



ARTÍCULO ORIGINAL

Hidrolizado de Sericina "SeriC": Evaluación del potencial genotóxico en ensayos a corto plazo

Sericin hydrolysate "SeriC": Assessment of genotoxic potential in short-term assays

Anabel Villa Testa¹, Sarah Fuentes Wajner¹, Zuarmis Medina Blanco¹, Adileidys Ruiz Barrcena², Saúl Padrón Yaquis¹ , Janet Piloto Ferrer¹ *

1 Centro de investigación y desarrollo de medicamentos, Cuba.

2 Entidad de Ciencia Tecnología e Innovación Sierra Maestra, Cuba.

*Autor para correspondencia:
janet.piloto@cidem.cu

RESUMEN

La Sericultura en el mundo data de más de 5 mil años y Cuba asume esta actividad como una alternativa sostenible para el desarrollo de productos destinados a las industrias biomédicas, biotecnológicas, cosméticas y textil. La sericina, por ser una proteína natural, es susceptible a la acción de enzimas proteolíticas, por lo tanto es digerible, biocompatible y biodegradable y se ha informado que puede ser aprovechada en el área de los alimentos y cosmeceútica debido a que posee propiedades como actividad antioxidante y antitirocinasa. Sin embargo, hasta la fecha muy poco se conoce sobre su potencial daño al ADN. Por tal motivo el objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial genotóxico del Hidrolizado de sericina Seric para su posterior incorporación en formulaciones cosmeceúticas. Para ello, se utilizaron dos ensayos a corto plazo, el sistema *in vitro* *Salmonella*/microsoma (Test de Ames) y el modelo *in vivo* de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. Los resultados obtenidos en el test de Ames mostraron que Seric a las concentraciones evaluadas no ocasionó daño al DNA. Igualmente el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón mostró que Seric C administrado por vía oral no indujo daño cromosómico, ni sobre el huso mitótico en el tejido eritropoyético de los animales tratados, lo cual se corroboró al no observarse aumento de la frecuencia de micronúcleos en las dosis empleadas respecto a los controles negativos y no tratados. Estos resultados indican que el hidrolizado de sericina Seric se considera no genotóxico en las condiciones evaluadas por lo que pudiera emplearse como materia prima segura para su futura inclusión en diferentes formulaciones para las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria.

Palabras clave: micronúcleos, mutagenicidad, reversión bacteriana, seguridad genotóxica

Recibido: 2020-09-15

Aceptado: 2021-07-26

ABSTRACT

The Sericulture in the world has been developed for more than 5,000 years and Cuba undertake this activity as a sustainable alternative for the development of products for the biomedical, biotechnological, cosmetic and textile industries. Sericin, as a natural protein, is susceptible to the action of proteolytic enzymes; therefore it is digestible, biocompatible and biodegradable. It has been reported that it can be used in the food and cosmeceutical area due to its properties such as antioxidant and antityrosinase activity. However, nowadays the information that is known about its potential damage to DNA is scarce. Hence, the aim of this study was to evaluate the genotoxic potential of the sericin hydrolysate SericC for its subsequent incorporation into cosmeceutical formulations. In order to achieve this goal, two short-term tests were used, the in vitro Salmonella / microsome system (Ames test) and the in vivo model of micronucleus induction in mouse bone marrow. The results obtained in the Ames test showed that SericC, at the concentrations tested, did not cause DNA damage. Likewise, the mouse bone marrow micronucleus induction test showed that SericC, administered via oral, did not induce chromosomal damage or mitotic spindle damage in the erythropoietic tissue of treated animals. This was verified because an increase in the frequency of micronuclei was not observed in the doses used compared to the negative and untreated controls. These results show that the sericin hydrolysate SericC is considered non-genotoxic under our evaluated conditions. Furthermore, it can be used as a safe raw material for its future inclusion in different formulations for the pharmaceutical, cosmetic and food industries.

