



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos
Licenciatura de Química Farmacéutica Biológica

Proyecto

“Estandarización de la expresión génica de ciclooxigenasa I y II en
macrófagos”

Alumna: Zuleyma Basurto Reyes

Matricula: 2192037364

Asesores

Dra. Ana Laura Esquivel Campos

No. Económico 33148

M en C. Felipe Mendoza Pérez

No. Económico 7183

04 Abril 2024

ÍNDICE

Resumen.....	3
Abstract	3
Introducción	4
Marco teórico.....	6
Inflamación	6
Macrófagos.....	8
Lipopolisacárido (LPS).....	13
Ciclooxigenasas 1 y 2.....	16
Hipótesis	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos.....	19
Metodología.....	20
Cultivo de macrófagos J774A.1.....	20
Preparación de placas de ensayo.....	20
Estimulación de macrófagos J774A.1	21
Lectura de óxido nítrico.....	21
Extracción de ARN	22
Transcripción inversa.....	23
PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	23
Resultados y discusión	25
Conclusión	27
Referencias.....	28

Resumen

Existen dos isoformas de ciclooxigenasas (COX) en los mamíferos, la ciclooxigenasa-1 (COX-1) constitutiva y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) inducible. La COX-1 y la COX-2 son las dos principales prostaglandinas sintetas responsables de la producción de prostaglandinas (PG) a partir del ácido araquidónico, estas a su vez, son altamente inmunomoduladores y actúan en sinergia con las citocinas para amplificar las respuestas proinflamatorias. En el presente estudio, se estimularon macrófagos J774A.1 con LPS (5 µg/mL), en donde, se usó indometacina (25 µM) como antiinflamatorio con el fin de evaluar la expresión génica de COX-1 y COX-2 y así observar el comportamiento que presentan en procesos inflamatorios. Se llevo a cabo la obtención del material genético de los macrófagos J774A.1 activados para posteriormente realizar el análisis en tiempo real de la PCR cuantitativa (qRT-PCR) usando ensayos de expresión génica, a partir del cDNA para COX-1 y COX-2. Se encontró que los macrófagos estimulados con LPS incrementan los niveles de expresión génica de COX-2, los cuales presentaban el doble de expresión en comparación de los de COX-1. Por otra parte, se analizaron los genes de TNF- α y IL-6 los cuales presentaron niveles más altos que los COX-1 producto del efecto inductor a inflamación del LPS.

Palabras clave: ciclooxigenasa 1, ciclooxigenasa 2, lipopolisacárido (LPS), macrófagos J774A.1, qRT-PCR.

Abstract

There are two isoforms of cyclooxygenases (COX) in mammals, constitutive cyclooxygenase-1 (COX-1) and inducible cyclooxygenase-2 (COX-2). COX-1 and COX-2 are the two main prostaglandin synthases responsible for the production of prostaglandins (PG) from arachidonic acid. These, in turn, are highly immunomodulatory and act in synergy with cytokines to amplify proinflammatory responses. In the present study, J774A.1 macrophages were stimulated with LPS (5 µg/mL), where, indomethacin (25 µM) was used as an anti-inflammatory to evaluate the gene expression of COX-1 and COX-2 and thus observe the behavior they present in inflammatory processes. The genetic material of activated J774A.1 macrophages was obtained to subsequently perform real-time analysis of quantitative PCR (qRT-PCR) using gene expression assays, from the cDNA for COX-1 and COX-2. It was found that macrophages stimulated with LPS increased the gene expression levels of COX-2, which had double the expression compared to that of COX-1. On the other hand, the TNF- α and IL-6 genes were analyzed, which presented higher levels than COX-1 as a result of the inflammation-inducing effect of LPS.

Keywords: cyclooxygenase 1, cyclooxygenase 2, lipopolysaccharide (LPS), J774A.1 macrophages, qRT-PCR.

Introducción

Los macrófagos son células inmunitarias innatas presentes en todos los tejidos, los cuales tienen funciones fundamentales en la homeostasis y en muchos procesos fisiológicos como la función metabólica, la eliminación de desechos celulares, la reparación y remodelación de tejidos (Watanabe *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021). Tienen un papel fundamental en el inicio, mantenimiento y resolución de la inflamación al recibir señales de activación de citocinas como interferón γ (IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), lipopolisacárido bacteriano (LPS), proteínas de la matriz extracelular y otros mediadores químicos (Fujiwara & Kobayashi, 2005). Los macrófagos se pueden diferenciar en dos poblaciones distintas: M1/M2, los macrófagos M1 activados clásicamente son inducidos por productos microbianos y citocinas, de manera particular IFN- γ y son microbicidas y están involucrados en procesos inflamatorios potencialmente dañinos y los macrófagos M2 activados alternativamente son inducidos por las citocinas IL-4 e IL-13 producidas por células Th2 y otras células y funcionan para el control de la inflamación y promover la reparación de tejidos y fibrosis, algunos investigadores dividen a los macrófagos M2 en subpoblaciones, una de las cuales es principalmente antiinflamatoria y la otra es responsable de la reparación del tejido. o M2 (Zhang *et al.*, 2021). Los macrófagos en M1 expresan citocinas proinflamatorias como interleucina IL-6, IL-12, IL-1 β y TNF- α y quimiocinas como CCL2 y CCL5 (Ross *et al.*, 2021) expresan los marcadores de superficie celular CD36, CD206 y CD163 (Ross *et al.*, 2021). Los macrófagos M2 son polarizados por citocinas Th2 como IL-4 e IL-13 y producen citocinas antiinflamatorias como IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Zhang *et al.*, 2021). La inflamación se presenta como una respuesta biológica del sistema inmunológico que se puede desencadenar por una variedad de factores, incluidos patógenos, células dañadas y compuestos tóxicos. Estos factores pueden inducir respuestas inflamatorias agudas y/o crónicas en el corazón, el páncreas, el hígado, los riñones, los pulmones, el cerebro, el tracto intestinal y el sistema reproductivo, lo que podría provocar daños o enfermedades en los tejidos (Chen *et al.*, 2018). Una vez eliminados los agentes nocivos, la inflamación cede (Oishi & Manabe, 2018). Los macrófagos muestran una polarización fenotípica diferente dependiendo de la respuesta a diversas señales ambientales (Lee and Choi, 2018).

Los lipopolisacáridos (LPS), se encuentran en la pared celular de las bacterias Gramnegativas, provocando fuertes respuestas inmunitarias, a menudo se emplean para la activación los macrófagos, lo que resulta en un fenotipo proinflamatorio M1 y la liberación de citocinas proinflamatorias, incluido el TNF α , IL-1 β e IL-6 (Han *et al.*, 2017). La participación de Gi en la mediación de los efectos de LPS se demostró por primera vez en macrófagos murinos y, desde entonces, se ha validado en varios tipos de células, incluidas las células de origen humano (Tucureanu *et al.*, 2018).

Existen dos isoformas de COX en los mamíferos, la COX-1 constitutiva y la COX-2 inducible. Aunque ambas isoformas de COX se expresan en macrófagos, la expresión de COX-2 aumenta en respuesta a la inflamación (Pan *et al.*, 2022). Las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 son responsables de la producción de prostaglandinas como productos de descomposición del ácido araquidónico (Tang *et al.*, 2017). Las prostaglandinas, a su vez, son altamente inmunomoduladores y actúan en sinergia con las citocinas para amplificar las respuestas proinflamatorias (Court & Bank, 2019). Ambas isoformas de COX tienen ~60% de homología a nivel de proteína (Na *et al.*, 2015). La prostaglandina E2 (PGE2) puede ser proinflamatoria o antiinflamatoria según el contexto. Las respuestas celulares mediadas por PGE2 resultan de la activación de 4 receptores específicos, EP1 a EP4 acoplados a proteína G asociados a membrana (Pan *et al.*, 2022). La importancia de COX-2 en la síntesis de prostaglandinas y la inflamación se destaca por la observación de que los inhibidores de COX-2 bloquean la síntesis de PGE2 y, como resultado, inhiben la inflamación y confieren analgesia (Eliopoulos *et al.*, 2002).

En el presente estudio, se estimularon macrófagos J774A.1 con LPS, para estudiar la expresión génica de COX-1 y COX-2 a través de PCR cuantitativa (qRT-PCR) en tiempo real con la finalidad de determinar si a través del estímulo estas aumentan su expresión. Por lo tanto, sugerimos que hay un aumento en la expresión de COX-2 con respecto a COX-1 al estimular las células con LPS.

Marco teórico

Inflamación

La inflamación es definida como una respuesta protectora del organismo debido a la presencia de patógenos invasores o señales endógenas como células dañadas, resultando en la eliminación de la causa inicial de la lesión, la eliminación de las células necróticas y la reparación del tejido (Netea *et al.*, 2017). La inflamación aguda ocurre en cualquier parte del cuerpo y es necesaria para una rápida eliminación del agente agresor y posteriormente regresar a la homeostasis mientras que la inflamación crónica ocurre cuando no se cumple la misión. La inflamación va acompañada de la producción de radicales libres y un aumento del estrés oxidativo (Zeliger, 2023).

A nivel tisular, la inflamación se caracteriza por presentar enrojecimiento, hinchazón, calor, dolor y pérdida de la función tisular, que surgen de las respuestas locales de células inmunes, vasculares e inflamatorias a una infección o lesión (Ratan *et al.*, 2022). Los eventos microcirculatorios importantes que ocurren durante el proceso inflamatorio incluyen cambios en la permeabilidad vascular, reclutamiento y acumulación de leucocitos y liberación de mediadores inflamatorios (L. Chen *et al.*, 2018).

Causas de la inflamación

La inflamación puede ser causada por varios factores, como infección microbiana, viral o fúngica, toxinas, compuestos tóxicos y lesiones tisulares los cuales se pueden clasificar en inductores exógenos y endógenos (Soares *et al.*, 2023).

