

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud Departamento de Sistemas

Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

INFORME FINAL DE PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

Actividad antiinflamatoria de cepas con potencial probiótico

Presenta:

Luis Fernando González Guerrero

Matricula:2192031979

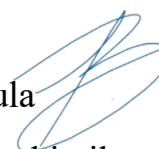
Asesora Interna: Dra. Ana Laura Esquivel Campos No. Eco. 33148

Adscripción: Departamento de Sistemas Biológicos de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud UAM-X



Asesora Externa: Dra. Raquel González Vázquez No. 900030. Cédula

09165459. Adscripción: Investigador por México SECIHTI-UAM Xochimilco



Fecha de inicio: 10 de febrero 2025
Fecha de término: 11 de agosto 2025

Índice

1. Resumen	3
2. Marco Teórico	3
2.1 Inflamación y su asociación a padecimientos crónicos degenerativos	3
2.2 Mediadores en el proceso inflamatorio	4
2.3 Mecanismo de la inflamación	6
2.4 Macrófagos en el proceso inflamatorio	7
2.5 Tratamientos actuales y sus desventajas	8
2.6 Cepas con potencial probiótico	9
2.7 Mecanismo de inmunomodulación	10
3. Objetivo General	11
3.1 Objetivos específicos	
4. Justificación	11
5. Metodología	12
5.1 Proliferación	12
5.2 Ajuste de DO	12
5.3 Siembra de macrófagos y su proliferación	13
5.4 Viabilidad	14
5.5 MTT	15
6. Resultados	17
7. Discusión	21
8. Conclusión	23
9. Referencias	23

1. Resumen

Este estudio evaluó la actividad antiinflamatoria de (*L. rhamnosus* (LBUX2302), *L. paracassei* (LBUX2304), *L. rhamnosus* (LBUX2306) y *L. rhamnosus* (LBUX2312), mediante la determinación de la producción de óxido nítrico en un modelo de macrófagos RAW 264 estimulados con LPS. Los resultados indican que el tratamiento con las diferentes cepas en un rango de $1.67 \times 10^3 - 4.33 \times 10^8$ UFC disminuyen la producción de óxido nítrico de los macrófagos hasta en un 94.7% con respecto a los macrófagos únicamente estimulados con LPS $1 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0.01$). Por lo anterior todas las cepas tienen el potencial para su uso en el potencial desarrollo de una alternativa o un complemento para combatir la inflamación.

2. Marco Teórico

1.1 Inflamación y su asociación a padecimientos crónicos degenerativos

La inflamación es un proceso biológico fundamental de nuestro cuerpo que actúa frente a estímulos dañinos, como patógenos, daño celular o irritantes (Alur I. 2023). La inflamación es también la respuesta inicial a la mayoría de las lesiones físicas, proporcionando una función de limpieza para dar paso a la reparación de tejidos (Thomas C. 2007). La inflamación se puede clasificar en aguda o crónica dependiendo del tipo de estímulo interno o externo. En el primer caso, la inflamación aguda se puede inducir frente al daño tisular por traumatismo o una infección microbiana que desencadena una cascada de intercambio de fluidos dentro del tejido vascularizado (Zachary J. 2017). La inflamación puede tener una duración que va desde algunas horas hasta pocos días y se caracteriza por la exudación de electrolitos, líquidos y proteínas plasmáticas, y la emigración leucocítica, principalmente neutrófilos, desde la microvasculatura (Pahwa R. 2023).

En general la inflamación puede ser beneficiosa al diluir o inactivar toxinas biológicas, al secuestrar microorganismos o material extraño para el cuerpo y al aportar factores de cicatrización si es que existe un tejido traumatizado e incluso al promover el aumento de la temperatura corporal o local para inducir vasodilatación e inhibir la replicación de algunos agentes microbianos (Zachary J. 2017). Sin embargo, cuando hay una alteración en este proceso inflamatorio y este se vuelve persistente, la inflamación se vuelve crónica y se pueden desarrollar enfermedades como diabetes mellitus tipo 2, cáncer o enfermedades cardiovasculares entre otras (Antoniades C. 2024) (Ephraim R. 2023); Además, se conoce cada vez más que la inflamación crónica esta compartida entre estas enfermedades metabólicas, psiquiátricas y neurodegenerativas (Perry VH. 2010).

2.2 Mediadores en el proceso inflamatorio

El mecanismo de inflamación conlleva una serie organizada de procesos que incluyen eventos celulares como cambio en ubicación de glóbulos blancos, además de eventos vasculares con secreciones humorales específicas (Abdulkhaleq L. 2018). Simultáneamente un grupo de mediadores y otras moléculas de señalización (aminas vasoactivas, prostaglandinas, leucotrienos, radicales libres derivados del oxígeno y el nitrógeno) son liberados por las células de defensa inmunitaria para ajustar la respuesta inflamatoria (Halliwell B. 2015).

Los mediadores actúan por medio de receptores específicos en células diana, y la mayoría de ellos tienen efectos en diferentes tipos celulares. Existen mediadores preformados que pueden ser secuestrados en gránulos (como histamina) que solo tienen que liberarse para tener efecto. Pero otros como las interleucinas tienen que ser sintetizados desde cero; Algunos tipos de mediadores suelen tener efecto en segundos o minutos, sin embargo otros como las interleucinas producen efectos después de horas, estas diferencias entre los perfiles de los mediadores son importantes para conocer cómo se coordinan los procesos inflamatorios (Thomas C. 2007). Los principales mediadores incluyen:

Aminas vasoactivas: Pueden provocar la contracción del músculo liso, la vasodilatación y la permeabilidad vascular. Las principales aminas vasoactivas con esta capacidad son la histamina y la serotonina. La histamina participa principalmente en respuestas de hipersensibilidad causando vasodilatación, edema y contracción del músculo liso. Por otro lado, la serotonina funciona como una hormona, un modulador inmunitario y un neurotransmisor. Por lo tanto, contribuye a la regulación de muchas funciones fisiológicas, como la vasoconstricción (Ira Fox S. 2016).

Óxido Nítrico (NO): Son moléculas pequeñas de vida media que tienen efecto en la microvasculatura. Se generan por enzimas llamadas óxido nítrico sintetasa. Existen dos isoformas de estas enzimas que producen NO, la óxido nítrico sintetasa endotelial y la óxido nítrico sintetasa inducible que es la que se expresa en macrófagos en los cuales la producción de NO es importante para la citotoxicidad microbiana. Dado que los macrófagos activados suelen estar presentes en los focos de inflamación, el NO producido por ellos también puede tener efectos localizados en el músculo liso vascular (promoviendo la vasodilatación), así como en las plaquetas y las células inflamatorias (Thomas C. 2007).

Mediadores derivados de fosfolípidos: Muchos mediadores derivan de fosfolípidos de membrana a través de intermediarios de ácido araquidónico. Existen dos vías enzimáticas principales para el metabolismo del ácido araquidónico en mediadores inflamatorios, la vía de las ciclooxigenasas y la vía de lipoxigenasa. En la vía de la ciclooxigenasa participan diferentes ciclooxigenasas como COX-1 y COX-2 que se expresan en diferentes tipos de células, y que al ser inhibido uno u otro, se conduce a la formación de mediadores como tromboxano (efecto vasoconstrictor y agregación plaquetaria) en el caso de inhibirse COX-2 o de prostaglandinas (efecto potente vasodilatador, inhibiendo la agregación plaquetaria) en el caso de inhibirse COX-1 (Kumar V. 2021) (Figura 1).

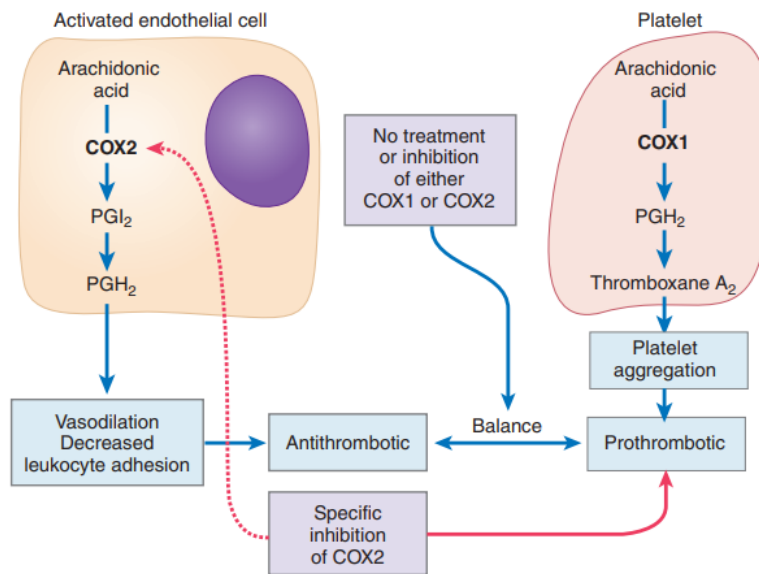


Figura 1. Inhibición de la ciclooxigenasa (COX) 1 y 2 en células endoteliales y plaquetas (Thomas C. 2007)

Citocinas: Son proteínas pequeñas secretadas por muchas células para regular e influir en las respuestas inmunitarias (Kany S. 2019). Aunque muchas células producen citocinas, las células T auxiliares (T_h) y los macrófagos son los principales productores (Bohl N. et al 2024). Las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias facilitan e inhiben la inflamación, respectivamente (Chen L. 2017). Las citocinas inflamatorias se clasifican como IL, factores estimulantes de colonias (CSF), IFN, TNF, TGF y quimiocinas, y son producidas por las células principalmente para reclutar leucocitos al sitio de la infección o lesión (tabla 1) (Turner M. 2014).