Keywords: Micronuclei, Mutagenicity, Bacterial Reversal, Genotoxic Safety

INTRODUCCIÓN

La introducción de la Sericultura en Cuba data del siglo XIX (1824-1945). Sin embargo, se abandona por diversas causas, entre ellas la aparición de una devastadora enfermedad denominada pebrina y la carencia de bases científicas para enfrentar estas adversidades. Cuba retoma la sericultura como una alternativa sostenible para el desarrollo de productos destinados a diferentes industrias, de ahí que desarrolle sus bases científico-metodológicas a fin de garantizar su sostenibilidad. A finales de 2011, se inicia el Proyecto Nacional de Sericultura, para el escalado productivo de la crianza del gusano de seda (*Bombyx mori*), sobre bases sostenibles, con el fin de obtener subproductos para las industrias médico-farmacéutica, cosmética, biotecnológica y textil (Hernández, 2017).

La sericina es una mezcla natural de proteínas sintetizadas por las larvas del gusano de seda (*Bombyx mori*). La seda natural consta de dos proteínas, sericina y fibroína, siendo la fibroína el centro estructural y la sericina el recubrimiento superficial que la rodea. La sericina es esencial en la formación de un capullo, sin embargo, dado que la sericina afecta el teñido de la tela de seda y la sensación del hilo de seda, se elimina durante el desgomado o refinado de la seda cruda. En la seda, la sericina representa aproximadamente el 20-30% del peso y la fibroína representa el resto (Dong *et al.*, 2020). El peso molecular de la sericina se encuentra entre 10 y 400 kDa (Chirila *et al.*, 2016, Jena *et al.* 2018). Se han encontrado un total de 18 tipos de ami-

noácidos en la sericina del gusano de seda, entre los cuales los aminoácidos polares representan aproximadamente el 78% (principalmente serina y ácido aspártico) y los aminoácidos no polares representan el 22% (Tsubouchi *et al.*, 2005).

Los resultados de estudios biomédicos modernos han mostrado que la sericina en capullos de gusanos de seda tiene múltiples actividades biológicas. Por ejemplo, se observó que la sericina activa la síntesis de colágeno en el tejido cutáneo y desempeña el papel de antiarrugas y antienvjecimiento a través de su actividad promotora de colágeno (Mandal y Kundu, 2009; Aramwit *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2020). La sericina podría estimular la proliferación celular en placas de cultivo sin suero (Tsubouchi *et al.*, 2005; Lapphanichayakool *et al.*, 2017). Otros estudios encontraron que la sericina reduce el contenido de lípidos séricos y mejora la tolerancia a la glucosa en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas (Okazaki *et al.*, 2010; Lapphanichayakool *et al.*, 2017) y tiene efectos protectores sobre lesiones hepáticas inducida por el alcohol en ratones (Li *et al.*, 2008). Además tiene actividad anticoagulante, fibrinolítica y de antiagregación (Guideline, 2011; Correa-Rivero *et al.*, 2020). Adicionalmente, se ha reportado que puede ser aprovechada en el área de los alimentos debido a que posee propiedades como actividad antioxidante y antityrosinasa (Aramwit *et al.*, 2010; Guideline, 2011; Debastiani *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que la sericina tiene un amplio potencial de aplicación y se ha aplicado en productos relacionados con la alimentación, cosméticos y suministros médicos (Cao y Zhang, 2016).

Actualmente, se ha informado sobre su potencial tóxico. En un estudio llevado a cabo por Qin *et al.* (2020), se demostró que el extracto acuoso de sericina no fue mutagénico ni genotóxico en ensayos *in vitro* e *in vivo*; sin embargo mostró baja toxicidad en sus condiciones experimentales en el ensayo de subcrónica de 90 días.

Aunque los efectos biológicos de la sericina en el capullo del gusano de seda han sido ampliamente reconocidos en público y confirmados mediante la investigación biomédica moderna, hasta la fecha se conoce muy poco sobre su potencial tóxico y genotóxico. Por tanto resulta imprescindible continuar su evaluación para que pueda ser incorporada como un compuesto seguro al arsenal terapéutico, cosmético o alimenticio. Por tal motivo el objetivo de este trabajo es evaluar el potencial genotóxico del hidrolizado de sericina SericC para su posterior incorporación en formulaciones cosmecéuticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características del hidrolizado de sericina: SericC