Los inductores exógenos son una agrupación que puede subdividirse en dos clases; inductores microbianos en los que se encuentran los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que son transportados por todos los microorganismos y los factores de virulencia restringidos a los patógenos que desencadenan la respuesta inflamatoria debido a los efectos de su actividad. Los ejemplos incluyen la actividad enzimática producida por helmintos y exotoxinas producidas por bacterias, que pueden ser detectadas por el sistema inmune. Por otro lado, los no microbianos incluyen alérgenos, compuestos tóxicos, irritantes y cuerpos extraños que son demasiado grandes para ser digeridos o que causan daño fagosómico en los macrófagos (Kiss, 2022).

Los inductores endógenos son señales liberadas por tejidos que están muertos, dañados, mal funcionamiento o estresados. Estos también pueden dividir los inductores inflamatorios en dos grandes grupos, que son los factores infecciosos y los factores no infecciosos. Los factores infecciosos incluyen bacterias, virus y otros microorganismos mientras que los factores no infecciosos pueden deberse a lesiones físicas como congelación, quemaduras, lesiones físicas, cuerpos extraños, traumatismos, radiaciones ionizantes, compuestos químicos como glucosa, ácidos grasos, toxinas, alcohol e irritantes químicos como el níquel y otros oligoelementos. Aparte de eso, también existen inductores biológicos, incluidas señales liberadas por células dañadas y fisiológicas debido a una posible activación (Hannoodee & Nasuruddin, 2022).

Estímulos no antigénicos pueden percibirse como “peligro” e iniciar una respuesta inflamatoria; estas influencias incluyen traumas como la radiación, la isquemia, la exposición a toxinas e incluso el estrés psicológico. Las toxinas y productos químicos ambientales (p. ej., residuos de pesticidas, aditivos, conservantes) también pueden inducir actividad inflamatoria mediante la activación de las vías del citocromo P450, la inducción de especies reactivas de oxígeno o el metabolismo a intermediarios reactivos y neoantígenos con efectos inmunotóxicos (Bennett *et al.*, 2018).

Respuesta inflamatoria

Una respuesta inflamatoria normal se caracteriza por la regulación positiva temporalmente restringida de la actividad inflamatoria que ocurre cuando hay una amenaza presente y que se resuelve una vez que la amenaza ha pasado (Furman *et al.*, 2019). Se han identificado diferentes factores que afectan la respuesta inflamatoria, incluido el microambiente tisular, las enfermedades, la energía, el estrés, el medio ambiente y los cambios estacionales (Aghasafari *et al.*, 2019). El curso de una respuesta inflamatoria está influenciado por la condición inmune del huésped, la virulencia, por ejemplo, de un agente infeccioso, y el ajuste fino de la reacción tisular local, que puede verse influenciada por factores genéticos individuales (Sahlmann & Ströbel, 2016). La inflamación no controlada o no resuelta puede provocar daño tisular, dando lugar a una gran cantidad de enfermedades inflamatorias crónicas, incluidos síndromes metabólicos y patologías autoinmunitarias con una eventual pérdida de la función de los órganos, así como aquellas de las que no se pensaba

que tuvieran un componente inflamatorio como la enfermedad de Alzheimer y la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Sugimoto *et al.*, 2016).

Marcadores inflamatorios

Los inductores de la inflamación desencadenan la producción de numerosos mediadores inflamatorios, que a su vez alteran la funcionalidad de muchos tejidos y órganos. Muchos de estos mediadores inflamatorios tienen efectos comunes sobre la vasculatura y el reclutamiento de leucocitos (Medzhitov, 2008).

El descubrimiento de mediadores inflamatorios celulares y moleculares y el desarrollo de biomarcadores sensibles han avanzado rápidamente en nuestra comprensión de la inflamación y su papel en la patología. Estos biomarcadores incluyen: Especies reactivas de oxígeno y óxido de nitrógeno (ROS y RNOS), formación de aductos de ADN, citocinas (p. ej., IL-6 y TNF-alfa) y quimiocinas, proteínas de fase aguda (p. ej., proteína C reactiva o PCR), prostaglandinas, metabolitos relacionados con la ciclooxigenasa (COX), factores de crecimiento y factores de transcripción relacionados con la inflamación (Stone *et al.*, 2022).

Tipos de células en la respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria involucra diferentes tipos de células como los macrófagos, monocitos y otras células activadas las cuales median las respuestas locales al daño tisular y a la infección. En sitios de lesión tisular, las células epiteliales y endoteliales dañadas liberan factores que desencadenan la cascada inflamatoria, junto con quimiocinas y factores de crecimiento, que atraen a neutrófilos y monocitos. Los neutrófilos son las primeras células en llegar a un sitio de lesión, seguidas de los monocitos, los linfocitos (células asesinas naturales [células NK], células T y células B) y mastocitos (L. Chen *et al.*, 2018).

Macrófagos

En 1883 los macrófagos fueron descritos por primera vez por Élie Metchnikoff, tras observaciones microscópicas de células móviles que respondían a una lesión en una larva de estrella de mar inducida por la inserción de una espina (Ross *et al.*, 2021). Los macrófagos son células inmunes innatas que pertenecen al grupo de los fagocitos mononucleares presentes en todos los tejidos. Los macrófagos detectan y responden a patógenos y otros desafíos ambientales y participan en la reparación de tejidos

después de una lesión (Watanabe *et al.*, 2019). Dependiendo de su ubicación en el organismo, se han identificado diferentes tipos de macrófagos, con funciones específicamente adaptadas al tejido que habitan. Estos tipos incluyen macrófagos periféricos en la sangre, macrófagos peritoneales, macrófagos pulmonares, células de Kupffer en el hígado y microglía en el cerebro (Nonnenmacher & Hiller, 2018). Los macrófagos residentes específicos del tejido se diferencian a partir de los monocitos circulantes, mientras que estos últimos se originan a partir de células progenitoras mieloides comunes en la médula ósea (Kolliniati *et al.*, 2022). En general, los macrófagos residentes mantienen la homeostasis del tejido, mientras que los macrófagos derivados de monocitos ayudan principalmente en la defensa del huésped y en la señalización patológica (Xia *et al.*, 2023).

Funciones

Los macrófagos desempeñan funciones en casi todos los aspectos de la biología de un organismo, desde la defensa contra patógenos y en la eliminación de células viejas, senescentes o muertas, pero también cumplen funciones importantes en la homeostasis y reparación de tejidos, por ejemplo, curación de heridas y regeneración muscular. Existen varias poblaciones de macrófagos que desempeñan funciones distintas y no redundantes en la fibrosis, la reparación y regeneración de tejidos (Lendeckel *et al.*, 2022). También se pueden reclutar macrófagos de diferentes fenotipos a partir de los reservorios de monocitos de la sangre, el bazo y la médula ósea y, quizás, de progenitores tisulares residentes o mediante proliferación local (Wynn *et al.*, 2013). Los estudios actuales de secuenciación de ARN unicelular (scRNA-seq) han revelado la presencia de múltiples subconjuntos de macrófagos con distintas funciones en varios tejidos. Además, la función y el fenotipo de los macrófagos se ven afectados por diversos factores en condiciones fisiológicas y patológicas, como la dieta y las citocinas. La alteración del fenotipo o la polarización de los macrófagos se asocia con distintos perfiles de expresión genética (Zhang *et al.*, 2021).

En el desarrollo de algunos órganos se requiere de fagocitos mononucleares, y la morfogénesis ramificada en órganos, como en la glándula mamaria y el páncreas, que depende de los macrófagos. En el sistema cardiovascular, los fagocitos mononucleares realizan funciones como la construcción de la pared vascular para mantener el ritmo cardíaco. En el hígado, las células de Kupffer residentes

interaccionan bidireccionalmente con los hepatocitos en el metabolismo de los lípidos, y son un componente esencial de la grasa. Una de las principales funciones homeostáticas de los macrófagos es proporcionar un nicho de cultivo para las células madre (Locati *et al.*, 2020).

Para llevar a cabo su papel como guardianes, los macrófagos presentan una amplia gama de moléculas sensoriales, incluidos receptores carroñeros, receptores de reconocimiento de patrones [receptores tipo Toll (TLR), receptores de lectina tipo C, receptores tipo RIG-I, receptores tipo Nod- receptores similares], receptores nucleares de hormonas y citocinas y moléculas de adhesión, los cuales varían entre los macrófagos y probablemente refleja una adaptación local (Varol *et al.*, 2015). Además, detectan y responden a la presencia de componentes microbianos, incluidos ARN y ADN, dentro de su citoplasma, activando inflammasomas intracelulares, procesamiento de caspasas y liberación de IL-1 β . Estos también secretan una gran cantidad de otras citocinas, enzimas, factores de crecimiento, productos de metabolitos derivados de lípidos y de bajo peso molecular en respuesta a estímulos fagocíticos y diversos y, a su vez, actúan sobre los receptores de macrófagos mediante mecanismos autocrinos (Gordon & Martinez-Pomares, 2017).

Polarización de macrófagos

La nomenclatura de polarización de macrófagos M1/M2 se introdujo en 2000, basándose en la propensión de los macrófagos de ratones C57BL/6J a activarse más fácilmente para producir NO (M1 polarizado) que los ratones Balb/c (M2 polarizados) (Orecchioni *et al.*, 2019). Al desempeñar una gran cantidad de funciones tanto en la salud como en la enfermedad, el fenotipo de activación de los macrófagos puede variar mucho y depende en gran medida del microambiente circundante (Verschoor *et al.*, 2012). Dependiendo de los estímulos microambientales, las cantidades de citocinas producidas y la duración de la exposición, los macrófagos contrarrestarán estas presiones desplegando funciones específicas, mostrando cada subconjunto de macrófagos un estado de polarización particular (Atri *et al.*, 2018). Esta polarización se ha agrupado clásicamente en dos programas principales, macrófagos activados clásicamente o M1 y macrófagos activados alternativamente o M2 según los receptores de superficie, las firmas genéticas y la secreción de mediadores inflamatorios (Saradna *et al.*, 2018), cada uno relacionado con respuestas inmunes específicas, entre las cuales tanto la progresión como la resolución de la inflamación

constituyen un determinante crítico (Atri *et al.*, 2018). El programa de polarización M1 se asocia típicamente con un fenotipo proinflamatorio y antibacteriano, mientras que el programa M2 se asocia con la cicatrización de heridas, la reparación de tejidos y la respuesta a los helmintos (Muñoz-Rojas *et al.*, 2021).