IL	Fuente	Función
IL-1B	Macrófagos	Proinflamación, proliferación y apoptosis

IL-4	Células Th	Anti-inflamación, proliferación de células T y diferenciación de células B
IL-6	Macrófagos, células T	Proinflamación, diferenciación y producción de citocinas
IL-8	Macrófagos, células endoteliales y epiteliales	Proinflamación, quimiotaxis y angiogénesis
IL-10	Monocitos, células T y B	Inhibición de citocinas proinflamatorias
IL-12	Células dendríticas y macrófagos	Proinflamación, activas células NK
TNF- α	Macrófagos, células NK y linfocitos CD4 ⁺	Proinflamación, producción de citocinas, proliferación celular, apoptosis.
IFN- γ	Células T, células NK	Proinflamación
TGF-B	Macrófagos y células T	Antiinflamatorio, inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias

Tabla 1. Fuente y función de citocinas (Chen L. 2017)

2.3 Mecanismo de la inflamación

Los procesos de respuesta inflamatoria dependen de la naturaleza del estímulo inicial y su ubicación. Sin embargo, todos comparten un mecanismo en común que se puede resumir en cuatro fases principales. (i) los receptores de patrones asociados a patógenos o PPR que se encuentran en las superficies celulares como son receptores tipo Toll (TLR) entre otros, identifican un estímulo, (ii), se activan vías proinflamatorias, (iii) liberación de marcadores y proinflamatorios y (iv) se reclutan células inflamatorias como, neutrófilos, basófilos, células NK y macrófagos, entre otras (Cheng L. et al 2017).

Estos procesos inflamatorios influyen en el desarrollo de diversas enfermedades crónicas y comparten mediadores inflamatorios y mecanismos reguladores. Los estímulos inflamatorios activan vías de señalización intracelular que luego activa la producción de mediadores inflamatorios (citocinas, aminas vasoactivas y ciclooxygenasas, entre otros). Los productos microbianos o las citocinas como la IL-1, IL-6 o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) son mediadores de la inflamación por su interacción con los receptores de tipo Toll (TLR), y diferentes receptores específicos para cada interleucina (Cheng L. et al 2017). La activación de estos receptores desencadena la activación de vías de señalización intracelular, como la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), el factor nuclear kappa-B (NF-kB) y las vías del transductor de señales y activador de la transcripción (STAT) de la quinasa Janus (JAK) (Hendrayani SF. 2016)

La vía NF-kB por ejemplo desempeña papeles importantes en los procesos inflamatorios, de respuesta

inmune, de supervivencia y de apoptosis. La actividad de NF- κ B es inducida por una gama de estímulos, incluyendo sustancias derivadas de patógenos, citocinas inflamatorias intercelulares y muchas enzimas. Bajo condiciones normales, las proteínas I κ B presentes en el citoplasma inhiben la activación de NF- κ B lo que regula las moléculas inflamatorias. Los receptores de reconocimiento de patrones tienen mecanismos de transducción de señales que activan la quinasa I κ B (IKK) que va a regular la activación de la vía NF- κ B por la fosforilación de I κ B, al ser fosforilado I κ B el proteosoma lo degrada y permite la liberación de NF- κ B para la translocación nuclear y la activación de la transcripción de genes (Figura 22) (Bedoya F. 2023), esta vía regula la producción de citocinas proinflamatorias y el reclutamiento de células que contribuyen a la respuesta inflamatoria.

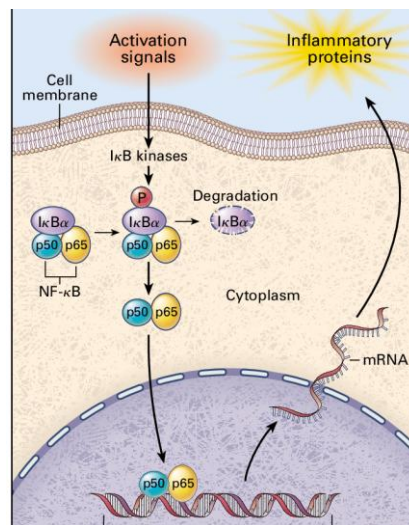


Figura 2. Mecanismo de activación de NF- κ B (Barnes P. 1997)

2.4 Macrófagos en el proceso inflamatorio

Dentro de las diversas células participantes del proceso inflamatorio (neutrófilos, basófilos, células NK y macrófagos, etc.) los macrófagos desempeñan un papel clave en la inmunidad innata, además son vitales para regular la homeostasis y en el reconocimiento y eliminación de patógenos. En las etapas iniciales de la inflamación, los macrófagos destruyen los estímulos anormales y eliminan los cuerpos apoptóticos de los neutrófilos muertos, así como cualquier factor de riesgo remanente. Posteriormente, los macrófagos presentan el antígeno a los linfocitos T para iniciar los mecanismos de inmunidad adquirida, lo que conduce a la producción de anticuerpos, citocinas y células de memoria (Lee C. 2018). Los macrófagos tienen la capacidad de polarizarse y diferenciarse debido a varios factores presentes en el entorno inflamatorio en el que se encuentren. Por ejemplo, cuando los macrófagos en reposo (M0) se exponen a lipopolisacáridos (LPS), INF- α , IL-12 e IL-23 se polarizan

a macrófagos proinflamatorios (M1), y por otro lado, cuando se exponen a IL-4 e IL-10 se promueve su polarización a macrófagos antiinflamatorios (M2) (Atri C. 2018). Ambos tipos de macrófagos tienen sus propios biomarcadores de superficie específicos y de igual forma cada subtipo de macrófago secreta diferentes citocinas, por lo que cada uno puede desempeñar diferentes funciones en el proceso inflamatorio (Orecchioni M. 2019). Sin embargo, un desequilibrio en la polarización M1 o M2 de los macrófagos suele asociarse con diversas enfermedades o afecciones inflamatorias (Lee C. 2018). Muchas enfermedades inflamatorias inmunomediadas pueden evolucionar a estados crónicos inflamatorios cuando falla el mecanismo que sigue la respuesta inmune adaptativa donde se involucran macrófagos y linfocitos T. (Figura 3). El fallo de este mecanismo radica en el reconocimiento de autoantígenos que desencadenan respuestas inmunes que se prolongan hasta causar daño tisular crónico e inflamación (Fleit H. 2014).

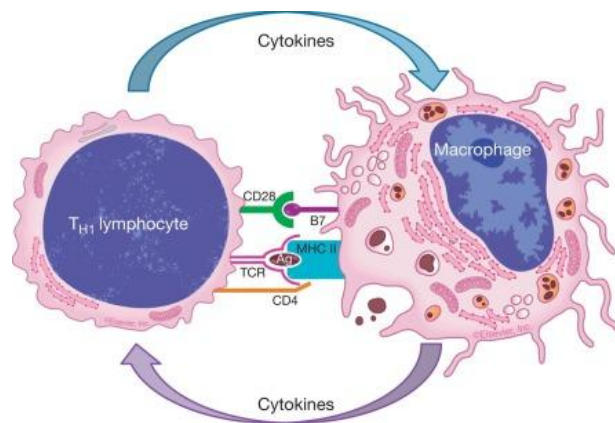


Figura 3. La interacción entre macrófago y célula $CD4^+T_{H1}$ implica la unión del receptor célula a célula y las comunicaciones a través de citocinas secretadas por cada tipo celular. Estas interacciones inician la transcripción de ARNm para citocinas por la célula T que activan el macrófago y la liberación de citocinas por el macrófago que mejoran la actividad de la célula T (Fleit H. 2014)

2.5 Tratamientos actuales y sus desventajas

Los tratamientos más comunes para tratar la inflamación incluyen AINES como el ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco que inhiben las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), reduciendo la producción de prostaglandinas, responsables de la inflamación y el dolor. Sin embargo, pueden causar efectos secundarios gastrointestinales (úlceras, sangrado), daño renal y aumento de la presión arterial, especialmente en uso prolongado o en pacientes de riesgo (Regueras E. 2024). También los corticosteroides que son usados para inflamaciones más graves, especialmente en enfermedades autoinmunes o alergias, pero su uso prolongado puede provocar efectos secundarios graves como osteoporosis, aumento de peso, diabetes, supresión del sistema inmunológico y riesgo de infecciones

(Rice et al 2017).