El hidrolizado de sericina, con nombre comercial SericC, fue obtenido de los capullos de gusanos de seda (*Bombyx mori* L.) cultivados en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, ubicado en Central España Republicana en Matanzas, Cuba. Para ello se siguió lo descrito por Hernández (2017). Los requisitos de calidad del hidrolizado de sericina, SericC se muestran en la Tabla 1. SericC es un producto estable a temperaturas inferiores a 30°C, con un período de validez de 18 meses, clasificó como no irritante dérmico ni ocular y fue registrado bajo la licencia 1305/15 Tomo II, Folio 305 del 21 de enero del 2015 (Hernández, 2017; Correa-Rivero *et al.*, 2020).

Tabla 1. Requisitos de calidad del hidrolizado de sericina SericC

Table 1: Quality requirements of SericC sericin hydrolizate

Requisitos de calidad	Hidrolizado de sericina SericC
Características organolépticas	líquido claro de color amarillo pálido, de olor característico
Concentración de proteínas	6,4 mg/mL
Densidad relativa a 20°C	1 g/L
pH	4,7
Carga microbiana UFC en 0,1 g o ml <100.	NO

Ensayo Reversión Bacteriana en *Salmonella typhimurium* (*Salmonella*/Microsoma)

Las cepas de *Salmonella typhimurium* empleadas en el ensayo fueron donadas por el Departamento de Microbiología de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo, Brasil. Una vez recibidas fueron analizados sus genotipos y conservadas a -80°C según lo descrito por Maron y Ames (1983). Los genotipos de las cepas empleadas son especificados en la Tabla 2, así como el tipo de daño genético que cada una es capaz de detectar y los controles positivos utilizados.

El ensayo se realizó por el método de incorporación en placa (Maron y Ames 1983). Se probaron cuatro concentraciones del hidrolizado de Sericina: 40, 80, 160 y 320 µg/mL; como control negativo se empleó agua destilada estéril. Para preparar la fracción microsomal de hígado de rata (S9). Se siguieron los principios éticos para el uso de los animales de Laboratorio recomendados en los lineamientos internacionales y

en la República de Cuba, plasmados en los Procedimientos Normalizados de Trabajo establecidos en el CIDEM. Se trataron ratas Wistar de 200 g de peso con fenobarbital (Sigma) y benzonaftoflavona (Sigma) (Maron y Ames, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000). En el momento del ensayo se preparó la mezcla S9 conteniendo un 4% de fracción S9 en una solución de cofactores. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h y al cabo de ese tiempo se contó el número de colonias revertantes por placa (Mortelmans y Zeiger, 2000). Se emplearon tres réplicas por cada concentración realizándose dos experimentos independientes. Como criterio de genotoxicidad se estableció el aumento en el número de revertantes que supere por más de dos veces la frecuencia de reversión del control negativo y que muestre un incremento en el número de revertantes en función de la concentración del producto (Maron y Ames, 1983; Test No OECD 1997; Guideline, 2011).

Tabla 2. Genotipo de las cepas de *Salmonella typhimurium* y controles positivos empleados en el ensayo de Ames**Table 2:** *Genotype of the Salmonella typhimurium strains and positive controls used in the Ames assay.*

Cepa	Genotipo	Tipo de mutación que detectan	Controles positivos	
			+S9	-S9
TA 98	hisD3052 bio uvrBrfa/pKM 101 (muc A/B)	Corrimiento del marco de lectura por deleciones	2-amino-fluoreno (10 µg/placa)	ácido picrolónico (100 µg/placa)
TA 100	hisG46 bio uvrBrfa/pKM 101 (muc A/B)	Sustitución de pares de bases	Benzo (a) pireno (2 µg/placa)	azida de sodio (1,5 mg/placa)

Ensayo de inducción de Micronúcleos en médula ósea de ratón

Se utilizaron ratones Cenp: NMRI machos, sanos, entre 6 y 8 semanas de edad y entre 20-30 g de peso corporal, suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana, Cuba. Los animales fueron aleatorizados y separados por grupos de tratamiento en cajas Macrolon tipo T3, encamadas con bagacillo de caña previamente esterilizado, mantenidos a temperatura ambiente y fotoperiodos de 12 horas de luz/oscuridad. El alimento proveniente del CENPALAB y el agua les fueron administrados *ad libitum*, para satisfacer sus requerimientos nutricionales.

