



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Estandarización e implementación de una técnica de qRT-PCR para amplificación de citocinas de leucocitos sanguíneos de *Rattus norvegicus* previamente estimulados con Microvesículas (MVs) de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) en condiciones *in vitro*”.

Tesis

Para obtener el título de

Médico Veterinario y Zootecnista

Sustentante

Elihu David Villegas Mondragón

Asesora

Dra. Cynthia González Ruíz.

Coasesor

Dr. Alejandro Vargas Ruíz.

Cuatitlán Izcalli, Estado de México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

En primer lugar, debo agradecer infinitamente a mi asesora la Doctora Cynthia González Ruíz, quien desde que fue mi profesora de patología me motivó a seguir adelante. Me permitió colaborar como servicio social y finalmente me hizo parte de este proyecto como tesista. Usted ha sido infinitamente paciente conmigo durante todo este proceso y me dijo en su momento justo las palabras que necesitaba escuchar para tomar la decisión y el camino que quería seguir en mi futuro. Usted se ha vuelto el modelo a seguir para mi formación académica ¡muchas gracias por todo!

Mi coasesor, el Doctor Alejandro Vargas Ruíz también le tengo muchísima gratitud. Por todas las explicaciones y la paciencia. Por darme rumbo, y escuchar mis dudas por absurdas que a veces parecieran. Le agradezco todas las bromas y el sentido del humor con el que me acompañó en este peregrinar, que estuvo tan repleto de obstáculos.

Agradecimiento al Técnico Académico MC Francisco Rodolfo González Díaz por el apoyo técnico en el desarrollo experimental de este trabajo.

A mi madre, eres testimonio de la paciencia y amor infinito del que siempre se habla. Jamás tendré palabras o acciones que retribuyan tu tiempo y amor. Este trabajo representa el arduo camino que recorrí para conocerme y entender mi lugar en el mundo, pero también la lucha que por años pasaste por mí. Eres un pilar en mi vida, y el ejemplo de perseverancia que me ha traído hasta donde estoy ahora, con mis pocos o muchos logros, y quien siempre será ejemplo para seguir en todos los años y proyectos.

Julián y Stephen. Mi familia es muy pequeña, pero la vida me bendijo al poder elegir a dos hermanos, a quienes, si viviera cien vidas, los elegiría cien veces.

Al “Team CGR” ¡Muchas gracias por todo lo que me han enseñado! Jon y Viri, aunque las cosas a veces parecen una montaña rusa, ya vendrán tiempos en los que podamos reunirnos los cuatro y volver a trabajar, aprender, reír, discutir porque Arturo es la representación física de la mala suerte en el laboratorio. Les agradezco mucho y les recalco la admiración tan profunda que les tengo a ambos.

Deseo agradecerle a mi amada Universidad, que me ha dado todo lo que siempre me faltó. Gracias a ella soy un hombre totalmente distinto a quien era antes de iniciar esta travesía. Espero que la persistencia y pasión que tuve al desarrollar este trabajo sea un tributo al agradecimiento que le tengo.

Y finalmente a Cris. Las palabras no son suficientes... No, solo bromeo. Tengo dos grandes amores en la vida. Una es mi profesión. La otra, eres tú. Agradezco infinitamente poder disfrutar la ciencia contigo.

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IT201521 y el Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (PIAPI) PIAPICI2210 por el financiamiento para la realización de este proyecto.



Este trabajo es en memoria del Doctor Raúl Aguilar Tovar. Profesor y amigo, a quien echo de menos infinitamente. Tus palabras y lecciones me acompañan cada día, Doctor. Y aunque no estás aquí para compartir este logro, espero que estés orgulloso de nosotros, estés donde estés.

CONTENIDO

Resumen.....	5
I. Introducción.....	6
1.1 <i>Rattus Norvegicus</i> Y Su Resistencia A Patógenos Gastroentéricos.	6
1.2 Generalidades De Las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL).....	7
1.2.1 Concepto De Probiótico.	8
1.2.2 Mecanismos De Acción De Los Probióticos.	9
1.2.3 Morfología Bacteriana.	11
1.2.4 Pared Celular De Bacterias Gram Positivas.	13
1.2.5 Pared Celular De Las Bacterias Gram Negativas.....	13
1.2.6 Acidos Teicóicos.....	15
1.3 Microvesículas De Membrana Externa (Mvs) De Las Bacterias.....	16
1.3.1 Mecanismos De Formación De Las Mvs Bacterianas.....	16
1.3.2 Funciones De Las Mvs.	18
1.4 Respuesta Inmune.	20
1.4.1 inmunidad celular.	24
1.4.2 Inmunidad Humoral.....	25
1.4.2.1 Citocinas.....	25
1.4.3 Interacción De Las Mvs Bacterianas Con La Respuesta Inmune. ...	28
1.5 Técnica De qRT-PCR.	29
II. Justificación.....	30
III. Objetivos.	31
Objetivo General.	31
Objetivos Particulares:.....	31
IV. Hipótesis.....	31
V. Material Y Método Experimental.....	32
5.1 Muestras De Leucocitos De Sangre Periférica.	33
5.2 Extracción De ARN.....	34
5.3 Cuantificación De ARN.	34
5.4 Retrotranscripción.	35
5.5 Diseño De Primers.	35
5.6 Estandarización De La Técnica De Pcr Punto Final.....	35

5.6.1	Visualización De Los Productos.	36
5.7	Estandarización De La Técnica De qRT-PCR.	36
5.8	Análisis De Resultados.....	36
VI.	Resultados.	37
6.1	Diseño de Primers.....	37
6.2	PCR Punto Final.	38
6.3	Estandarización de la técnica de qPCR	40
6.4	Implementación de la qPCR.	47
6.5	Cuantificación.	49
VII.	Discusión.....	51
VIII.	Bibliografía.	59

Resumen.

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), son un grupo de bacterias Gram (+), las cuales son consideradas probióticas, y administradas en cantidades adecuadas, aportan a su hospedero un beneficio más allá de la nutrición básica. Estas bacterias, son capaces de producir Microvesículas (MVs), las cuales son estructuras esféricas que se forman a partir del plegamiento de la pared celular de su célula progenitora. Dichas estructuras mantienen en su superficie elementos propios de la pared celular de origen, como puede ser el Ácido lipoteicoico, proteínas transportadoras y glicocálix. Además, acarrean en su interior una amplia variedad de proteínas, lípidos, fracciones de ADN, y componentes biológicamente activos, que permiten a la bacteria progenitora, desarrollar diferentes estrategias para sobrevivir en el medio donde se desarrollan. En ese sentido, en un trabajo previo se montó un cultivo celular con leucocitos de sangre periférica de *Rattus norvegicus* cepa Wistar, los cuales fueron estimulados con dos diferentes concentraciones de MVs de dos cepas de *Lactobacillus acidophilus*, una de campo en aislada del tracto gastrointestinal (TGI) de una *Rattus norvegicus* de vida libre capturada de asentamientos urbanos, y una *L. acidophilus* ATCC 314. A partir de estos leucocitos se obtuvo RNA mediante TRIzol para estandarizar una técnica de qRT-PCR, que permitió evaluar la expresión de genes codificantes para IL-1 β e IL-10, tras el estímulo con MVs de BAL. Para esta técnica se diseñaron primers inéditos para las citocinas de interés. Los resultados mostraron que dichas células codifican para ambas citocinas, obteniendo productos de amplificación correspondientes al tamaño del producto esperado durante el diseño *in silico*. La estandarización de la técnica identificó que la temperatura de amplificación idónea usando los primers sugeridos en el presente trabajo fue de 60° C. Mientras que la concentración de templado ideal fue de 50 ng y en el caso de los primers, la concentración más eficiente fue 10 μ M. El presente trabajo es el primer reporte de la capacidad de las MVs de BAL para estimular la respuesta inmune del hospedero, y representa un antecedente de investigación que permitirá el desarrollo de estudios más detallados en relación al efecto inmunoestimulante de las MVs de BAL en modelos biológicos *in vivo* e *in vitro*.

I. Introducción.

1.1 *Rattus Norvegicus* y su resistencia a patógenos gastroentéricos.

La rata noruega (*Rattus norvegicus*), ha sido utilizada como modelo biológico en la investigación biomédica durante mucho tiempo, y en una amplia gama de líneas que van desde la oncología hasta el estudio de enfermedades metabólicas.

Pero un aspecto que ha sido relativamente poco abordado es la capacidad de adaptación que estos organismos presentan ante los desafíos del medio que les rodea, especialmente cuando hablamos de ratas silvestres que comparten asentamientos urbanos con el ser humano. Lo anterior es muy destacable, pues si bien se conoce su rol como reservorios de enfermedades potencialmente zoonóticas como el hantavirus, la peste bubónica o leptospirosis, pocas veces se ha abordado de forma descriptiva el motivo por el cual, estos animales pueden convivir con patógenos de forma cotidiana sin mostrar abatimiento masivo de sus poblaciones

En el caso de las enfermedades gastrointestinales, como las ocasionadas por las bacterias del género *Salmonella* o *Campylobacter jejuni*, en 2007 Meerburg y Kijlstra, realizaron un estudio descriptivo de la prevalencia de los géneros bacterianos mencionados en ratas (*Rattus norvegicus*), capturadas en zonas rurales y granjas avícolas. Mostraron interesantes resultados, las aves mostraron un historial de mortalidad ocasionada por salmonelosis, lo cual podría estar relacionado con un 24% de los roedores capturados, que aparentemente se mostraban sanos antes de realizar la necropsia, pero resultaron portadores de *S. enteritidis*. En este mismo trabajo, se detalla que hasta un 87% del excremento de ratas recolectado en granjas avícolas con historial de infección por *C. jejuni*, estaba contaminado por dicha bacteria⁵¹.

Hasta el momento, no se han desarrollados estudios de prevalencia de *E. coli* y *Salmonella spp.* en medios urbanos. Sin embargo, sabemos con certeza que las ratas tanto de la especie *Rattus norvegicus* como *Rattus rattus*, son capaces de portar ambas bacterias.

En un estudio realizado por Himsforth, Zabek, Desruisseau, *et al*, donde se capturaron 633 ratas de un vecindario en la ciudad de Vancouver, Canadá, 593 de estos animales fueron etiquetados como *R. norvegicus*. De estos animales, 397 (62.7%) eran portadoras de *E. coli*, y de ellas 17 individuos (4.3%) portaban alguna cepa multirresistentes ante antibióticos.

Por otro lado, *Salmonella spp.* fue aislada en solo 3 de las 633 ratas (0.5%). Los serotipos encontrados incluyen *Salmonella entérica*, *Salmonella indiana*, y *Salmonella enteritidis*³⁵.

La interacción de los roedores con microorganismos patógenos gastroentéricos es una norma común, que se repite en las granjas de alimento para consumo humano, y que se ve amplificado en asentamientos urbanos, especialmente por la íntima interacción con el hombre. Sin embargo, existe factores en los roedores que les permite adaptarse de forma rápida a estos patógenos, observándose clínicamente sanos. En este trabajo abordaremos el papel que juega la microbiota intestinal, como una medida de control de microorganismos potencialmente dañinos, así como una poderosa fuente de inmunoestimulación. En donde las Bacterias Ácido-lácticas de la microbiota intestinal de estos roedores, podrían ser la clave para comprender esta resistencia. Y, asimismo, sugerir su potencial uso como un producto probiótico acelular que pueda ser empleado tanto en el área veterinaria como para uso humano, en un futuro.

1.2 Generalidades de las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL).

A lo largo del tracto gastroentérico, habita un grupo de bacterias saprófitas, las cuales interactúan de diversas formas con su hospedero, tanto de mamíferos como de aves y reptiles, llamadas Bacterias Ácido-Lácticas (BAL)¹. A este grupo, pertenecen especies como las bifidobacterias y los lactobacilos⁶⁵.

La denominación BAL, comprende un amplio número de géneros bacterianos que comparten características morfológicas y metabólicas, siendo todas ellas estrictamente fermentadoras de glucosa, tanto homofermentativas como heterofermentativas. Son también bacterias anaerobias facultativas, catalasas negativas, así como ácido-tolerantes. En todos los casos, el producto final del metabolismo de este grupo de bacterias es el ácido láctico y su desarrollo óptimo se ubica en un pH entre 5.5 y 6.2^{43, 65}.

Morfológicamente las BAL, pueden ser tanto cocos como bacilos, y serán positivos si se tiñen mediante la técnica de Gram. Estos microorganismos son usados de forma regular para la elaboración de lácteos, cárnicos, bebidas alcohólicas o productos de panadería, así como para la producción de ensilados para animales⁴³.

Entre los múltiples beneficios que estas bacterias ofrecen al organismo eucarionte que colonizan, es su capacidad para controlar el crecimiento de microorganismo oportunistas, así como la invasión de otros agentes exógenos potencialmente patógenos.

El papel que desarrollan las BAL en la microbiota intestinal, puede ser afectado por factores como la administración de antibióticos, la colonización agresiva de patógenos o circunstancias fisiológicas del hospedador, como puede ser el estrés o el envejecimiento⁶⁵.

Aunado a esto, durante las últimas décadas se ha aprovechado la actividad inocua de estas bacterias, para usarlas como probióticos orales⁷⁶, siendo

Lactobacillus acidophilus, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* y *L. reuteri*, así como algunas especies del género *Bifidobacterium*, las más usados para este fin^{43, 76}. Además, son consideradas potentes vectores, para el transporte de proteínas terapéuticas como medio de presentación de antígenos a superficies mucosales¹⁴.

1.2.1 Concepto de probiótico.

El concepto de probiótico puede definirse como microorganismos vivos que, ingeridos en cantidades adecuadas, ejercen efectos beneficiosos en la salud, más allá de lo inherentes a la nutrición básica⁷⁶.

Se han realizado investigaciones acerca de los probióticos desde hace 25 años, las cuales han comprobado sus efectos protectores. Estos han sido relacionados con el tratamiento preventivo de alergias, así como con efectos positivos en la regulación del sistema endócrino, nervioso, circulatorio y digestivo en seres humanos¹⁹.

Al momento de seleccionar un grupo de bacterias para fungir como probióticos, es necesario evaluar el potencial de colonización de la cepa, la habilidad que muestre para producir competencia con microorganismos patógenos, impacto para incrementar su resistencia ante algunas enfermedades³¹, resultar inocuos para el hospedero^{43, 76} y pertenecer al microbioma regular de este último⁶⁵, entre otros criterios que se deben satisfacer para su selección³¹.

Algunas de las cepas más comúnmente usadas como probióticos son:

1. *Lactobacillus casei* GG y *Lactobacillus acidophilus*.

L. casei GG fue originalmente seleccionado por su capacidad de resistir los jugos gástricos y las sales biliares del organismo hospedero, así como su capacidad de colonizar el colon del ser humano. Su resistencia a antibióticos es estable, pues no expresa plásmidos. Finalmente, se sabe que durante su metabolismo solo produce ácido láctico, y no su isómero D.

Por su parte, *L. acidophilus* ha demostrado ser capaz de unirse al enterocito hospedero de forma independiente al calcio, así como inhibir el crecimiento de bacterias francamente patógenas como *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*.

2. Bifidobacterias como. *B. breve*, *B. Lonngum*, *B. infatis*, *B. animalis*.

Seleccionadas por características como la no formación de aminos linfáticas, derivados sulfurosos o nitratos, mientras que a la par, producen vitaminas del complejo B, favorecen la producción de enzimas digestivas y como parte de su metabolismo generan ácidos grasos de cadena corta como el acetato o el lactato, mismos que acidifican el pH del medio intestinal, teniendo un efecto antibacteriano. Del mismo modo, estos Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC), resultan muy provechosos como sustrato trófico de los colonocitos del hospedero e intervienen en el metabolismo hepático.

3. *Streptococcus salivarius spp.* y *S. thermophilus*.

Son microorganismos comúnmente utilizados en la elaboración de productos de consumo diario como el yogurt. En este mismo rubro, *L. bulgaricus*, es también importante⁷⁶.

1.2.2 Mecanismos de acción de los probióticos.

Han sido reportados diferentes mecanismos, por los cuales los probióticos ejercen sus efectos benéficos al hospedero. Por ejemplo, el mecanismo de exclusión competitiva; donde el nicho ecológico que las bacterias potencialmente patógenas podrían tomar es ocupado por las bacterias probióticas, impidiendo la colonización del epitelio por parte del primer grupo. Los probióticos ejercen aún más presión al crear competencia por los nutrientes disponibles, este fenómeno también resulta interesante en pacientes que reciben alimentación parenteral, pues dificulta la translocación bacteriana en el tracto gastroentérico³¹.

Otro de los mecanismos de acción probiótica, es la generación de peróxido de hidrógeno, lo cual reduce el pH luminal y el potencial redox. Asimismo, muchas bacterias probióticas como los lactobacilos presentan la capacidad de producir péptidos antibióticos como las bacteriocinas, helveticinas, curvacinas, nicinas o bifidocinas, que inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas. Aunado a esto, el favorecimiento de medios de baja presión de oxígeno favorece el crecimiento de microorganismos anaerobios⁷⁶. Finalmente, se deben considerar las interacciones antigénicas entre las células bacterianas y el hospedero.

De forma reciente, mediante diferentes trabajos experimentales, se ha logrado constatar la capacidad de los probióticos, para estimular el sistema inmune del organismo que colonizan. Sin embargo, aún no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales estas bacterias producen dicho efecto^{43, 67}.

Se sabe que las células del sistema inmune asociadas al tracto gastroentérico realizan de forma periódica “censos” a los microorganismos de la microbiota, y como resultado de este reconocimiento, diferentes componentes de la pared celular de las bacterias Gram (+) que residen en ese epitelio, son presentadas

a las células inmunes mediante Receptores de Reconocimiento de Patrones Antigénicos (PRRS), lo cual inicia en los leucocitos la expresión del Factor Nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). Factor clave en la codificación de inmunoglobulinas y síntesis de interleucinas. Del mismo modo, la interacción descrita anteriormente, también inicia la STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)^{17, 42}.

Una consecuencia más de la presentación de componentes de la pared celular de bacterias Gram (+) de la microbiota, a las células del sistema inmune del hospedero, es la producción de interleucinas de la respuesta inmune, así como interleucinas proinflamatorias, tales como el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α), IL-12, y el Interferon γ (INF γ)^{17, 38}. También se propicia la síntesis de citocinas reguladoras, como el Factor de Crecimiento Transformante β (GTF- β) y la IL-10.

Aunado a esto, la activación del NF- $\kappa\beta$ y la subsecuente producción de IL-12, conllevan a la activación de linfocitos NK, que pueden limitar el desarrollo de algunas neoplasias no metastásicas¹⁷.

De forma general, los microorganismos que penetran al cuerpo por vía oral generan una respuesta inmune mediada por inmunoglobulinas IgA secretoras (Tormo). La interacción entre el sistema inmune y los probióticos, se da por las células M, del Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT)^{44, 76}.

Sin embargo, se debe considerar que existen algunas cepas de lactobacilos que pueden translocarse a través de la mucosa intestinal sin causar daño, adquiriendo así la posibilidad de entrar a la circulación linfática, y por lo tanto influir en eventos inmunológicos de escala sistémica¹⁷.

En cuanto a su interacción con el GALT, se ha observado que algunas cepas de lactobacilos tienen la facultad de incrementar la población linfocitaria que yace en este tejido asociado, así como mejorar su expresión de receptores de superficie¹⁷.

En segundo plano, los probióticos también pueden suprimir reacciones inmunes indeseables como sucede en el caso de las alergias e hipersensibilidades, donde los probióticos conducen a un estímulo en las células T *helper* (Th1), productoras de citocinas y responsables de la respuesta inmune celular. Estos cambios pueden modificar la forma en la que el hospedero interactúa con potenciales alérgenos, al inhibir las reacciones inmunes de tipo Th2, de tal modo que se tiene un mejor pronóstico y evolución de las alergias⁷⁶.

Múltiples estudios se han realizado entorno a la interacción de los probióticos y la respuesta inmune de su hospedador. Por ejemplo, en un estudio realizado con 31 adultos humanos los cuales padecían rinitis alérgica, se les administró por vía oral *Lactobacillus paracasei* ST11 y se encontró que las células mononucleares sanguíneas de estos pacientes produjeron una menor cantidad de IL-5, IL-8 e IL-

10. Estos resultados sugieren la capacidad de estos microorganismos para modular la producción de citocinas por parte de monocitos y linfocitos.