Macrófagos activados clásicamente o M1

Los macrófagos clásicamente activados o macrófagos M1 son considerados como un fenotipo proinflamatorio, con una sólida capacidad fagocítica y citotóxica; estas células se caracterizan por su expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II (Ross *et al.*, 2021). Constituyen la primera línea de defensa contra patógenos intracelulares y promueven la polarización Th1 de las células CD4. Los macrófagos M1 se producen en un entorno inflamatorio dominado por el receptor tipo Toll (TLR) y la señalización de IFN- γ . Exhiben un alto nivel de actividad fagocítica, y los marcadores que mejor los caracterizaron fueron CD64 y CD80, aunque el nivel de expresión de estos dos marcadores depende principalmente de la naturaleza del estímulo M1 (IFN- γ versus LPS versus IFN- γ y LPS) (Atri *et al.*, 2018). Los macrófagos M1 expresan óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), el marcador principal que confirma la respuesta de estas células en una enfermedad específica. Sin embargo, aún no se ha identificado un marcador de superficie que defina la identidad de los macrófagos M1 (De Sousa *et al.*, 2019).

Estimulación de M1

Los productos microbianos o citocinas proinflamatorias inducen la activación de macrófagos polarizados M1 (M1). El mediador inflamatorio crítico derivado de las células Th1 que polariza los macrófagos al fenotipo M1 es el IFN- γ . La unión de IFN- γ a su receptor (IFNGR) activa los adaptadores de Janus cinasa (Jak), lo que conduce a la activación de STAT1 (transductor de señal y activador de transcripción 1) (Chen *et al.*, 2023). El IFN- γ , que anteriormente se llamaba factor activador de macrófagos, activa los macrófagos en reposo para matar los microbios ingeridos mediante la acción del óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno y enzimas lisosomales. El IFN- γ es secretado principalmente por las células Th1; que es activado por IL-12 secretada por macrófagos activados; refleja el sinergismo entre las células Th1 y los macrófagos y M1. Además, esta sinergia se produce mediante la unión de las moléculas de macrófagos CD80/CD86 y CD40 con las de las células T, CD28 y

CD40L, respectivamente (Abdelaziz *et al.*, 2020). El IFN- α es el que desencadena los perfiles de expresión génica específicos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II, IL-12, óxido nítrico sintasa 2 (NOS2) y supresor de la señalización de citocinas (SOCS). IFN- γ es parte del modelo M1/M2 combinado con LPS. Sin embargo, los perfiles de expresión génica dependen de la combinación de LPS e IFN- γ (Chen *et al.*, 2023).

Los macrófagos M1 son capaces de producir citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e IL-23, TNF- α e IFN tipo I; y varias quimiocinas tales como CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13 y CXCL16; CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL15, CCL11, CCL19 y CCL20; así como CX3CL1; que inducen la activación de la respuesta Th1, facilitan la fagocitosis mediada por el complemento y la inflamación tipo I (Atri *et al.*, 2018; Ross *et al.*, 2021).

Macrófagos activados alternativamente o M2

Los macrófagos M2 o macrófagos antiinflamatorios. actúan en la resolución de la inflamación y las vías de reparación de tejidos, estos expresan marcadores de superficie celular CD36, CD206 y CD163. La población polarizada M2 está involucrada durante las infecciones parasitarias, helmínticas y fúngicas, inducidos en respuestas a Th2 (Atri *et al.*, 2018). Los macrófagos M2 presentan más diversidad en funciones, con varios subtipos (M2a, M2b, M2c, M2d) que expresan diferentes combinaciones de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Ross *et al.*, 2021). Entre los fenotipos, los macrófagos M2a, M2b y M2c se caracterizan por la presencia de arginasa (Arg). Estas subpoblaciones expresan un receptor eliminador de la superficie celular que reconoce complejos de haptoglobina-hemoglobina utilizados para identificar macrófagos M2 y el marcador CD163 (De Sousa *et al.*, 2019).

Estimulación de M2

La IL-4 y la IL-13 activan a los macrófagos M2 (M2 para reflejar la nomenclatura Th2). Las células M2 antagonizan los efectos de las células M1 (mediadas por IL-10) y promueven la reparación de tejidos, la remodelación y la cicatrización de heridas (a través de TGF- β y otros factores) después de una lesión inflamatoria ya que IL-4 interrumpe la polarización de células Th1 y M1 (Abdelaziz *et al.*, 2020). En su mayor parte, las señales JAK1 y JAK3 activan STAT6, el cual se traslada al núcleo y modula las respuestas inmunes antivirales innatas mediadas por genes de interferón.

Proteínas como la arginasa 1 (Arg 1), Ym1 (o Chitinase 3-like 3, Chi3l3), resistin-like- α (Retnla o Fizz1), CCL17 y CD206 (o receptor 1 de manosa de macrófagos, Mrc1) son controlado por STAT6, IRF4 y PPAR γ . Todos los leucocitos pueden contener IL-10, que se une a los receptores de IL-10 (IL10-R1 e IL10-R2). La IL-10 se une al IL-10R, lo que provoca la autofosforilación del receptor, que activa el factor de transcripción STAT3. La unión de STAT3 a su promotor puede modular la expresión del supresor de la señalización de citocinas 3 (SOCS3), que bloquea las vías de señalización de citocinas proinflamatorias (Chen *et al.*, 2023).

Los macrófagos tipo M2 se identifican principalmente en función de la expresión de CD64 y CD209, una lectina de tipo C. Inducen la producción de IL-13, CCL1, CCL2, CCL13, CCL14, CCL17, CCL18, CCL22, CCL23, CCL24, CCL26 e IL-1R. También pueden producir grandes cantidades de IL-8, proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP)-1, IP-10, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 β y CCL5, también puede ser producida y secretada por células T normales con el fin de reclutar neutrófilos, monocitos y linfocitos T para inducir una respuesta antiinflamatoria o reguladora (Atri *et al.*, 2018). Los macrófagos M2a, expresan altos niveles de IL-10, TGF- β y quimiocinas inflamatorias como CCL17, CCL18, CCL22, y CCL24. Contrariamente los macrófagos M2b son promovidos por complejos inmunes y se ha demostrado que desempeñan funciones importantes en las respuestas inmunes Th2 a través de su expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 y CCL1. Por otro lado, un microambiente rico en IL-10 y prostaglandina E2 induce la activación de macrófagos M2c, que continúan expresando IL-10 así como TGF- β y, por lo tanto, son reguladores clave de la resolución de la inflamación y la reparación de tejidos. Finalmente, los macrófagos M2d surgen en respuesta a TLR y ligandos del receptor A2A de adenosina, así como a IL-6, y se ha demostrado que participan en la angiogénesis a través de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e IL-10 (Ross *et al.*, 2021).

Lipopolisacárido (LPS)

El lipopolisacárido (LPS) es el principal componente de la pared celular presente en casi todas las bacterias Gram-negativas y es esencial tanto para la forma como para la función de la membrana externa (Tran & Whitfield, 2009; Shu & Mi, 2022). Las bacterias Gram negativas son los únicos organismos en la naturaleza que poseen LPS y lípido A, que es un componente "endotóxico". El peso molecular y la estructura

variarán según la especie de bacteria, al igual que la patogenicidad real del propio LPS (Schultz, 2018).

Estructura del LPS

La molécula de LPS es anfifílica y está compuesta por tres regiones diferentes, el lípido A, un ancla hidrófoba formada por cadenas de acilo, un núcleo compuesto por azúcares y una larga cadena polisacáridica, llamada antígeno O, figura 1 (Servais et al., 2023; Caroff & Новиков, 2020).

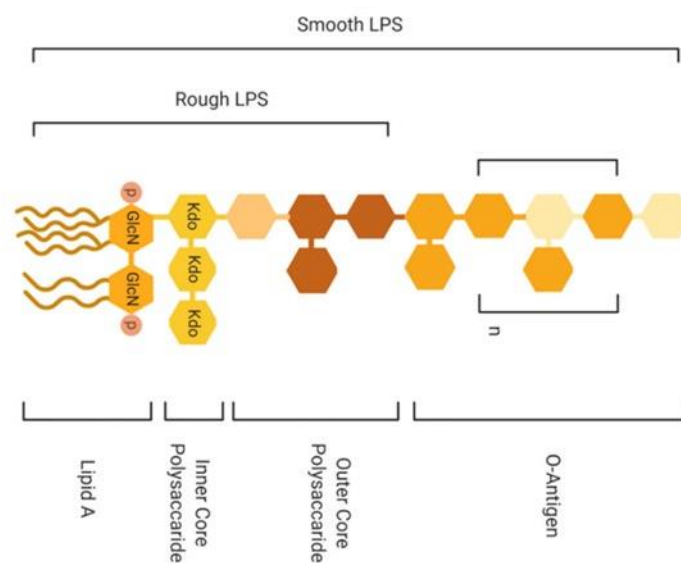


Figura 1. Estructura simple del LPS (Page et al., 2022).