Se establecieron 10 animales en 5 grupos experimentales: control no tratado, control negativo (H₂O, 10 mL/Kg), control positivo (Ciclofosfamida, 20 mg/kg) y 3 dosis del hidrolizado de sericina Seric 1.6, 3.2 y 6.4 mg/Kg de peso corporal administradas por vía oral, dos administraciones separadas por 24 horas. El control positivo fue administrado solo una vez por vía intraperitoneal siguiendo el protocolo de las ICH en el 2011. Los animales fueron sacrificados a las 24 horas de la última administración y la médula ósea de los ratones fue obtenida según lo descrito por Hayashi *et al.* (2000) y Krishna y Hayashi (2000). Las láminas se tiñeron con solución de May-Grunwald y Giemsa (Merck) para el análisis de micronúcleos. El aumento de la frecuencia de micronúcleos con respecto al control negativo, es indicativo de genotoxicidad. Se registró el número de eritrocitos normocromáticos (NCE) y policromáticos (PCE), así como el número de PCE con micronúcleos (MN-PCE) en 2000 PCE. El índice de Genotoxicidad (IG), se expresó en función de la frecuencia de MN-PCE del conteo total de 2000 PCE por animal. La proporción de PCE/NCE se evaluó como estimador de la citotoxicidad sobre la hematopoyesis cuantificando los NCE presentes hasta el conteo de 250 PCE por lámina (OECD, 1997; Krishna y Hayashi, 2000; Guideline, 2011).

Análisis estadístico

Para el test de Ames se aplicó el programa estadístico SALANAL versión 1.0, de la EPA (*Environmental Protection Agency*) de Estados Unidos, diseñado específicamente para el análisis de los resultados experimentales obtenidos en el ensayo de Ames. Este programa permite calcular la significación estadística de las diferencias observadas entre las frecuencias promedios correspondientes al control negativo y los tratamientos. Asimismo, es posible valorar si los efectos observados mantienen una relación proporcional a dichas concentraciones (relación dosis – respuesta) la diferencia se consideró estadísticamente significativas para $p < 0,01$. Para el ensayo *in vivo* las medias y las desviaciones estándar fueron determinadas usando el test de Kolmogorov–Smirnov y los grupos fueron comparados usando ANOVA y el Tukey como test secundario, la diferencia se consideró estadísticamente significativas para $p < 0,05$. Los gráficos y los análisis estadísticos fueron realizados con ayuda del programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EUA).

RESULTADOS

Evaluación de la mutagenicidad del hidrolizado de sericina: Seric mediante el ensayo *Salmonella/microsoma* (Test de Ames)

En los resultados obtenidos en el *el ensayo Salmonella/microsoma* (Test de Ames) se puede observar un aumento de la respuesta dependiente de la concentración para las cepas TA 98 ±S9 y TA 100 sin S9, sin embargo, este aumento no fue significativo, con respecto al control negativo (Figura 1 A-D). Dicho aumento no duplicó la frecuencia de revertantes por placas, criterio indicativo de genotoxicidad, por tanto se considera que la exposición de ambas cepas al hidrolizado de sericina a las concentraciones evaluadas no ocasionó daño al ADN según las normativas internacionales que establecen estos parámetros como definitorios para los ensayos de reversión bacteriana.