Por otro lado, en experimentos realizados con *B. longum*, se observó una disminución en la cantidad de eosinófilos, en muestras de pacientes que recibieron el tratamiento, así como una reducción de los niveles IFN- γ en sangre. Lo anterior sugiere la capacidad del microorganismo que coloniza de regular el efecto de la respuesta Th2.

Finalmente, en un tercer experimento realizado con niños asmáticos que además padecían de rinitis alérgica, el uso de probióticos orales resultó en una disminución significativa en la producción de TNF- α , IL-12 e IL13, por parte de las células mononucleares sanguíneas⁸⁰.

Este efecto inmunomodulador, también puede ser apreciado en pacientes que sufren de alguna enfermedad autoinmune⁷⁶.

Se puede tomar como ejemplo de lo anterior, la artritis reumatoide, pues experimentos realizados con el fin de proponer el uso de probióticos como adyuvante en el tratamiento de esta enfermedad, han arrojado resultados positivos, apreciándose disminución en la producción de interleucinas proinflamatorias como la IL-6, así como el incremento de interleucinas reguladoras como IL-10⁵³.

1.2.3 Morfología bacteriana.

Una célula bacteriana tiene a grandes rasgos las siguientes estructuras: material genético; representado por un cromosoma único que no está rodeado por una membrana nuclear, ribosomas, citoplasma y membrana⁵⁷ (Pírez). En la Imagen 1 se muestra la morfología tanto de bacterias Gram (+), como Gram (-).

Las estructuras bacterianas pueden pertenecer a dos clasificaciones:

Estructuras Permanentes:

- Membrana celular.
- Ribosomas.
- Material genético.
- Pared celular.

Y estructuras variables:

- Flagelo.
- Fimbrias o pilis.
- Cápsulas.

- Esporas.

Imagen 1. Morfología de Gram (+) y (-).

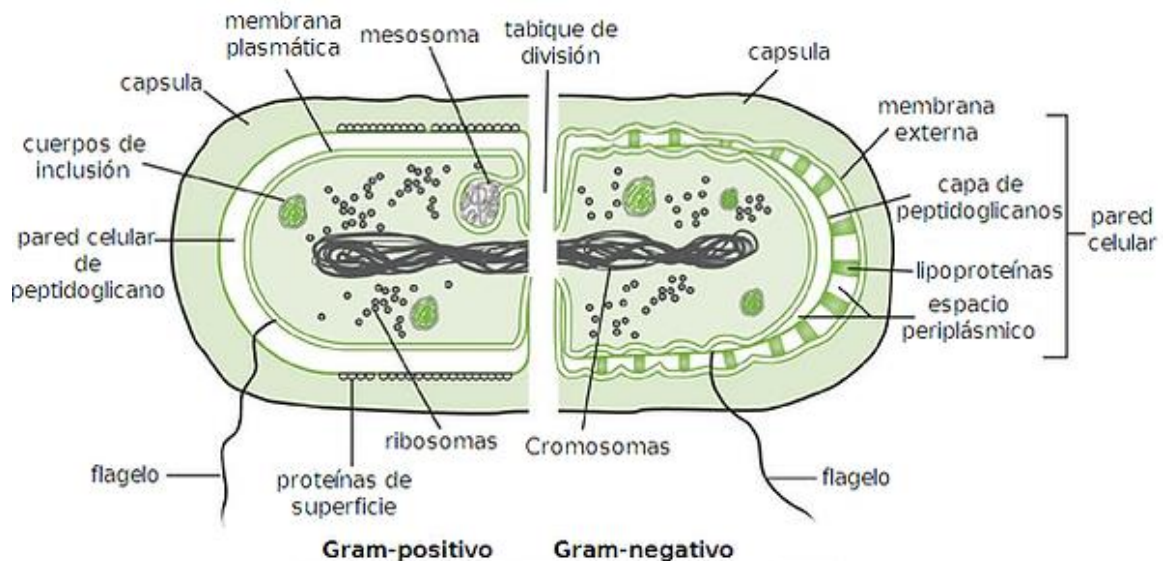


Imagen 1. Morfología comparativa de bacterias Gram (+) y Gram (-) Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden.

Las estructuras variables, se refiere a aquellas que existen en algunas bacterias. Sin embargo, aún en el mismo grupo bacteriano o en una misma cepa, dichas estructuras se pueden presentar o no, dependiendo de las condiciones en donde se desarrollen⁵⁷.

Por otro lado, las estructuras permanentes, son aquellas imprescindibles para la vida de la bacteria. Ejemplos de estas estructuras incluyen el citoplasma, ribosomas, el ADN o la membrana citoplásmica⁴⁸.

A continuación, se describe brevemente los elementos permanentes de las bacterias.

- Ribosomas: la célula bacteriana presenta ribosomas libres en su citoplasma, estos poseen un coeficiente de sedimentación de 70s, pauta que las diferencias de las células eucariotas, que poseen coeficiente de 80s⁵⁷.
- ADN bacteriano: al ser células procariotas, las bacterias carecen de una membrana nuclear, diferenciándose así de las células eucariotas, además carecen de un nucleolo. El material genético está compuesto por una estructura fibrilar, constituida por un ADN circular de doble cadena, enrollado sobre sí mismo, mediante proteínas que imitan la función de las histonas en las células eucariotas.
- Plásmidos: es material genético extra cromosómico, constituido de cadenas cortas circulares de ADN que se replican de forma autónoma. Este material

codifica factores de virulencia, resistencia a antibióticos, producción de toxinas, etc.

- Membrana celular: se trata de una estructura vital para la célula bacteriana, la cual, si se altera compromete la viabilidad del microorganismo. Su composición es similar a la mayoría de las membranas biológicas; una bicapa fosfolipídica, en donde el ácido graso hidrofóbico se orienta hacia el interior y el glicerol hidrofílico, se dirige hacia el exterior, la cual está estabilizada por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y cationes como el calcio y el magnesio⁵⁸.

Fijas en la membrana, podemos encontrar múltiples proteínas transmembranales, que facilitan el transporte de sustancias hidrofílicas a través de ésta, permitiendo el paso de solutos por transporte activo.

Las funciones de la membrana se manifiestan por una permeabilidad selectiva, que permite el ingreso de sustancias nutritivas para la bacteria, además de expulsar desechos y proteínas, por ejemplo, toxinas. Al no poseer membranas internas, todos los sistemas de fosforilación, oxidación y citocromos para la producción de energía se encuentran alojados en ella^{48, 58}.

- Pared celular: con excepción de los micoplasmas, se trata de una estructura imprescindible para las bacterias. Es una estructura rígida, situada al exterior de la membrana citoplasmática. Si ésta se destruye o se impide su formación, la célula perderá su viabilidad^{48, 57}.

1.2.4 Pared celular de las bacterias Gram negativas.

La pared celular de las bacterias Gram (-), está compuesta de una lámina simple de peptidoglucano, rodeado por una estructura denominada membrana externa. Esta resulta mucho más delgada que la que encontramos en las bacterias Gram (+). Sin embargo, a pesar de eso mantiene rigidez y elasticidad, permitiendo proporcionar protección contra los factores del medio extracelular¹².

El grosor de las capas de peptidoglucano es considerablemente distinto entre las bacterias Gram (+), Gram (-) y las ácido-alcohol resistentes, siendo en el caso de las primeras muy prominente, con un grosor de 0.02 a 0.06 μm en forma de multicapas. Por otro lado, los dos grupos bacterianos restantes presentan capas simples y más finas, de 0.01 μm ⁵⁸.

1.2.5 Pared celular de bacterias Gram positivas.

Podemos imaginar a la pared celular, como una macromolécula gigante constituida por peptidoglucano, que envuelve al resto de la célula⁵⁷ y que está complementada

con otros glicopolímeros denominados ácidos teicoicos, así como polisacáridos y otras proteínas¹⁴.

La pared celular de las bacterias Gram (+), está formada por una única capa homogénea de 20 a 80 nm de grosor de peptidoglucano o mureína, situada por fuera de la membrana celular. La superficie del peptidoglucano de las bacterias Gram (+), está recubierta por proteínas. Los diferentes grupos de bacterias Gram (+), así como sus diferentes especies difieren en la composición de sus proteínas y de ácidos teicoicos; esto resulta trascendental durante la identificación y clasificación bacteriana. Es esta gruesa capa de peptidoglucano determinante para que este grupo de bacterias, retengan el cristal violeta durante la tinción de Gram⁵⁸.

El peptidoglucano, es el principal constituyente de la pared celular, está conformado por unidades repetidas del monómero formado por: dos derivados de carbohidratos, N-acetil Glucosamina y N-acetil Murámico (N-Ac.G, N-Ac.M), unidas por enlaces β 1-4, asociados a cortas cadenas peptídicas a través del N-acetil Murámico⁵⁷. Las cadenas peptídicas están unidas a través de enlaces covalentes por sus extremos N-terminal al grupo lactilo del N-AcM. Estos enlaces peptídicos varían entre las diferentes especies bacterianas y pueden estar unidas de forma directa o indirecta, mediante cadenas cortas de uno o más aminoácidos, generando así una estructura tridimensional que rodea a la célula, cumpliendo su función de mantener protegida la integridad de esta¹⁴. Lo anterior se ejemplifica en **Imagen 2**.

Imagen 2. Estructura de la pared celular una bacteria Gram (+).

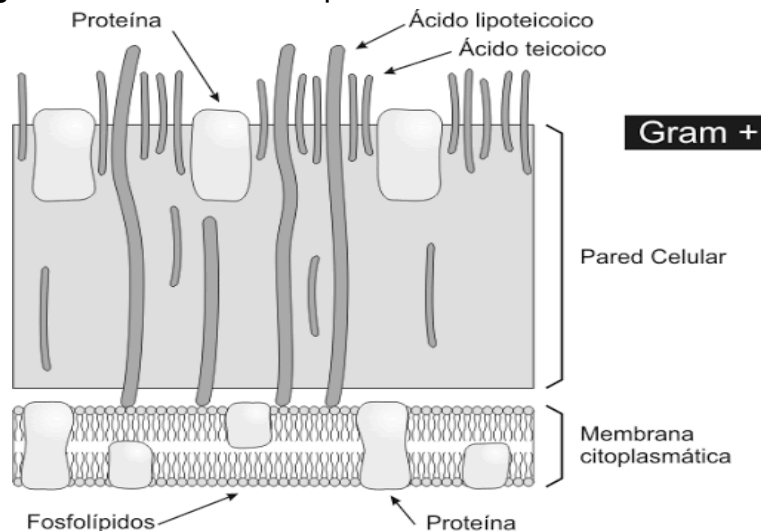


Imagen 2. Esquema de la conformación tridimensional la pared celular de una bacteria Gram (+). Cohelo, C.; Brown, L.; Maryam, M.; Burnet, M.; Kyle, J.; Heyman, H.; Raghav, V.; Ramirez, J.; Prados, R.; Lauvau, G.; Nakayasu, E.

Para las BAL, el orden secuencia de aminoácidos es L-Ala- γ -D-Glu-X-D-Ala, siendo la variable "X" en todos los casos, un diaminoácido, con L-Lys, el más común. Pero también podemos encontrar al ácido diaminopimelico (mDAO) o la L-ornitina.

Dando por sentado que cada especie bacteriana posee su patrón característico de peptidoglucano, se debe mencionar que esta molécula se mantiene siempre en un proceso de cambio dinámico a lo largo de la vida de la bacteria, siendo al final de cuentas el resultado de una compleja secuencia de reacciones de síntesis y degradación¹⁴.

1.2.6 Ácidos teicóicos.

La pared celular de la mayoría de las bacterias Gram (+) contiene estos polímeros hechos de unidades subsecuentes de alditolfostato. Los ácidos teicoicos pueden ser clasificados en dos grupos: Ácidos Teicoicos de Pared (ATP), los cuales se unen por enlaces covalentes a las moléculas de peptidoglucano, y Ácidos Lipoteicoicos (ALT), los cuales están anclados a la membrana plasmática.

Los ATP más comunes, son estructuras conformadas por cadenas de poli-glicerolfosfatos o poli-ribitolfosfatos. Estas están asociadas al peptidoglucano mediante enlaces fosfodiéster al N-AcM. En la mayoría de las bacterias Gram (+), pueden presentarse tanto ALP como ALT. Sin embargo, existen peculiaridades en especies como *L. casei* y *L. rhamnosus*, los cuales aparentemente exhiben de forma exclusiva ALT.

La importancia de la pared celular yace en su facultad de servir como “interferencia” entre la célula bacteria y su medio ambiente¹⁴, confiriendo rigidez y resistencia osmótica, además de representar una barrera contra las sustancias que podrían resultar dañinas para el microorganismo, tal es el caso de bacteriófagos infectantes o células eucariotas de su hospedero⁴⁸, pues es bien sabido que los ácidos teicoicos presentes en la pared celular son un importante antígeno que al interactuar con los receptores Toll like Receptors (TLR) de tipo 2, estimulan la respuesta inmune innata¹³.

No limitado a lo anterior, se sabe que los ácidos teicoicos tienen una importante influencia en el desarrollo de la respuesta inmune que se monta contra bacterias Gram (+). En 2007, Chan y colaboradores, realizaron un experimento en el cual compararon la producción de interleucinas IL-12 p70 e IL-10, por parte de células dendríticas de ratón al ser expuestas tanto a un mutante de *Streptococcus gordonii* al cual se le había eliminado el gen *dltA*, como a la misma especie bacteriana sin haber sido modificada. Como resultado, la producción de las citocinas de interés en ese experimento fue mucho menor por parte de las células dendríticas expuestas al mutante. Esto es interesante porque el gen *dltA* es encargado de la producción de la proteína acarreadora D-alanilo, la cual interviene durante la formación de ALT, al proveerlo de carga (+). Asimismo, está relacionada al control de la actividad autolítica de la membrana y tiene un papel esencial en las enzimas dependientes de Mg²⁺, al ser la proteína ligadora de ese ion. Otro resultado interesante que se obtuvo de ese experimento es que los ácidos teicoicos aislados y purificados tanto del mutante como de la cepa íntegra, indujeron la producción de

TNF- α e IL-6. Sin embargo, una vez más la producción que fue generada por la exposición al mutante fue sensiblemente menor. Estos resultados sugieren la importancia de los ácidos teicoicos en la respuesta inmune mediada por células como las NK, células T helper, o en la modulación de la respuesta innata¹³.

1.3 Microvesículas de Membrana externa (Mvs) de las bacterias.

Las Microvesículas de membrana externa (MVs) son nanoestructuras esféricas constituidas por una bicapa lipídica, formadas a partir de la membrana de la célula de origen, cuyo tamaño varía entre los 20 nm y hasta los 500 nm de diámetro. Las MVs están constituidas, por elementos propios de la membrana externa de la bacteria progenitora, así como cualquier otro componente activo, alojado en el espacio periplásmico al momento de su formación. Asimismo, pueden contener diferentes proteínas, polisacáridos, lípidos o incluso ácidos nucleicos⁷⁸.

Durante las últimas décadas, múltiples estudios han corroborado la producción de MVs por parte de bacterias Gram (-), Gram (+) e incluso hongos⁷.

En el caso de las bacterias Gram (+), el mecanismo en que estas proyecciones extracelulares de membrana son producidas, permanece sin ser totalmente dilucidado, pues a priori, la expulsión de la membrana citoplásmica bacteriana por parte de estas nanoestructuras se ve dificultado por la gruesa pared celular característica de estos microorganismos⁷⁸.

1.3.1 Mecanismos de formación de las MVS bacteriana.

En las últimas décadas, las MVs han sido extensamente estudiadas principalmente en bacterias Gram (-), teniendo total claridad de las funciones que estas cumplen, para la célula bacteriana de origen. De forma general, las MVs representan una adaptación de las bacterias, frente a elementos que generen estrés en las mismas, tales como aquellos factores químicos o físicos que causen daño o deterioro a la membrana de la bacteria.

Una de estas fuentes de estrés, puede ser la alteración en la composición del Lipopolisacárido (LPS), así como el acumulamiento de fosfolípidos en la membrana. Pero también se deben considerar variaciones en la temperatura, pH, exposición a antibióticos, toxinas y competencia bacteriana por un espacio vital.

En *E. coli*, se han descrito sistemas que se activan ante las señales estresantes, una de ellas es la Señal de Respuesta σ^{ξ} , una molécula con la facultad de reconocer componentes defectuosos en las proteínas de la membrana externa⁸³.

Durante la formación de las MVs de bacterias Gram (-), la membrana externa debe liberarse de la delgada capa de peptidoglicano de la membrana interna, creando una región abultada la cual eventualmente sufrirá fisión y se desprenderá de su célula original, sin causar inestabilidad en la misma⁶⁶ (Schwechheimer, C.;

Kuehn, M). En el caso de *P. aeruginosa*, este mecanismo ha sido atribuido a una repulsión de cargas presentes en el antígeno O constitutivo de su LPS⁷⁹.

Por parte de las bacterias Gram (+), así como en microorganismos como los micoplasmas u hongos, en la actualidad existen tres teorías que intentan dar una explicación a este fenómeno. Es importante aclarar que estos postulados no son mutuamente excluyentes.

En primer lugar, se ha teorizado que las MVs son expulsadas hacia afuera de la pared celular por efecto de la presión osmótica, una vez que se ha separado de la membrana citoplasmática. Este mecanismo podría ser regulado por poros presentes en la pared celular y al mismo tiempo, este mecanismo podría verse influido por el grosor de esta última estructura.

Adicional o alternativamente, se han encontrado enzimas que son liberadas dentro de las MVs, las cuales tienen la capacidad de modificar la pared celular y facilitar la salida de la nanoestructura.

Finalmente, las MVs podrían ser exteriorizadas al salir a través de canales de tubulina presentes en la pared celular. En este caso, es incluso posible que las MVs alteren su morfología con la finalidad de ser expulsadas por canales de un diámetro inferior al propio. Es prudente mencionar que estas teorías son las más recientes en este campo³⁶. Como se aprecia en la **Imagen 3**.

Imagen 3. Liberación de MVs a través de canales.

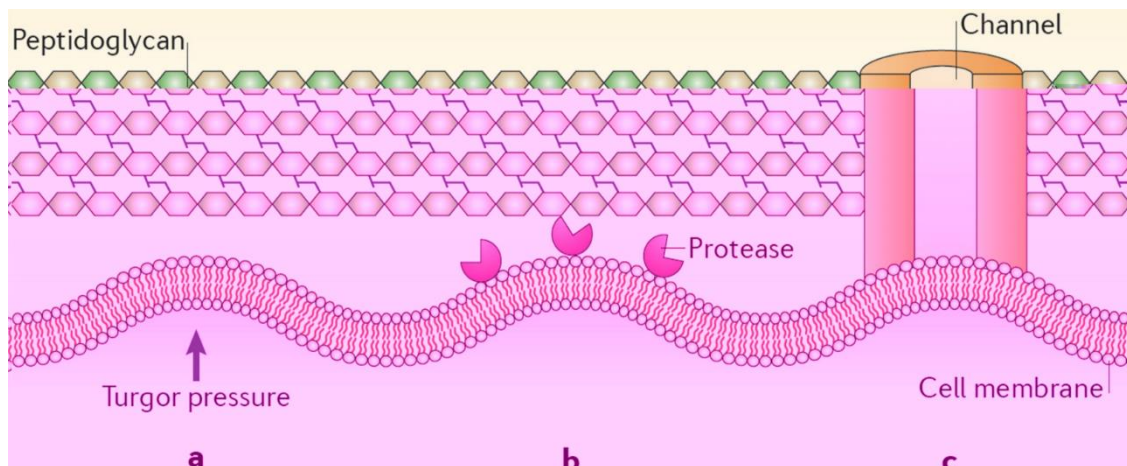


Imagen 3. Expulsión de MVs a través de la pared celular. a) MVs siendo expulsadas por la presión osmótica⁵. a) MVs liberadas por enzimas⁵. a) MVs liberadas por canales de tubulina. Brown, L.; Wolf, J.; Prados, R.; Casadevall, A.

1.3.2 Funciones de las MVS.

Los primeros intentos por caracterizar las MVs de bacterias Gram (+), se realizaron con *Staphylococcus aureus*, y en este estudio proteómico se encontró que las MVs pueden cumplir varias funciones: comunicación con otras bacterias, promover la resistencia contra antibióticos, acarrear factores de virulencia, transporte de material genético e incluso regular la biogénesis de más MVs³⁶.

