada, 1997), lo que junto a su amplio espectro bactericida explican el descenso que el antibiótico ha provocado en los microorganismos aerobios mesófilos totales. Es precisamente esta necesidad de condiciones aerobias para poder penetrar en la bacteria, lo que puede explicar, en parte, que el descenso en el número de unidades formadoras de colonias de enterococos no hay llegado a ser significativo, ya se trata de bacterias grampositivas anaerobias facultativas (Mandell *et al.*, 2016). Además, algunos enterococos son capaces de sintetizar enzimas inactivadoras de aminoglucósidos, destacando un porcentaje elevado de cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, lo que les confiere una gran resistencia a todos los aminoglucósidos (Bennett *et al.*, 2003). La inmunosupresión causada por el uso de dexametasona no parece tener ningún efecto significativo en la cantidad de microbiota intestinal de los microorganismos valorados (Fig. 9), ni tampoco ha provocado ninguna interacción significativa por su administración conjunta con el antibiótico que

provocará un descenso de su actividad bactericida. Sin embargo, debido a la acción antiinflamatoria e inmunosupresora de los glucocorticoides, se incrementa la predisposición a las infecciones (Velasco *et al.*, 2003), por lo que no se puede descartar que microorganismos como *E. faecalis* y *E. faecium*, habitantes comunes del tracto gastrointestinal de humanos y animales y responsables de la mayoría de infecciones enterocócicas (Kliegman *et al.*, 2016), puedan provocar una invasión intestinal agresiva ante la alteración de la respuesta inmunitaria y la poca eficacia que la kanamicina ejerce sobre ellos.

Como se ha comprobado, la administración de kanamicina por vía oral sólo provoca un efecto a nivel de tracto intestinal, ejerciendo una acción bactericida y suprimiendo el crecimiento de la microbiota, lo que demuestra que el fármaco no es inactivado durante su paso por el aparato digestivo (Hardman *et al.*, 2003). Quizás, esta escasa absorción en las vías gastrointestinales ha sido el motivo por el cual el antibiótico no ha provocado ningún efecto significativo en los demás niveles estudiados ni interacción valorable con la dexametasona, por lo que se deduce que por esta vía de administración aparentemente no produce efectos a nivel sistémico que pudieran provocar, en relación con el glucocorticoide, un efecto sinérgico o inhibitorio.

Finalmente, analizando el cariotipo y dentro de la valoración que la tinción no diferencial ha permitido, no se observa efecto alguno de los tratamientos a nivel cromosómico, presentando un número normal de cromosomas, y un tamaño e índice centromérico dentro de los valores correctos para la especie *Rattus norvegicus* (Hamta *et al.*, 2006).

7. CONCLUSIÓN.

1. La dexametasona provoca una disminución del peso corporal, debido al aumento de la proteólisis y lipólisis.
2. La dexametasona provoca un aumento del tamaño relativo del hígado respecto al tamaño del animal, debido a la estimulación de la gluconeogénesis, glucogenogénesis y síntesis proteica, mostrando tendencia a aumentar el almacenamiento de glucógeno.
3. La dexametasona provoca un efecto hiperglucemiante, debido al aumento de la gluconeogénesis y la disminución de la captación de glucosa, así como una glucosuria ligada a este aumento plasmático.
4. La dexametasona provoca una reducción de tamaño y atrofia de las glándulas suprarrenales.
5. El efecto inmunosupresor de la dexametasona disminuye considerablemente el tamaño del timo, así como del bazo y su proporción de tejido linfoide y número de células

plasmáticas IgG⁺ esplénicas.

6. Ninguno de los fármacos tiene efecto a nivel cromosómico.
7. La kanamicina disminuye los organismos aerobios mesófilos y enterobacterias de la microbiota gastrointestinal, mostrando tendencia a la reducción poblacional de enterococos.
8. No se observan efectos significativos de la kanamicina más allá del tracto gastrointestinal ni interacción aparente con la dexametasona, probablemente debido a la casi nula absorción del antibiótico por vía oral, que impide que el efecto a nivel sistémico sea aparente.

8. BIBLIOGRAFÍA.

Anglada, R.R. 1997. *Microbiología sanitaria y clínica*. 751 págs. Editorial Síntesis. Madrid.