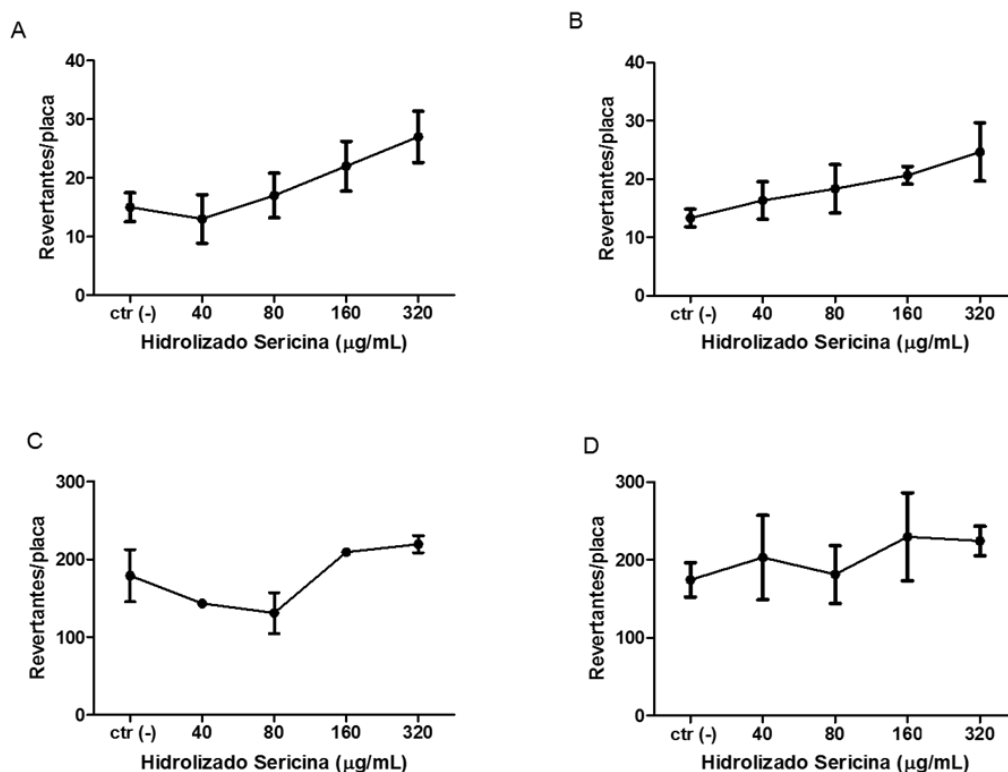


Figura 1. Efecto del hidrolizado de sericina Seric frente a las cepas de *Salmonella* TA 98 y TA 100 con y sin activación microsomal. A) Cepa TA 98 sin S9. B) Cepa TA 98 con S9. C) Cepa TA 100 sin S9. D) Cepa TA 100 con S9. Los datos representan la media \pm Desviación estándar (DE) de tres réplicas. Se consideró estadísticamente significativas para $p < 0.01$.

Figure 1. Effect of the sericin Seric hydrolysate vs *Salmonella* TA 98 y TA 100 strains with and without microsomal activation A) Strain TA 98 without S9. B) Strain TA 98 with S9. C) Strain TA 100 without S9. D) Strain TA 100 with S9. Data are mean \pm standard deviation (ED) for 3 replics.

Evaluación de la genotoxicidad del hidrolizado de sericina Seric mediante el ensayo de micronúcleos

La Tabla 3 muestra el índice de eritrocitos policromáticos/normocromáticos (PCE/NCE) como marcador de citotoxicidad y la frecuencia de eritrocitos policromático con micronúcleos (MN-PCE) como marcador de daño aneugénico/clastrogénico. La administración oral del hidrolizado de sericina Seric en las dosis ensayadas no provocó citotoxicidad sobre la médula ósea de los ratones, lo que se evidenció por la ausencia de cambios en el índice PCE/NCE entre los grupos tratados, el control negativo y el control no tratado. Del mismo modo, Seric no indujo daño aneugénico, ni clastrogénico sobre el tejido eritropoyético de los animales tratados, lo que se corroboró al no observarse aumento de la frecuencia de micronúcleos en las dosis empleadas respecto a los controles negativos y no tratados (Tabla 3). El peso inicial y final de los ratones fue similar al evidenciado por los controles y no se observaron signos de toxicidad ni mortalidad a las dosis evaluadas de 1,6 a 6,4 mg/kg de peso corporal.

Tabla 3. Efecto citotóxico y genotóxico del hidrolizado de sericina Seric sobre la médula ósea de ratones machos.

Table 3: Cytotoxic and genotoxic effect of Seric sericin hydrolysate on bone marrow of male mouse.