La subestructura del Lípido A (Región III) del LPS estructuralmente es la parte más conservada de la estructura. Está compuesta por largas cadenas laterales de ácidos grasos (aproximadamente 16 carbonos) y es muy resistente (Schultz, 2018). Está compuesto por un "grupo principal" polar y un grupo hidrofóbico voluminoso que se compone de cuatro a siete residuos de lípidos 3-hidroxiados de cadena larga. La región polar del lípido A consiste en una cadena principal de diglucosamina unida con enlaces β , 1-6 y está acilado con R-3-hidroxiacilato en las posiciones 2, 3, 2' y 3', y fosforilado en las posiciones 1 y 4'. Los dos grupos R-3-hidroxi-acilo de la glucosamina no reductora se esterifican aún más con laurato y miristato (Rhee, 2014). Su actividad endotóxica del LPS generalmente depende del número, longitud y distribución de las cadenas lipídicas a lo largo del esqueleto disacárido del lípido A, así como del estado de fosforilación de las unidades de azúcar. (Zamyatina & Heine, 2020)

La región central del LPS se divide en núcleo interno y núcleo externo. La primera parte está unida al lípido A y la segunda a la cadena O-específica. La posición 6' del lípido A está glicosilada con un azúcar de ocho carbonos, el ácido 3-desoxi-D-mano-octulosónico (KDO). (Schultz, 2018; King, 2007). Se cree que el KDO, que se encuentra en la mayoría de las endotoxinas, es un blanco potencial en la terapia contra las enfermedades asociadas al LPS. Otros azúcares centrales incluyen L-glicero-D-mano-heptosa, glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. (Rhee, 2014). EL antígeno O del polisacárido (Región 1) es el sitio principal de especificidad inmunológica. Generalmente es un polímero de glicano repetitivo. El antígeno O puede constar de 20-40 (puede tener más) sacáridos repetidos, pero la composición difiere para cada especie bacteriana (Rhee, 2014). Los diversos monosacáridos pueden contener pentosas, hexosas y desoxiazúcares, y ácidos urónicos, con grupos amino N-acetilados. La unidad de repetición del antígeno O es muy variable inmunológicamente, dando lugar a una gran cantidad de serotipos (Maldonado *et al.*, 2016). Este se encuentra completamente expuesto al ambiente extracelular (Schultz, 2018).

Función del LPS

La función principal del LPS es proporcionar integridad estructural y una barrera de permeabilidad protegiendo a la célula bacteriana de la entrada de moléculas nocivas como toxinas y sales biliares durante su estancia en el tracto gastrointestinal (Valvano, 2015), también protege a las bacterias Gram-negativas del estrés físico, químico ambiental, en la resistencia a los medicamentos, en la patogénesis, la simbiosis y es reconocido por el sistema inmunológico innato tras una infección (Di Lorenzo *et al.*, 2021). Además, el LPS es el componente principal que confiere patogenicidad a la célula bacteriana. En comparación con las exotoxinas bacterianas clásicas, las endotoxinas (LPS) son moléculas constitutivas y bastante estables y son los principales modificadores de la respuesta biológica para inducir síntomas y patologías específicas de las enfermedades (Bertani & Ruiz, 2019).

El LPS no induce una respuesta proinflamatoria hasta que es liberado de la membrana bacteriana al desprenderse de vesículas de la membrana externa o tras la división, lisis o muerte celular. Una vez que el LPS se libera de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, el lípido A puede, en última instancia, interactuar con los

receptores Toll-4 de reconocimiento del huésped para inducir respuestas proinflamatorias y provocar toxicidad (Gorman & Golovanov, 2022).

Mecanismo de acción

En el sistema del huésped, el receptor en la superficie de los macrófagos y las células endoteliales detectan la fracción lípido A del LPS en niveles picomolares, en donde, el LPS se une a la proteína de unión a LPS (LBP) en el suero, que lo transfiere al receptor CD14 presente en la membrana celular de las células inmunes. El CD14 lo transfiere al MD2, que interactúa con el receptor tipo Toll-4 (TLR4). Por tanto, el LPS se une al complejo receptor CD14/TLR4/MD2 presente en muchos tipos de células huésped, como monocitos, células dendríticas, macrófagos y células B (Tsukamoto *et al.*, 2018). El complejo TLR4 activado estimula las vías de señalización intracelulares de proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) a través de una vía mediada por IRAK-1 y conduce a la síntesis y secreción de citocinas pro y antiinflamatorias. La respuesta posterior depende del tipo de célula a la que está unido el LPS (Pelvin *et al.*, 2016).

En monocitos y macrófagos, se desencadenan tres respuestas plausibles, que se mencionan a continuación;

- 1.- Producción de citocinas como TNF, IL-1, IL-6, IL-8, que estimulan la liberación de prostaglandinas y leucotrienos que inducen la inflamación, además, estimula la liberación de citocinas proinflamatorias, incluidas NO, IFN- γ y ciclooxigenasa-2 (COX- 2) (Henry & Moss, 2010).
- 2.- Al activarse el complemento este inicia la liberación de anafilotoxinas, provocando vasodilatación con quimiotaxis y acumulación de neutrófilos (Farhana & Khan, 2023).
- 3.- Activación de la cascada de coagulación: el factor XII de coagulación sanguínea activa los sistemas humorales que provocan coagulación, trombosis y coagulación intravascular diseminada aguda (Farhana & Khan, 2023).

Ciclooxigenasas 1 y 2

Los macrófagos activados por lipopolisacáridos (LPS) habitualmente se han utilizado para evaluar efectos antiinflamatorios de numerosos fármacos. Los LPS estimulan los macrófagos; las células producirán grandes cantidades de óxido nítrico (NO) y

prostaglandina E2 (PGE2), catalizadas por el óxido nítrico sintasa (NOS) y la ciclooxigenasa (COX), respectivamente (Wang *et al.*, 2017).

La ciclooxigenasa-1 (COX-1) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) son las dos principales prostaglandinas H sintasas responsables de la producción de prostaglandinas (PG), implicadas en la regulación de las respuestas inmunitarias e inflamatorias (Ren *et al.*, 2020). Las enzimas ciclooxigenasa COX-1 y COX-2, son codificadas por los genes *Ptgs1* y *Ptgs2* (Tang *et al.*, 2017). La COX-1 es la isoforma expresada constitutivamente en la mayoría de las células de mamíferos, y se ha informado de su papel en la tumorigénesis (Xiao *et al.*, 2012). Por el contrario, la COX-2 se expresa en niveles bajos en la mayoría de las células, pero se induce de forma transitoria en respuesta a factores de crecimiento, estrés o estímulos proinflamatorios (Tang *et al.*, 2017; Miciaccia *et al.*, 2021). No obstante COX-2 es expresada por una amplia gama de células como los macrófagos tras una estimulación adecuada. La COX-2 presenta un gen de respuesta temprana inmediata que es altamente inducible por estímulos inflamatorios, como los lipopolisacáridos de endotoxinas (LPS) (GUAN *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013). El ARNm de COX-2 tiene una vida media corta de aproximadamente 3 horas, en comparación con las 12 horas del ARNm de COX-1 (Bazán *et al.*, 2012; Olszowski *et al.*, 2015). Ambas isoformas de COX tienen aproximadamente un 63 % de identidad de secuencia a nivel de proteína (Shay *et al.*, 2017) y catalizan la conversión de ácido araquidónico en prostaglandina H2 (PGH2) que posteriormente se metaboliza a prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina I2 (PGI2), prostaglandina F2 (PGF2), prostaglandina D2 (PGD2) y tromboxano A2 (Aid *et al.*, 2010; Na *et al.*, 2015).

Las enzimas COX-1 y COX-2 median la producción de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. La prostaglandina E2 (PGE 2) es el principal producto del metabolismo del ácido araquidónico mediado por la COX-2 en muchas células. La PGE 2 desempeña funciones fundamentales en numerosos procesos biológicos, aumentando el flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular y la nocicepción, contribuyendo así a los cuatro signos cardinales de inflamación; enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor (Tang *et al.*, 2017; Williams *et al.*, 1999). Su secreción es inducida por diversos estímulos, incluidos LPS, ésteres de forbol, citocinas y fagocitosis. La PGE 2 es una de las principales PG secretadas en grandes cantidades por los macrófagos y actúa como regulador autocrino de su actividad. (Giroux & Descoteaux, 2000).

Estructura de COX-1 y COX-2

La COX-1 y COX-2 humanas son homodímeros de 576 y 581 aminoácidos, respectivamente. Estas enzimas contienen tres oligosacáridos con alto contenido de manosa, la cual facilita el plegamiento de proteínas. Teniendo en cuenta el 63% de identidad en la secuencia entre COX-1 y COX-2 sus estructuras tridimensionales son casi superponibles (Rouzer & Marnett, 2009).

COX consta de tres dominios estructurales: un dominio corto del factor de crecimiento epidérmico N-terminal, un dominio de unión a membrana y un dominio catalítico C-terminal grande y globular. Los sitios activos de COX y peroxidasa (POX) se ubican en lados opuestos del dominio catalítico con el grupo protésico hemo ubicado en la base del sitio de peroxidasa. El dominio del factor de crecimiento epidérmico y el dominio catalítico crean la interfaz del dímero y colocan los dos dominios de unión a la membrana en la misma cara del homodímero con una separación de aproximadamente 25 Å. El dominio de unión a la membrana de la ciclooxigenasa consta de cuatro hélices α anfipáticas, con residuos hidrofóbicos y aromáticos los cuales se proyectan desde las hélices creando una superficie que interactúa con una cara de la bicapa lipídica. Tres de las cuatro hélices se encuentran en el mismo plano, mientras que la última hélice (hélice D) se proyecta hacia el dominio catalítico (Blobaum & Marnett, 2007).

COX-1 y COX-2 presentan diferencias en las secuencias de aminoácidos en los terminales N (amino) y C (carboxilo). En el extremo N de la isoforma COX-1, se encuentra una secuencia de 17 aminoácidos que no se presenta en la isoforma COX-2, así como el extremo C de la isoforma COX-2 que tiene una secuencia de 18 aminoácidos que no se encuentra en la isoforma COX-1. Además, COX-1 y COX-2 muestran diferencias en su composición de aminoácidos de su sitio activo, en donde, la isoforma COX-2 tiene un canal de sustrato más ancho y flexible que la isoforma COX-1, y la región de unión inhibitoria en la COX-2 es entre un 17% y un 25% más grande que en la COX-1 (Faki & Er, 2021; Rouzer & Marnett, 2020).

Los macrófagos son fuentes ricas en ciclooxigenasa (COX) y el prostanoide más frecuente producido por los macrófagos es la prostaglandina E2 (PGE2). La PGE2 puede ser proinflamatoria o antiinflamatoria según el contexto. Las respuestas celulares mediadas por PGE2 resultan de la activación de 4 receptores específicos acoplados a proteína G asociados a membrana, EP1 a EP4. EP4, que está acoplado principalmente a Gs, el cual es el receptor de PGE2 predominante en los macrófagos.

Aunque ambas isoformas de COX se expresan en macrófagos, la expresión de COX-2 aumenta en respuesta a la inflamación (Pan *et al.*, 2022).