Ansar, S., & Sriranganathan, N. 1994. Differential effects of dexamethasone on the thymus and spleen: alterations in programmed cell death, lymphocyte subsets and activation of T cells. *Inmunopharmacology*, 28: 55-66

Barnes, P.J. 2010. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 120: 76-85.

Bennet, J.E., Dolin, R., & Blaser, M.J. 2016. *Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades Infecciosas*. 3960 págs. ELSEVIER. Barcelona.

Bolani, B., Calvo, M.A., Cejalvo, D., Gimeno, O., Gimeno, L., & Lloris, J.M. 1990. Hematología y Bioquímica Clínica de la Rata. Parte 2. *Research in Surgery*, suplemento 4, abril 1990.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.

Brunton, L.; Lazo, J. & Parker, K. 2009. *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*. 11^a Edición. McGraw-Hill. México.

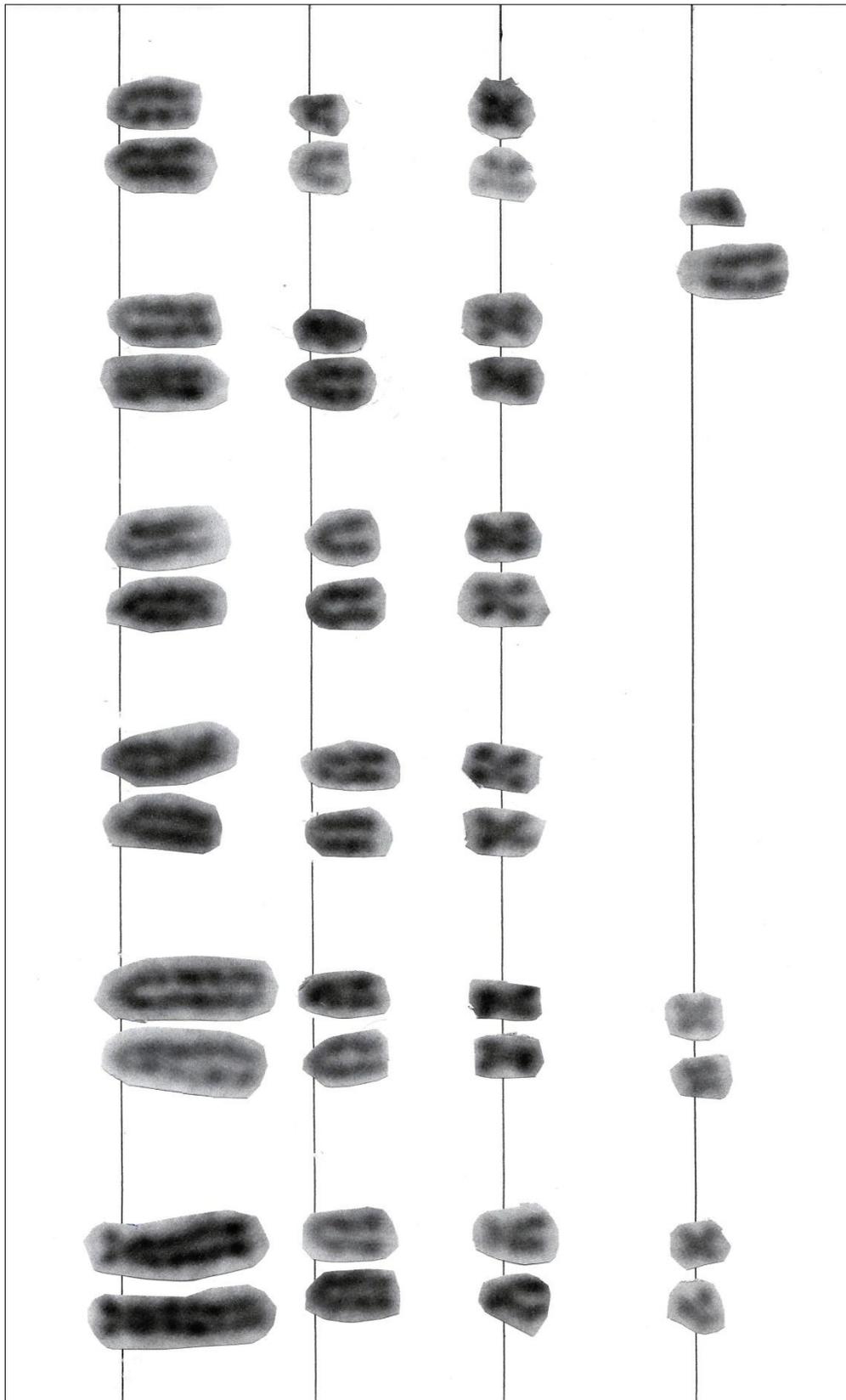
Cossio-Bolaños, M., Gómez, R., Vargas, R., Tadeu, R., & de Arruda, M. 2013. Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición Hospitalaria*, 2013, 28(6): 2151-2156.