Tratamiento (mg/kg p.c.)	Machos	
	PCE/NCE	MN-PCE/1000
No Tratado	1,39 \pm 0,35	0,24 \pm 0,20
C(-) H ₂ O	1,45 \pm 0,32	0,08 \pm 0,04
1,6	1,46 \pm 0,07	0,11 \pm 0,03
3,2	1,51 \pm 0,16	0,07 \pm 0,03
6,4	1,70 \pm 0,10	0,11 \pm 0,03
CP 20	0,53 \pm 0,07*	5,38 \pm 0,75*

(PCE/NCE) índice normocromáticos/ policromáticos (MN-PCE) eritrocitos policromáticos con micronúcleos. CP 20: Ciclofosfamida. Cada valor representa la media \pm desviación estándar. (*) Diferencia estadísticamente significativa para $P < 0,01$ (Test t de Student).

DISCUSIÓN

La exploración de los Productos Naturales como fuente de nuevos compuestos ha cobrado actualmente gran interés. Esta área de investigación crece continuamente, con el objetivo de descubrir y diseñar compuestos más selectivos, más eficaces, menos tóxicos y con índices terapéuticos adecuados. Actualmente en Cuba, la sericina se ha sugerido como un ingrediente natural en la industria de alimentos y como materia prima en cosméticos y farmacia (proyecto Formulación de productos cosméticos a partir de un hidrolizado de proteínas de seda y sericina en concentraciones entre 0,5 y 5%, No publicado). Por tanto la confirmación de la seguridad sobre el daño al ADN, como parte de estudios preclínicos, es el objetivo de esta investigación. La utilización de ensayos *in vitro* e *in vivo* fue decisiva para obtener un perfil del potencial genotóxico de este compuesto e identificar el riesgo/beneficio para la salud humana (Mahadevan *et al.*, 2011).

La sericina es una proteína altamente hidrofílica y está compuesta por 18 aminoácidos donde glicina (16%), ácido aspártico (18%), y serina (32%) son los componentes fundamentales (Li *et al.*, 2008). Recientemente se ha demostrado que la sericina resiste la oxidación, es biocompatible, promueve la digestión en humanos y trabaja sobre la superficie de la piel humana formando una capa protectora para mantener y promover la retención de la humedad en la epidermis por largas horas, provocando que la textura mejore y que las arrugas prematuras se suavicen haciéndose menos evidentes (Aramwit *et al.*, 2010). Adicionalmente la Sericina exhibe varias actividades biológicas informadas en la literatura, por ejemplo, inhibe la actividad de la tirosinasa, tiene alta actividad bactericida, antioxidante y antimicótica, la cual ayuda a inhibir el crecimiento de microorganismos productores de numerosas enfermedades que afectan hoy en día la piel de las personas (Cenis, 2008; Mandal y Kundu, 2009; Vicente-Ortega, 2015; Barajas-Gamboa *et al.*, 2016). También se ha demostrado que su ingesta mejora en la biodisponibilidad del Zn, Fe, Mg y Ca en ratas, ayuda a prevenir la muerte celular y promueve el crecimiento celular sin efectos tóxicos y secundarios (Avendaño *et al.*, 2018; Debastiani *et al.*, 2019). Por lo que progresivamente la sericina se ha convertido en un componente natural muy importante para las industrias farmacéutica, cosmética y alimenticia (Barajas-Gamboa *et al.*, 2016; Avendaño *et al.*, 2018; Debastiani *et al.*, 2019).

Con el fin de evaluar el potencial del hidrolizado de sericina SericC para inducir mutaciones puntuales en sistemas bacterianos se empleó el procarionte *Salmo-*