Otra alternativa son los nuevos tratamientos biológicos como anticuerpos monoclonales (depemokimab, que bloquea la IL-5 y es útil en enfermedades eosinofílicas), pero estos son tratamientos costosos, pueden tener efectos secundarios inmunológicos y requieren administración por vía inyectable (Fernández D. 2023). Por lo anterior es importante disponer de una terapia alternativa, efectiva, segura y con menos inmunogenicidad.

2.6 Cepas con potencial probiótico

Los probióticos como los lactobacilos y las bifidobacterias son macroorganismos que confieren beneficios a la salud cuando se administran en concentraciones adecuadas normalmente de 1×10^9 UFC por día (Biagioli et al. 2017). El género *Lactobacillus* es un grupo complejo de bacterias grampositivas, estrictamente fermentativas y productoras de ácido láctico. Los miembros del género *Bifidobacterium* son microorganismos estrictamente anaerobios, Grampositivos, y no formadores de esporas, que pueden presentar ácido láctico y acético como productos finales (Villena J, 2017). Ambos géneros contienen varias cepas probióticas que han demostrado que proporcionan una actividad gastrointestinal beneficiosa en modelos animales, y son potenciadores de los tratamientos convencionales para trastornos inflamatorios en humanos (Del Carmen et al 2011). Sus beneficios generalmente están relacionados con la actividad antioxidante, con la creación de una barrera en el intestino y con la exclusión contra patógenos (Li et al 2020). Terapéuticamente se ha documentado su uso para tratar desordenes gastrointestinales e inmunológicos (Davoren et al 2019). Además, al estudiar su utilidad y empleabilidad se han reconocido generalmente como seguros (Abriouel et al 2017).

Aunque existen estudios *in vitro* o en modelos animales que indican que moléculas bioactivas de microorganismos muertos, como proteínas, polisacáridos, nucleótidos o péptidos también tienen efectos que pueden ser beneficiosos en los desastres inflamatorios. Por ahora la definición de probiótico requiere que los microorganismos se encuentren vivos, y se asume que los efectos biológicos que puedan causar en la inmunomodulación se deben a la viabilidad de las bacterias y están condicionados a que ocurra la adherencia previa de estos microorganismos al tejido epitelial del intestino (Shanahan F. 2014).

Actualmente, los probióticos se consideran el producto alimenticio funcional más destacado y comúnmente utilizado (Georgieva M. 2022). Entre las numerosas funciones de los probióticos, destacan sus propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Hao R. 2023). Los probióticos son capaces de modular directa o indirectamente la respuesta inmune del huésped y disminuir el daño inducido por el estrés oxidativo y la inflamación (Liu et al 2024).

2.7 Mecanismo de inmunomodulación

Los efectos de las bacterias probióticas en la inmunidad ocurren a través de la colonización epitelial, seguido de la producción de compuestos bioactivos, al excluir patógenos, al prevenir su adherencia a la superficie epitelial y al inhibir la proliferación de patógenos por la competencia que hay por los nutrientes (Mazziotta C. 2023). La manera en la que ocurre la inmunomodulación es diferente dependiendo de cada cepa, pero se atribuye principalmente la intervención en la producción de citocinas o quimiocinas por parte de las células inmunes, la activación de receptores como los TLR, o la inhibición de la activación de la vía NF-kB, la vía JAK/STAT y de la proteína activada por mitógenos (MAPK) (Aghamohammad, S. 2022).

Se han descrito diferentes mecanismos que siguen los probióticos para ejercer sus efectos inmunomoduladores, por ejemplo, se conoce qué estructuras de la superficie de los probióticos desencadenan la capacidad fagocítica de los macrófagos, lo que puede conducir a una mejor eliminación de patógenos y una mejor respuesta inmunitaria (Montovani A. 2004). También se sabe que después de la adherencia de los probióticos a las células epiteliales se desencadena la producción de citocinas que conduce a la activación de células Treg y a la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 (Thoda C. 2023). Además, existen diversos estudios más específicos de los mecanismos que siguen diferentes cepas con potencial probiótico para ejercer su efecto antiinflamatorio. Uno de ellos es el estudio de D. Ma (2004) en el que se describe como *L. reuteri* ejerce su efecto al intervenir en la vía NF-Kb, al impedir la degradación de Ikb lo que impide la traslocación de NF-kB al núcleo, inhibiendo así la expresión de mRNA que codifica para proteínas inflamatorias. Otro en el caso de *Lactobacillus rhamnosus* GG reduce la formación de especies reactivas de oxígeno lo que inhibe la activación de NF-kB. También se ha descrito en el caso de Bifidobacterias que estas estimulan la liberación de citocinas reguladoras/antiinflamatorias, IL-10 y TGFβ (Adejumo S. 2023). De igual manera existen diversas investigaciones que describen como influyen diferentes cepas de probióticos en la producción de citocinas, Adedeji (2022) describe como *L. rhamnosus* en un modelo en células CaCo inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias y promueve la secreción de citocinas antiinflamatorias.

Los resultados de las investigaciones disponibles indican que los probióticos tienen efectos inmunomoduladores beneficiosos para la salud humana. Sin embargo, es fundamental destacar que las ventajas terapéuticas de los probióticos son exclusivas de cada cepa. Por lo que comprender la influencia de diferentes cepas de probióticos en los procesos inflamatorios es clave para aprovechar sus beneficios, prevenir enfermedades y desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas y personalizadas (Thoda C. 2023).

3. Objetivo general

Evaluar la actividad antiinflamatoria de cepas con potencial probiótico en macrófagos RAW 264.7.

a. Objetivos específicos

- Producir un stock de las cepas de lactobacillus a utilizar
- Realizar cultivos *in vitro* de células de macrófagos RAW 264.7
- Determinar la viabilidad celular de los macrófagos al ser estimulados con cepas probióticas
- Evaluación de la producción de iNOS en macrófagos
- Evaluar la expresión génica de marcadores pro- y anti- inflamatorios

4. Justificación

Las enfermedades inflamatorias crónicas son la causa más importante de muerte en el mundo, la OMS declara a las enfermedades crónicas son una amenaza para la salud humana, 3 de cada 5 personas mueren debido a enfermedades como accidentes cerebrovasculares, enfermedades respiratorias crónicas, trastornos cardíacos, cáncer, obesidad, artritis, lupus, asma y diabetes entre otras (Deepak, 2019; Laveti, 2013).

La inflamación puede ser de carácter agudo cuando existe daño tisular de un traumatismo o invasión microbiana entre otros, o crónica cuando es una inflamación lenta que puede durar meses o años. Como tratamiento de los procesos inflamatorios se emplean AINES, que generalmente son seguros. Sin embargo, presenta efectos secundarios como náuseas, vómitos, dolor abdominal, acidez de estómago, mareos, dolor de cabeza, ataque cardíaco, accidente cerebrovascular, úlceras de estómago y sangrado estomacal (Haley, 2019). Ríos (2018) se señala que en nuestro país del 2011 a 2014 se reportaron 4553 reacciones adversas atribuibles a la administración de AINES, lo que pone en riesgo la salud del paciente, ya que en el caso de efectos adversos leves puede generarse la ineffectividad de algún tratamiento, pero en el caso de reacciones moderadas o graves con un mal acompañamiento pueden culminar en la muerte. Actualmente se buscan alternativas terapéuticas, un candidato son los probióticos en el manejo preventivo o terapéutico de enfermedades inflamatorias debido a sus propiedades inmunomoduladoras. Los mecanismos de interacción de los probióticos con las células del sistema inmune son diversos, el efecto sobre la maduración de esta célula y en su producción de citocinas depende de la cepa de los probióticos (Manzano, 2012). Por eso es importante evaluar la actividad antiinflamatoria de diferentes cepas con potencial probiótico, para determinar la viabilidad de su uso para contrarrestar el proceso inflamatorio.

5. Metodología

5.1 Proliferación de cepas con potencial probiótico

Las diferentes cepas lactobacilos y bifidobacterias fueron sembrados en viales con 7ml de caldo MRS para su activación, se incubaron a 37°C durante 24h, posteriormente se realizó una resiembra en viales con 10ml de caldo MRS y se incubaron durante 24h. Se centrifugo el contenido de cada vial en tubos Falcon a 3,600rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se agregaron 2ml de PBS para realizar lavado del cultivo 3 veces. Finalmente, se re suspendió la biomasa de cada tubo en 2ml de PBS.

5.2 Ajustes de DO

Del cultivo anteriormente resuspendido se agregó una alícuota a tubos Eppendorf que se llevó a un volumen final de 1mL y se realizó lectura en espectro UV a una longitud de onda de 600nm. Se ajusto la cantidad adicionada de cultivo hasta obtener una lectura de 0.5 de DO. Véase la proporción en la Tabla 1.

Tabla 1. Proporción medio-cultivo

Cepa	PBS μ L	Cultivo μ L
2	900	100
4	900	100
6	950	50
12	900	100

Posteriormente se realizaron 5 diluciones seriadas de los tubos Eppendorf con las proporciones previamente descritas. Tomando 100 μ L de la primera dilución y pasándola al siguiente tubo con 900 μ L de PBS, 5 veces consecutivas como se muestra en la Figura 4.