Cruz, J.M., Narváez, W.V., Urrea, M.I., Flórez, M., & Mesa, H. 2011. Efecto de la aplicación de dexametasona en la evolución de la enfermedad hepática crónica, en un modelo de experimentación murino. *Revista Lasallista de Investigación*, 2011, Vol.8 No.2.

Guión experimental y de Análisis de Datos. TFG específico, mención Biosanitaria. Curso 2015-2016. Universidad Complutense de Madrid (UCM).

- Hamta, A., Adamovic, T., Samuelson, E., Helou, K., Behboudi, A., & LEvan, G. 2006. Chromosome ideograms of the laboratory rat (*Rattus norvegicus*) based on high-resolution banding, and anchoring of the cytogenetic map to the DNA sequence by FISH in sample chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 115: 158-168.
- Hardman, J.G., Limbird, L.E., & Gilman, A.G. 2003. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica Vol.II*. 2149 págs. 10ª Edición. McGrawHill. Mexico.
- Hill, R.W., Wyse, G.A. & Anderson, M. 2004. *Fisiología animal*. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- Kliegman, R.M., Stanton, B., & St Geme III, J.W., & Schor, N.F. 2016. *Nelson. Tratado de pediatría*. 17ª Edición. ELSEVIER. Barcelona
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, M.A., & Portolés, A. 2008. *Farmacología Básica y Clínica. Velázquez*. 1369 págs. 18ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid
- McMahon, M., Gerich, J., & Rizza, R. 1988. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes Metab Rev*. 1988, 4:17-30.
- Midvedt, K., Hjelmesaeth, J., Hartman, A., Lund, K., Paulsen, D., & Egeland, T. 2004. Insulin resistance after renal transplantation: the effect of steroid dose reduction and withdrawal. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15.
- Montero, F.J., & Jiménez, M. 2016. Análisis elemental de orina. En: Jiménez, L., Montero, F.J. *Medicina de Urgencias y emergencias*. Capítulo 7. 51-56. ELSEVIER. Barcelona.
- Orduñas-Valls, J.M., Nebreda-Clavo, C.L., López-Pais, P., Torres-Rodríguez, D., Quintans-Rodríguez, M., & Álvarez-Escudero, J. 2016. Características de los corticoides particulados y no particulados. Condicionantes para su uso en el tratamiento del dolor crónico. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*, 2016.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., & Moore, P.K. 2003. *Farmacología*. 797 págs. 5ª Edición. ELSEVIER. Madrid.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Sci USA*, 74: 5463-7
- Savary, I., Debras, E., Dardevet, D., Rambourdin, F., Vason, M.P., Obled, C., & Grizard, J. 2001. Evidence for an alteration of plasma and liver proteins response to Dexametashone in aging rats. *Mechanisms of Aging and Development*, 122: 105-120.
- Tresguerres, J.A.F. 1989. *Fisiología Endocrina*. EUDEMA, S. A. Madrid
- Velasco, A., San Román, L., Serrano, J., Martínez-Sierra, R. & Cadavid, I. 2003. *Farmacología fundamental*. 1019 págs. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.