Justificación

La presente investigación se enfocará en el estudio de la expresión génica de ciclooxigenasa 1 y 2 en macrófagos, ya que son importantes en el proceso de inflamación desde su inicio, mantenimiento y resolución. Los macrófagos son células fagocíticas que se activan y tienen efectos destructivos, aparte su activación implica la inducción de más de 400 genes que da como resultado una mayor capacidad para eliminar bacterias y regular muchas otras células. Además, los macrófagos son fuentes ricas en ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2) las cuales son responsables de la producción de prostaglandinas como productos de descomposición del ácido araquidónico, éstas a su vez actúan en sinergia con las citocinas para amplificar las respuestas proinflamatorias. Este trabajo nos permitirá determinar si la expresión génica de COX-1 y COX-2 es proporcional a la concentración de las proteínas COX-1 y COX-2 expresadas por los macrófagos.

Hipótesis

Los macrófagos estimulados con LPS incrementan la expresión génica de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2.

Objetivo General

Evaluar la expresión génica de ciclooxigenasa 1 y 2 en macrófagos estimulados con LPS.

Objetivos Específicos

- Obtención de material genético en macrófagos activados.
- Evaluar la expresión genética de COX-1 y COX-2 mediante PCR en tiempo real.

Metodología

Cultivo de macrófagos J774A.1

La línea celular de macrófagos fue cultivada y mantenida en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) y 1 mL de antibiótico antimicótico (10^3 unidades de penicilina, 10^3 μg de estreptomicina y 25 μg de anfotericina B por mL en solución salina (CAISSON LABS). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada del 5% de CO_2 , hasta 70% confluencia.

Preparación de placas de ensayo

Las cajas de cultivo fueron raspadas suavemente con un gendarme para la obtención de los macrófagos adheridos, posteriormente se recuperó el sobrenadante y fue colocado en un tubo Falcon de 15 mL estéril el cual se llevó a centrifugar a 1400 rpm por 7 minutos. Posterior a la centrifugación se decantó y el pellet de macrófagos se resuspendió suavemente con 1 mL de medio DMEN. Se procedió a contar las células.

Conteo de macrófagos en cámara de Neubauer

De las células resuspendidas se tomó una alícuota de 10 μL para realizar una dilución 1:10 con 90 μL de azul tripano. Se homogenizaron las células suavemente (con la pipeta), de esta dilución se tomaron 10 μL y se depositan en la cámara de Neubauer. Se observó al microscopio (40X) y se contabilizaron las células de los cuatro cuadrantes. Una vez contabilizados los cuadrantes se calculó el número de macrófagos con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración celular} = \bar{x}MC \cdot FD \cdot PC \cdot mL.$$

En donde:

- $\bar{x}MC$ es el promedio de macrófagos contados
- FD es el factor de la dilución
- PC es la profundidad de la cámara
- mL es el volumen que se utilizó para resuspender el pellet de macrófagos

Siembra en pozos

Los macrófagos J774A.1 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 4×10^5 células por pocillo con 1 mL de DMEM suplementado con FBS al 10% y antibiótico/antimicótico. Se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂ durante 24 horas.

Estimulación de macrófagos J774A.1

Los macrófagos J774A.1 se estimularon después de las 24 horas de incubación, el protocolo de estimulación fue el siguiente Fig. 2.

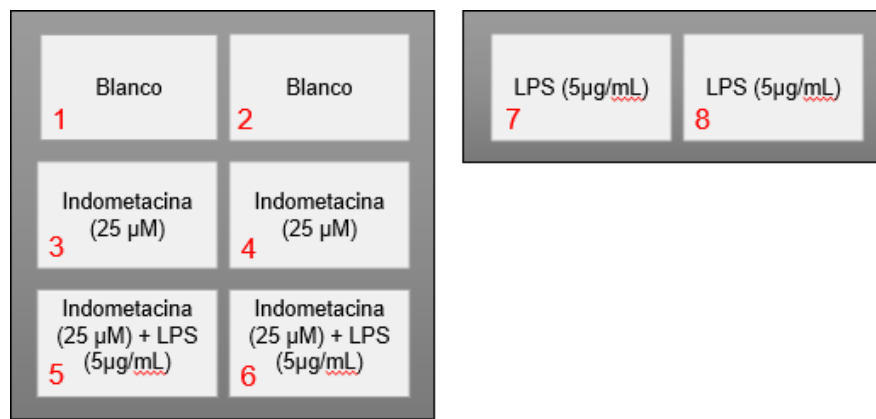


Figura 2. Distribución de pozos para experimento (2023).

A los pozos se les retiró el medio para posteriormente adicionar medio nuevo suplementado, ajustado a una concentración final de LPS de 5 µg/mL e indometacina a 25 µM en 1 mL de DME suplementado con FBS al 10% y antibiótico/antimicótico. Los pozos 1 y 2 (blanco) solo tuvieron cambio del medio, a los pozos 3, 4, 5 y 6 se les adicionó la indometacina (25 µM), después de 2 horas se adicionó a los pozos 5 y 6 el LPS en donde primero se les retiró 100 µL del medio que tenían y después se adicionaron los 100 µL de LPS para obtener una concentración de 5 µg/mL y al mismo tiempo se les adicionó el LPS a los pozos 7 y 8. Después de realizar la estimulación se realizó una incubación de un día a 37°C en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂.

Lectura de óxido nítrico

Después de 24 horas de exposición de los macrófagos J774A.1 a los estímulos descritos anteriormente el valor de óxido nítrico (NO₂) se evaluó utilizando el kit de Sistema de reactivos de Griess (Promega) de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. Esta prueba se realizó en una placa de 96 pozos.

Procedimiento

Se realizaron 3 diluciones seriadas de la solución estándar (0.1M) de nitrito para llegar a una concentración final de 100 μ M. En la placa de 96 pozos se utilizaron 2 columnas para la realización de la curva de calibración a las que se les adicionaron 50 μ L de PBS de las filas B a la H. Posteriormente de la solución estándar de nitrito de 100 μ M se adicionaron en la fila A 100 μ L y seguidamente se realizan diluciones seriadas dobles desde 100 hasta 1.56 μ M hasta la fila G. La fila H es el blanco (0 μ M). Para las muestras a analizar primero se recuperó el sobrenadante, el cual se centrifugo a 3000 rpm durante 2 minutos, después de esto se agregaron 50 μ L de cada muestra a los pocillos por triplicado. Una vez colocadas todas las muestras con una pipeta multicanal se adicionaron 50 μ L de la solución de sulfanilamida tanto para los pozos de la curva de calibración como las muestras experimentales. Después de esto se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Una vez pasado el tiempo de incubación se adicionaron 50 μ L de la solución de NED a todos los pozos, posterior a esto se llevó a incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Para finalizar una vez transcurrido el tiempo de incubación de la solución NED se leyó la placa en un lector a 540 nm.

Determinación de óxido nítrico

Para la curva de calibración se trazó la absorbancia promedio de la solución estándar de nitrito en función de "Y" y las concentraciones conocidas en función de "X" con la finalidad de obtener R^2 y la ecuación de la curva $y=mx+b$ la cual se despejo para obtener x ($x=(y-b) /m$). Esta ecuación se utilizó con las muestras experimentales de las cuales primero se obtuvo el promedio de las absorbancias de cada muestra la cual tendría la función de "Y" y a través de los valores obtenidos de la curva de calibración se logró obtener el valor de "X", dicho de otra forma, la concentración de óxido nítrico en cada muestra.

Extracción de ARN

El sobrenadante del cultivo de macrófagos J774A.1 fue eliminado del pozo. A cada pozo se le añadieron 300 μ L de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA), después de eso se raspó el pozo para recolectar el sobrenadante en un microtubo de 1.5 mL,

posterior a esto se añadieron 200 μL de cloroformo, se mezcló en agitador vortex y se centrifugo a 8000rpm/15 min a 4°C. Después de la centrifugación se recuperó el sobrenadante y se transfirió a otro microtubo de 1.5 mL y se añadieron 500 μL de isopropanol, seguidamente se mezcló por inversión continua y se centrifugo a 8000 rpm/15 min a 4°C, luego se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 mL de etanol al 70% y se homogenizó y se centrifugó a 8000rpm/15 min 4°C, se decantó y el sedimento se resuspendió en 15 μL de H₂O libre de RNAsa. El producto de la extracción de ARN se cuantifico espectrofotométricamente en Nanodrop.

Transcripción inversa

Se transcribieron 2 μg de ARN total de forma inversa a ADNc para una reacción de 20 μL utilizando el High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se usaron 10 μL de Buffer, 1 μL del Mix de enzima, 2 μL de muestra de ARN y cuanto baste para de H₂O libre de RNAsa para completar los 20 μL en una reacción, la cual se agito en vortex y se centrifugo durante al menos 1 minuto, esto se realizó para todas muestras. Después se incubaron en un termociclador a 37°C/60 minutos, posterior a esto se detiene la reacción calentando a 95°C/5 minutos y después manteniendo a 4°C/5 minutos. El producto se cuantifico espectrofotométricamente en Nanodrop.

Todos los componentes del kit, así como las muestras de ARN se mantuvieron en hielo y el procedimiento se llevó a cabo con los microtubos colocados en placas frías.

PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

El análisis en tiempo real de la PCR cuantitativa (qRT-PCR) se realizó usando ensayos de expresión génica, a partir del cDNA.

Se realizo la PCR para el gen constitutivo 18s, y los no constitutivos COX-1 y COX-2 de acuerdo con el Kit SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD). Se añadieron 10 μL de Master mix que contiene el fluorocromo SYBR Green®, 0.25 μL de Primer Forward 10 μM , 0.25 μL de Primer Reverse 10 μM , 7 μL de H₂O libre de RNAasa, 2 μL de ADNc 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para gen constitutivo (para no constitutivo se usara 2 μL de ADNc concentrado) por reacción. Se realizarán 40 ciclos de reacción a 95°C como temperatura de desnaturalización, 60°C la temperatura de alineación y 60°C la temperatura de elongación. La PCR de ciclooxigenasas se normalizó con 18s rRNA. Cada análisis de expresión génica se realizará por duplicado. Los niveles relativos

de expresión se determinaron por el método ΔCT ($CT_{interés} - CT_{18S} = \Delta CT = Potencia$ ($2,^{-\Delta CT}$)) de todos los cebadores, con la finalidad de realizar comparaciones de la abundancia relativa de las COX-1 y COX-2 (Tabla 1).