Diluciones seriadas: Transferencia de 100 μ L + 900 μ L PBS para completar 1 mL

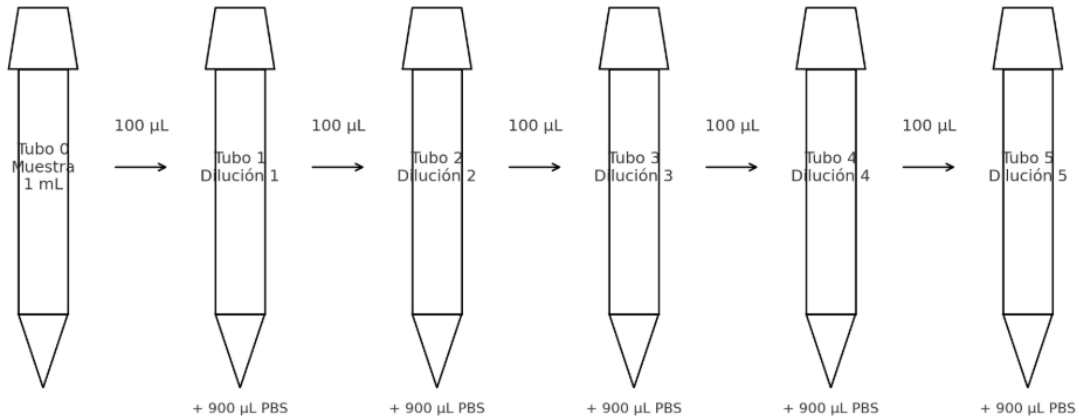


Figura 4. Diagrama de diluciones en serie.

5.3 Cuenta en placa

De cada dilución se tomó una alícuota de 3 μ L por triplicado para agregarlos a una placa Petri con Agar MRS con 6 divisiones, una para cada dilución.

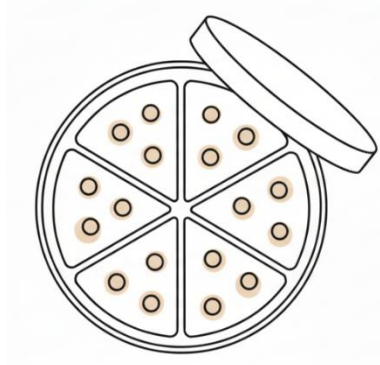


Figura 5. Diagrama de cuenta en placa

5.4 Inactivación de cepas

Por último, todos los tubos con diluciones se inactivaron con calor a 85°C por 15 minutos.

5.3 Macrófagos, proliferación

Se descongeló vial de 1ml de células RAW 264, se transfirió a tubo Eppendorf de 1.5ml y se centrifugó a 3500rpm durante 5 min, se decantó el contenido, después se re suspendió en 1ml de suero fetal bovino, se centrifugó a 3500rpm por 5min, finalmente se realizó el mismo proceso con medio

DMEM-F12 suplementado con Suero Fetal Bovino (5%) para su posterior siembra en una caja de cultivo de 25cm³. Se dejó incubando hasta su uso a 37°C con 5% de CO₂ para su proliferación, con cambio de medio frecuente.

5.4 Viabilidad

Se boto el sobrenadante de cada caja con macrófagos, se agregó 1ml de medio DMEM F-12 sin suplementar a cada caja, se rasparon con gendarme y el sobrenadante se depositó en tubo Falcon de 15ml, se centrifugo a 3600rpm por 5 min, después se decantó el medio y se re suspendió en 1 ml de medio nuevo. Para determinar concentración de células se hizo un conteo en placa usando azul tripano; Se tomaron 10µl de cada cultivo re suspendido y se depositaron en tubo Eppendorf con 90µl de azul tripano, se homogeneizo y se tomaron 10µ de ahí para depositar en cámara de Neubauer. Se realizaron los cálculos de las diluciones para determinar número de células x ml de la siguiente forma:

$$\#promedio \text{ de células contadas} \times 10 \times 10,000 \times 1mL$$

Se depositaron en placa de 96 pocillos el equivalente a 40,000 células por pocillo en un volumen final de 100µL. Se dejó incubar la placa a 37°C con 5% de CO₂ por 24h. Transcurrido el tiempo se eliminó el medio y agregando 100µl de cada dilución de los probióticos resuspendidos en medio DMEM F-12 y se dejó incubar a 37°C por 24h.

5.5 MTT

Se preparo una solución de MTT de 5mg/ml. Se retiro todo el sobrenadante de la placa de 96 pocillos y se agregaron 100µl de la solución de MTT por pocillo. Se incubo a 37°C. Se reviso constantemente la placa para confirmar formación de cristales de formazan (aproximadamente 30 minutos), y una vez formados se disolvieron agregando 100 µl de DMSO y manteniéndolo en agitación, se descartó el sobrenadante y se realizó una lectura en espectro UV a 540nm.

5.6 Estimulación de macrófagos para ensayo antiinflamatorio

Se sembraron macrófagos placas de 12 pozos a una densidad de 2.5×10^5 , 3×10^5 y 3.5×10^5 por pozo en medio DMEM F-12 suplementado con suero fetal bovino (10%), se dejaron incubar por 24h.

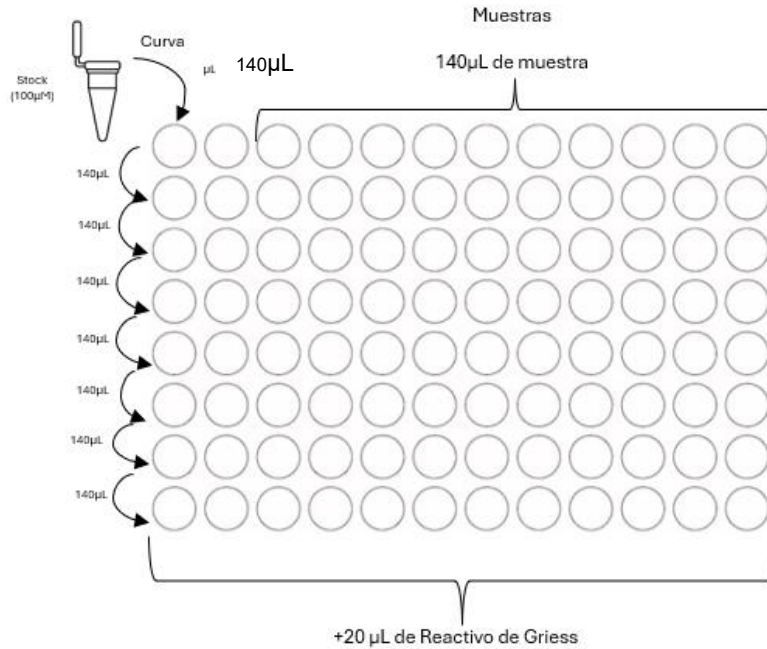


Figura 6. Diagrama de cuantificación de óxido nítrico.

Posteriormente se cambió el medio de los pozos por medio suplementado con suero fetal bovino (4%). Se formaron grupos, uno al que no se le realizó ningún tratamiento (basal) uno de los grupos se estimuló con 100µL de soluciones de LPS a diferentes concentraciones (5µg/mL, 2.5mg/mL, 1µg/mL y 100ng/mL), otro de los grupos se trató con 56µL de una solución de 250µg/mL de diclofenaco, y finalmente un grupo para cada cepa con potencial probiótico probada (*L. rhamnosus* (LBUX2302), *L. paracassei* (LBUX2304), *L. rhamnosus* (LBUX2306) y *L. rhamnosus* (LBUX2312)). Se dejaron incubar las placas a 37°C en oscuridad, finalmente se tomaron muestras a las 17h, 24h y 48h para la posterior cuantificación de óxido nítrico.

5.7 Cuantificación de ON

Se realizó la cuantificación de ON con un kit comercial (Biotium), en placa de 96 pozos se preparó inicialmente una curva de calibración haciendo una primera dilución 1:10 del stock de nitritos (1mM) para obtener una concentración final de 100µM, se tomaron 280µL de esa dilución y se agregó a la placa, se hicieron 5 diluciones seriadas en la misma placa tomando 140 µL y diluyendo con 140µL de PBS en el siguiente pozo, 5 veces seguidas y agregando al final 20µL de reactivo de Griess. Para las muestras se agregaron 140µL de muestra con 20µL de reactivo de Griess, se dejaron incubar 30min a temperatura ambiente y se determinó la densidad óptica a 540nm.

5.8 Extracción de RNA

A las placas de 12 pozos sin sobrenadante se les agregaron 200µL de TRIZOL para la lisis celular, a continuación, se agregaron 300µL de cloroformo a tubos Eppendorf de 1,5mL, se colectaron los lisados celulares y se agregaron a los tubos con cloroformo, se agitaron inmediatamente hasta observar una mezcla homogénea, después se llevaron a centrifugar los tubos a 7,500 rpm por 15 minutos. Posteriormente se colectó la fase superior de los tubos con pipeta para pasarlo a nuevos tubos Eppendorf con 500µL de isopropanol frío que se mezcló por inversión, después de centrifugar los tubos a 8,000 rpm por 15 minutos, se desechó el isopropanol y se hicieron dos lavados con etanol al 70%, esto agregando 500µL de etanol y golpeando los tubos en la parte inferior para lavar el pellet y centrifugando a 8,000 rpm por 7 minutos entre cada lavado, se desechó el etanol y se dejaron los tubos boca abajo 15 minutos para permitir la evaporación de etanol. Finalmente se agregaron de 20-25 µL de agua libre de RNAasa para hidratar las muestras y se llevó a congelador hasta su cuantificación.