ANEXO 1 CARIOTIPO



ANEXO 2 RESUMEN RESULTADOS GRUPOS

Rata	Trat.	Prots plasma (mg/mL)	% IgG (H)	Glucosa sangre (mg/dL)	Glucosa orina (mg/dL)	C. Ceton orina (mg/dL)	Glucóg hepático (mg)	Glucóg (mg/g Híg)	Cls Plas/ campo40x	% PALS	Aerobios mesófilos (ufc/g)	Enterobac (ufc/g)	Enterococ (ufc/g)
M1-1	Dx	22,43		345	750	0	444,00	46,43	13,3	10,93	7,65E+06	2,01E+05	3,80E+06
M1-2	Kn	14,68		168	0	0	494,94	42,38	13,6	19,15	8,15E+05	0,00E+00	2,43E+05
M1-3	DxKn	55,94		84	250	0	277,27	33,37	15,8	9,16	2,13E+06	0,00E+00	0,00E+00
M1-4	Co	33,60		108	0	0	459,00	38,88	21,9	14,29	1,15E+07	4,70E+03	4,95E+06
M2-1	Dx	43,64		177	0	0	788,48	90,72	5,2	9,24	7,60E+06		8,20E+05
M2-2	Kn	35,84		179	0	0	560,00	51,04	9,8	21,62	1,80E+05	1,59E+04	2,16E+04
M2-3	DxKn	73,60		204	0	0	256,85	26,92	10,8	12,60	6,30E+06	1,90E+04	9,15E+04
M2-4	Co	45,57		146	0	0	315,00	31,53	17,3	17,15	3,85E+05	4,65E+03	1,45E+03
M3-1	Dx	35,52		196	250	0	387,90	38,68	6,4	7,13	1,11E+07	3,66E+04	1,91E+06
M3-2	Kn	46,72		116	0	0	406,53	37,30	3,0	30,00	3,34E+06	2,40E+04	5,45E+04
M3-3	DxKn	100,34		217	100	0	288,60	29,66	2,0	16,90	1,50E+04	0,00E+00	1,29E+05
M3-4	Co	63,36		155	0	0	883,50	81,06	6,1	26,88	3,20E+07	1,01E+05	5,43E+07
M4-1	Dx	41,60		268	1000	0	382,90	42,80	16,0	12,00	1,09E+08	1,84E+05	1,43E+07
M4-2	Kn	55,04		134	0	0	601,00	53,50	9,0	20,50		6,30E+05	0,00E+00
M4-3	DxKn	66,56		241	1000	5	340,60	40,40	15,0	11,00		4,50E+03	1,78E+06
M4-4	Co	51,20		242	0	0	353,40	33,10	18,0	27,00	1,92E+08	1,81E+04	2,50E+06
T1-5	Dx	42,40		342	2000	0	716,11	56,56	4,9	10,72	1,17E+08	1,46E+07	
T1-6	Kn	37,78		289	250	0	501,40	41,75	15,1	29,31	1,60E+06	1,69E+05	
T1-7	DxKn	53,76		290	2000	0,025	1034,00	87,00	6,8	18,33	3,40E+04	6,60E+03	
T1-8	Co	47,25		313	250	0	650,00	41,00	23,4	29,50	4,15E+06	3,79E+04	
T2-5	Dx	79,54		298	250	0	555,88	53,45	9,7	16,00	4,50E+06	1,22E+05	1,02E+06
T2-6	Kn	69,91		240	0	0	380,70	35,62	25,7	28,00	9,60E+04	6,10E+04	3,10E+04
T2-7	DxKn	74,24		279	100	0	593,42	59,05	9,8	10,49	2,20E+03	9,05E+03	1,80E+07
T2-8	Co	81,92		131	0	5	339,17	33,21	32,4	22,07	1,19E+08	2,66E+07	
T3-5	Dx	58,93		318	500	0	582,00	62,87	4,0	7,38	1,06E+07	5,10E+04	5,33E+06
T3-6	Kn	30,64		169	0	0	342,30	30,60	35,9	20,20	9,20E+03	1,22E+04	1,93E+04
T3-7	DxKn	55,40		276	1500	3	709,85	72,13	14,0	17,70	8,10E+07	8,00E+02	2,90E+05
T3-8	Co	27,10		310	0	0	415,00	37,56	23,7	30,26	2,46E+06	1,20E+04	4,45E+05