Por ejemplo, la toxina LLO (pore-forming toxin listeriolysin) producida por *Listeria monocytogenes*, es generada una vez que la bacteria ha logrado introducirse a una célula del hospedador. Esta proteína, tiene la finalidad de proveer una ruta de escape para la progenie de la bacteria tras haberse reproducido, facilitando también la infección de otras células vecinas, sin que las bacterias salgan al medio extracelular. El rol de la MVs para esta toxina es el de acarreador, puesto que los mecanismos defensivos de la célula huésped, se activarían de forma inmediata al ser detectada la toxina en el citosol, conduciendo a la eliminación de la *Listeria* en su interior. Adicionalmente se ha observado en condiciones experimentales, que la MVs también limita la efectividad de la toxina, puesto que de no estar presente causaría una destrucción descontrolada de la membrana citoplasmática de la célula huésped. Sin embargo, al estar presentes las MVs acarreadoras, el efecto de la toxina se mantiene regulado, reduciendo la efectividad de esta, de modo que solo crea poros en regiones específicas de la membrana de la célula infectada. Asimismo, al estar encapsulada por una estructura similar a la pared celular de la bacteria que la produjo, puede ser pasada por alto por los mecanismos que inician el proceso de autofagia¹⁶.

También se ha demostrado que otros factores de virulencia pueden ser transportados por las MVs. En el caso de muestras de MVs purificadas provenientes de cultivos de *S. aureus*, se ha evidenciado que estas nanoestructuras están importantemente cargadas de proteínas ligadoras de penicilina, las cuales unen intrínsecamente β - lactamasas a antibióticos. Aunado a lo anterior, se ha probado que estas mismas MVs pueden acarrear el factor regulador asociado a membrana (MsrR). Ambas moléculas consideradas de vital importancia en el desarrollo de resistencia contra antibióticos⁷.

Además de acarrear factores de virulencia, las MVs permiten a las bacterias interactuar de diferentes formas con otros individuos que les rodean, beneficiando incluso a otras especies. Por ejemplo, resultado de análisis proteómicos, se ha encontrado que las MVs de *Bacillus fragilis* y *B. thetaioamicron* contienen proteínas que no fueron halladas en la membrana externa de sus bacterias progenitoras, esto es importante pues se ha observado que las MVs de estas bacterias son capaces de descomponer polisacáridos, dejando los productos de esta reacción disponible para todas las especies bacterianas presentes en ese momento¹⁰.

Pero las funciones de las MVs no se limitan solo a efectos positivos, sino que también pueden ser usados por las bacterias como una eficaz arma contra otros microorganismos. Tal es el caso de *P. aeruginosa*, cuyas MVs pueden acarrear factores de virulencia como proteasas, hemolisinas, fosfolipasa C, fosfatasa alcalina, quinolonas antibacterianas, y mureínhidrolasas, todas estas moléculas pueden dañar células del hospedador infectado o eliminar a bacterias potencialmente competidoras.

De forma similar, se ha documentado ampliamente que las MVs de bacterias Gram (+), acarrear péptidos antimicrobianos como bacteriocinas, las cuales le proporcionan una ventaja a sus bacterias progenitoras sobre otros microorganismos competidores o incluso inhiben la colonización de bacterias potencialmente patógenas en epitelio de su hospedero^{3,10, 43}.

Es importante visualizar en este punto el potencial de las MVs, como mecanismo de comunicación tanto entre microorganismos, como entre bacterias y su hospedador.

Podemos tomar como ejemplo de esta comunicación entre bacterias, el rol que juegan las MVs en el mecanismo de Quorum Sensing (QS); un atributo común de muchas especies bacterianas, mediante el cual las bacterias expiden al medio que habitan diferentes moléculas señalizadoras, las cuales estimulan la expresión de genes en todos los individuos de la comunidad que reciban el estímulo, independientemente de pertenecer a la misma especie de bacteria que produjo esas moléculas en primer lugar^{10, 61, 77}. En este caso, se ha demostrado que las MVs son indispensables para el adecuado tránsito de moléculas señalizadoras que en la mayoría de sus casos son altamente hidrofóbicas, y por lo tanto no pueden dispersarse de forma eficiente en el medio donde se desarrolla la bacteria, como es el caso de la *Pseudomona quinolone signal*¹⁰.

Finalmente, debemos remarcar que la función de las MVs para comunicar a las bacterias no se limita solo a interacciones entre bacterias, sino que sirven también como una línea de interacción entre las bacterias de la microbiota y las células de su hospedero.

Desde hace varios años, se sabe con certeza que las bacterias saprófitas del intestino de los mamíferos interactúan con las células del hospedero. Sin embargo, resultaba enigmático hasta hace algún tiempo, como sucedía la interacción bacteria-célula, al estar el epitelio cubierto por una densa capa de moco. De forma reciente, se ha demostrado que las MVs de las bacterias Ácido lácticas que habitan el tracto gastrointestinal de humanos y animales por igual, proveen una vía soluble para acarrear distintos componentes bioactivos, que en muchos casos estimulan a las células del sistema inmune del hospedero mediante sus receptores TLR (Toll Like Receptors) ó NOD *Nucleotide Oligomerization Domain* (Caruana, J.).

Evidencia de lo anterior son los experimentos realizados por Shen en 2012, quien observó el efecto inmunoestimulante de las MVs de *Bacterioides fragilis*, previniendo el desarrollo experimental de colitis en ratones. De forma similar, experimentos realizados en modelos animales por Ramakrishna, *et al* en 2010, en donde se observó un efecto protector contra los signos de la enfermedad de colon irritable, efecto que se obtuvo por la presencia del Polisacárido A (PSA) contenido en las MVs de estas bacterias. Se sabe que esta molécula que puede inducir la maduración de linfocitos T reguladores¹⁰.

Hablando concisamente de los mecanismos mediante los cuales las MVs tanto de bacterias Gram (+), como Gram (-) interactúa con las células de sus hospederos, se sabe que estas pueden ser internalizadas por las células eucariotas mediante el proceso de endocitosis⁴⁰, pero también pueden interactuar directamente con los receptores de superficie de las células del hospedero, debido a patrones antigénicos como el LPS, peptidoglicano, ácidos teicoicos, ADN o ARN en su estructura, resultando en el inicio de cascadas de señalización intercelular mediadas por citocinas^{9, 40}.

Un ejemplo de lo anterior es la producción de IL-8 por parte de cultivos de células epiteliales, al ser expuestos por MVs de *H. pylori* en condiciones de ausencia de la toxina VacA, producida por esta bacteria³⁸. Otro ejemplo son los experimentos realizados por Cañas, *et al* en 2018, quienes documentaron la producción de cascadas de señalización mediante interleucinas, al exponer a cultivos de células de colon humanas a MVs de cepas comensales de *E. coli*⁹.

1.4 Respuesta inmune.

Hasta este punto, en este trabajo se ha abordado de forma muy breve la importancia que tienen las BAL y las MVs en la regulación del sistema inmune, sin embargo, para ahondar más profundamente en esta interacción, es necesario describir de forma breve algunas particularidades del sistema inmune.

Para entender el sistema inmune se debe describir los diferentes mecanismos a través de los cuales ejerce su función. Para esto, en términos generales, se deben distinguir dos tipos de respuestas: la respuesta innata y la respuesta adaptativa.

Se conoce como respuesta inmune innata a la primera línea de defensa del huésped frente a los microorganismos.

El nombre “innata” se le atribuye debido a que sus mecanismos efectores están presentes en el hospedero aún antes que haya un estímulo potencialmente dañino. Este tipo de inmunidad les debe su importancia a tres funciones:

- Es la respuesta inicial a los microorganismos, previene infecciones e incluso puede eliminar completamente a cierto tipo de patógenos.

- Sus mecanismos efectores estimulan a la respuesta inmune adaptativa e influyen en el tipo de respuesta.
- La inmunidad adaptativa utiliza, además de sus mecanismos propios a la respuesta inmune innata como parte de un sistema de retroalimentación.

Detallando más en profundidad los mecanismos de la respuesta inmune innata, debemos mencionar en primer lugar las barreras epiteliales. Estas representan un límite que separa al organismo hospedero de su medio externo y en donde participan otros eventos inmunológicamente relevantes, como la síntesis de péptidos con capacidad antibiótica y antimicótica denominados “Defensinas”, los cuales aumentan sus concentraciones en presencia de IL-1 y TNF- σ .

En conjunto a estas barreras, la respuesta innata cuenta con diferentes células efectoras denominadas Polimorfonucleares (PMN), que incluyen las siguientes líneas celulares:

- Neutrófilos. Representan la primera línea de defensa ante una potencial amenaza. Alcanzan el sitio de infección en pocas horas y en su interior contienen gránulos ricos en lisozima, colagenasa y elastasa.
- Eosinófilos. Este granulocito reside predominantemente a nivel tisular y es reclutado en sitios de reacciones específicas, combatiendo helmintos y en reacciones alérgicas⁶⁴.
 - Basófilos. Constituyen menos del 1% de la población total de leucocitos. Los basófilos tienen varios receptores de superficie, incluidos los receptores de inmunoglobulina E (IgE). Como parte de su estructura, contienen gránulos de histamina, heparina, factor quimiotáctico de eosinófilos, factor quimiotáctico de neutrófilos y peroxidasa²³

Además de estos PMN, la respuesta innata posee otras células efectoras:

- Monocitos y macrófagos. Los monocitos son células maduras precursoras de los macrófagos, es decir, una vez que el monocito es activado este experimenta cambios morfológicos que lo adapta para sus nuevas funciones como macrófagos. Los macrófagos tienen capacidades fagocíticas que exceden a las de los neutrófilos. También tienen la habilidad de unirse a otros macrófagos y originar “células gigantes” con una capacidad fagocítica aún mayor. Los macrófagos constituyen una segunda “oleada” de células que acuden al sitio de infección. Existen, además de los monocitos y macrófagos circundantes, otros macrófagos que se encuentran como residentes de cada tejido, por ejemplo: en el hígado existen las células de macrófagos estrellados, o en los alvéolos pulmonares, los macrófagos alveolares.

Los macrófagos, además, tienen la capacidad de secretar distintas citocinas que activan a la misma célula, causando que realice sus funciones de forma más

eficiente⁷⁵. De hecho, esta función de los macrófagos los convierte en el enlace que conecta la respuesta inmune innata con la respuesta adaptativa²¹.

Algunas de las citocinas que secretan los macrófagos al ser sometidos a estímulos inflamatorios son: Factor de Necrosis Tumoral (TNF), IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12.²¹ (Duque and Descoteaux).

- Células NK. Las células NK son un tipo de linfocitos, que participan en la inmunidad frente a virus y a microorganismos intracelulares. Esta estirpe celular se caracteriza por poder identificar a esos elementos intracelulares ajenos al organismo mediante las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo I (MHC-I), de modo que si una célula expresa péptidos antigénicos en su membrana unidos a moléculas del MHC-I, las células NK las reconocerán y activarán sus mecanismos apoptóticos. Las células NK controlan inicialmente infecciones virales y otros agentes intracelulares mediante la secreción de perforinas y granzimas, además de poseer una importante actividad antitumoral^{6,75}.

Además de este mecanismo, las células NK, participan en un sistema conocido como "Citotoxicidad mediada por anticuerpos". Esto consiste en la activación de las células NK, frente a antígenos que se encuentren unidos a anticuerpos que en general son IgG.

También, las células NK, son capaces de responder a la IL-12, esta citocina es producida por los macrófagos. En respuesta a la IL-12, las células NK liberan INF γ , el cual potencia la actividad de los macrófagos.

En conjunto a las estirpes celulares anteriormente mencionadas, la respuesta innata cuenta con un grupo de proteínas efectoras denominado "*Sistema del complemento*". Este grupo de proteínas plasmáticas tiene como principales funciones: la inflamación, opsonización de microorganismos y la lisis bacteriana.

El reconocimiento del patógeno y la activación del sistema del complemento, se realiza a través de tres posibles rutas: La vía clásica, capaz de reconocer a los microorganismos recubiertos de anticuerpos, la cual involucra los componentes C1, C2 y C4. La vía alternativa, ruta que involucra los factores B, D H e I, que interactúan entre sí, y C3b, permitiendo la generación de la convertasa C3, C3bBb, que puede activar más C3. A este fenómeno se le conoce como "bucle de amplificación", y se le relaciona con la presencia de paredes bacterianas y fúngicas.

Y finalmente tenemos la vía de la lectina. Esta ruta es activada por la unión de Lectinas a Manosa (MBL) a residuos de manosa en las superficies de patógenos. Como consecuencia se activan las serín proteasas asociadas a MLB, que activan C4 y C2 para formar la convertasa C3, C4Ba2a. En la **Imagen 4**, se resume de forma breve el Sistema del Complemento y las moléculas que lo componen²⁹.

Imagen 4. Sistema del Complemento.

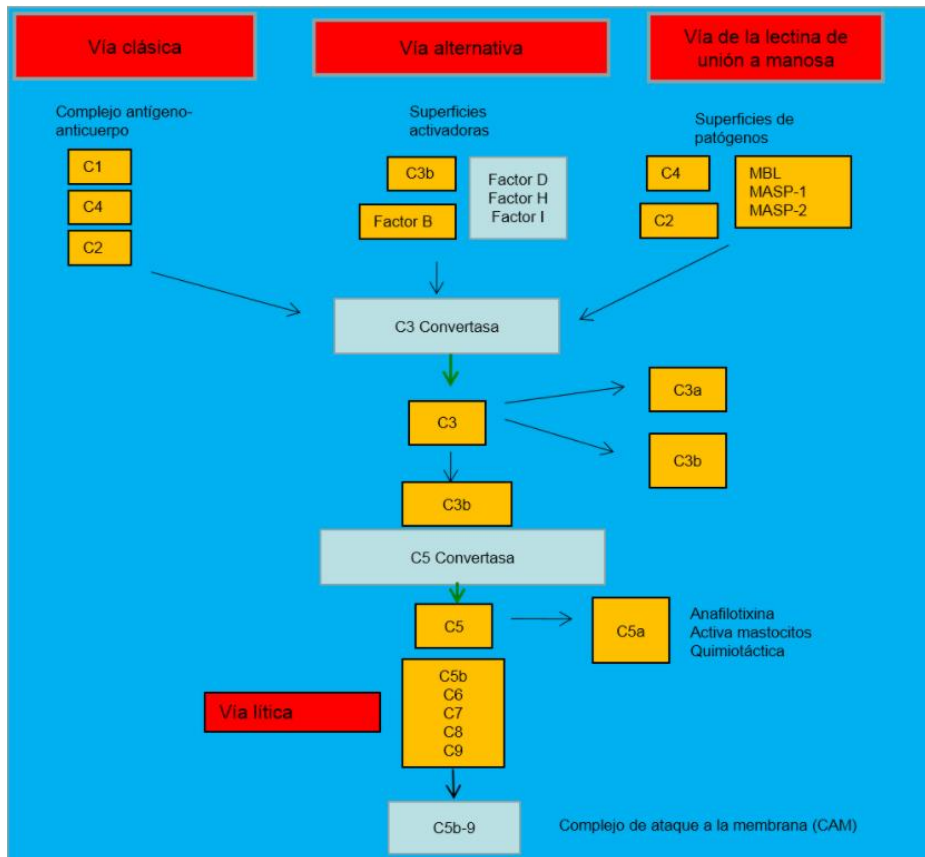


Imagen 4. Componentes del Sistema del complemento.: Gani, Z.

Todos los anteriores mecanismos de la respuesta inmune innata se ponen en marcha a partir de la inflamación. En este complejo proceso, existe un aumento de la permeabilidad capilar y migración de los leucocitos desde la sangre, hacia la zona afectada. Esto se logra a través de cambios estructurales en los capilares sanguíneos, que permiten el paso de los leucocitos desde la sangre al tejido. Además, el reclutamiento celular se lleva a cabo por las citocinas, especialmente el TNF- σ , pero además de eso, durante la inflamación se liberan muchas otras citocinas que estimulan a la inmunidad adaptativa, para poder finalmente erradicar al patógeno.

Funcionando de forma complementaria a la respuesta innata, tenemos a la respuesta adaptativa. Este grupo de mecanismos de la respuesta inmune se caracteriza por ser altamente específica, así como incrementar la capacidad defensiva ante patógenos a los que previamente ha sido expuesta.

Existen dos tipos de inmunidad adaptativa, la inmunidad celular y la inmunidad humoral. Ambas actúan en conjunto, a fin de eliminar a los microorganismos patógenos, pero se divide de esta forma para poder estudiarlas detalladamente.

La inmunidad celular recibe este nombre debido a que sus mecanismos son efectuados directamente por células, contrastando con la respuesta humoral la cual está representada por moléculas.

Como complemento a la primera reacción innata ante un estímulo inflamatorio, se desencadena la Respuesta Adaptativa (RA). Este mecanismo del sistema inmune se caracteriza por ser altamente específico, sin embargo, tiende a ser una respuesta “lenta” durante la primera exposición ante un determinado estímulo. No obstante, cuando suceda un posterior evento de estímulo con la misma molécula, la respuesta será iniciada de forma más rápida y con una mayor eficiencia, a este fenómeno se le conoce como memoria inmune y puede mantenerse presente en el organismo hasta el final de su vida^{75, 68}.

Los principales elementos de la RA son los linfocitos B y T que se activan frente a Patrones Antigénicos Asociados a Patógenos (PAMPs). A continuación, se hablará más a detalle de las particularidades de las divisiones de la RA⁷⁵.

1.4.1 Inmunidad celular.

Es mediada por linfocitos T y constituye el principal mecanismo de defensa contra microorganismos intracelulares (virus y algunas bacterias) promoviendo la destrucción de estos en fagocitos o eliminando células infectadas. Los linfocitos T se dividen en dos subpoblaciones principales: linfocitos T CD4+ cuya función principal es la secreción de citocinas, y los linfocitos T CD8+ que eliminan células infectadas y tumorales.

Esta reacción inmune se inicia al ingresar algún antígeno a través del epitelio, siendo captado por una Célula Presentadora de Antígenos (APC), como las células dendríticas o un macrófago. Cuando esta interacción sucede, la APC transporta estos antígenos hacia el linfonodo regional o el bazo, transformados en péptidos expresados en la membrana de la célula. Los linfocitos T *naive*, son diferenciados mediante la exposición de su Receptor de Células T (TCR) al antígeno, convirtiéndose en linfocitos T efectores y de memoria. Una vez sucedido este evento, los linfocitos T efectores migran hacia los sitios de infección o inflamación encontrando el antígeno para el cual son específicos.

Existen dos subpoblaciones de linfocitos T efectores: la subpoblación CD8+ encargada de la eliminación de células infectadas o tumorales que expresan HLC-I, y los linfocitos CD4+ que secretan citocinas las cuales ayudan en la activación de los macrófagos, haciéndolos más eficientes en la eliminación de microorganismos e induciendo al linfocito B a diferenciarse a célula plasmática para secretar anticuerpos específicos para ese microorganismo.

Se han descrito dos grupos de linfocitos T CD4+ (helper): TH1 y TH2, los cuales se diferencian en Th1 por el efecto de interleucina 12 (IL-12) amplificado por

la acción de interferón gamma (INF- γ), o en Th2 en presencia de IL-4. Esta diferenciación determina el tipo de funciones efectoras que tendrá cada linfocito.

Hablando en términos de agentes patógenos, los linfocitos T CD4+ son diferenciados a Th1 por el estímulo de patrones antigénicos relacionados a bacterias intracelulares y virus. Los linfocitos Th1 secretan INF- γ , TNF- α e IL-12.

Por otra parte, la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia Th2 es estimulada por la presencia de alérgenos y helmintos que inducen la secreción de IL-4. Estas células TH2 secretan IL-4 e IL-13 que induce el cambio de clase en el linfocito B hacia la producción de anticuerpos del tipo IgE, así como también secretan IL-5 que induce a la maduración de los eosinófilos⁷⁵.

1.4.2 Inmunidad humoral.

Esta respuesta es mediada por anticuerpos que son secretados por los linfocitos B. Los anticuerpos son péptidos compuestos que poseen una región constante (Fc) que determina su clase y funciones biológicas (G, A, M, D y E).

Y la región variable, mediante la cual los anticuerpos reconocen y neutralizan los microorganismos, disparando posteriormente diferentes mecanismos efectoras para su eliminación.

La función de los linfocitos B, y por ende el tipo de inmunoglobulina (anticuerpo) que producirá, está fuertemente relacionada a la interacción con los linfocitos T helper. La IL-4 secretada por parte del linfocito Th2, inducirá al linfocito hacia un isotipo productor de IgE, mientras que el INF- γ e IL-12 producido por los Th1, convertirán al linfocito B en una célula secretora de IgG⁷⁵.