6. Resultados

6.1 Viabilidad y cuenta en placa

En la Figura 7 se muestra el porcentaje de viabilidad de células RAW 264 al exponerlas a concentraciones en un rango de 1.67×10^3 – 4.33×10^8 UFC de *L. rhamnosus* (LBUX2302), *L. paracasei* (LBUX2304), *L. rhamnosus* (LBUX2306) y *L. rhamnosus* (LBUX2312). Al agregar *L. rhamnosus* (LBUX2302), *L. paracasei* (LBUX2304) no hubo disminución de la viabilidad por debajo del 80% para ninguna de las concentraciones de lactobacilo probadas. Incluso se puede apreciar el incremento por encima de 120% de viabilidad lo que indica que los lactobacilos incluso promueven el crecimiento de células RAW 265.7. Sin embargo, al probar los estímulos con 1.67×10^8 y 2.12×10^8 UFC de *L. rhamnosus* (LBUX2306) y *L. rhamnosus* (LBUX2312) respectivamente, si se apreció un descenso de la viabilidad incluso por debajo de 65%.

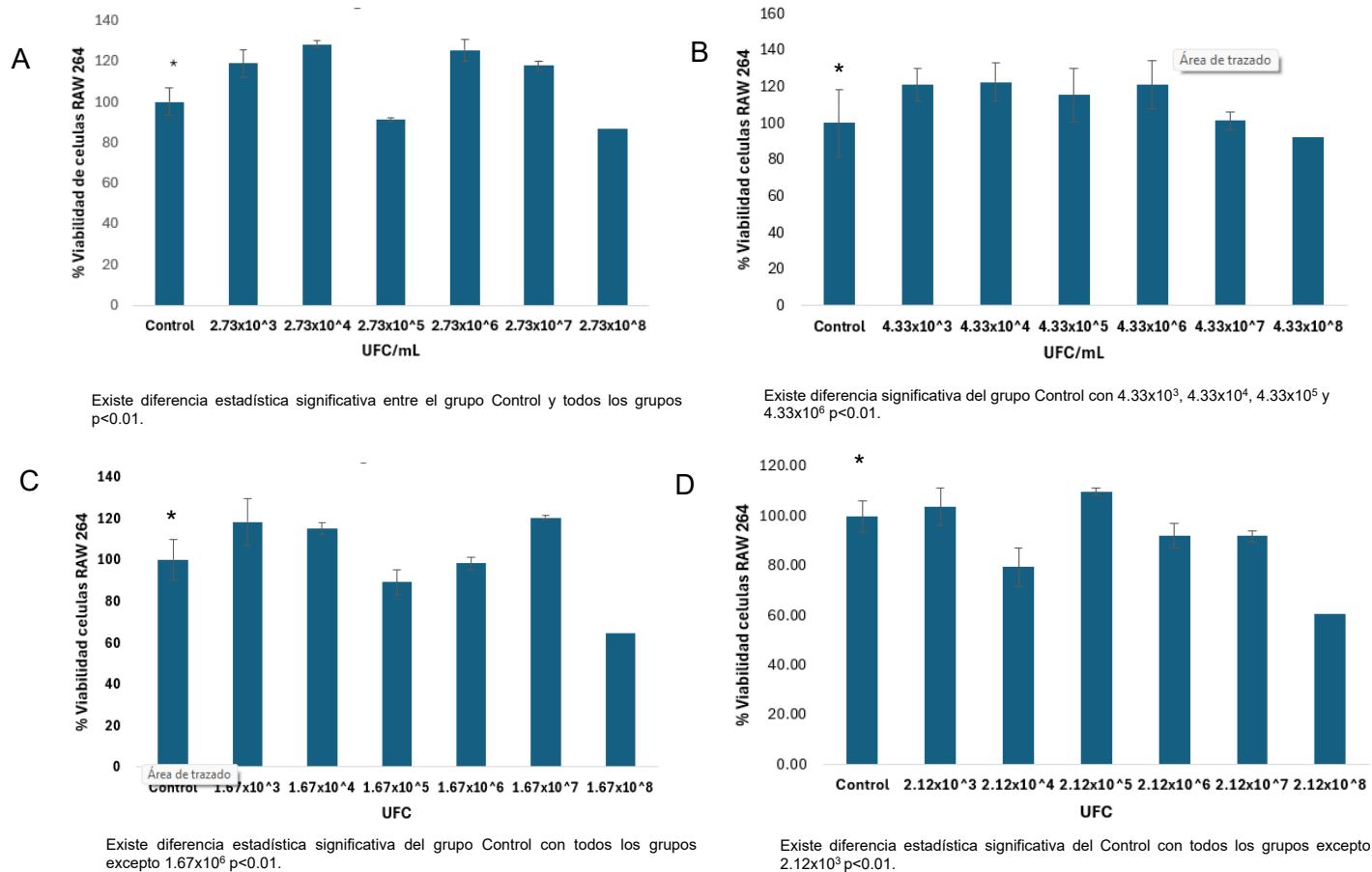


Figura 7. Viabilidad, A) *Lactobacillus rhamnosus* (LBUX2302), B) *Lactobacillus rhamnosus* (LBUX2304), C) *Lactobacillus paracassei* (LBUX2306) y D) *Lactobacillus rhamnosus* (LBUX2312).

6.2 Óxido nítrico

En la Figura 8 se muestra la respuesta en la producción de óxido nítrico de las células RAW 264 al agregar los diferentes microorganismos (*L. rhamnosus* (LBUX2302), *L. paracassei* (LBUX2304), *L. rhamnosus* (LBUX2306) y *L. rhamnosus* (LBUX2312)). Se observa una notable disminución de la producción de óxido nítrico en las muestras a las que se les agregaron las diferentes cepas con potencial probiótico, obteniendo así una producción de 40.85µM/mL en el grupo Basal, 41.40µM/mL en el grupo tratado con diclofenaco + LPS, 107.77µM/mL en el grupo estimulado solo con LPS, 6.32µM/mL en el grupo tratado con *L. rhamnosus* (LBUX2302), 5.71µM/mL en el grupo tratado con *L. paracassei* (LBUX2304), 6.44 µM/mL en el grupo tratado con *L. rhamnosus* (LBUX2306) y 5.82µM/mL en el grupo tratado con *L. rhamnosus*(LBUX2312), y disminuyendo por lo tanto la

producción de óxido nítrico en 62.08%, 61.6%, 94.13%, 94.7%, 94.03%, 94.64% en los grupos Basal, Diclofenaco + LPS, *L. rhamnosus* (LBUX2302), *L. paracassei* (LBUX2304), *L. rhamnosus* (LBUX2306) y *L. rhamnosus*(LBUX2312) respectivamente, esto con respecto a la producción de óxido nítrico de las células RAW 264 estimuladas solo con LPS.

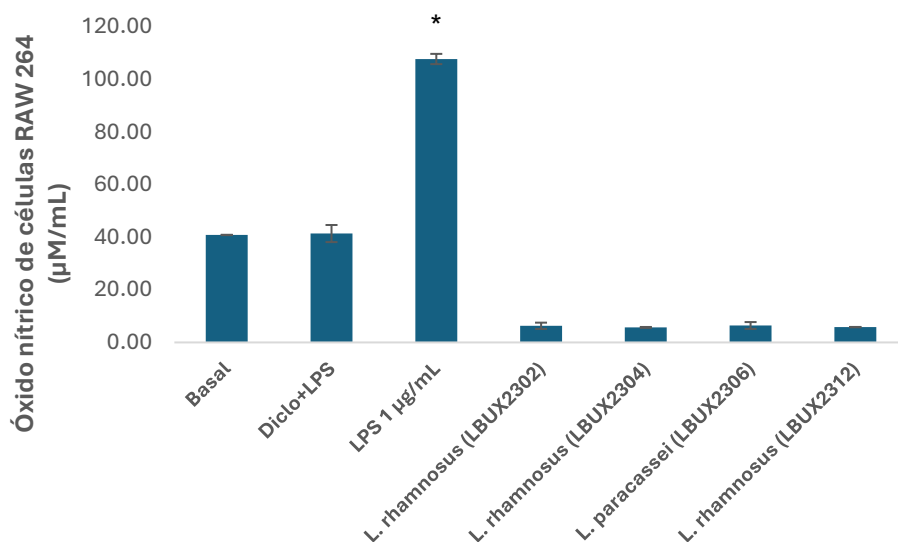


Figura 8. Respuesta en la producción de óxido nítrico con los diferentes estímulos. Existe diferencia estadística significativa entre Basal con todos los grupos $p < 0.01$, a excepción de Diclo+LPS. También existe diferencia significativa entre Diclo+LPS con LPS, (*L. rhamnosus* (LBUX2302), *L. paracassei* (LBUX2304), *L. rhamnosus* (LBUX2306) y *L. rhamnosus*(LBUX2312) $p < 0.01$ y existe diferencia significativa entre LPS y (*L. rhamnosus* (LBUX2302), *L. paracassei* (LBUX2304), *L. rhamnosus* (LBUX2306) y *L. rhamnosus*(LBUX2312) $p < 0.01$.