Rata	Tratam.	Peso Inicial (g)	Peso Interm (g)	Peso Final (g)	P Int-Ini (g)	P Fin-Ini (g)	P Hígad (g)	Higad (IO) (mg/g)	P Bazo (g)	Bazo (IO) (mg/g)	P Timo (g)	Timo (IO) (mg/g)	P Adren (g)	Adren (IO) (mg/g)
M1-1	Dx	234,0	202,0	177,0	-32,0	-57,0	9,56	54,02	0,25	1,42	0,19	1,07	0,021	0,120
M1-2	Kn	246,0	255,0	270,5	9,0	24,5	11,68	43,17	0,61	2,25	0,54	1,99	0,063	0,230
M1-3	DxKn	245,0	220,0	199,4	-25,0	-45,5	8,31	41,68	0,33	1,65	0,22	1,20	0,024	0,119
M1-4	Co	260,0	275,0	288,6	15,0	28,6	11,80	40,91	0,55	1,89	0,45	1,57	0,060	0,210
M2-1	Dx	248,0	233,0	200,0	-25,0	-48,0	8,69	43,45	0,28	1,38	0,26	1,30	0,027	0,135
M2-2	Kn	253,0	260,0	288,0	7,0	35,0	11,03	38,29	0,66	2,29	0,52	1,82	0,060	0,200
M2-3	DxKn	260,0	223,0	193,0	-37,0	-67,0	9,54	49,43	0,27	1,40	0,21	1,09	0,040	0,210
M2-4	Co	227,0	238,0	246,0	11,0	19,0	9,99	40,60	0,56	2,27	0,27	1,10	0,057	0,230
M3-1	Dx	252,0	225,0	208,0	-27,0	-44,0	10,25	49,00	0,32	1,54			0,040	0,192
M3-2	Kn	249,0	258,0	271,8	9,0	22,8	10,90	40,10	0,65	2,39	0,64	2,35	0,080	0,290
M3-3	DxKn	256,0	223,0	192,5	-33,0	-63,5	9,70	50,39	0,20	1,04	0,60	3,11	0,010	0,052
M3-4	Co	218,0	225,0	236,9	7,0	18,9	10,90	46,02	0,64	2,70	0,59	2,49		
M4-1	Dx	230,0	210,0	184,0	-20,0	-46,0	8,95	49,76	0,36	1,95	0,12	0,65	0,030	0,160
M4-2	Kn	253,0	262,0	281,0	9,0	28,0	11,24	39,97	0,62	2,20	0,53	1,88	0,044	0,160
M4-3	DxKn	235,0	213,0	192,0	-22,0	-43,0	8,43	43,86	0,31	1,61	0,09	0,47	0,032	0,170
M4-4	Co	245,0	253,0	261,0	8,0	16,0	10,68	40,92	0,82	3,14	0,71	2,72	0,051	0,200
T1-5	Dx	266,0	242,0	208,8	-24,0	-57,2	12,66	60,63	0,33	1,58	0,33	1,58	0,022	0,110
T1-6	Kn	235,0	243,0	263,7	8,0	20,7	12,01	45,54	0,76	2,88	0,41	1,55	0,062	0,233
T1-7	DxKn	250,0	235,0	216,2	-15,0	-33,8	11,50	53,19	0,30	1,39	0,20	0,93	0,026	0,122
T1-8	Co	280,0	303,0	321,5	23,0	41,5	15,62	48,60	0,80	2,49	0,62	1,93	0,078	0,240
T2-5	Dx	250,0	220,0	195,6	-30,0	-54,5	10,40	53,10	0,20	1,02	0,23	1,17	0,024	0,123
T2-6	Kn	254,0	260,0	279,0	6,0	25,0	10,69	38,32	0,62	2,22	0,52	1,86	0,058	0,210
T2-7	DxKn	248,0	220,0	193,0	-28,0	-55,0	10,05	52,07	0,33	1,71	0,12	0,62	0,023	0,110
T2-8	Co	249,0	265,0	285,0	16,0	36,0	10,21	35,82	0,59	2,07	0,48	1,68	0,090	0,315
T3-5	Dx	220,0	200,0	182,0	-20,0	-38,0	9,26	50,88	0,29	1,59	0,53	2,91	0,038	0,210
T3-6	Kn	220,0	227,0	242,8	7,0	22,8	11,16	45,97	0,50	2,05	0,75	3,09	0,110	0,450
T3-7	DxKn	259,0	233,0	196,2	-26,0	-63,0	9,84	50,15	0,25	1,27	0,60	3,05	0,030	0,150
T3-8	Co	239,0	250,0	260,0	11,0	21,0	11,05	42,50	0,40	1,54	0,96	3,69	0,062	0,238