1.4.2.1 Citocinas.

Como se ha documentado durante este trabajo, las diferentes células que componen el sistema inmune tienen una intrincada comunicación y sistemas de retroalimentación mutua, lo cual se suscita principalmente mediante la secreción de péptidos llamados citocinas.

Estas moléculas se caracterizan estructuralmente por estar constituidas de entre 120 a 180 aminoácidos. Desde la perspectiva funcional, poseen la capacidad de modular la función de células y algunos tejidos, siendo importante mencionar que las citocinas son funcionalmente *pleiotrópicas*, es decir, que una citocina es capaz de ejercer efectos biológicos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares, así como poseer la característica de ser *redundantes*, pues varias citocinas pueden contribuir al desarrollo del mismo efecto en una célula. Además, las citocinas pueden actuar en lo que se conoce como cascadas de amplificación, estimulando la producción de otras citocinas, ampliando así sus efectos biológicos, o bien

desencadenando un efecto antagonista, regulando de esta forma la respuesta originada o su intensidad¹¹.

A continuación, se describirá de forma breve algunas importantes citocinas que intervienen tanto en la respuesta innata como en la respuesta adaptativa:

Tabla 1. *Citocinas de la respuesta adaptativa.*

Citocina	Célula productora	Célula blanca	Efecto biológico
IL-1 β	Principalmente monocitos y macrófagos, pero también las células NK, linfocitos B, células dendríticas y macrófagos pueden producirla.	Hígado, SNC mastocitos y linfocitos T CD4+	*Estimula: producción de proteínas de fase aguda por parte del hígado. *Induce: al SNC a producir fiebre. *Promueve: secreción de histamina por los mastocitos, y promueve maduración y diferenciación de linfocitos T CD4+ ²¹ .
IL-10	Macrófagos activados, linfocitos B y linfocitos T	Macrófagos activados, linfocitos Th1, células NK, linfocitos B	*Disminuye: síntesis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 y GM-CSF por macrófagos activados, suprime la expresión de moléculas del MHC-II por estas mismas células. Inhibe la producción de IFN- γ por Th1 y células NK. Induce la diferenciación y secreción de IgG por linfocitos B ²¹ .

IL-12	Monocitos, macrófagos, linfocitos Th1, neutrófilos y células dendríticas.	Linfocitos T, células NK	*Estimula: proliferación de linfocitos T, mejora los efectos citotóxicos de las células NK, e incrementar la producción de IFN- γ por parte de macrófagos activados ³⁴ .
TNF- α	Macrófagos, linfocitos T y células endoteliales.	Hipotálamo, hígado, células endoteliales, macrófagos.	*Citocina pirógena. *Induce: en hipotálamo la respuesta adrenal. Logra que el hígado inicie la producción de proteína C reactiva. *Incrementa permeabilidad de las células endoteliales, facilitando el reclutamiento de linfocitos, neutrófilos y monocitos ²⁷ .

1.4.3 Interacción de las mvs bacterianas con la respuesta inmune.

Es un hecho plenamente documentado que dada la estructura que tienen, las MVs de diferentes géneros bacterianos tienen la facultad de interactuar con el sistema inmune del organismo hospedero, por ejemplo, se tiene evidencia que las MVs de las bacterias del género *Campylobacter* pueden inducir a la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-8, e IL-12³³. También, está documentado que las MVs de bacterias Gram (-) como *L. pneumophila* pueden interactuar directamente con células del sistema inmune, como es el caso de los macrófagos³⁶.

Se ha reportado en varios experimentos realizados *in vitro* con células epiteliales humanas la producción de citocinas y quimiocinas al ser estimuladas con MVs de *H. pylori*, sugiriendo así que este microorganismo Gram negativo, tiene la capacidad de inducir la producción de una respuesta proinflamatoria medida por IL-8, citocina de alta especificidad por los neutrófilos como célula diana⁵.

Análisis realizados a macrófagos provenientes del tejido pulmonar de pacientes infectados con *L. pneumophila* mostraron la presencia de MVs en el interior de su citoplasma, sugiriendo que las estructuras esféricas tienen la capacidad de interactuar con estas células *in vivo*.

Otro ejemplo de la capacidad para interactuar con células del sistema inmune, por parte de las MVs de bacterias Gram (-), es *Salmonella typhimurium*. En un experimento se observó que no solo estructuras cargadas con factores de virulencia son transportadas hacia el interior del macrófago, sino que estas MVs son capaces de activar a los macrófagos, así como a las células dendríticas, además de estimular la producción de citocinas como TNF- α e IL-12.

N. meningitidis ha sido también señalado en trabajos experimentales por la capacidad de sus MVs de estimular la producción de citocinas y quimiocinas tales como CCL2, CCL3, CCL5C, CXCL8, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL12p40, IL-12p70 y TNF- α .

De la misma forma, las MVs producidas por bacterias Gram (+) han demostrado tener efectos inmunogénicos. En un estudio proteómico realizado a MVs producidas por *S. aureus*, se encontró que estas estructuras son ricas en proteínas ligadoras de penicilina, contribuyendo a la resistencia antibiótica de este microorganismo.

Posteriormente, fue demostrado que las MVs de *S. aureus* pueden inducir a respuestas inflamatorias en fibroblastos dérmicos, pero no en células epiteliales humanas. Sugiriendo así, un rol potencial de las MVs en la modulación de la inflamación durante la dermatitis atópica³⁶.

Aunado a estas cualidades proinflamatorias, las MVs también pueden también proveer efectos antiinflamatorios sobre los monocitos. Un ejemplo de esto

sucede en *H. pylori*, cuyas MVs inducen la producción de IL-10 en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC). De forma similar, las MVs de *Brucella abortus* inhiben las respuestas mediadas por TLR como TLR2, TLR4 y TLR5, así como reducir la expresión de moléculas del MHC-II, inducida por INF- γ ³⁸.

1.5 Técnica de qRT-PCR.

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro*, que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN de un gen durante varios ciclos repetidos. En los que la secuencia blanca, es copiada fielmente. Para ello, la reacción utiliza la actividad de la enzima ADN polimerasa, la cual tiene la capacidad de duplicar la información genética almacenada en el ADN⁶⁴ (Maga, G).

La técnica de PCR permite la detección de la actividad genómica, teniendo la ventaja de realizarse con una cantidad relativamente reducida de material genético. Sin embargo, se obtienen resultados que no son cuantificables. Muchas técnicas han sido desarrolladas para solucionar este inconveniente, incluyendo la PCR en tiempo real (qPCR), la cual presenta la ventaja de ser relativamente fácil de realizar, y requiere pequeñas cantidades de templado⁸ (Budhia, S). Esta técnica recibe su nombre, debido a que el amplicón puede ser monitoreado de forma directa durante el proceso de la prueba⁷² (Stordeur, Poulin).

Otro detalle importante de mencionar es la capacidad de la técnica de emplear no solo ADN genómico, sino emplear ADN complementario obtenido a través del proceso de retro transcripción a RNA mensajero⁷³ (Tamay).

El grupo de investigación de Cañas y Fábrega en 2018 utilizó la técnica de qPCR para evaluar el potencial de bacterias saprófitas como inmunomoduladoras. Ellos emplearon la qPCR para evaluar la expresión de genes codificantes, para receptores de Dominio de Oligomerización de Nucleótidos (NOD), así como la expresión de IL-6 e IL-8⁹ (Cañas Fábrega). En este sentido, el presente trabajo es innovador, pues documenta la implementación de la técnica de qPCR para medir la expresión de genes de interleucinas que estimulan las MVs de BAL en un cultivo celular de leucocitos de sangre periférica.

Las BAL han demostrado a lo largo de décadas tener un importante papel en el balance de la salud de su hospedero humano, sirviendo como un director de orquesta para los fenómenos inmunes. Sin embargo, el uso de células bacterianas completas no es recomendable en todos los casos, por ejemplo, en pacientes fuertemente inmunosuprimidos o en tratamientos de quimioterapia³⁷ (Karapakis). El descubrimiento de la producción de MVs por parte de las BAL, así como su interacción con el sistema inmune, podría representar un nuevo paradigma en el uso de probióticos.

II. Justificación.

Existe una cantidad importante de evidencia científica referente al potencial de las MVs bacterianas, para modular el tipo e intensidad de eventos inmunes. En ese sentido, las MVs de BAL demostraron en un trabajo previo (Gutiérrez, 2020 y Lonngi 2022) que estas estructuras tienen la capacidad de inhibir crecimientos *in vitro* de *S. typhimurium* y *E. coli* respectivamente. Además de demostrar que dichas estructuras, arrastran constitutivamente antígenos y péptidos antimicrobianos tales como las BLIS (Bacteriosine like substances). Por lo que resulta sumamente atractiva la posibilidad de desarrollar un probiótico acelular que posea las facultades de las células completas de origen, en igual o mayor magnitud. Asimismo, las MVs de BAL podrían iniciar una adecuada respuesta inmune en aquellos pacientes inmunosuprimidos por una comorbilidad presente, por ejemplo, hipersensibilidad, diabetes, neoplasias (cáncer), u otra condición que comprometa una respuesta adversa asociada al uso de BAL completas.

Estas características de las BAL, son particularmente interesantes de observar en la microbiota intestinal de *Rattus norvegicus* de vida libre, pues estas les confieren la resistencia a un sinnúmero de microorganismos patógenos, capaces de producir infecciones agudas, en muchos otros organismos, incluido el ser humano.

Es importante comprender el contexto biológico de las MVs de BAL y su efecto sobre células del sistema inmune. Ya que los eventos inmunes no suceden de forma aislada, sino que se trata de un sistema intrincado de eventos que involucra una serie de elementos que tienen su efecto en diferentes tejidos, células, receptores y moléculas. De tal manera que, es importante realizar un estudio puntual de los efectos de las MVs de BAL sobre el sistema leucocitario sanguíneo, que nos permita evaluar cuales son los efectos de estas sobre la activación celular mediante la detección de interleucinas. Para el sistema inmune los leucocitos representan en su totalidad una gran parte de sus mecanismos efectores, de este modo el estudio de estas células sentará bases sólidas y justificadas a trabajos subsecuentes en los que se dirijan investigaciones más específicas.

III. Objetivos.

Objetivo general.

Estandarizar e implementar la técnica de qRT-PCR para la amplificación de IL-1 β e IL-10, a partir de leucocitos sanguíneos obtenidos de *Rattus norvegicus* y estimuladas con MVs de BAL en condiciones de cultivo.

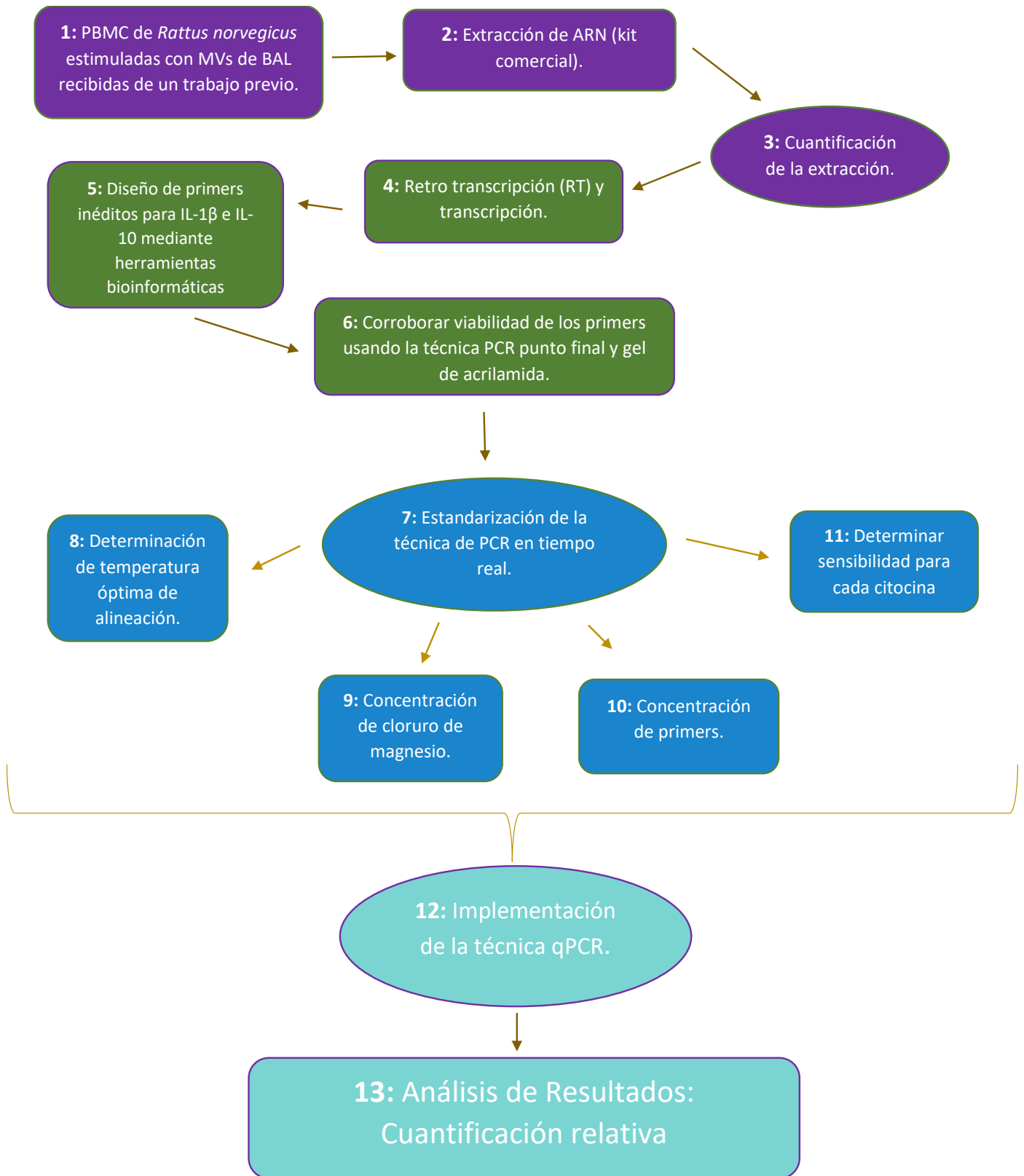
Objetivos particulares:

1. Realizar la extracción del RNA a partir de PBMCs de *Rattus norvegicus* empleando un kit comercial, siguiendo las especificaciones del fabricante.
2. Confirmar la pureza de la muestra mediante electroforesis (Nano Drop 200, UV- vis Spectrophotometer), siguiendo las especificaciones del fabricante.
3. Diseñar los primers específicos para la amplificación de IL-1 β e IL-10
4. Determinar la temperatura óptima de hibridación para estos primers.
5. Determinar la concentración óptima del templado y la concentración mínima de detección para el protocolo de qRT-PCR.
6. Implementación de la técnica de qRT-PCR para la amplificación de amplificación IL-1 β e IL-10 y su cuantificación.
7. Realizar la cuantificación del amplicón obtenido comparándolo con un gen constitutivo (HPRT1) mediante el método de cuantificación relativa mediante la comparación del punto de cruce (cross-point/Cp).
8. Evaluar la expresión de genes que codifiquen para la síntesis de interleucinas (IL) propias de la respuesta inmune adaptativa, mediante la técnica de qRT-PCR cuantitativo, en cultivos celulares de mononucleares sanguíneos de *Rattus norvegicus*, tras ser expuestos a microvesículas (MVs) de bacterias ácido-lácticas (BAL).

IV. Hipótesis.

Si la presencia de BAL tiene efecto inmunoestimulante en leucocitos sanguíneos, entonces las MVs de éstas, inducirán la producción de interleucinas propias de la inmunidad innata y adaptativa en condiciones *in vitro*, y esta actividad podrá ser evaluada mediante la técnica de qRT-PCR.

V. Material y método experimental.



5.1 Muestras de leucocitos de sangre periférica.

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon leucocitos de sangre periférica las cuales habían sido estimuladas con microvesículas de BAL en un trabajo previo. Estas células fueron obtenidas de sangre de *Rattus norvegicus* de laboratorio.

Las cepas usadas para estimular estas células fueron una cepa de referencia de *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 314) y una cepa de *Lactobacillus acidophilus* obtenida del tracto gástrico de *Rattus norvegicus* de vida libre, obtenidas de asentamientos urbanos y caracterizada molecularmente mediante PCR y bioquímicamente mediante el sistema Apiweb 50 CHL, la cual fue denominada cepa 54 durante trabajos anteriores.

Se recibieron 48 muestras contenidas en microtubos y conservadas en Trizol (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA). Las muestras se clasificaron en diferentes grupos de acuerdo con la cepa de BAL, con las que fueron estimuladas, así como la concentración: 20 µl y 40 µl. Asimismo, algunas de estas muestras fueron estimuladas con 2µM Apolactoferrina, estableciendo un criterio más de clasificación. Estos grupos se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Grupos de muestras de leucocitos estimulados con MVs de BAL.

Número de muestras	Descripción de la muestra
24	Células sin tratamiento
4	20 µg MVS de la cepa ATCC
4	20 µg MVS de la cepa 54
4	40 µg MVS de la cepa 54
4	40 µg MVS de la cepa ATCC
4	20 µg MVS estimuladas con apo-Lfb de la cepa 54
4	40 µg MVS estimuladas con apo-Lfb de la cepa 54

5.2 Extracción de ARN.

Se realizó la extracción de ARN empleando el kit comercial TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA) empleando el siguiente procedimiento señalado por el fabricante:

- 1) Se adicionó 100 µl de cloroformo y homogenizó en vórtex por 1 minuto.
- 2) Incubó a temperatura ambiente por 3 minutos.
- 3) Centrifugó a 12,000 rpm x 15 minutos a 4° C.
- 4) Transfirió Fase Acuosa a un tubo Eppendorf.
- 5) Se adicionó 250 µl de alcohol isopropílico y homogenizar en vórtex.
- 6) Incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 7) Centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4° C.
- 8) Decantó el sobrenadante y adicionar 500 µl de etanol al 75% a 4° C.
- 9) Se Re suspendió en 500 µl de etanol al 75%
- 10) Se homogenizó en vórtex.
- 11) Se Centrifugó a 7,500 rpm durante 5 minutos a 4° C.
- 12) Decantó el sobrenadante.
- 13) Se secó al aire durante 10 minutos
- 14) Re suspender en 50µl de agua libre de RNAasas.
- 15) Se incubó en bloque a 55° C durante 15 minutos.

5.3 Cuantificación de ARN.

Se realizó la cuantificación del ARN obtenido mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA).

5.4 Retrotranscripción.

Para la retrotranscripción se usó el kit comercial de la Promega kit Goscript reverse transcription system (PROMEGA, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

Las muestras se dividieron en grupos acorde a los resultados de la cuantificación del ARN obtenidos y se realizaron los siguientes cálculos obteniendo siempre reacciones individuales de 15µl.

En cada caso, la Mezcla I fue sometida a incubación a 70°C y posteriormente dejada a reposar en hielo mientras se preparaba la Mezcla II, incorporando finalmente Mezcla I y Mezcla para realizar la reacción de retrotranscripción.

El protocolo de retrotranscripción se realizó empleando un termociclador Eppendorf E5331 MasterCycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) siguiendo las siguientes condiciones de amplificación: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 15 minutos a 70°C.

Finalmente se cuantificó el cDNA obtenido empleando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA) y se prepararon alícuotas de trabajo de un volumen total de 15 µl y una concentración de 25 ng/µl de ADN complementario.

5.5 Diseño de primers.

Se diseñaron primers inéditos para cada citocina empleando software Primer3 input V0.4.0 a partir de las secuencias publicadas en Gene Bank IL-1β M98820.1, E05490.1, XM032902343.1, BC091141.1; IL-10 x60675.1, NM012854.2, L02926.1 (*Rattus rattus*). Los cuales se corroboró su alineación a una región conservada de las secuencias de referencia, de forma individual por cada citocina empleando el software Bioedit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5. Estos primers fueron sintetizados de forma comercial (Oligo 4t, Guanajuato).

5.6 Estandarización de la técnica de PCR Punto Final.

Se realizó una curva de temperatura para identificar las condiciones óptimas de amplificación, la cual iba de 58°C hasta los 62°C con un intervalo de 2°C, y usando un termociclador Eppendorf E5331 MasterCycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Se emplearon reacciones de 12.5µl de Master Mix (MyTaq, Biorline, USA), así como 50 ng de templado y 10 µmol de cada primer.