6.3 RNA

En la Tabla 3 se muestra la cuantificación de RNA posterior a la extracción con TRIzol de las células tratadas con diclofenaco, LPS, *L. rhamnosus* (LBUX2302), *L. paracassei* (LBUX2304), *L. rhamnosus* (LBUX2306) y *L. rhamnosus* (LBUX2312). Las cuales fueron sembradas a una densidad de 2.5×10^5 En la mayoría de los casos se obtuvo una alta concentración de RNA con alta pureza.

Tabla 3. Concentración y pureza de RNA

Muestra	[ng/µl]	260/280	260/230

Basal	676	1.79	1.94
Diclo+LPS 1 µg	601	1.81	1.81
Diclo+LPS 1 µg	791	1.84	1.54
Diclo+LPS 1µg	676	1.8	1.7
LPS 5 µg	801	1.85	1.84
LPS 5 µg	629	1.62	1.19
LPS 2.5 µg	494	1.77	0.86
LPS 2.5 µg	168	1.65	0.84
LPS 1 µg	616	1.81	1.74
LPS 1 µg	687	1.8	1.51
LPS 100 ng	656	1.8	1.67
LPS 100 ng	869	1.82	1.77
<i>L. rhamnosus (LBUX2302)+LPS</i>	268.2	2.01	0.38
<i>L. rhamnosus (LBUX2302)+LPS</i>	91.9	1.59	0.42
<i>L. paracassei (LBUX2304)+LPS</i>	115.8	1.75	0.35
<i>L. paracassei (LBUX2304)+LPS</i>	145.3	1.87	0.46
<i>L. rhamnosus (LBUX2306)+LPS</i>	180.2	0.193	0.49
<i>L. rhamnosus (LBUX2306)+LPS</i>	210.8	1.84	0.59
<i>L. rhamnosus (LBUX2312)+LPS</i>	463.3	2.1	0.55
<i>L. rhamnosus (LBUX2312)+LPS</i>	296.3	2.07	1.15

En la Figura 9 se muestra la integridad del RNA en geles de agarosa. En los incisos A), C) y D) se observan bandas nítidas y brillantes que confirman la alta concentración de las muestras y su integridad. Sin embargo, en el inciso B) las muestras: LPS 5, Diclo+LPS 100ng y Diclo+LPS 1 se muestran degradadas.

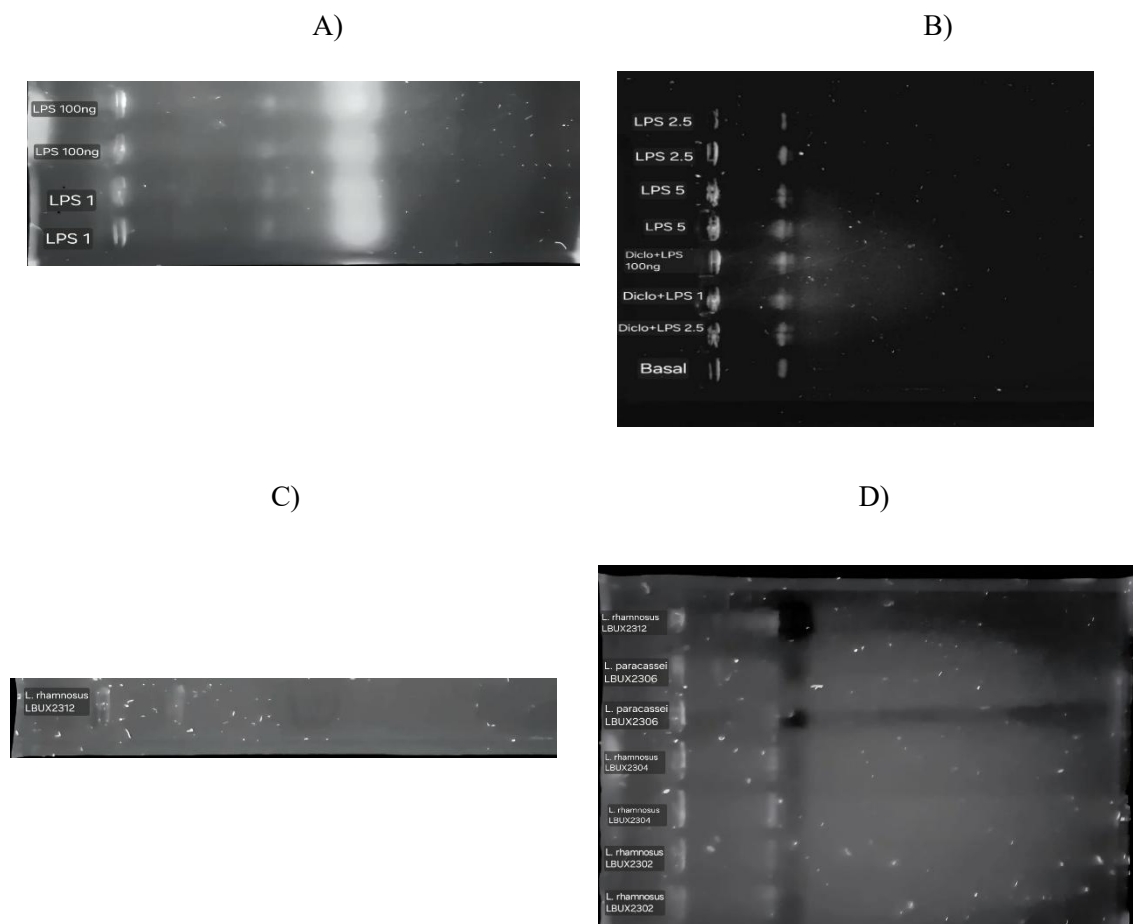


Figura 9. Integridad de RNA, A) LPS 100ng y LPS 1, B) LPS 5, LPS 2.5, Diclo+LPS 2.5, Diclo+LPS 1 y Diclo+LPS 100ng, C) *L. rhamnosus* (LBUX2302), *L. paracasei* (LBUX2304), *L. rhamnosus* (LBUX2306) y *L. rhamnosus* (LBUX2312), D) *L. rhamnosus* (LBUX2312).

6.7 cDNA

En la Tabla 4 se muestra la concentración y pureza obtenidas al sintetizar el cDNA usando el RNA obtenido previamente por extracción con TRIzol. Se obtuvieron muestras altamente concentradas de hasta ___ con alta pureza.

Muestra	[ng/μl]	260/280	260/230
Basal	1243	1.63	1.83
Diclo+LPS 1 μg	1212	1.60	1.87
LPS 1 μg	1244	1.82	1.90
<i>L. rhamnosus</i> (LBUX2302)+LPS	1384	1.66	2.01

<i>L. rhamnosus (LBUX2302)+LPS</i>	1508	1.66	1.98
<i>L. paracassei (LBUX2304)+LPS</i>	1426	1.60	1.24
<i>L. rhamnosus (LBUX2306)+LPS</i>	1776	1.65	1.99
<i>L. rhamnosus (LBUX2312)+LPS</i>	1284	1.62	1.65
<i>L. rhamnosus (LBUX2312)+LPS</i>	1218	1.65	1.77

Tabla 4. cDNA

7. Discusión

La inflamación, especialmente crónica es indirectamente la principal causa de muerte en el mundo. Ya que muchas personas padecen enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos que desencadena accidentes cerebrovasculares, cardiopatías, obesidad, diabetes, enfermedades respiratorias crónicas y cáncer entre otras (Pahwa R. 2023). Los cuales se tratan principalmente con AINES cuya principal función es inhibir la producción de ciclooxigenasas y por lo tanto de prostaglandina. Sin embargo, la inhibición de ciclooxigenasas produce efectos negativos graves en la mucosa gástrica, el sistema cardiovascular, el sistema renal, el sistema hematológico y el sistema hepático, por lo que se vuelve crucial desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento de la inflamación (Ghlichloo, I., 2023).

La viabilidad de células RAW 264.7 tras estimularlas con diferentes concentraciones de bacterias lácticas (*L. rhamnosus (LBUX2302)*, *L. paracassei (LBUX2304)*, *L. rhamnosus (LBUX2306)* y *L. rhamnosus(LBUX2312)*), en un rango de concentraciones de 1.67×10^3 – 4.33×10^8 UFC no afecta su crecimiento. Sin embargo, se observó un aumento de 20% en la viabilidad de las células tratadas en el rango de 1.67×10^3 – 4.34×10^6 UFC. Lo que podría atribuirse al efecto promotor de proliferación asociado a las bacterias ácido lácticas señalado por ejemplo por Lu Y. (2024), con un incremento del 32% de viabilidad en células RAW 264.7 estimuladas con *Lactobacillus reuteri AUc2301* en una concentración de 1.02×10^8 , o el reportado por Liu ML (2019) donde se demostró que *Lactiplantibacillus plantarum* ML2018 promovía el crecimiento de macrófagos RAW264.7 a concentraciones experimentales de 0,07 a 1,2 µg/mL.