Tabla 1. *Secuencias de los cebadores utilizados para RT-qPCR.*

Gen	Primer forward	Primer reverse
COX-1	CAGACGACCCGCCTCATCCTCAT AG	GCCTCAACCCCATAGTCCACCAACA
COX-2	TTCAAAGAAGTGCTGGAAAAGGT	GATCATCTCTACCTGAGTGCTTT

Resultados y discusión

A través del microscopio de contraste de fase invertido se observó en los macrófagos J774A.1 una diferencia en la morfología entre los 4 grupos de estudio mostrados en la figura 3. El grupo control (figura 3a) mantiene una forma circular con un ligero alargamiento, al igual que el grupo de indometacina (b), mientras que en el grupo de LPS las células muestran una forma alargada (c), efecto producido por el estímulo de este mismo, lo cual coincide con lo descrito por Hourani y colaboradores (2023) en dónde los grupos que presentan el grupo control y el de LPS muestran diferencias en el alargamiento de las células. En cuanto al grupo de indometacina con LPS (d), en este se observan a las células con un ligero alargamiento similar al grupo control, así como otras con un alargamiento más definido. De acuerdo con Singh y colaboradores (2020) los macrófagos al ser estimulados con LPS presentan afectaciones en su morfología en comparación con el grupo control debido a que estos están siendo activados por efecto del LPS.

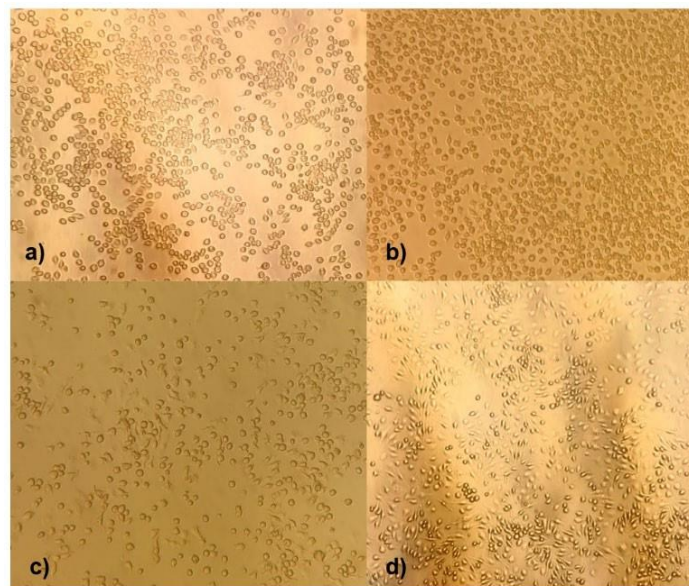


Figura 3. Grupos de estudio en microscopio de a) control, b) indometacina (25 $\mu\text{M}/\text{mL}$), c) indometacina (25 $\mu\text{M}/\text{mL}$) con LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y d) LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (2024).

Determinación de óxido nítrico

Los niveles de producción de NO obtenidos en los grupos del experimento mostrados en la Fig. 4 fueron de acuerdo con lo esperado, ya que el grupo control obtuvo 5.5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de NO y el grupo de indometacina 6.4 $\mu\text{M}/\text{mL}$ los cuales tuvieron bajos niveles de producción con respecto a aquellos estimulados con LPS, en donde el grupo de indometacina más LPS produjo 19.9 $\mu\text{M}/\text{mL}$, mientras que el grupo de LPS presentó

38 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de NO. De lo anterior resulta que el grupo control tuvo una diferencia del 84.9 % con respecto al grupo de LPS, ya que de acuerdo con los descrito por Sin Teh y colaboradores (2017) el LPS es un activador policlonal de macrófagos el cual induce la producción de citocinas proinflamatorias, entre ellas TNF- α , IL-6, además de especies reactivas de oxígeno como el NO al activar alguna de las isoformas de la NO sintasa como la NO sintasa inducible (iNOS). En cuanto al grupo control de indometacina con LPS estaría mostrando el efecto antiinflamatorio que se está generando debido a la indometacina ante la estimulación con el LPS, ya que este grupo presenta 52.3 % menos de NO con respecto al grupo de LPS.

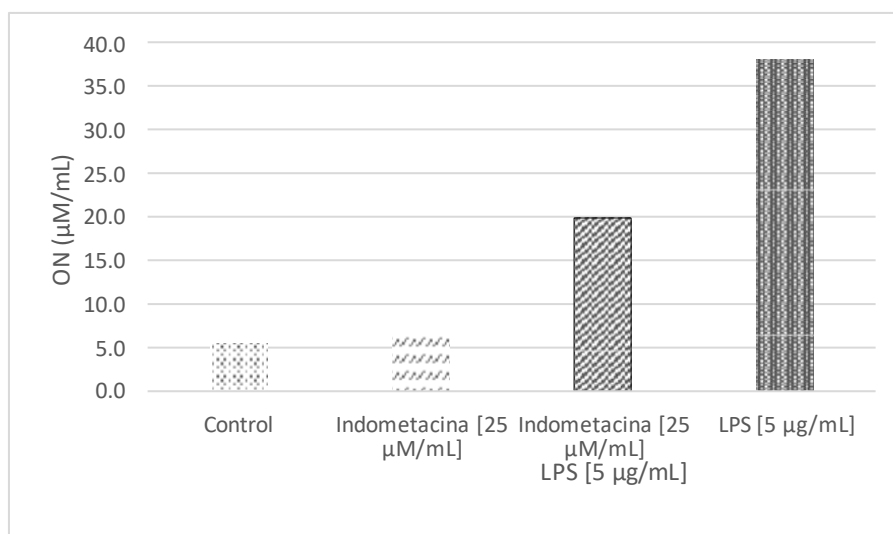


Figura 4. Cuantificación de ON ($\mu\text{M}/\text{mL}$) (2024).

De acuerdo con lo anterior podemos determinar que los macrófagos del grupo de LPS tuvieron una activación del fenotipo M1 debido a que el estímulo con LPS causa o promueve la activación del fenotipo M1 el cual tiene la capacidad de liberar citocinas proinflamatorias como IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el ON, entre otras de acuerdo con los descrito por Rostam y colaboradores (2017) y por los datos mostrados por Hourani y colaboradores (2023) donde los macrófagos con el fenotipo M1 tuvieron altos niveles de iNOS la cual dará paso a la producción de ON.

Mediante la técnica de PCR en tiempo real se analizaron los genes de IL-6, TNF- α , COX-1 y COX-2 en los macrófagos estimulados con LPS, los resultados de la expresión de ARNm se muestran en la figura 5.

En el grupo estimulado con LPS se encontró que los niveles de COX-2 fueron el doble de COX-1. Este grupo presento una expresión de TNF- α y IL-6 en niveles más altos que COX-1, esto como resultado de la estimulación con el mitógeno por otro lado en el grupo control se observaron niveles bajos de TNF- α y IL-6 al igual que una diferencia en las expresiones de COX-1 y COX-2.

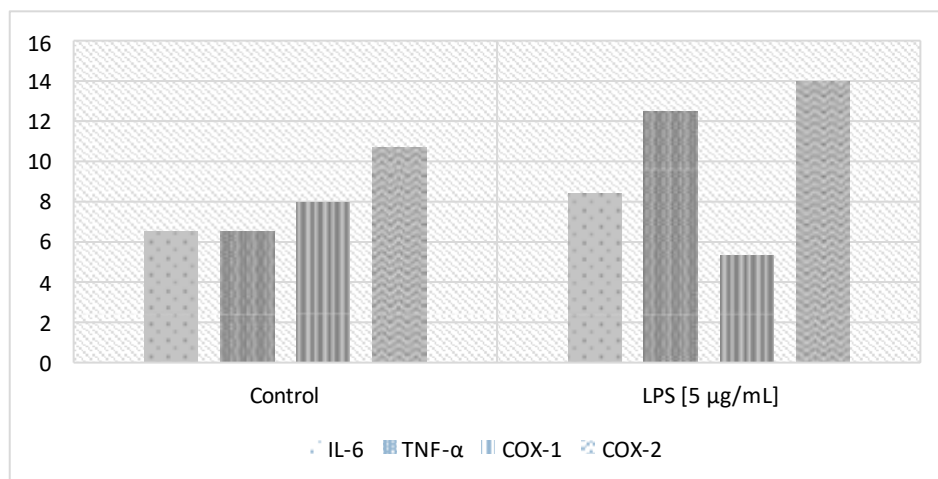


Figura 5. Expresión de IL-6, TNF- α , COX-1 Y COX-2 (2024).

De acuerdo con lo descrito por Chien y colaboradores (2015) el estímulo de LPS induce la producción de COX-2 de manera que en el grupo control la expresión de esta era menor que en el grupo estimulado con LPS concordando con los resultados presentados anteriormente. Por otro lado, Grkovich y colaboradores (2006) muestran que COX-1 no está regulada positivamente al estímulo con LPS ya que su expresión es constitutiva a diferencia de COX-2 que es inducible. En relación con la expresión de IL-6 y TNF- α estas aumentan al ser estimuladas con LPS concordando con lo reportado por Ohtsu y colaboradores (2017) y por Purcu y colaboradores (2022) al contrario de los grupos control presentados por ellos.

Conclusión

Los resultados obtenidos indican que los macrófagos fueron estimulados en presencia de LPS ya que se obtuvieron niveles altos de COX-2, IL-6 y TNF, así como un aumento en la expresión de COX-2. Con base a lo anterior, podemos concluir que los macrófagos estimulados con LPS incrementan la expresión génica en mayor proporción de COX-2 en relación con COX-1.