5.6.1 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en un transiluminador de luz (Apollo, Instrument, Claremont) para identificar la temperatura óptima.

5.7 Estandarización de la técnica de qRT-PCR.

Se consideraron los resultados observados durante el gradiente de temperatura del PCR Punto final para realizar esta técnica. Esta metodología, se implementó en un termociclador Agilent technologies Mx3005P (Stratagene, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA). Se empleó 10 µl del kit comercial SensiFAST SYBR LoRox (Master mix x1 MgCl₂ 3 mM. BioLine, Toronto, Canadá) en concentración 1x, además, se emplearon dos concentraciones de templado (50 ng y 75 ng), así como de primer (10 µM y 5 µM) para determinar las condiciones idóneas para la amplificación. En cada uno de los casos, las condiciones empleadas fueron las siguientes: desnaturalización 10 segundos a 95°C, alineación 10 segundos a 60°C y enlongación 20 segundos a 72°C por 40 ciclos.

Por otro lado, se empleó el gen codificante para la enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa 1 (HPRT1) como gen constitutivo. Para la amplificación de este gen se emplearon primers diseñados en un trabajo previo y se emplearon las siguientes condiciones: desnaturalización 5 segundos a 95°C, alineación 10 segundos a 50°C y enlongación 20 segundos a 72°C por 40 ciclos. Posteriormente, la temperatura se elevó a 95°C para obtener una curva de disociación. Para cada reacción se empleó 10 µmol de primer y 50 ng de templado.

5.8 Análisis de resultados.

Para el análisis de los resultados obtenidos se usó el método de cuantificación relativa mediante la comparación del punto de cruce (cross-point/Cp), de las muestras con cada citocina, contra las 48 muestras contra el gen HPRT1.

Las ecuaciones para calcular Delta, delta T para el método de cuantificación relativa son:

C_p de la muestra - C_p (gen de referencia) = ΔC_p .

ΔC_p de la muestra - ΔC_p del calibrador = $\Delta \Delta C_p$.

Cantidad relativa = $2^{-\Delta \Delta C_p}$.

Imagen 6. Primers diseñados para IL-10.

Primer3 Output

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
WARNING: Left primer is unacceptable: Tm too low

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	378	19	55.67	52.63	4.00	0.00	CTGGGAGAGAAGCTGAAGA
RIGHT PRIMER	545	22	57.32	40.91	4.00	1.00	GCAGTTGATGAAGATGTCAAAC

SEQUENCE SIZE: 1307
INCLUDED REGION SIZE: 1307

A PRODUCT SIZE: 168, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

X60675.1	TCCC	TGGGAGAGAAG	CTGAAGACC
NM 012854.2	TCCC	TGGGAGAGAAG	CTGAAGACC
L02926.1	TCCC	TGGGAGAGAAG	CTGAAGACC
Fw	---	TGGGAGAGAAG	CTGAAGACC---

X60675.1	TGAGTTT	TGACATCTTC	ATCAAATG	ATAA
NM 012854.2	TGAGTTT	TGACATCTTC	ATCAAATG	ATAA
L02926.1	TGAGTTT	TGACATCTTC	ATCAAATG	ATAA
Rv	---	TTT	TGACATCTTC	ATCAAATG---

Imagen 6. A) Captura de pantalla del programa Primer3 Output, donde se muestra la secuencia de los primers Forward (Fw) y Reverse (Rv), así como su Tm, porcentaje de GC y longitud del producto esperado (señalado en el rectángulo rojo). B) Captura de pantalla del programa Bioedi, donde se muestra la alineación de los primers en fragmentos conservados de secuencias encontradas en GenBank.

6.2 PCR Punto final.

El resultado de la prueba muestra una banda de un solo producto de replicación, el cual correspondió al tamaño del producto esperado. Además, se determinó mediante el gradiente, que la temperatura ideal para la amplificación todas las citocinas es 60°C, tal como se muestra en la Imagen 7 e Imagen 8.

Imagen 7. Gradiente de temperatura de IL-1 β

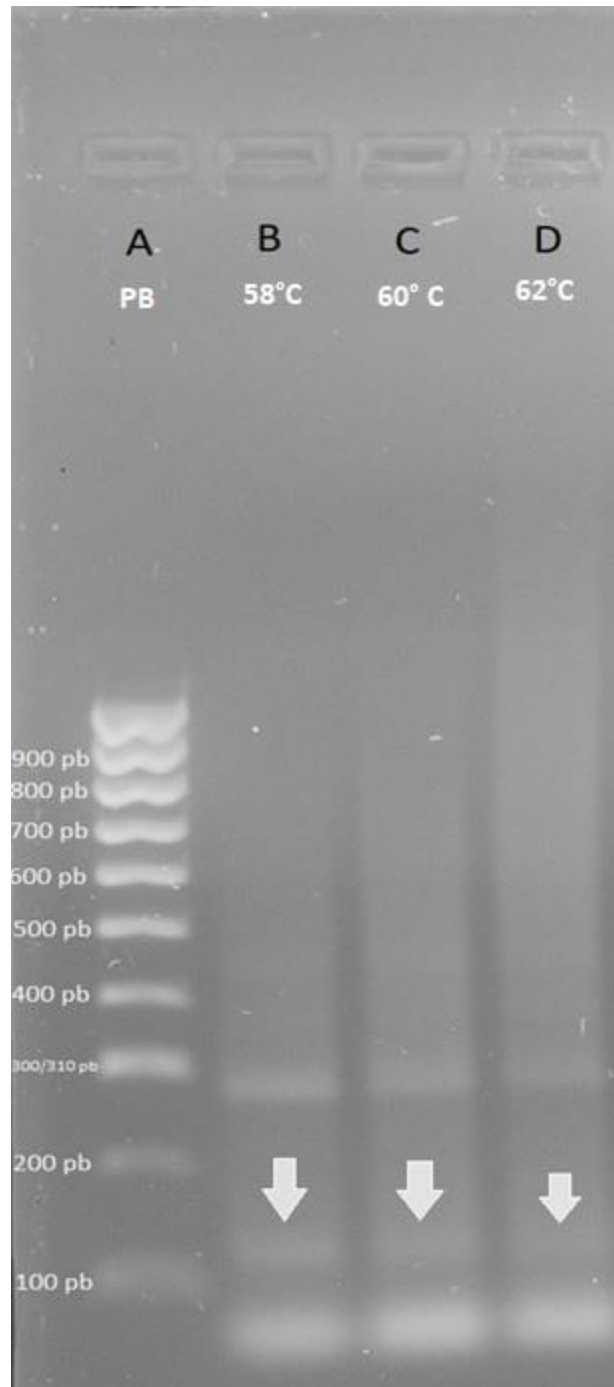


Imagen 7. Gel de agarosa al 1.5%. Gradiente de IL-1 β . Carril A: marcador de pares de bases (pb). Carril B: La flecha gris muestra la banda correspondiente al tamaño del producto esperado obtenida a 58° C. Carril C: La flecha gris muestra la banda obtenida al tamaño esperado, obtenida a 60°. Carril D: La flecha gris muestra la banda correspondiente al tamaño del producto esperado, obtenida a 62° C.

6.3 Estandarización de la técnica de qPCR.

Una vez definida la temperatura ideal de amplificación con la técnica de PCR Punto Final, se identificó la concentración adecuada del templado y primer para cada caso.

Al realizar las pruebas con IL-1 β , se observó que la reacción donde se empleó 50 ng de templado y 10 μ M de primer (**Imagen 9**), presentó una amplificación más rápida que las reacciones con 75 ng/ 5 μ M y 50 ng/ 5 μ M, del mismo modo, la intensidad de la luminiscencia al superar el punto de corte fue la más alta entre las tres reacciones, sugiriendo una respuesta de mayor intensidad.

Por otro lado, las reacciones de 75 ng/ 5 μ M (**Imagen 10**), 50 ng/ 5 μ M (**Imagen 11**), presentaron una velocidad de amplificación muy similar. Sin embargo, la intensidad de la respuesta en el caso de la reacción con 75 ng/ 5 μ M, fue la más alta entre estas dos sugiriendo una mayor intensidad de la reacción.

Imagen 9. qPCR de IL-1 β al emplear 50 ng de templado/ 10 μ M del primer.

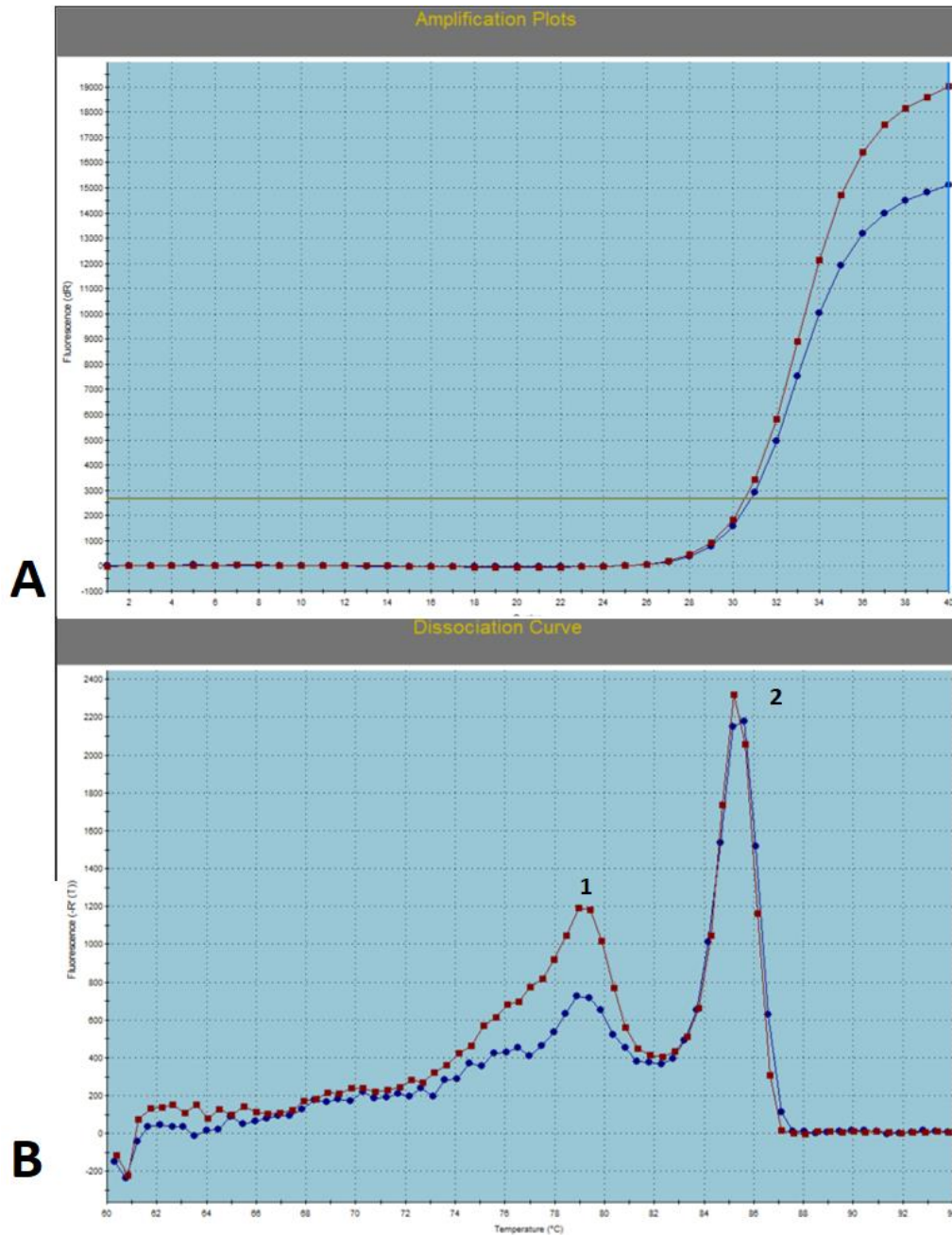


Imagen 9. Captura de pantalla del software MxPro3000. A) curva de amplificación de IL-1 β usando 50 ng de templado/ 10 μ M de primer. Se observa un solo producto amplificado. Ambas curvas representadas en el histograma corresponden a la misma citocina y las mismas condiciones. Sin embargo, son dos muestras seleccionadas de forma aleatoria de entre las 26 muestras trabajadas. B) Curva de disociación de esta reacción. Se aprecia un primer pico (1) el cual corresponde a un producto inespecífico, y un segundo pico (2) el cual corresponde al producto esperado.

Imagen 10. qPCR de IL-1 β al emplear 75 ng de templado/ 5 μ M de primer.

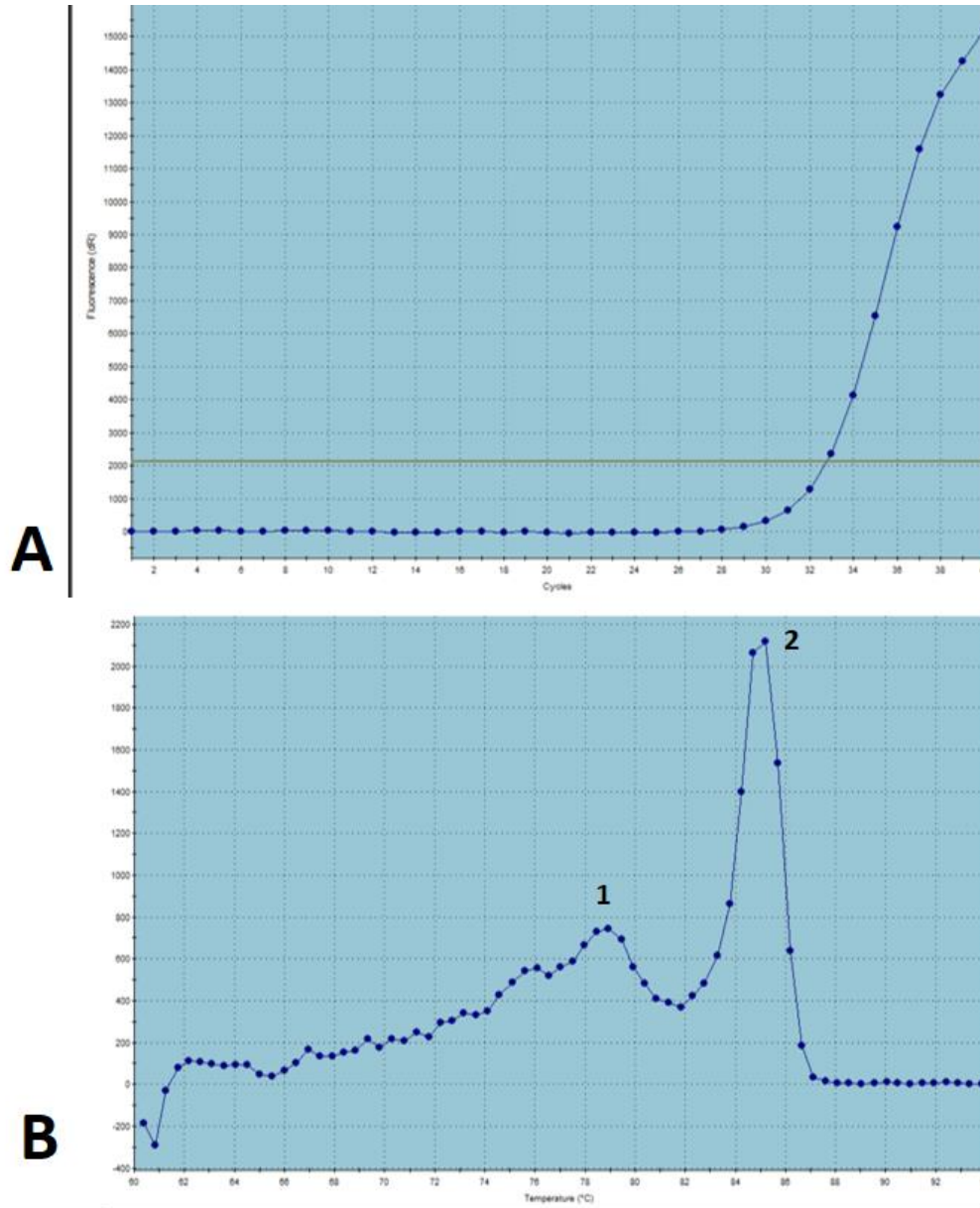


Imagen 10. Captura de pantalla del software MxPro3000. A) curva de amplificación de IL-1 β usando 75 ng de templado y 5 μ M de primer. Se aprecia una amplificación más lenta que lo observado en el caso anterior, y con una intensidad menor, con un solo producto amplificado. B) Curva de disociación de esta reacción, en donde se observa un pequeño pico inicial (1) que puede ser un producto inespecífico, seguido de un pico principal (2) correspondiente al producto deseado.

Imagen 11. qPCR de IL-1 β al emplear 50 ng de templado/ 5 μ M del primer.

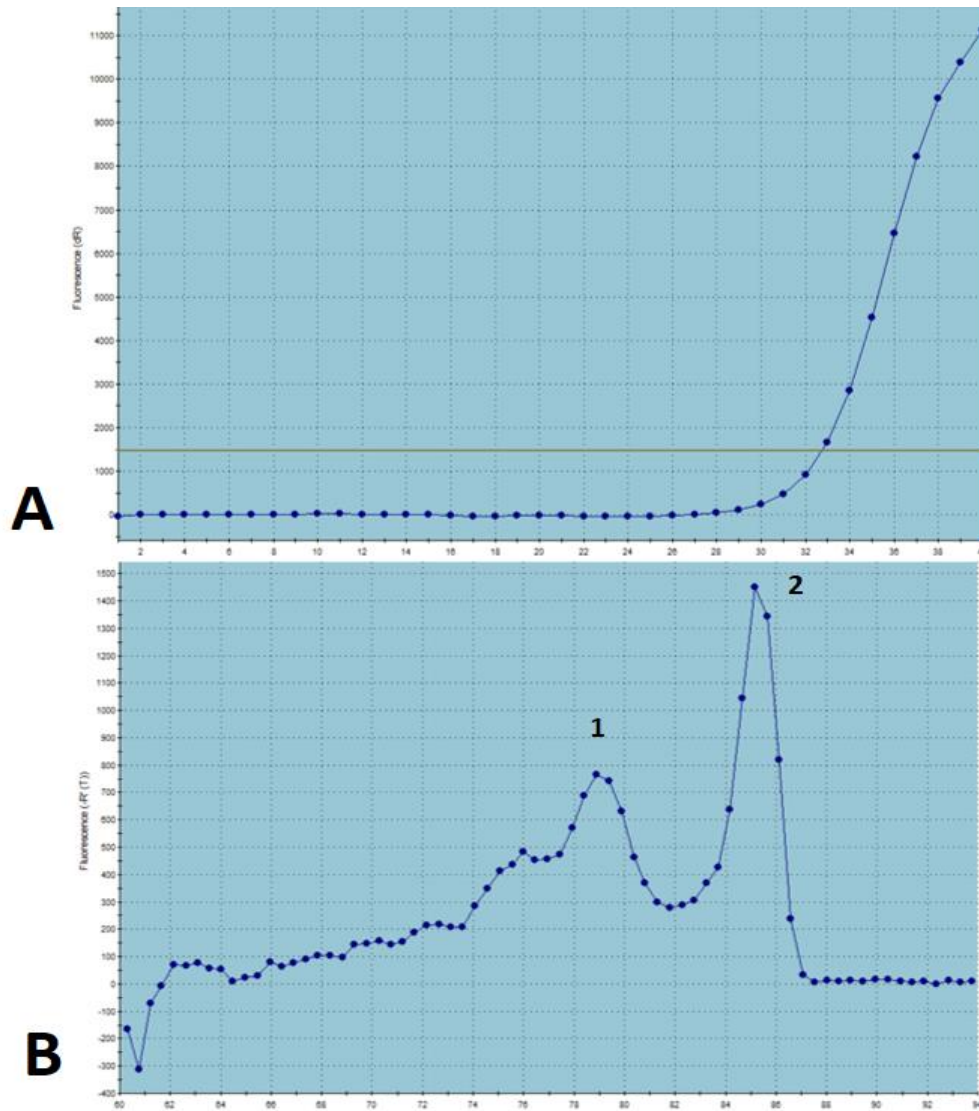


Imagen 11. Captura de pantalla del software MxPro3000. A) curva de amplificación de IL-1 β usando 50 ng de templado y 5 μ M de primer. La intensidad de la luminiscencia en esta curva es la más baja entre las tres reacciones de esta citocina. B) Curva de disociación de esta reacción. Se observa un pico (1) muy corto, seguido de un pico principal (2), correspondiente al producto deseado.