Entre otras características los macrófagos producen (ON) al exponerse a estímulos inflamatorios, por lo que su capacidad antiinflamatoria puede evaluarse mediante la detección del contenido de ON en los sobrenadantes del cultivo celular (Whu X., 2024). De la misma manera en el presente estudio se empleó LPS para estimular la activación de las células y en consecuencia generar altos niveles de óxido nítrico, que son característicos de la inflamación. Por otro lado, la producción de óxido nítrico es inestable y se oxida rápido a nitritos, por lo que es importante cuantificar de manera indirecta el nivel de nitritos como indicador de producción de óxido nítrico (Suriyaprom, S, 2023). En nuestro estudio la producción de óxido nítrico con *L. rhamnosus* (LBUX2302), *L. paracassei* (LBUX2304), *L. rhamnosus* (LBUX2306) y *L. rhamnosus* (LBUX2312) en presencia de LPS 1µg/mL disminuyó en un rango de 94% ($p < 0.01$) en comparación con las células estimuladas con LPS 1mg/mL (control inflamatorio). Estos resultados son similares a los reportados por Michels M. (2021) que evaluó el efecto de *L. gasseri* CCT6870, *L. casei* CCT7859 y *L. paracassei* CCT6871 entre otros, demostrando una disminución en la producción de ON en 30% en el caso de *L. casei*. Sin embargo, en ese caso, los cultivos celulares de RAW 264.7 se trataron en un rango de cepas probióticas del 0.001 a 2mg/ml. Por otro lado, Li. et al en 2024 evaluó la actividad antiinflamatoria de *L. rhamnosus* GG como tratamiento de inflamación intestinal, observando una disminución superior al 50% en la producción de ON en las células RAW 264.7. Además, se ha descrito la actividad antiinflamatoria de *Lactobacillus rhamnosus* DSM 20011T en un estudio donde se observó una inhibición del nivel de óxido nítrico en células RAW 264.7 del 50% al agregar la cepa a una concentración de 10^8 UFC/mL y posteriormente incubar en conjunto con LPS 0.1µg/mL (Oh et al., 2018). Existe evidencia que indica que la mediación en la inflamación se debe a inhibición de mediadores inflamatorios como el ON al impedir la síntesis de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) debido a la supresión de la vía MAPK, como en el estudio publicado por Gao K. (2017) en el que demostró que proteínas de la capa superficial y exopolisacáridos inhiben esta señalización que a su vez regula la señalización de NFκB, que conjunto con la habilidad de los probióticos a unirse a LPS inhibe la activación de los macrófagos al exponerlos a LPS (Khanna, S et al, 2020; Li et al. 2019).

Adicionalmente se realizó la extracción de RNA de los macrófagos obteniendo muestras

altamente concentradas en un rango de 91.6 – 801 ng/ μ L como se muestra en la Tabla 2. Sin embargo, la integridad no es la deseable para todas las muestras, lo que puede deberse principalmente a las RNasas que son enzimas que se encuentra incluso dispersas en el aire y que degradan rápidamente el RNA. La integridad del RNA es fundamental para la síntesis de cDNA u otras aplicaciones posteriores (Romero G. 2014) Por lo que se sugiere emplear variaciones en el método de electroforesis en gel de agarosa como el propuesto por Aranda P. (2012), en el que demostraron que agregar lejía (solución de hipoclorito en agua) al 6% destruye cualquier RNasa presente en el gel lo que mejora considerablemente la capacidad de analizar rápidamente el RNA.

8. Conclusión

Lactobacillus rhamnosus (LBUX2302, LBUX2306, LBUX2312) y *Lactobacillus paracasei* (LBUX2304) reducen significativamente la producción de óxido nítrico en un modelo antiinflamatorio utilizando células RAW 264.7. El ON es un marcador clave en los procesos inflamatorios y, aunque en concentraciones fisiológicas cumple funciones beneficiosas para el huésped, su sobre producción puede inducir daño celular y tisular. Los resultados sugieren que estas cepas podrían tener potencial para estudios más profundos, orientados al desarrollo de un complemento terapéutico.

9. Referencias

- Alur, I. (2023) Low-Grade Inflammation: A Familiar Factor in Cardiovascular Diseases. *JACC Basic. Transl. Sci*, 8, 1475.
- Antoniades C., Chan K.(2024) Calcificación vs. Inflamación: El conjunto de herramientas moderno para la evaluación del riesgo cardiovascular. *JACC Cardiovasc. Imaging*. 17:1225–1228. doi: 10.1016/j.jcmg
- Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary World*, 11(5), 627-635. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>
- Abriouel H, Perez-Montoro B, Casado-Munoz MC, Knapp CW, Galvez A, Benomar N (2017) In silico genomic insights into aspects of food safety and defense mechanisms of a potentially probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 isolated from brines of naturally fermented Alorena green table olives. *PLoS ONE* 12:e017680
- Aghamohammad, S.; Sepehr, A.; Miri, ST; Najafi, S.; Rohani, M.; Pourshafiea, MR. (2022). Efectos

del cóctel probiótico en la modulación de las vías de señalización NF- κ B y JAK/STAT implicadas en la respuesta inflamatoria en un modelo de enfermedad intestinal. *BMC Immunol.* 23, 8.

-Adejumo, S. A., Oli, A. N., Rowaiye, A. B., Igbokwe, N. H., Ezejiegu, C. K., & Yahaya, Z. S. (2023). Immunomodulatory Benefits of Probiotic Bacteria: A Review of Evidence. *OBM Genetics*, 07(04), 1-73.

-Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366-369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>

-Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. (2018) Función de la polarización de los macrófagos humanos en la inflamación durante enfermedades infecciosas. *Int J Mol Sci* .19(6):1801. doi: 10.3390/ijms19061801

-Bedoya, F. A. (2023). El factor de transcripción nuclear NF- κ B en cáncer. *Horizonte Médico (Lima)*, 23(1), e1987. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2023.v23n1.12>

-Blériot C, Chakarov S, Ginhoux F. (2020) Determinantes de la identidad y función de los macrófagos tisulares residentes. *Inmunidad*. 52:957–70. doi: 10.1016/j.immuni.

-Bhol, N. K., Bhanjadeo, M. M., Singh, A. K., Dash, U. C., Ojha, R. R., Majhi, S., Duttaroy, A. K., & Jena, A. B. (2024). The interplay between cytokines, inflammation, and antioxidants: mechanistic insights and therapeutic potentials of various antioxidants and anti-cytokine compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 178, 117177. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117177>

-Barnes, P. J., & Karin, M. (1997). Nuclear Factor- κ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *New England Journal Of Medicine*, 336(15), 1066-1071. <https://doi.org/10.1056/nejm199704103361506>

-Biagioli M, Laghi L, Carino A, Cipriani S, Distrutti E, Marchianò S, Parolin C, Scarpelli P, Vitali B, Fiorucci S (2017) Metabolic variability of a multispecies probiotic preparation impacts on the anti-inflammatory activity. *Front Pharmacol* 8:505

-Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204-7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>

-Colautti, A., Orecchia, E., Comi, G., & Iacumin, L. (2022). Lactobacilli, a Weapon to Counteract Pathogens through the Inhibition of Their Virulence Factors. *Journal Of Bacteriology*, 204(11), e0027222. <https://doi.org/10.1128/jb.00272-22>

-Davoren MJ, Liu J, Castellanos J, Rodríguez-Malavé NI, Schiestl RH (2019) A novel probiotic, *Lactobacillus johnsonii* 456, resists acid and can persist in the human gut beyond the initial ingestion period. *Gut Microbes* 10:458–480

-Del Carmen, S., De Moreno de LeBlanc, A., Miyoshi, A., Rocha, C. S., Azevedo, V., & LeBlanc, J. G. (2010). Potential Application of Probiotics in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Ulcers, 2011*, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2011/841651>