ANEXO 3 RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Variable dependiente	variable indep. en el modelo final	Modelo final	P-valor	R2
Peso Intermedio-Inicial (g)	Dx	$P \text{ Int- Ini (g)} = 10,428 - 36,428 * Dx$	<0,0001	92,75%
Peso Final-Inicial (g)	Dx	$P \text{ Fin-Ini (g)} = 25,7 - 76,807 * Dx$	<0,0001	95,36%
Peso Hígado (g)	Dx	$P \text{ Hígad (g)} = 11,354 - 1,558 * Dx$	0,0032	28,90%
Índice Organosomático Hígado (mg/g)	Dx	$IO \text{ Hígado (mg/g)} = 41,909 + 8,205 * Dx$	<0,0001	49,95%
Peso Bazo (g)	Dx	$P \text{ Bazo (g)} = 0,627 - 0,34 * Dx$	<0,0001	80,39%
Índice Organosomático Bazo (mg/g)	Dx	$IO \text{ Bazo (mg/g)} = 2,312 - 0,845 * Dx$	<0,0001	62,92%
Peso Timo (g)	Dx	$P \text{ Timo (g)} = 0,57 - 0,286 * Dx$	0,0002	42,70%
Índice Organosomático Timo (mg/g)	Dx	$IO \text{ Timo (mg/g)} = 2,122 - 0,649 * Dx$	0,0485	14,68%
Peso Glándulas Adrenales (g)	Dx	$P \text{ Adren (g)} = 0,067 - 0,0396 * Dx$	<0,0001	69,39%
Índice Organosomático Adren (mg/g)	Dx	$IO \text{ Adren (g)} = 0,246 - 0,104 * Dx$	0,0001	45,71%
Prots. plasm. (mg/mL)	Dx Kn Dx*Kn	$Prots. \text{ Plasm. (mg/mL)} = 49,105 - 1,712 * Dx - 49,023 * Kn + 180,727 * Dx + Kn$	0,859 0,484 0,064	24,52%
Glucosa sangre (mg/dL)	Dx	$Glucosa \text{ sangre (mg/ml)} = 192,857 + 72,604 * Dx$	0,0072	25,51%
Cuerpos Cetonicos orina (mg/dL)	Dx Kn Dx*Kn	$C. \text{ Ceton. orina (mg/dL)} = 0,693 - 0,662 * Dx - 4,931 * Kn + 12,048 * Dx * Kn$	0,377 0,361 0,105	11,80%
Glucógeno hepático (mg)	Dx Kn Dx*Kn	$Glucóg. \text{ hepá. (mg)} = 496,068 + 25,261 * Dx - 254,202 * Kn + 309,771 * Dx * Kn$	0,815 0,744 0,768	1,99%
Glucógeno (mg/g Híg)	Dx Kn Dx*Kn	$Glucóg. \text{ (mg/g Híg)} = 43,134 + 10,324 * Dx - 16,056 * Kn + 8,191 * Dx * Kn$	0,277 0,812 0,928	10,20%
Células plasmáticas IgG+/ campo40x	Dx	$Cls \text{ Plas/ campo40x} = 18,207 - 8,657 * Dx$	0,0056	25,93%
% PALS	Dx	$\% \text{ PALS} = 23,995 - 11,882 * Dx$	<0,0001	64,35%
Log (Aerobios mesófilo (ugf/g) +1)	Kn	$Log \text{ (Aerobios mesófilos (ugf/g) +1)} = 16,484 - 26,138 * Kn$	0,0004	41,78%
Log (Enterobac (ufc/g) +1)	Kn	$Log \text{ (Enterobac (ufc/g) +1)} = 11,242 - 22,73 * Kn$	0,0307	17,34%
Log (Enterococ (ufc/g)+1)	Kn	$Log \text{ (Enterococ (ufc/g)+1)} = 13,885 - 24,781 * Kn$	0,0596	15,88%