nella typhimurium en el Ensayo de Ames. Esta prueba ha sido utilizada por casi cuatro décadas para evaluar daño mutagénico *in vitro* y continúa siendo hoy ampliamente utilizada en los laboratorios de investigación toxicológica como parte de la evaluación preclínica de nuevos productos de uso humano (Lapphanichayakool *et al.*, 2017). En el presente estudio se emplearon dos cepas estándares de *S. typhimurium* TA 98 y TA 100, que detectan mutaciones por corrimiento del marco de lectura por deleciones y sustitución de pares bases, respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que el hidrolizado de sericina SericC a las concentraciones evaluadas no ocasionó daño mutagénico. Igualmente para corroborar este resultado, se empleó el ensayo de micronúcleos en medula ósea de ratón, un ensayo *in vivo* que permite detectar efecto clastogénico o aneugénico sobre el tejido eritropoyético y es recomendado por las agencias reguladoras como parte de la evaluación para el uso seguro de productos que serán utilizados por los humanos. Los micronúcleos representan remanentes de cromatina nuclear que quedaron rezagados en la transición metafase-anafase durante la formación del núcleo, producto de un daño genotóxico. Los resultados mostraron que el hidrolizado de sericina SericC administrado por vía oral no indujo daño cromosómico, ni sobre el huso mitótico en el tejido eritropoyético de los animales tratados.

Los resultados obtenidos están en concordancia con un estudio similar realizado por Qin *et al.* (2020), se evaluó al extracto de sericina en una batería de cepas de *S. typhimurium* mediante el ensayo de Ames y también demostraron que el extracto no fue mutagénico en sus condiciones experimentales. Conjuntamente este extracto fue evaluado *in vivo* utilizando células eritropoyéticas de mamíferos y corroboraron que el extracto de sericina no es genotóxico. Igualmente, otro estudio previo fue realizado empleando el hidrolizado de sericina como protector frente al daño de las radiaciones UV. Los resultados demostraron que no existían diferencias significativas en el número de micronúcleos en las muestras tratadas con respecto a los controles (Vicente-Ortega, 2015). De esta forma también pudimos corroborar nuestros resultados, sin embargo al evaluar la toxicidad del extracto acuoso de sericina mediante en estudio subcrónico de 90 días, Qin *et al.* (2020) informaron toxicidad sólo a la dosis de 1000 mg/Kg de peso corporal y proponen al extracto de sericina promisorio para su aplicación en productos relacionados con la alimentación. Es importante sugerir que se realicen otros estudios de toxicidad que puedan argumentar la seguri-

dad de dicho extracto antes de emplearlo en formulaciones para el consumo humano.

Los datos presentados en este artículo constituyen un estudio sobre el potencial genotóxico del hidrolizado de sericina SericC para avalar su seguridad. Los resultados demostraron que no mostró daño al ADN al ser evaluado en dos sistemas, *in vitro* e *in vivo* ampliamente validados. Otros estudios pudieran ser sugeridos para completar el perfil no genotóxico de SericC y considerarlo como una materia prima segura para emplearlo en diferentes formulaciones para las industrias farmacéutica, cosmética y alimenticia.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Angel R. Torres McCook y a Wendy Tamayo Ruiz pertenecientes a la Entidad de Ciencia Tecnología e Innovación Sierra Maestra, igualmente a Héctor Correa Rivero y Elaine Díaz Casaña por el aporte y la contribución en este estudio.