Referencias

- Abdelaziz, M. H., Abdelwahab, S. F., Wan, J., Cai, W., Huixuan, W., Jianjun, C., Kumar, K. D., Vasudevan, A., Sadek, A., Su, Z., Wang, S., & Xu, H. (2020). Alternatively activated macrophages; A double-edged sword in allergic asthma. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02251-w>
- Aghasafari, P., George, U., & Pidaparti, R. (2019). A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflammation Research*, 68(1), 59–74. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1191-2>
- Aid, S., Silva, A. C., Candelario-Jalil, E., Choi, S. H., Rosenberg, G. A., & Bosetti, F. (2010). Cyclooxygenase-1 and-2 differentially modulate lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption through matrix metalloproteinase activity. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(2), 370–380. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.223>
- Atri, C., Guerfali, F. Z., & Laouini, D. (2018). Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>
- Bazán, N. G., Stark, D. T., & Petasis, N. A. (2012). Lipid mediators. En *Elsevier eBooks* (pp. 643-662). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374947-5.00036-5>
- Bennett, J. M., Reeves, G., Billman, G. E., & Sturmberg, J. P. (2018). Inflammation-nature's way to efficiently respond to all types of challenges: Implications for understanding and managing "the epidemic" of chronic diseases. *Frontiers in Medicine*, 5(NOV), 1–30. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00316>
- Bennett, J. M., Reeves, G., Billman, G. E., & Sturmberg, J. P. (2018). Inflammation-nature's way to efficiently respond to all types of challenges: Implications for understanding and managing "the epidemic" of chronic diseases. *Frontiers in Medicine*, 5(NOV), 1–30. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00316>
- Bertani, B., & Ruiz, N. (2019). Function and biogenesis of lipopolysaccharides Blake HHS Public Access. *CoSal Plus.*, 8(1), 1–33. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018.Function>
- Blobaum, A. L., & Marnett, L. J. (2007). Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(7), 1425–1441. <https://doi.org/10.1021/jm0613166>
- Caroff, M., & Новиков, A. B. (2020). Lipopolysaccharides: structure, function and

- bacterial identification. *Oilseeds And Fats, Crops And Lipids*, 27, 31. <https://doi.org/10.1051/ocl/2020025>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. www.impactjournals.com/oncotarget/
- Chen, S., Saeed, A. F. U. H., Liu, Q., Jiang, Q., Xu, H., Xiao, G. G., Rao, L., & Duo, Y. (2023). Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01452-1>
- Chien, H. Y., Lu, C. S., Chuang, K., Kao, P. H., & Wu, Y. L. (2015). Attenuation of LPS-induced cyclooxygenase-2 and inducible NO synthase expression by lysophosphatidic acid in macrophages. *Innate Immunity*, 21(6), 635-646. <https://doi.org/10.1177/1753425915576345>
- Court, F., & Bank, W. (2019). Hif-1 α stabilisation polarises macrophages via cyclooxygenase/prostaglandin E2 in vivo.
- De Sousa, J. R., Vasconcelos, P. F. D. C., & Quaresma, J. A. S. (2019). Functional aspects, phenotypic heterogeneity, and tissue immune response of macrophages in infectious diseases. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2589–2611. <https://doi.org/10.2147/IDR.S208576>
- Di Lorenzo, F., Duda, K., Lanzetta, R., Silipo, A., De Castro, C., & Molinaro, A. (2021). A Journey from Structure to Function of Bacterial Lipopolysaccharides. *Chemical Reviews*, 122(20), 15767-15821. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01321>
- Eliopoulos, A. G., Dumitru, C. D., Wang, C. C., Cho, J., & Tschlis, P. N. (2002). Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *EMBO Journal*, 21(18), 4831–4840. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf478>
- Faki, Y., & Er, A. (2021). Different chemical structures and physiological/pathological roles of cyclooxygenases. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10426>
- Farhana, A., & Khan, Y. S. (2023). Biochemistry, lipopolysaccharide. *StatPearls - NCBI Bookshelf*. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554414/#:~:text=Lipopolysaccharides%20\(LPS\)%20are%20important%20outer,oligosaccharide%20and%20a%20distal%20polysaccharide.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554414/#:~:text=Lipopolysaccharides%20(LPS)%20are%20important%20outer,oligosaccharide%20and%20a%20distal%20polysaccharide.)
- Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in inflammation. *Current Drug*

- Targets: Inflammation and Allergy, 4(3), 281–286.
<https://doi.org/10.2174/1568010054022024>
- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D. W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A. H., Mantovani, A., Weyand, C. M., Barzilai, N., Goronzy, J. J., Rando, T. A., Effros, R. B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., & Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature medicine*, 25(12), 1822–1832.
<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675->
- Giroux, M., & Descoteaux, A. (2000). Cyclooxygenase-2 Expression in Macrophages: Modulation by Protein Kinase C- α . *The Journal of Immunology*, 165(7), 3985–3991. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3985>
- Gordon, S., & Martinez-Pomares, L. (2017). Physiological roles of macrophages. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 469(3–4), 365–374.
<https://doi.org/10.1007/s00424-017-1945-7>
- Gorman, A., & Golovanov, A. P. (2022). Lipopolysaccharide Structure and the Phenomenon of Low Endotoxin Recovery. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, 180, 289-307.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.10.006>
- Grkovich, A., Johnson, C. A., Buczynski, M. W., & Dennis, E. A. (2006). Lipopolysaccharide-induced Cyclooxygenase-2 Expression in Human U937 Macrophages Is Phosphatidic Acid Phosphohydrolase-1-dependent. *Journal Of Biological Chemistry*, 281(44), 32978-32987.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m605935200>
- GUAN, F., WANG, H., SHAN, Y., CHEN, Y., WANG, M., WANG, Q., YIN, M., ZHAO, Y., FENG, X., & ZHANG, J. (2014). Inhibition of COX-2 and PGE2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells by Ionimacranthoide VI, a chlorogenic acid ester saponin. *Biomedical Reports*, 2(5), 760–764. <https://doi.org/10.3892/br.2014.314>
- Han, S., Chen, Z., Han, P., Hu, Q., & Xiao, Y. (2017). Activation of Macrophages by Lipopolysaccharide for Assessing the Immunomodulatory Property of Biomaterials. *Tissue Engineering - Part A*, 23(19 20), 1100–1109. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0501>
- Hannoodee, S., & Nasuruddin, D. N. (2022, 14 noviembre). Acute inflammatory response. *StatPearls* - *NCBI Bookshelf*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556083/>

- Henry, M. C., & Moss, R. L. (2010). NECROTIZING ENTEROCOLITIS. En *Elsevier eBooks* (pp. 439-455). <https://doi.org/10.1016/b978-1-4160-6127-4.00034-3>
- Hirayama, D., Iida, T., & Nakase, H. (2018). The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010092>
- Hourani, T., Perez-Gonzalez, A., Khoshmanesh, K., Luwor, R. B., Achuthan, A., Baratchi, S., O'Brien-Simpson, N. M., & Al-Hourani, A. (2023). Label-free macrophage phenotype classification using machine learning methods. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32158-7>
- Jain, N., Moeller, J., & Vogel, V. (2019). Mechanobiology of Macrophages: How King, T. C. (2007). Inflammation, Inflammatory Mediators, and Immune-Mediated Disease. En *Elsevier eBooks* (pp. 21-57). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-04328-1.50008-5>
- Kiss, A. L. (2022). Inflammation in Focus: The Beginning and the End. *Pathology & Oncology Research*, 27. <https://doi.org/10.3389/pore.2021.1610136>
- Kolliniati, O., Ieronymaki, E., Vergadi, E., & Tsatsanis, C. (2022). Metabolic Regulation of Macrophage Activation. *Journal of Innate Immunity*, 14(1), 51–68. <https://doi.org/10.1159/000516780>
- Lee, C.H., & Choi, E. Y. (2018). Macrophages and Inflammation. *Journal of Rheumatic Diseases*, 25(1), 11. doi:10.4078/jrd.2018.25.1.11
- Lendeckel, U., Venz, S., & Wolke, C. (2022). Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts*, 8(2), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s40828-022-00163-4>
- Li, X., Yu, Y., & Funk, C. D. (2013). Cyclooxygenase-2 induction in macrophages is modulated by docosahexaenoic acid via interactions with free fatty acid receptor 4 (FFA4). *The FASEB Journal*, 27(12), 4987-4997. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235333>
- Locati, M., Curtale, G., & Mantovani, A. (2020). Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15, 123–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718>
- Maldonado, R. F., Sá-Correia, I., & Valvano, M. A. (2016). Lipopolysaccharide modification in gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 480–493. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>
- Mass, E., Nimmerjahn, F., Kierdorf, K., & Schlitzer, A. (2023). Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nature Reviews*

- Immunology*, 23(9), 563–579. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00848-y>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Miciaccia, M., Belviso, B. D., Iaselli, M., Cingolani, G., Ferorelli, S., Cappellari, M., Loguercio Polosa, P., Perrone, M. G., Caliandro, R., & Scilimati, A. (2021). Three-dimensional structure of human cyclooxygenase (hCOX)-1. *Scientific Reports*, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83438-z>
- Muñoz-Rojas, A. R., Kelsey, I., Pappalardo, J. L., Chen, M., & Miller-Jensen, K. (2021). Co-stimulation with opposing macrophage polarization cues leads to orthogonal secretion programs in individual cells. *Nature Communications*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20540-2>
- Na, Y. R., Yoon, Y. N., Son, D., Jung, D., Gu, G. J., & Seok, S. H. (2015). Consistent inhibition of cyclooxygenase drives macrophages towards the inflammatory phenotype. *PLoS ONE*, 10(2), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118203>
- Netea, M. G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M. Y., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Golenbock, D., Gresnigt, M. S., Heneka, M. T., Hoffman, H. M., Hotchkiss, R., Joosten, L. A. B., Kastner, D. L., Korte, M., Latz, E., Libby, P., Mandrup-Poulsen, T., Mantovani, A., Mills, K. H. G., ... Dinarello, C. A. (2017). A guiding map for inflammation. *Nature Immunology*, 18(8), 826–831. <https://doi.org/10.1038/ni.3790>
- Nonnenmacher, Y., & Hiller, K. (2018). Biochemistry of proinflammatory macrophage activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(12), 2093–2109. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2784-1>
- Ohtsu, Ayaka; Shibutani, Yui; Seno, Kotomi; Iwata, Hisataka; Kuwayama, Takehito; Shirasuna, Koumei (2017). Advanced glycation end products and lipopolysaccharides stimulate interleukin 6 secretion via the RAGE/TLR4 NF κB ROS pathways and resveratrol attenuates these inflammatory responses in mouse macrophages. *Experimental and Therapeutic Medicine*, (), -. [doi:10.3892/etm.2017.5045](https://doi.org/10.3892/etm.2017.5045)
- Oishi, Y., & Manabe, I. (2018). Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *International Immunology*, 30(11), 511–528. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy054>