En el caso de IL-10, se observaron resultados considerablemente similares, en la reacción realizada con 50 ng de templado/ 10 μ M de primer como la reacción con amplificación más rápida y de mayor intensidad (**Imagen 12**). Mientras que la reacción utilizando 75 ng/ 5 μ M, muestra una velocidad e intensidad inferior a la primera reacción (**Imagen 13**), pero superior a lo que se observa en la reacción con 50 ng/ 5 μ M (**Imagen 14**).

Imagen 12. qPCR de IL-10 al emplear 50 ng de templado /10 μ M de primer.

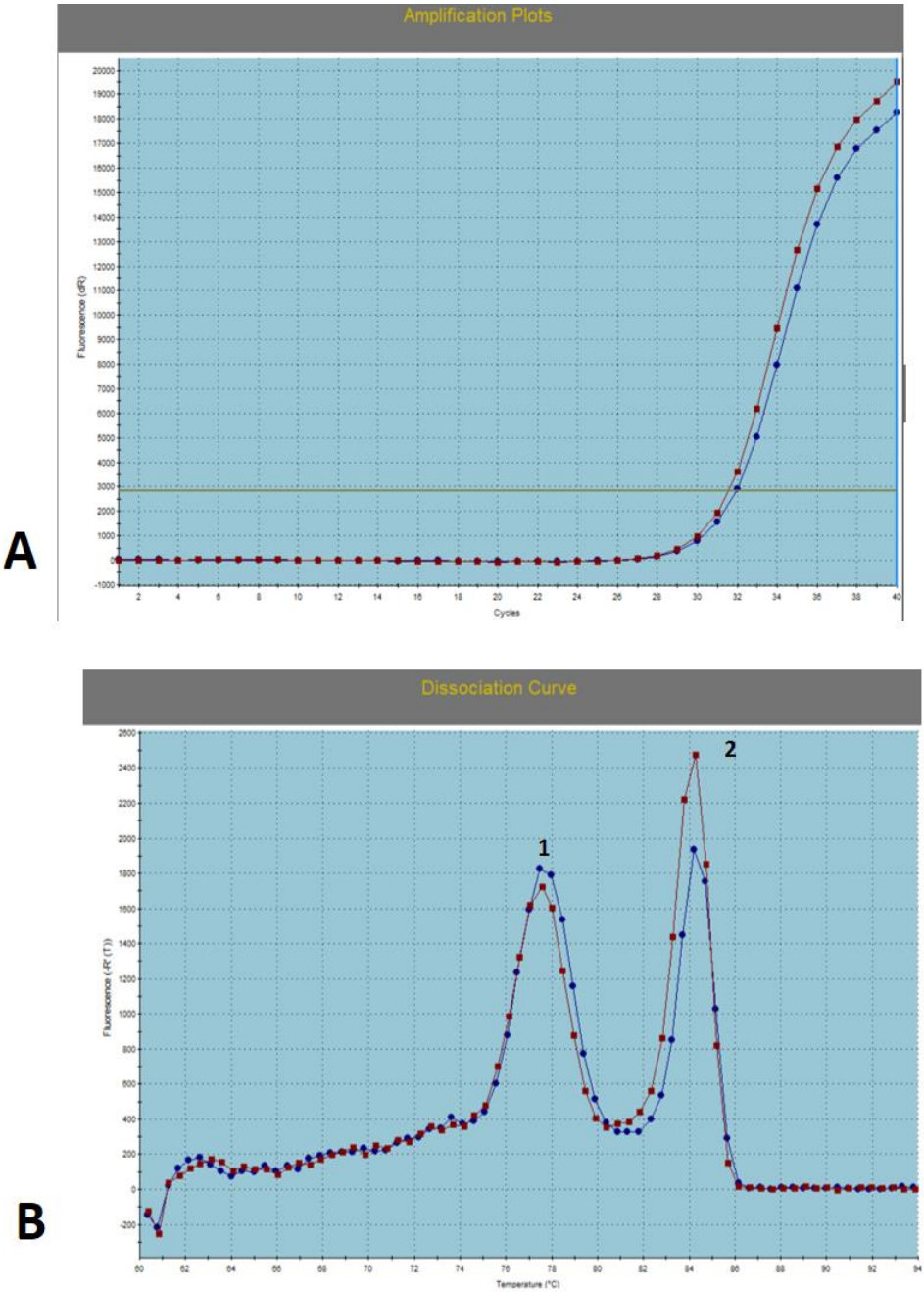


Imagen 12. Captura de pantalla del software MxPro3000. A) curva de amplificación de IL-10 empleando 50 ng de templado y 10 μ M de primer. Se observa un único pico correspondiente al producto deseado. Ambas curvas observadas en el histograma corresponden a la misma citocina bajo las mismas condiciones. Sin embargo, son dos muestras seleccionadas de forma aleatoria. B) Curva de disociación de esta reacción. Se aprecian dos picos en la curva, donde el primer pico (1) atribuye a una disociación irregular entre los productos, y el segundo pico (2) correspondiente al producto esperado. Sin embargo, la sensibilidad de la prueba queda confirmada al contrastarla con lo observado en el gel de agarosa al 1.5%.

Imagen 13. qPCR de IL-10 al emplear 75 ng de templado /5 μ M de primer.

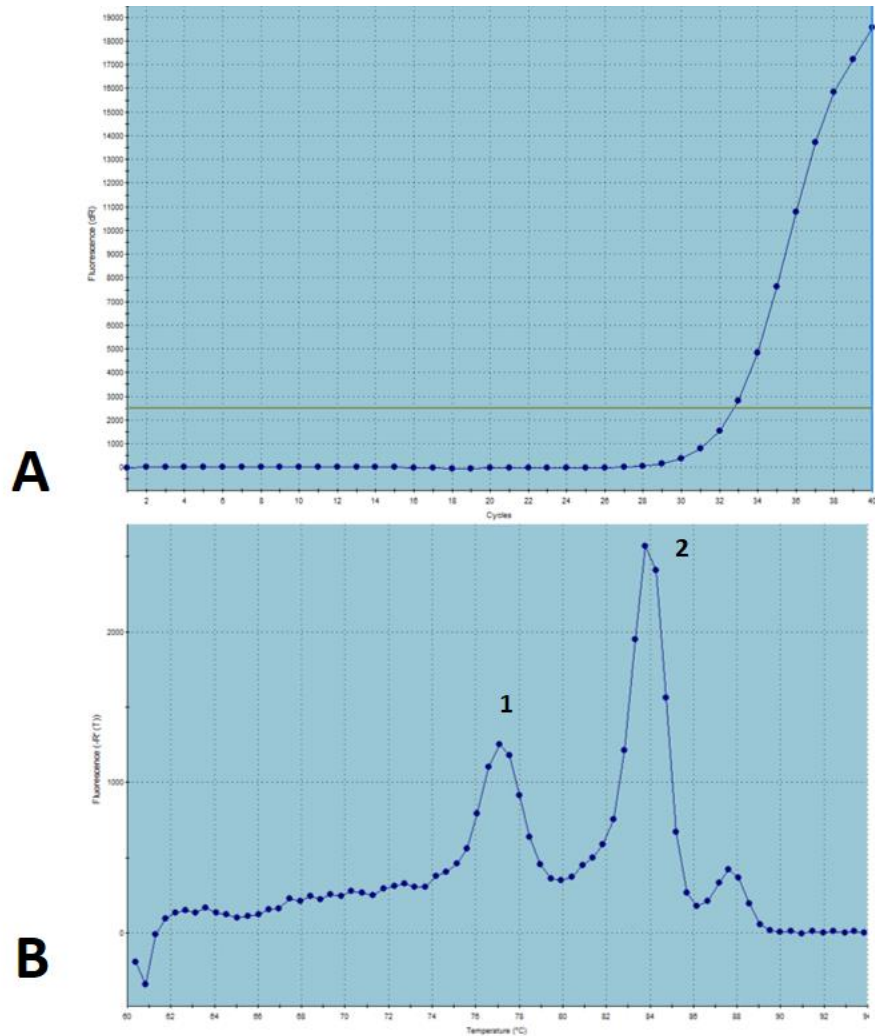


Imagen 13. Captura de pantalla del software MxPro3000. A) Curva de amplificación de IL-10 empleando 75 ng de templado/ 5 μ M de primer. B) Curva de disociación de esta reacción. donde observar 2 picos. El primero (1) corresponde a productos inespecíficos de la reacción. El segundo (2), corresponde al producto esperado. Finalmente observamos un pequeño pico final que es atribuible a un producto inespecífico.

Imagen 14. qPCR de IL-10 al emplear 50 ng de templado/5 μ M de primer.

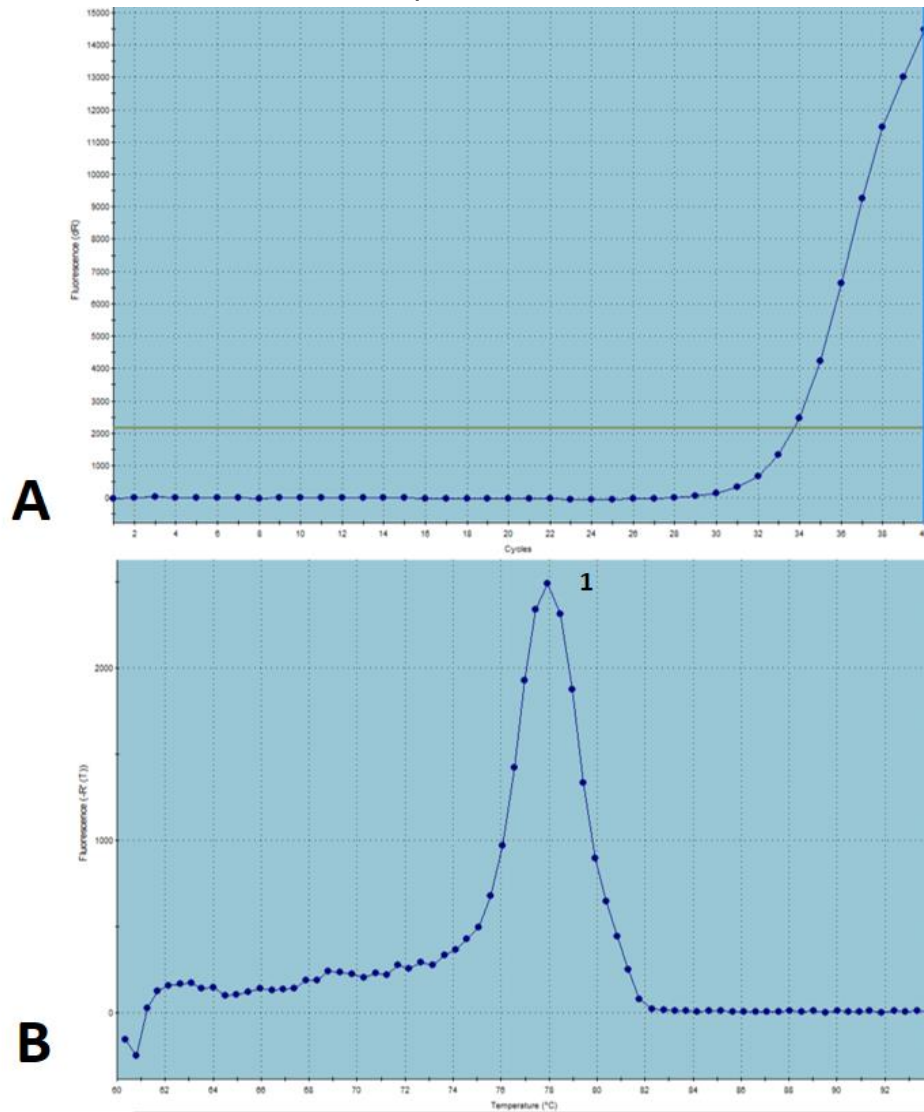


Imagen 14. Captura de pantalla del software MxPro3000. A) curva de amplificación de IL-10 utilizando 50 ng de templado/ 5 μ M de primer. Esta reacción es la menos eficiente de las tres realizadas para esta citocina. Resultando la más lenta para superar el umbral, así como la de menor intensidad fluorescente. B) Curva de disociación para esta reacción. En este caso se observa un único pico (1) el cual confirma la sensibilidad de la técnica.

6.4 Implementación de la qPCR.

Se logró amplificar el gen constitutivo HPTR-1, de las muestras de leucocitos de sangre periférica de rata, tal como se muestra en la **Imagen 15**.

Imagen 15. Curva de amplificación del gen constitutivo HPRT-1.

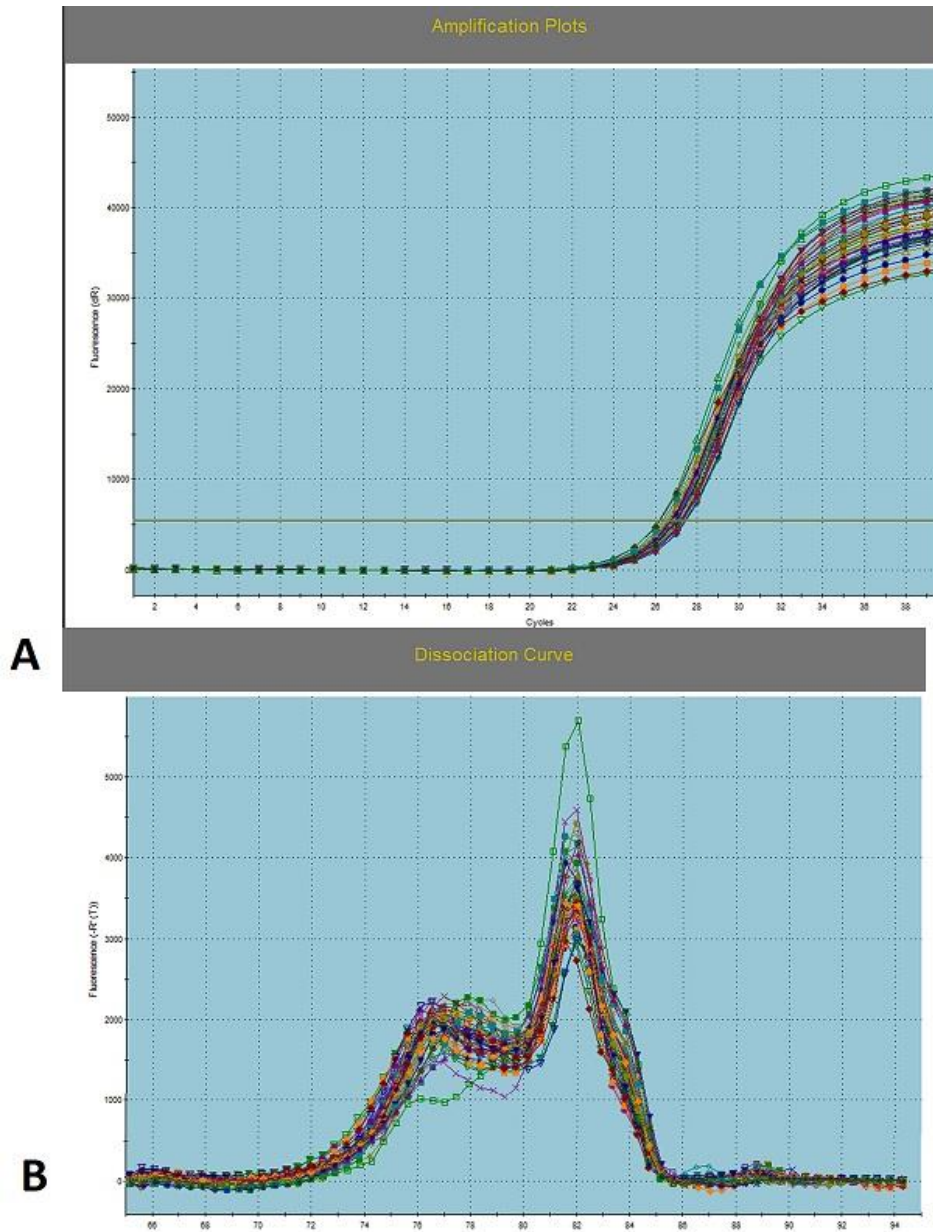


Imagen 15. Captura de pantalla del software MxPro3000. A) curva de amplificación del gen constitutivo HPRT-1. B) curva de disociación del gen constitutivo.

En las **Imágenes 16** y **17**, se muestran los resultados de las reacciones aplicadas al total de muestras en cada citocina, empleando las condiciones óptimas para su amplificación, previamente establecidas.

Imagen 16. qPCR de IL-1 β .

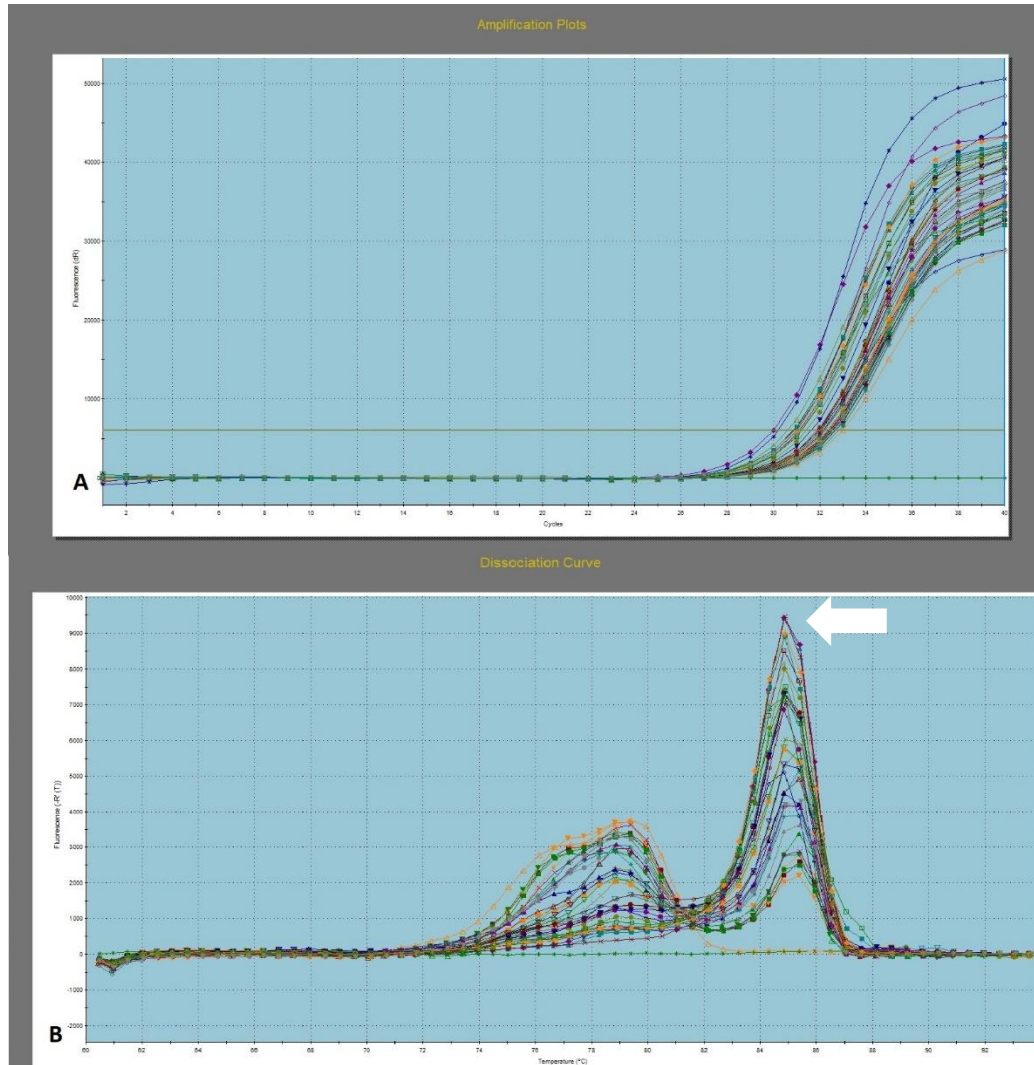


Imagen 16. A) Curva de amplificación de IL-1 β . B) Curva de disociación de IL1- β señalando, con la flecha blanca el pico correspondiente a los productos esperados.

Imagen 17. qPCR de IL-10.