LITERATURA CITADA

- Aramwit, P., S. Kanokpanont, T. Nakpheng y T. Srichana (2010). The effect of sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production. *Int. J. Mol. Sci.* 11(5): 2200-2211.
- Avendaño, Y., G. A. Hincapié Llanos, D. Castrillón Martínez, M. Cardona Aristizábal, J. A. Barajas Gamboa y C. Álvarez López (2018). Propiedades de la sericina de seda colombiana. *Revista Lasallista de Investigación* 15(1): 57-66.
- Barajas-Gamboa, J. A., A. M. Serpa-Guerra, A. Restrepo-Osorio y C. Álvarez-López (2016). Aplicaciones de la sericina: una proteína globular proveniente de la seda. *Ing. Compet.* 18(2): 193-206.
- Cao, T.-T. y Y.-Q. Zhang (2016). Processing and characterization of silk sericin from *Bombyx mori* and its application in biomaterials and biomedicines. *Mater. Sci. Eng. C.* 61: 940-952.
- Cenis, J. (2008). La seda como material en Medicina Regenera-46 tiva. *Revista Eubacteria.*
- Chirila, T. V., S. Suzuki y N. C. McKirdy (2016). Further development of silk sericin as a biomaterial: comparative investigation of the procedures for its isolation from *Bombyx mori* silk cocoons. *Prog. Biomater.* 5(2): 135-145.
- Correa-Rivero, H., E. Díaz-Casañas, O. B. Veitia y Y. M. Fernández (2020). Determinación de la estabilidad e irritabilidad del hidrolizado de sericina. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.* 49(2): 9-19.
- Debastiani, J. C., A. J. Santana, L. d. F. C. Ribeiro, R. M. C. Brancalhão y G. R. F. Bertolini (2019). Sericin silk protein in peripheral nervous repair associated with the physical exercise of swimming in Wistar rats. *Neurol. Res.* 41(4): 326-334.
- Dong, X., S.-X. Zhao, X.-L. Yin, H.-Y. Wang, Z.-G. Wei y Y.-Q. Zhang (2020). Silk sericin has significantly hypoglycaemic effect in type 2 diabetic mice via anti-oxidation and anti-inflammation. *Int. J. Biol. Macromol.* 150: 1061-1071.
- Guideline, I. H. T. (2011). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1). International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH Expert Working Group.
- Hayashi, M., J. T. MacGregor, D. G. Gatehouse, I. D. Adler, D. H. Blakey, S. D. Dertinger, S. Sutou (2000). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ. Mol. Mutagen.* 35(3): 234-252.
- Hernández, M. d. C. P. (2017). Sericultura: bases científicas para su desarrollo sostenible en Cuba. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba.*
- Jena, K., J. Pandey, R. Kumari, A. Sinha, V. Gupta y G. Singh (2018). Tasar silk fiber waste sericin: new source for anti-elastase, anti-tyrosinase and anti-oxidant compounds. *Int. J. Biol. Macromol.* 114: 1102-1108.
- Krishna, G. y M. Hayashi (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res-Find. Mol. M.* 455(1-2): 155-166.
- Lapphanichayakool, P., M. Sutherawattananonda y N. Limpeanchob (2017). Hypocholesterolemic effect of sericin-derived oligopeptides in high-cholesterol fed rats. *J. Nat. Med.* 71(1): 208-215.
- Li, Y.-G., D.-F. Ji, S. Chen y G.-Y. Hu (2008). Protective effects of sericin protein on alcohol-mediated liver damage in mice. *Alcohol & Alcoholism* 43(3): 246-253.
- Mahadevan, B., R. D. Snyder, M. D. Waters, R. D. Benz, R. A. Kemper, R. R. Tice y A. M. Richard (2011). Genetic toxicology in the 21st century: reflections and future directions. *Environ. Mol. Mutagen.* 52(5): 339-354.
- Mandal, B. B. y S. Kundu (2009). Self-assembled silk sericin/polyoxamer nanoparticles as nanocarriers of hydrophobic and hydrophilic drugs for targeted delivery. *Nanotechnology* 20(35): 355101.
- Maron, D. M. y B. N. Ames (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res., Sect. Environ. Mutagen. Relat. Subj.* 113(3-4): 173-215.
- Mortelmans, K. y E. Zeiger (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res-Find. Mol. M.* 455(1-2): 29-60.
- OECD (1997). 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: 1-21.
- OECD, T. N. (1997). 471: bacterial reverse mutation test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4.
- Okazaki, Y., S. Takechi, Y. Xu, K. Tsujimoto, M. Sasaki, H. Ogawa y N. Kato (2010). Consumption of sericin reduces serum lipids, ameliorates glucose tolerance and elevates serum adiponectin in rats fed a high-fat diet. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74(8): 1534-1538.
- Qin, H., J. Zhang, H. Yang, S. Yao, L. He, H. Liang, G. Qin (2020). Safety Assessment of Water-Extract Sericin from Silkworm (*Bombyx mori*) Cocoons Using Different Model Approaches. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2020.
- Tsubouchi, K., Y. Igarashi, Y. Takasu y H. Yamada (2005). Sericin enhances attachment of cultured human skin fibroblasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69(2): 403-405.
- Vicente-Ortega (2015). Efectos "in vitro" de tres extractos del capullo del gusano de la seda frente a la radiación ultravioleta B. Proyecto de investigación.