- Olszowski, T., Gutowska, I., Baranowska-Bosiacka, I., Piotrowska, K., Korbecki, J., Kurzawski, M., & Chlubek, D. (2015). The Effect of Cadmium on COX-1 and COX-2 Gene, Protein Expression, and Enzymatic Activity in THP-1 Macrophages. *Biological Trace Element Research*, 165(2), 135–144. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0234-6>
- Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>
- Page, M. J., Kell, D. B., & Pretorius, E. (2022). The Role of Lipopolysaccharide-Induced Cell Signalling in Chronic Inflammation. *Chronic Stress*, 6. <https://doi.org/10.1177/24705470221076390>
- Pan, Y., Cao, S., Tang, J., Arroyo, J. P., Terker, A. S., Wang, Y., Niu, A., Fan, X., Wang, S., Zhang, Y., Jiang, M., Wasserman, D. H., Zhang, M. Z., & Harris, R. C. (2022). Cyclooxygenase-2 in adipose tissue macrophages limits adipose tissue dysfunction in obese mice. *Journal of Clinical Investigation*, 132(9). <https://doi.org/10.1172/JCI152391>
- Plevin, R. E., Knoll, M., McKay, M., Arbabi, S., & Cuschieri, J. The Role of Lipopolysaccharide Structure in Monocyte Activation and Cytokine Secretion. *Shock*. 2016 Jan;45(1):22-7. doi: 10.1097/SHK.0000000000000470. PMID: 26674452; PMCID: PMC5181111.
- Purcu, D. U., Korkmaz, A., Gunalp, S., Helvacı, D. G., Erdal, Y., Doğan, Y., Süner, A., Wingender, G., & Sağ, D. (2022). Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers. *PLOS ONE*, 17(3), e0265196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265196>
- Ratan, Z. A., Haidere, M. F., Costa, J. J., Runa, N. J., Hosseinzadeh, H., & Cho, J. Y. (2022). Overview of inflammation. En *Elsevier eBooks* (pp. 29-51). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822368-0.00003-7>
- Ren, H., Chen, X., Jiang, F., & Li, G. (2020). Cyclooxygenase-2 Inhibition Reduces Autophagy of Macrophages Enhancing Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Infection. *Frontiers in Microbiology*, 11(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00708>
- Rhee, S. H. (2014). Lipopolysaccharide: Basic Biochemistry, Intracellular Signaling, and Physiological Impacts in the Gut. *Intestinal Research*, 12(2), 90.

<https://doi.org/10.5217/ir.2014.12.2.90>

- Ross, E. A., Devitt, A., & Johnson, J. R. (2021). Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. *Frontiers in Immunology*, 12(August), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708186>
- Rostam, H. M., Reynolds, P. M., Alexander, M. R., Gadegaard, N., & Ghaemmaghmi, A. M. (2017). Image based Machine Learning for identification of macrophage subsets. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03780-z>
- Rouzer, C. A., & Marnett, L. J. (2009). Cyclooxygenases: Structural and functional insights. *Journal of Lipid Research*, 50(SUPPL.), 29–34. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800042-JLR200>
- Rouzer, C. A., & Marnett, L. J. (2020). Structural and Chemical Biology of the Interaction of Cyclooxygenase with Substrates and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Chemical Reviews*, 120(15), 7592–7641. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00215>
- Sahlmann, C. O., & Ströbel, P. (2016). Pathophysiologie der Entzündung [Pathophysiology of inflammation]. *Nuklearmedizin. Nuclear medicine*, 55(1), 1–6.
- Saradna, A., Danh, C., Kumar, S., Fu, Q., & Gao, P. (2018). Macrophage polarization and allergic asthma. *Translational Research*, 191, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.09.002>
- Schultz, C. (2018). Lipopolysaccharide, structure and biological effects. *General Internal Medicine and Clinical Innovations*, 3(1), 1–2. <https://doi.org/10.15761/gimci.1000152>
- Servais, C., Vassen, V., Verhaeghe, A., Küster, N., Carlier, E., Phégnon, L., Mayard, A., Auberger, N., Vincent, S., & De Bolle, X. (2023). Lipopolysaccharide biosynthesis and traffic in the envelope of the pathogen *Brucella abortus*. *Nature Communications*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36442-y>
- Shay, A. E., Diwakar, B. T., Guan, B. J., Narayan, V., Urban, J. F., & Prabhu, K. S. (2017). IL-4 up-regulates cyclooxygenase-1 expression in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 292(35), 14544–14555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.785014>
- Shu, S., & Mi, W. (2022). Regulatory mechanisms of lipopolysaccharide synthesis in *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32277-1>

- Singh, R., Dubey, V., Wolfson, D., Ahmad, A., Butola, A., Acharya, G., Mehta, D. S., Basnet, P., & Ahluwalia, B. S. (2020). Quantitative assessment of morphology and sub-cellular changes in macrophages and trophoblasts during inflammation. *Biomedical optics express*, 11(7), 3733–3752. <https://doi.org/10.1364/BOE.389350>
- Soares, C. L. R., Wilairatana, P., Silva, L. R., Moreira, P. S., Barbosa, N. P., Da Silva, P. R., Coutinho, H. D. M., De Menezes, I. R. A., & Felipe, C. F. B. (2023). Biochemical aspects of the inflammatory process: A narrative review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 168, 115764. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115764>
- Stone, W. L., Basit, H., & Burns, B. (2022, 14 noviembre). Pathology, inflammation. *StatPearls - NCBI Bookshelf*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534820/>
- Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M., & Teixeira, M. M. (2016). Resolution of inflammation: What controls its onset? *Frontiers in Immunology*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00160>
- Tang, T., Scambler, T. E., Smallie, T., Cunliffe, H. E., Ross, E. A., Rosner, D. R., O’Neil, J. D., & Clark, A. R. (2017). Macrophage responses to lipopolysaccharide are modulated by a feedback loop involving prostaglandin E2, dual specificity phosphatase 1 and tristetraproline. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04100-1>
- Teh, S. S., Ee, G. C. L., & Mah, S. H. (2017). Evaluation of nitric oxide inhibition effect in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages by phytochemical constituents from *Mesua beccariana*, *Mesua congestiflora*, and *Mesua ferrea*. *Medicinal Chemistry Research*, 26(12), 3240-3246. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-2017-4>
- Tran, A. X., & Whitfield, C. (2009). Lipopolysaccharides (Endotoxins). En *Elsevier eBooks* (pp. 513-528). <https://doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00196-6>
- Tsukamoto, H., Takeuchi, S., Kubota, K., Kobayashi, Y., Kozakai, S., Ukai, I., Shichiku, A., Okubo, M., Numasaki, M., Kanemitsu, Y., Matsumoto, Y., Nochi, T., Watanabe, K. C., Aso, H., & Tomioka, Y. (2018). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKK α -IRF3 axis activation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(26), 10186–10201. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.796631>
- Tucureanu, M. M., Rebleanu, D., Constantinescu, C. A., Deleanu, M., Voicu, G., Butoi, E., Calin, M., & Manduteanu, I. (2018). Lipopolysaccharide-induced inflammation in monocytes/macrophages is blocked by liposomal delivery of Gi-protein inhibitor. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 63–76. <https://doi.org/10.2147/IJN.S150918>

- Valvano, M. A. (2015). Genetics and Biosynthesis of Lipopolysaccharide. En *Elsevier eBooks* (pp. 55-89). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-397169-2.00004-4>
- Varol, C., Mildner, A., & Jung, S. (2015). Macrophages: Development and tissue specialization. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 33). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>
- Verschoor, C. P., Puchta, A., & Bowdish, D. M. (2012). The macrophage. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 844, 139–156. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-527-5_10
- Wang, G. H., Zou, G. X., You, X. M., Zhang, Y., Jiang, H., Li, F., & Li, G. X. (2017). Tectorigenin and irigenin inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in murine macrophages. *Biomedical Research* (India), 28(12), 5412–5417.
- Watanabe, S., Alexander, M., Misharin, A. V., & Budinger, G. R. S. (2019). The role of macrophages in the resolution of inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 129(7), 2619–2628. <https://doi.org/10.1172/JCI124615>
- Williams, C. S., Mann, M., & DuBois, R. N. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 18(55), 7908–7916. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203286>
- Wynn, T. a., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature*, 496(7446), 445–455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>.Origins
- Xia, T., Fu, S., Yang, R., Yang, K., Lei, W., Yang, Y., Zhang, Q., Zhao, Y., Yu, J., Yu, L., & Zhang, T. (2023). Advances in the study of macrophage polarization in inflammatory immune skin diseases. *Journal of Inflammation* (United Kingdom), 20(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12950-023-00360-z>
- Xiao, L., Ornatowska, M., Zhao, G., Cao, H., Yu, R., Deng, J., Li, Y., Zhao, Q., Sadikot, R. T., & Christman, J. W. (2012). Lipopolysaccharide-Induced Expression of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Mediates Late-Phase PGE2 Production in Bone Marrow Derived Macrophages. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050244>
- Zamyatina, A., & Heine, H. (2020). Lipopolysaccharide Recognition in the Crossroads of TLR4 and Caspase-4/11 Mediated Inflammatory Pathways. *Frontiers in Immunology*, 11(November), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585146>
- Zeliger, H. I. (2023). inflammation. En *Elsevier eBooks* (pp. 101-109). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91890-9.00037-4>

Zhang, C., Yang, M., & Ericsson, A. C. (2021). Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 12(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.620510>