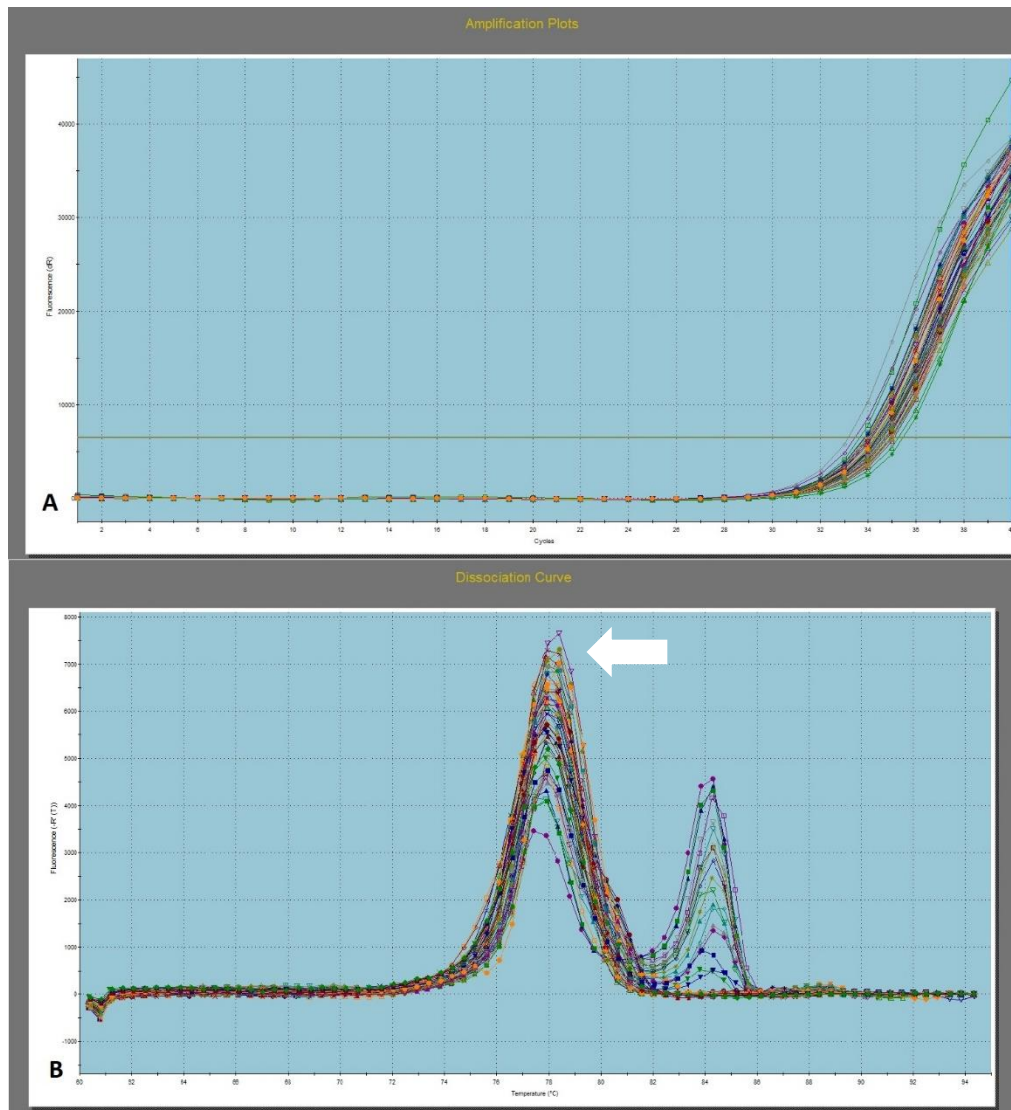


Imagen 17. A) Curva de amplificación de IL-1 β . B) Curva de disociación de IL1- β , señalando con la flecha blanca el pico correspondiente a los productos esperados.

6.5 Cuantificación.

Los resultados del análisis de Cross point, se realizaron de forma individual para cada citocina en cada muestra. Los resultados presentados en las siguientes tablas se expresan en logaritmo base 10.

Tabla 3. Resultados de la cuantificación empleando la concentración de 50µL/ 10 µM

IL-1β		IL-10	
Muestra	Resultado	Muestra	Resultado
1	0.003	1	0.315
2	0.083	2	0.086
3	0.02	3	0.099
7	0.134	7	0.215
8	0.164	8	0.09
9	0.059	9	0.34
10	0.077	10	0.214
11	0.081	11	0.3
12	0.06	12	0.044
13	0.086	13	0.199
14	0.376	14	0.203
15	0.44	15	0.321
16	0.141	16	0.035
19	0.659	19	0.035
20	0.215	20	0.492
21	0.507	21	0.29
22	0.385	22	0.668
23	0.096	23	0.047
24	0.33	24	0.292
25	0.036	25	0.104

Tabla 3. Cuantificación final de todas las muestras en ambas interleucinas, empleando 50µl de templado/10µmol de primer.

VII. Discusión.

El presente trabajo es parte de una línea de investigación enfocada principalmente a evaluar el efecto inmunoestimulante *in vitro* de un probiótico elaborado a base de Microvesículas (MVs) de bacterias Acido Lácticas (BAL), aisladas del tracto gastrointestinal (TGI) de *Rattus norvegicus* de vida libre (PAPIIT IT201521). De lo anterior deriva el trabajo de tesis de licenciatura titulado: Estandarización de una técnica de cultivo celular de leucocitos sanguíneos de rata Wistar, para ser estimulados con Microvesículas (MVs) de Bacterias Acido Lácticas (BAL), la cual permitió evidenciar la expresión de interleucinas como resultado de la inmunomodulación que inducen dichas estructuras, tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa.

Del trabajo anterior se desarrolló el presente proyecto, donde se estandarizó una prueba de qRT-PCR e implementar dicha técnica para la amplificar IL-1 β e IL-10, a partir de leucocitos sanguíneos obtenidos de *Rattus norvegicus* (cepa Wistar), estimuladas con MVs de BAL en condiciones de cultivo.

La técnica de PCR se basa en emular el proceso por el cual el ADN se replica de forma natural; separando mediante calor las dobles hélices del material genético, y empleando enzimas exógenas para lograr la replicación de una secuencia de nucleótidos previamente seleccionados, con un bloque complementario diseñado por el investigador denominado *primer*⁶⁹.

La técnica de PCR ha sido sujeta a innovación a través del tiempo, esto debido a que la PCR Punto Fina, tiene la limitación de expresar resultados exclusivamente cuantitativos, además, de requerir pasos adicionales para trabajar con ARN⁸.

En este trabajo se empleó una variación de esta técnica denominada qRT-PCR, la cual es una reacción en dos pasos: en el primero se extrae el ARN de la muestra, con el fin de someter este ácido nucleico a un proceso de retrotranscripción (RT) y convertirlo en ADN complementario (cDNA), esto convierte este material genético en cadenas dobles de cDNA, más resistente al calor, además de volverlo viable para la técnica de PCR, tal como lo comenta Farkas en 2009.

Durante este paso, la pureza del ARN extraído es un factor determinante para el éxito de la reacción⁶⁹ y de acuerdo con lo que comenta Fleige, *et al.* en 2006, es sumamente recomendable realizar constantes mediciones de la pureza del ARN durante el procedimiento. En el presente trabajo experimental, se empleó el reactivo TRIzol para extraer el ARN a partir de leucocitos de sangre periférica en condiciones de cultivo celular y se corroboró su pureza empleando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000, observando una alta pureza en el ARN obtenido tras el uso del mismo.

El reactivo TRIzol fue elegido debido a la ventaja que ofrece al separar en tres fases distintas las proteínas, ADN y ARN de una muestra⁵⁶. Sin embargo, de acuerdo con Rio en 2012, al elegir este reactivo es importante considerar que es costoso y que los comprimidos de ARN son difíciles de resuspender. La extracción convencional del ARN, mediante fenol puede ser más práctica en algunos casos. Sin embargo, la muestra es más susceptible a la contaminación. Existen diferentes métodos para extraer ARN. Para la estandarización de una qRT-PCR, la muestra es fundamental debido a que, a partir de la pureza, aumenta la especificidad de la reacción. En 2016, Oliveira y colaboradores, compararon tres métodos de extracción de ARN: TRIzol, kit comercial Dorect-zol RNA MiniPrep y el kit comercial RNeasy mini kit. Los resultados de su experimento revelaron que la cantidad de ARN obtenida mediante el TRIzol, fue la más alta. Sin embargo, la pureza del ARN obtenido fue la menor entre las tres. En contraste, en el presente trabajo, la cantidad de ARN obtenido con dicho reactivo fue alta, la pureza del mismo fue adecuada. Consiguiendo una relación 260/280 de absorbancia por encima de 1.8 con todas las muestras procesadas.

Otro factor a considerar cuando se emplea la técnica de qRT-PCR, es la enzima empleada para la retrotranscripción. Para convertir las cadenas de ARN en cDNA, en el presente trabajo, se empleó un kit comercial que integra una enzima RTasa, sintetizada a partir de Virus Moloney Leucemia Murina (MMLV).

En 2019 el equipo de Zucha y colaboradores, realizaron una comparativa empleando 11 kits comerciales de retrotranscripción distintos. La mayoría de estos contenían una enzima derivada de MMLV, uno no especificaba el origen de la RTasa empleada, y solo uno incluía un RTasa de Virus de Mieloblastosis Aviar (AMV). Los resultados de su trabajo mostraron que todas las RTasas basadas en MMLV, tenían una alta sensibilidad. Mientras que el único kit fundamentado en RTasas de AMV, mostraba una eficiencia por debajo del 50% de sensibilidad. Asimismo, fue esta misma enzima la que mostró una menor cantidad de ARN convertido en cDNA. El kit empleado durante el presente trabajo mostró una alta eficiencia para convertir las cadenas de ARN en cDNA debido a se empleó la RTasa de MMLV la cual tiene una alta sensibilidad.

Una vez realizada la RT, la técnica continúa con un segundo paso, en el cual se amplificarán los primers diseñados empleando un termociclador para pruebas de tiempo real, el cual, mediante el uso de un software, reportará el número de ciclos que se necesitan para superar el umbral mínimo de amplificación⁸. En el caso del trabajo presentado, se usó el equipo Agilent technologies Mx3005P, el cual provee del software ProMX3000, el cual tiene funcionalidades nativas para la lectura del fluorocromo SYBR Green, proveyendo el histograma de la reacción realizada.

Para el desarrollo de nuestro trabajo, fue necesario el diseño de primers inéditos para la amplificación de IL-1 β e IL-10 de *Rattus norvegicus*. Lo anterior, representa una ventaja para el procedimiento de nuestro trabajo, puesto que tal

como lo reporta Al-mohanna en 2004, es crucial garantizar la especificidad de los primers empleados para toda reacción de PCR, de esto depende que la amplificación exitosa de la muestra.

Existen pocos reportes de esta técnica realizada para la amplificación IL-1 β e IL-10 en *Rattus norvegicus*. Lo anterior debido a la variabilidad genética que existe entre especies, e incluso entre subespecies de estos roedores. La selección adecuada de primers para el diseño de nuestra prueba de PCR garantizó el éxito de la reacción^{18, 82}.

De acuerdo con lo descrito por Al-mohanna, es de suma importancia diseñar primers para el gen de interés corroborando su alineación con nucleótidos que se conserven en diferentes secuencias de referencia. Puesto que ligeras variaciones en el acomodo de los nucleótidos podrían reducir sensiblemente la especificidad de la reacción. Al realizar este protocolo de investigación, los primers diseñados fueron alineados *in silico*, con al menos tres secuencias de referencia obtenidas del GeneBank del NCBI. Obteniendo así primers que se alinearon exclusivamente en las regiones previstas, y que se conservaban en todas las secuencias de referencia consultadas.

Asimismo, Al-mohanna, considera que existen otros criterios indispensables para el correcto diseño de primers. Entre estos debemos destacar la temperatura de hibridación (T_m), la cual debe situarse entre los 55° C y 65°C. Que la secuencia del primer no pueda hibridar en regiones del ADN diferentes a la región deseada, y que la presencia de “casquetes GC” (Guaninas y Citocinas) en el extremo 3'; esto se refiere a la cantidad de Guaninas (G) y Citocinas (C) en el extremo 3' de la secuencia del primer. Es importante monitorear este fenómeno, pues si bien la presencia de estas bases nitrogenadas en el extremo 3' brindan estabilidad a los primers, de presentarse demasiadas G o C en consecución, se formarán enlaces muy fuertes y por lo tanto será necesaria mayor temperatura para desnaturalizarlos, pudiendo alterar la T_m de los primers. Adicionalmente, en el caso particular de las pruebas de qPCR, los primers deben ser pequeños en comparativa de los diseñados para otras técnicas como el PCR punto final. Thornton, *et al.*, en 2011, fijan el tamaño ideal para los primers empleados en qPCR entre 18 y 24 pb.

Los primers diseñados en este proyecto experimental, poseen una T_m que varía desde los 55.67°C hasta los 58.82°C, satisfaciendo así los criterios sugeridos por Al-mohanna. Finalmente, ninguno de los primers, tanto Fw, como Rv de ambas citocinas muestra casquetes GC y el tamaño se situó entre 19 y 22 pb.

Otro factor que se debe considerar al estandarizar e implementar una técnica de qRT-PCR, es el Master Mix a emplear. En términos generales existen dos tipos de métodos para la cuantificación de la reacción de qPCR: mediante pruebas de hidrólisis usando Taq polimerasas (Taqman) o mediante el acoplamiento de marcadores luminiscentes a cadenas dobles de ADN (SYBR Green).

En términos de sensibilidad ambos principios son muy similares. Sin embargo, de acuerdo con lo comentado por Mohamadhasan, T. en 2013, las pruebas realizadas con Taqman tienen mejor especificidad que las realizadas con SYBR Green. Cabe mencionar el reactivo es más costoso y su implementación es más complicada.

En 2020, Flores y colaboradores, evaluaron ambos métodos de amplificación para una técnica de qPCR, encontrando que el SYBR Green-A, presentó un límite de detección bajo, pero manteniendo una alta especificidad. Mientras que la TaqMan se mostró con una sensibilidad significativamente superior. Estos resultados se contraponen a lo reportado por Mohamadhasan.

Para el desarrollo de este protocolo experimental se empleó el método de fluorescencia con la enzima SYBR Green, debido a su fácil implementación y al reducido costo del reactivo. Como resultado, las qPCR mostraron una suficiente sensibilidad. Sin embargo, la especificidad tiene una complicada interpretación, pues casi en todas las reacciones, las curvas de disociación mostraron más de un pico, lo que en algunos casos podría ser interpretado como amplificación de más de un producto en la reacción.

En el presente proyecto, se realizó una prueba de PCR punto final, la cual, si bien tenía el objetivo de ahorrar costos al implementar las curvas de temperatura, también permitió corroborar la especificidad de las reacciones de qPCR en nuestras citocinas.

En este caso, las curvas de disociación evidencian en todas las muestras un pico correspondiente a la T_m del producto esperado, que es el más prominente en el histograma.

En el manual para la solución de problemas en la implementación de técnicas de qPCR, provisto por Integrated DNA Technologies, se explica que la hibridación del ADN no debe ser interpretado como un evento que se suscita de forma espontánea y uniforme, sino que se da en diferentes estadios. De este modo, la presencia de cadenas simples o dobles de ADN en la muestra puede crear discrepancias al momento de generar el histograma de la curva de disociación.

Otro factor que se debe tener en consideración es que regiones ricas en G y C dentro de la secuencia amplificada, necesitarán de una temperatura mayor para desnaturalizar predominantes en Timina (T) y Adenina (A). Por lo que es posible generar pequeños picos adicionales en la curva de disociación. Si bien existe software de terceros como el programa uMelt, que pueden apoyar la interpretación de las curvas de disociación, en este trabajo se empleó de forma exclusiva la información que el software MxPro3000 arrojó, en complemento de lo observado en los geles de agarosa al 1.5% resultantes de la PCR punto final.

En el presente trabajo, se empleó como modelo experimental un *pool* de leucocitos de sangre periférica de rata Wistar. Considerando que en sangre se encuentran circulando del linaje celular granulocítico: eosinófilos, basófilos y neutrófilos. Estos últimos son considerados la primera línea de defensa del cuerpo, por ser los más abundantes y eficientes en el reconocimiento y destrucción de patógenos. Mientras que del linaje celular agranulocítico, se encuentran circulando los monocitos, linfocitos *Natural Killer*, los linfocitos B y T, y células dendríticas. Tanto los monocitos como las células dendríticas juegan un papel determinante en el procesamiento y presentación de antígenos, mismo que se requiere para activar la inmunidad adquirida y determinar el tipo de respuesta (Th1 y/o Th2)⁷¹.

Ávalos y col. en 2015, demostraron en condiciones de cultivo celular la estimulación de macrófagos diferenciados a partir de monocitos sanguíneos de ovino, con MVs de *Mannheimia haemolytica* A2. En este sentido, este grupo de investigación demostró que la respuesta de citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α en macrófagos, es dependiente del tiempo y de la dosis de MVs de *Mannheimia haemolytica* A2, utilizada en el tratamiento de estos. Se confirmó que el aumento en la transcripción de genes para citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , en macrófagos, está mediado específicamente por la vía de señalización LPS/MVS/TRL4. Las MVs de *Mannheimia haemolytica* A2 no modifican la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10, en ninguna de las concentraciones y tiempos utilizados en este experimento. Lo anterior nos hace pensar, que del *pool* de leucocitos estimulados en condiciones de cultivo celular con MVs de BAL, los monocitos sanguíneos, pudieron ser las células principalmente reactivas a dichas estructuras. A estas células se les atribuye la expresión de IL-1 β e IL-10. En 2020, Skrzeczynka-Moncznik y *et al*, mencionó que al estimular monocitos con LPS de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25223 inactivado por calor, induce principalmente la síntesis de IL-10.

Adicionalmente, Lapinet *et al*. En el año 2000, describió la capacidad de las OMV de *Neisseria meningitidis* para inducir la expresión de genes para IL-1 β y TNF- α en neutrófilos humanos. En ese sentido, en el presente trabajo debemos considerar que en el *pool* de leucocitos que se evaluaron había neutrófilos en la muestra pudiendo ser estimulados por las MVs de BAL.

Las MVS bacterianas han demostrado similitudes estructurales con respecto a las células completas de origen, ya que estas derivan de la membrana externa de sus células progenitoras. Durante su formación, los componentes periplasmáticos de la bacteria, así como proteínas y biomoléculas en tránsito durante su creación, quedan atrapadas en la luz de dichas estructuras⁸¹. MVs tanto de Gram (-) como de Gram (+), son considerados potentes inmunógenos que estimulan al sistema inmune, y su composición representa un importante mecanismo que permiten a la bacteria de origen, generar importantes estrategias durante el proceso de invasión o bien en el desarrollo de la enfermedad que desencadena.

Los efectos de las MVs de Gram (-), son variados y actualmente se encuentran bien descritos. Estos efectos, abarcan el acarreo de toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano. Para el caso de las bacterias Gram (-), algunos microorganismos como *Pseudomona aeruginosa* liberan en sus MVs componentes como: fosfatasa alcalina, fosfolipasa C, proelastasa, proteasas y péptidoglicanoelastasa. Por otro lado, en el caso de *Mannheimia haemolytica* serotipo A1 y A2, se ha identificado que las MVs de dichos microorganismos pueden acarrear los principales antígenos de la bacteria: leucotoxina, lipopolisacárido, proteínas de membrana externa e incluso fracciones de ADN³⁰.

En el caso de bacterias Gram (+), es un hecho que han sido menos documentadas en el pasado. Sin embargo, recientemente se ha confirmado de su capacidad para producir MVs. Actualmente se conoce que *Staphylococcus aureus* transportan a través de dichas estructuras una importante gama de proteínas y péptidos que contribuyen fuertemente a sus mecanismos de virulencia tales como: leucotoxina α , subunidades de la leucocidina de Pantón-Valentine, adhesinas, componentes de transportadores ABC como la proteína MntC, proteasas y factores de evasión de la respuesta inmune⁷⁸.