- Ephraim R., Fraser S., Devereaux J., Stavely R., Feehan J., Eri R., Nurgali K., Apostolopoulos V. (2023) Expresión génica diferencial de marcadores de puntos de control y marcadores de cáncer en modelos murinos de colitis crónica espontánea. *Cancers*.15:4793. doi: 10.3390/cancers15194793.
- Feehan J., Tripodi N., Apostolopoulos V. (2021) El ocaso del sistema inmunitario: El impacto de la inmunosenescencia en el envejecimiento. *Maturitas*.147:7–13. doi: 10.1016/j.maturita
- Fleit, H. (2014). Chronic inflammation. En Elsevier eBooks (pp. 300-314). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386456-7.01808-6>
- Fernández-Ávila, D., & Dávila-Ruales, V. (2023). Frecuencia de uso y costo del tratamiento biológico para enfermedad inflamatoria intestinal y artropatía asociada a enfermedad inflamatoria intestinal en Colombia durante el año 2019. *Revista de Gastroenterología de México*, 89(2), 213-221. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2023.03.007>
- Georgieva, M.; Georgiev, K.; Hvarchanova, N. (2022) Capítulo 29—Probióticos: Desafíos pasados, presentes y futuros. En *Probióticos en la prevención y el manejo de enfermedades humanas* ; Dwivedi, MK, Amaresan, N., Sankaranarayanan, A., Kemp, EH, Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, EE. UU. págs. 431–448.
- Gao, K., Wang, C., Liu, L., Dou, X., Liu, J., Yuan, L., Zhang, W., & Wang, H. (2017). Immunomodulation and signaling mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its components on porcine intestinal epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide. *Journal Of Microbiology Immunology And Infection*, 50(5), 700-713. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.05.002>
- Gallego Romero I, Pai AA, Tung J, Gilad , . (2014). RNA-Seq: impacto de la degradación del ARN en la cuantificación de transcritos. . *BMC: Biology*, (2014), 12-42,
- Ghlichloo, I., & Gerriets, V. (2023b, mayo 1). *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs)*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547742/>
- Hendrayani SF, Al-Harbi B, Al-Ansari MM, Silva G, Aboussekhra A (2016) El ciclo de retroalimentación positiva IL-6/STAT3/NF-κB relacionado con la inflamación y el cáncer incluye AUF1 y mantiene el estado activo de los miofibroblastos mamarios. *Oncotarget*.7:41974–41985. doi: 10.18632/oncotarget.9633.
- Halliwell B, Gutteridge JM, editores. (2015) Radicales libres en biología y medicina. EE. UU.: Oxford University Press.
- Hitch, A. (2025). Nuevos tratamientos para la tiroiditis de Hashimoto en 2025 | Blog Swiss Medica. Swiss Medica. <https://www.startstemcells.com/es/new-treatments-for-hashimotos-thyroiditis.html>
- Hao, R.; Liu, Q.; Wang, L.; Jian, W.; Cheng, Y.; Zhang, Q.; Hayer, K.; Kamarudin Raja Idris, R.; Zhang, Y.; Lu, H.; et al. (2023) Efecto antiinflamatorio de sobrenadantes libres de células T1 de *Lactiplantibacillus plantarum* mediante la supresión del estrés oxidativo y las vías de señalización de

NF- κ B y MAPK. *Appl. Environ. Microbiol.* 89, e0060823.

-Ira Fox S. *Human Physiology*. 14th. ed. (2016) McGraw-Hill Education. New York.

-Khanna, S., Bishnoi, M., Kondepudi, K. K., & Shukla, G. (2020). Isolation, characterization and anti-inflammatory mechanism of probiotics in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 36(5), 74. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02852-z>

-Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins y Cotran (2021) *Patología estructural y funcional*. 10a. ed. Elsevier. Barcelona.

-Kany, S., Vollrath, J. T., & Relja, B. (2019). Cytokines in Inflammatory Disease. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(23), 6008. <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>

-Li T, Teng D, Mao R, Hao Y, Wang X, Wang J (2020) A critical review of antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Food Res Int* 136:109571

-Liu, CH; Qi, XF; Liu, XL; Sun, Y.; Mao, KD; Shen, GQ; Ma, Y.; Li, QM. (2024) Los probióticos antiinflamatorios HF05 y HF06 alivian sinérgicamente la colitis ulcerosa y la lesión hepática secundaria. *FOOD Funct.* 15, 3765–3777.

-Li SC, Hsu WF, Chang JS, Shih CK (2019) La combinación de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis muestra un efecto antiinflamatorio más potente que las cepas individuales en células HT-29. *Nutrients* 11(5):969. <https://doi.org/10.3390/nu11050969>

-Lu, Y., Wu, Y., Pan, L., Wang, J., Tang, R., Deng, F., Kang, W., & Zhao, L. (2024). In Vitro Screening of Lactic Acid Bacteria with RAW264.7 Macrophages and the Immunoregulatory Mechanism. *Processes*, 12(5), 903. <https://doi.org/10.3390/pr12050903>

-Liu, M., Zhang, X., Hao, Y., Ding, J., Shen, J., Xue, Z., ... & Wang, N. (2019). Efectos protectores de una nueva cepa probiótica, *Lactococcus lactis* ML2018, en la colitis: evidencia in vivo e in vitro. *Food & function*, 10 (2), 1132-1145.

-Lee, C., & Choi, E. Y. (2018). Macrophages and Inflammation. *Journal Of Rheumatic Diseases*, 25(1), 11. <https://doi.org/10.4078/jrd.2018.25.1.11>

-Mazziotta, C.; Tognon, M.; Martini, F.; Torreggiani, E.; Rotondo, JC.(2023) Mecanismo de acción de los probióticos sobre las células inmunitarias y efectos beneficiosos para la salud humana. *Cells*, 12, 184.

-Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. (2004) El sistema de quimiocinas en diversas formas de activación y polarización de macrófagos. *Trends Immunol.* 25: 677-686

-Michels, M., Jesus, G. F. A., Voytena, A. P. L., Rossetto, M., Ramlov, F., Córneo, E., Feuser, P., Gelain, D., & Dal-Pizzol, F. (2021). Immunomodulatory Effect of Bifidobacterium, Lactobacillus, and Streptococcus Strains of Paraprobiotics in Lipopolysaccharide-Stimulated Inflammatory Responses in RAW-264.7 Macrophages. *Current Microbiology*, 79(1), 9. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02708-1>

-Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. (2019) Polarización de macrófagos: Diferentes firmas génicas en macrófagos activados clásicamente (M1(LPS+)) y alternativamente (M2(LPS-)). *Front Immunol.* 10:1084. doi: 10.3389/fimmu.2019.01084

- Pahwa R, Goyal A, Jialal I. (2023) Chronic Inflammation. In: Stat Pearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); PMID: 29630225.
- Perry VH. (2010) Contribución de la inflamación sistémica a la neurodegeneración crónica. *Acta Neuropathol.* 120:277–286. doi: 10.1007/s00401-010-0722-x.
- Plaza-Díaz, J.; Ruiz-Ojeda, F.J.; Gil-Campos, M.; Gil, A. (2019) Mecanismos de acción de los probióticos. *Adv. Nutr.* 10, S49–S66.
- Regueras, E., Velazquez, I., & Torres, L. M. (2024). Actualización en la Farmacología de los AINES (Anti-Inflamatorios No Esteroideos). *Multidisciplinary Pain Journal*. <https://doi.org/10.20986/mpj.2024.1059/2023>
- Rice, J. B., White, A. G., Scarpati, L. M., Wan, G., & Nelson, W. W. (2017). Long-term Systemic corticosteroid exposure: A Systematic Literature review. *Clinical Therapeutics*, 39(11), 2216-2229.
- Suriyaprom, S., Srisai, P., Intachaisri, V., Kaewkod, T., Pekkoh, J., Desvaux, M., & Tragoolpua, Y. (2023). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity on LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells of White Mulberry (*Morus alba* L.) Leaf Extracts. *Molecules*, 28(11), 4395. <https://doi.org/10.3390/molecules28114395>
- Thomas, C. (2007). *Elsevier's Integrated Pathology*. Elsevier
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Citocinas y quimiocinas: En la intersección de la señalización celular y la enfermedad inflamatoria. *BBA-Mol Cell Res.* 2014; 1843:2563–2582. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
- Thoda, C., & Touraki, M. (2023). Immunomodulatory Properties of Probiotics and Their Derived Bioactive Compounds. *Applied Sciences*, 13(8), 4726. <https://doi.org/10.3390/app13084726>
- Thomas CM, Versalovic J (2010) Comunicación entre probióticos y huésped: modulación de las vías de señalización en el intestino. *Gut Microbes* 1:148–163
- Villena, J., & Kitazawa, H. (2017). Editorial: Immunobiotics—Interactions of Beneficial Microbes with the Immune System. *Frontiers In Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01580>
- Wang, G.; Huang, S.; Wang, Y.; Cai, S.; Yu, H.; Liu, H.; Zeng, X.; Zhang, G.; Qiao, S. (2019) Uniendo la inmunidad intestinal y la microbiota intestinal mediante metabolitos. *Cell Mol. Life Sci.* 76, 3917–3937
- Wu, X. (2024). Guidelines for anti-inflammatory assays in RAW264.7 cells. *Food Safety And Health*, 3(1), 128-136. <https://doi.org/10.1002/fsh3.12073>
- Zhang, Z.; Tang, H.; Chen, P.; Xie, H.; Tao, Y. (2019) Desmitificando la manipulación de la inmunidad del huésped, el metabolismo y los tumores extraintestinales por el microbioma intestinal. *Signal Transduct. Target. Ther.* , 4 , 41.
- Zachary, J. (2017). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Urbana, Illinois: Mosby