Los resultados de este protocolo experimental nos muestran la expresión de IL-1 β e IL-10 en leucocitos de sangre periférica mantenidos en condiciones de cultivo celular, obtenidos de *Rattus norvegicus* cepa Wistar, tras ser estimulados con MVs de BAL. Estos resultados son comparables con lo observado por Lee, *et al.* en 2016, quienes reportan la expresión relativa de IL-1 β en células mononucleares de sangre periférica de porcino, a los cuales se les administró por vía oral, células completas *L. acidophilus*, y de manera inmediata se les desafió con de LPS. En su experimento, la expresión relativa de mRNA de la IL-1 β en concentraciones basales, fue aproximada a 1.1, expresado en una escala con en logaritmo base 10. En contraste a esto, la expresión relativa de la IL-1 β de nuestro trabajo experimental, fue de 1.58, mostrando evidencia que sugiere estimulación en la expresión de esta citocina.

Por otro lado, el equipo de Lee, repitió su protocolo, pero esta vez midiendo IL-10, demostrando una expresión relativa basal de 1.1 en logaritmo base 10. El resultado de Lee, es muy similar a lo reportado por Mata y colaboradores en 2013, quienes obtienen una expresión de 1.0 en logaritmo base 10. En nuestro trabajo, se encontró una expresión de 1.6 en logaritmo base 10, sugiriendo una vez más que las MVs de BAL inducen la expresión de esta citocina, incluso en un grado ligeramente mayor que lo observado en el caso de IL-1 β .

Durante nuestro trabajo experimental la expresión relativa tanto de IL-1 β e IL-10, fueron muy similares. Si bien la expresión del mRNA de estas citosinas se ubicó por arriba de lo reportado como niveles basales, en otros trabajos realizados, se sugiere realizar un protocolo experimental donde solo se emplee una sola estirpe

celular. Lo anterior, permitirá identificar de forma precisa la respuesta de las células a evaluar ante el estímulo antigénico.

Asimismo, sería de gran utilidad realizar mediciones en diferentes momentos posteriores al estímulo, esto con la finalidad de tener un panorama más amplio de los eventos inmunes que se suscitan durante la interacción de las MVs de BAL con las células del sistema inmune de su hospedador.

Al mismo tiempo, se sugiere en un futuro realizar la técnica de qRT-PCR siguiendo la metodología expuesta en presente trabajo y complementarla con una técnica que correlacione la expresión del mRNA de la IL-1 β e IL-10, con la presencia de dichas citocinas en sobrenadante de cultivo, como podría ser ELISA o Westernblot.

Conclusiones.

- Las MVs de BAL estimulan la expresión de genes que codifican para IL-1 e IL-10 en leucocitos de sangre periférica de *Rattus norvegicus* subespecie Wistar.
- La técnica de qRT-PCR muestra adecuada sensibilidad para amplificar los genes seleccionados para IL-1 β e IL-10 en leucocitos de sangre periférica de *Rattus norvegicus* subespecie Wistar.
- La temperatura de alineación más apropiada para la amplificación de los genes blanco de las citocinas IL-1 β e IL-10, empleando los primers diseñados para este trabajo, fue de 60°C en todos los casos.
- Se estandarizó de la técnica de qRT-PCR para IL-1 β e IL-10 de leucocitos sanguíneos de *Rattus norvegicus* cepa Wistar tras estimularlos con MVs de BAL.
- Este trabajo es el primer reporte que evidencia el efecto inmunomodulador de las MVs de BAL de *Rattus norvegicus* de vida libre mediante qRT-PCR.

VIII. Bibliografía.

- 1) Abad, R.; “Cambios en la Microbiota Intestinal de las Aves y sus Implicaciones Prácticas”. Consultado del sitio: https://www.researchgate.net/publication/323152630_Cambios_en_la_microbiota_intestinal_de_las_aves_y_sus_implicaciones_practicas.
- 2) Al-mohanna, M.; Guidelines For Designing Primers” July of 2014. Consultable en el sitio <https://www.researchgate.net/publication/315832536>
- 3) Álvarez-Sieiro, P.; Montalbán, M.; Mu, D.; Kuipers, O.; “Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Extending the Family”. Appl Microbiol Biotechnol (2016) 100:2939-2951 DOI 10.1007/s00253-016-7343-9
- 4) Ávalos, C.; “Identificación del receptor tipo Toll-4 en macrófagos de ovino y su activación, al interactuar con Microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* A2 en condiciones *in vitro*”. Tesis para optar por el grado de Maestra en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional de México. 2015.
- 5) Bickel, M.; “The Role of Interleukine-8 in Inflammation and Mechanisms of Regulation”. Journal of Periodontology 1993 May; 64 (5 suppl): 456-60 PMID: 8315568
- 6) Brandan, N.; Aquino, J.; Codutti, A.; “Respuesta Inmunitaria”. Catedra de Bioquímica. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina. Argentina. 2007.
- 7) Brown, L.; Wolf, J.; Prados, R.; Casadevall, A.; Through the Wall: Extracellular Vesicles in Gram-Positive Bacteria, Mycobacteria and Fungi”. Nat Rev Microbiol. 2015 October; 13(10): 620-630. doi:10.1038/nrmicro3480.
- 8) Budhia, S.; Haring, L.; McConnell I.; Blacklaws, B.; “Quantification of Ovine Cytokine mRNA by Real-Time RT-PCR”. Journal of Immunological Methods 309 (2206) 160-172.
- 9) Cañas, M.; Fábrega, M.; Giménez, R.; Badia, J.; Baldomá. L.; “Outer Membrane Vesicles Form Probiotic and Comensal Escherichia Coli Activate NOD1-Mediated Immune Responses in Intestinal Epithelial Cells”. Frontiers in Microbiology. Doi 10.3389/fmicb.2018.00498. 2018.
- 10) Carauana, J.; Walper, S.; “Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of Microbe and Microbe-Host Community Interactions”. Frontiers in Microbiology. 11:432 doi.org/10.3389/fmicb.2020.00432
- 11) Carrasco, L.; “Citocinas: De Fieles Aliadas a Terribles Enemigas”. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental. Anales Vol. 24 (1)- Dic. 2011.
- 12) Cell Walls of Prokaryotes. Boundless Microbiology. Consultado del sitio: <https://courses.lumenlearning.com/boundless-microbiology/chapter/cell-walls-of-prokaryotes/#:~:text=In%20the%20Gram%2Dnegative%20Bacteria,added%20after%20the%20crystal%20violet>. Agosto del 2020.

- 13) Chandler, C.; Ernst, R.; "Bacterial Lipids: Powerful Modifiers of the Innate Immune Response". Department of Microbial Pathogenesis, University of Maryland, Baltimore, USD. 2017.
- 14) Chapot, M.; Kulakauskas, S.; "Cell Wall Structure and Function in Lactic Acid Bacteria". Microbial Cell Factories. 2014, 13(Suppl 1): S9
- 15) Christensen, H.; Frøkiær, H.; Pestka, J.; "Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Murine Dendritic Cells".
- 16) Cohelo, C.; Brown, L.; Maryam, M.; Burnet, M.; Kyle, J.; Heyman, H.; Raghav, V.; Ramirez, J.; Prados, R.; Lauvau, G.; Nakayasu, E.; "*Listeria monocytogenes* Virulence Factors are Secreted in Biologically Active Extracellular Vesicles". Journal of Biological Chemistry. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/210906>. 2017.
- 17) Cross, M.; "Microbes versus Microbes: Immune Signals Generated by Probiotic Lactobacilli and Their Role in Protection Against Microbial Pathogens". FEMS Immunology and Medical Microbiology 34 (2002) 245-253.
- 18) Delghandi, M.; Pedersen, M.; Goddard, S.; "The significance of PCR Primer Design in Genetic Diversity Studies: Exemplified by Recent Research into the Genetic Structure of Marine Species". Methodes in Molecular Biology, volume 2392. 14 November 2021. DOI: 10.1007/978-1-0716-1799-1_1
- 19) Dominguez, p.; Martinez, J.; Martinez, D.; Coluccio, F.; Piuri, M.; Pérez, O.; "Lactobacillus casei BL23 Produces Microvesicles Crrying Proteins That Have Been Associated with Is Probiotic Effect". Frontiers in Microbiology, septiembre 2017. Vol. 8 Article 1783.
- 20) Downey, N.; Dwight, Z.; "Explaining multiple peaks in qPCR melt curves analysis". Feb 1. 2017. Integrated DNA Technologies. Consultable del sitio <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis>
- 21) Duque, G.; Descoteaux, A.; "Macrophage Cytokynes: Involvement in Immunity and Infectious Diseases". Frontiers in Immunology, doi: 10.3389/fimmu.2014.00491 Octubre 2014.
- 22) Fábrega, M.; Aguilera, L.; Giménez, R.; Varela, E.; Cañas, M.; Antolin, M.; Badia, J.; Baldomá, L.; "Activation of Immune and Defense Responses in the Intestinal Mucosa By Outer Membrane Vesicles of Commensal and Probiotic Escherichia coli Strains. Frontiers in Microbiology. Doi 10.3389/fmicb.2016.00705. 2016.
- 23) Facultad de Medicina, Departamento de Biología Celular y Tisular. "Repaso Teórico Biología celular E Histología Médica 2ª Unidad". Universidad Nacional Autónoma de México. 2012.
- 24) Farkas, D.; Holland, C.; "Overview of Molecular Diagnostic Techniques and Instrumentation". Cells and molecular Pathology 2009. 19-32. Doi: 10.1016/B978-044306901-7.50008-0

- 25) Fleige, S.; Pfaffl, M.; RNA integrity and the effect on the real time qRT-PCR performance". *Molecular Aspects of Medicine*. Volume 27, Issue 2-3, April 2006, pges 126-139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- 26) Flores, B.; Halaihel, N.; Pérez, T.; Sheleby, J.; Mora, B.; Fuentes, H.; Jirón, W.; "Evaluación de tres PCR cuantitativas para la detección de leptoespiras patógenas en animales domésticos en Nicaragua". *Biomédica* 2020;40:673-B1. Doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.5170>
- 27) Fragoso, J.; Vargas, G.; Jiménez, M.; Reyes, O.; Ramírez, J.; "El Factor de Necrosis Tumoral σ (TNF- σ) en las enfermedades autoinmunes (EA); *Biología Molecular y Genética*". *Gaceta Médica de México*. 2014; 150:334-44
- 28) Fukuyama, K.; Islam, A.; Tkagi, M.; Ikeda, W.; Kurata, S.; Aso, H.; Vignolo, G.; Villena, J.; Kitazawa, H.; "Evaluation of the Immunomodulatory Ability of Lactic Acid Bacteria Isolated from Feedlor Cattle Against Mastitis Using a Bovine Mammary Epithelial Cells *In vitro* Assay". *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(5), 410. Doi.org/103390/pathogens9050410. 2020
- 29) Gani, Z.; "Sistema del Complemento". Consultado el día 27 de diciembre de 2021 del sitio <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/systems-and-processes/sistema-del-complemento>
- 30) González, C.; "Evaluación y caracterización de Microvesículas (MVs) de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 para su posible utilización como vacuna en ovinos". Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. 2007.
- 31) Guillian, M.; Rodriguez, J.; "Estudio del Efecto Inmunoestimulante de Bacterias Probioticas Asociadas al Cultivo del Camarón *Penaeus vannamei*". Escuela Superior Politecnica del Litoral. Magister en Ciencias Especialidad Acuicultura Marina. Guayaquil, Ecuador. 2001.
- 32) Gutiérrez, V.; "Identificación debacteriocinas en Microvesículas (MVs) Producidas por Bacterias Ácido-Lácticas (BAL), aisladas del tracto gastro intestinal (TGI) de *Rattus norvegicus*". Tesis para obtener el título de Médica Veterinaria Zootecnista. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. 2020
- 33) Hameed, A.; "Human Immunity Against *Campylobacter* infection". *Immune Netq*. 2019 Dec; 19(6): e38. Doi: 10.4110/in.2019.19.e38
- 34) Hamza, T.; Barnett, J.; Li, Bi.; "Interleukin 12 a Key Immunology Cytokine in Infection Applications". *Int. J. Mol. Sci*. 2010, 11, 789-806; doi: 10.3390/ijms11030789
- 35) Himsworth, C.; Zabeck, E.; Desruisseau, A.; Parmley, E.; Reid- Smith, R.; Jardine, C.; Tang, P.; Patrick, D.; "Prevalence and Characteristics of *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* In the Faces of Wild Urban Norway and Black Rats (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*) From an Inner-city

- Neighborhood of Vancouver, Canadá”. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(3), 2013, pp. 000-000. DOI: 10.7589/2014-09-242
- 36) Johnston, E.; Kufer, T.; Karaparakis, M.; “Immunodetection and Pathogenesis Mediated by Bacterial Membrane Vesicles”.
 - 37) Kaparakis, M.; Kufer, T.; “Bacterial Membrane Vesicles. Biogenesis, Functions and Applications.” Springer Nature. Switzerland. 2020.
 - 38) Lawrence, T.; “The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation”. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a001651.
 - 39) Li, S.; Soo, H.; Mo, J.; Ho, I.; “*Lactobacillus acidophilus* modulates inflammatory activity by regulating the TLR4 and NF- κ B expression in porcine peripheral blood mononuclear cells after lipopolysaccharide challenge”. *British Journal of Nutrition* (2016), 115, 567-575. Doi:10.1017/S0007114515004857
 - 40) Liu, Y.; Defourny, A.; Smid, E.; Abee, T.; “Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease”. *Food Microbiology*, Wageningen University & Research, Wageningen, Netherlands. *Frontiers in Microbiology*. Doi: 10.3389/fmicb.2018.01502
 - 41) Longi, C.; “Evaluación del Efecto de Microvesículas (MVs) de Bacterias Ácido Lácticas (BAL), En cultivos de *Salmonella typhimurium* ATCC 154 y *Escherichia coli* de Campo”. Tesis para obtener el título de Médica Veterinaria Zootecnista. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2022.
 - 42) López-Bojorquez, L.; “La Regulación del Factor de Transcripción NF- κ B. Un Mediador Molecular en el Proceso Inflamatorio”. *Rev. Invest. Clín.* Vol56 no.1 México Feb. 2004.
 - 43) Lucena, M.; “Respuesta del Sistema Inmune a Bacterias Probióticas”. Master en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo. Oviedo, España. 2016.
 - 44) Lucena, M.; Huanca, R.; “Estructura Bacteriana”. *Revista de actualización Clínica*, Volumen 49, 2014. Universidad Mayor de San Andrés. Bolivia.
 - 45) Maassen, C.; Holten- Neelen, C.; Balk, F.; Bak-Glashouwer, J.; Leer, R.; Lamar, J.; Boersman, W.; Claassen, E.; “Strain dependent induction of cytokine profiles in the guy by orally administered *Lactobacillus strains*”. Elsevier, 2000.
 - 46) Maga, G.; “DNA Polymerases”. Elsevier, 2019. doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.62185-2.
 - 47) Marjolaine, D.; Miquel, S.; Garcin, S.; Bertran, T.; Balestrino, D.; Evrard, B.; Forestier, C.; “Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* on Inflammatory Response Induced by *Klebsiella pneumoniae*”. *Infection and Immunity*. November 2019. Volume 87 Issue 11. Doi: 10.1128/IAI.0057019
 - 48) Maroley, L.; Reyna, H.; “Estructura Bacteriana”. *Revista de Actualización Clínica*. Volumen 49. 2017.

- 49) Márquez, S.; Valenzuela, L.; Gálvez, G.; Fernández, L.; Bocchino, C.; “Introducción al Estudio de la Célula”. Consultado el día 26 de enero de 2021 del sitio <http://www.genomasur.com/lecturas/Guia01.htm>
- 50) Mata, V.; Reséndiz, M.; Hernández, J.; “*In vitro* differential modulation of immune responses by probiotics in porcine peripheral blood mononuclear cells”. *Food and Agricultural Immunology*, 25:2, 209-219, DOI: 10.1080/09540105.2013.768962
- 51) Meerbug, B.; Kijlstra, A.; “Role of rodents in transmission of *Salmonella* and *Campylobacter*”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI: 10.1002/jsfa.3004. 2007.
- 52) Mohamadhasan, T.; Mojtaba, P.; Shaghayegh, H.; “Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes”. *Adv Biomed Res*. 2014 Feb 28;3:85. Doi: 10.4103/2277-9175.127998
- 53) Mohammed, A.; Khatib, M.; Ahmed, A.; Turk, T.; Sakr, N.; Khalil, A.; Abdelhaim, M.; Sawaf, B.; Hirayama, K.; Tien, N.; “The Therapeutic effect of Probiotics on Rheumatoid Arthritis: A Systemic Review and Meta-analysis of Randomized Control Trials”. *International League of Associations for Rheumatology*. 2017. DOI 10.1007/s10067-017-3814-3
- 54) Moreira, L.; Zamboni, D.; “NOD1 and NOD2 Signaling In infection and Inflammation”. *Front Immunol*. 2012; 3: 328. Doi 10.3389/fimmu.2012.00328
- 55) Oliveira, M.; Pérez, M.; Padín, E.; Reboiras, M.; Suárez, J.; López, R.; Lima, C.; Scholz, J.; García, A.; “Comparison of RNA Extraction Methods for Molecular Analysis of Oral Cytology”. *Acta stomatol Croat*. 2016;50 (1): 108-115. DOI: 10.15644/asc50/2/2
- 56) Panga, R.; Aishwarya, R.; Darpan, M.; Samridhi, S.; Ravinder, K.; Jain, R.; Gollapalli, K.; Pendharkar, N.; Srikanth, R.; Sanjeeva, S.; “A Simple Protein Extraction Method for Proteomic Analysis of Diverse Biological Specimens”. *Current Proteomics*, 2013, 10, 298-311. Doi: 10.2174/15701646113106660004
- 57) Pérez, M.; “Morfología y Estructura Bacteriana”. Consultado del sitio <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%209.pdf>, junio del 2020.
- 58) Pérez, M.; Mota, M.; “Morfología y Estructura Bacteriana”. Consultado del sitio: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>, junio, 2020.
- 59) Ramakrishna, C.; Kujawki, M.; Chu, H.; Mazmanian, S.; Cantin, E.; “*Bacterioides fragilis* polysaccharide A induces IL-10 secreting B and T cells That prevent viral encephalitis”. *Nature Communications* 10, Article number 2153 (2019). 2019.
- 60) Rio, D.; Ares, M.; Hannon, G.; Nilsen, T.; “Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2010. Doi: 10.1101/pdb.prot5439

- 61) Rojas, M.; "Quorum sensing en la Asociación Beneficiosa de las Bacterias con las Plantas". Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIII No. 2 Diciembre 2011 135-143.
- 62) Rosental; Than.; Rapid Review Microbiology and Immunology, 3rd Edition. Elsevier, 2011.
- 63) Rumi, K.; Kiyoshima-Shibata, J.; Nagaoka, M.; Nanno, M.; Shida, K.; "Bacterial Teichoic Acids Reverse Predominant IL-12 Production Induced by Certain *Lactobacillus* Strains into Predominant IL-10 production via TLR2-Dependent ERK Activation in Macrophages". The Journal of Immunology, Febrero 2021. Doi: 10.4049/jimmunol.0901569
- 64) Santini, F.; Crosta, C.; "El Eosinófilo". Servicio de Hematología. Hospital Privado de la Comunidad. Mar del Plata, Argentina. 2012
- 65) Satokari, R.; "Molecular Identification and Characterisation of Bifidobacteria and Lactobacilli in the human Gastrointestinal Tract". Thesis Wageningen University, Holanda, 2001.
- 66) Schwechheimer, C.; Kuehn, M.; "Outer-membrane Vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions." Nature Reviews Microbiology 13, 605-619 (2015).
- 67) Seegers, F.; "Lactobacilli as Live Vaccine Delivery Vectors: Progress and Prospects". TRENDS in Biotechnology. Vol 20 No. 12 December 2002.
- 68) Segel, L.; Lev, R.; "One role of Feedback in Promoting Conflicting Goals of the Adaptive Immune System", The Journal of Immunology. 1 de Agosto 1999. 163 (3) 1342-1349.
- 69) Serrato, A.; Flores, L.I.; Aportela, J.; Sierra, E.; "PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa". Departamento de Hibridología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Consultable del sitio <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf>
- 70) Shen, Y.; Giardino, M.; Lawson, G.; Karp, C.; Ashwell, J.; Mazmanian, S.; "Outer Membrane Vesicles of a Human Commensal Mediate Immune Regulation and Disease Protection". Cell Host & Microbe. Doi.org/10.1016/j.com.2012.08.004
- 71) Skrzeczyńska-Moncznik, J.; Malgorzata Bzowska, S.; Grievenow, M.; "Peripheral Blood CD14^{High} CD16⁺ Monocytes are Main Producers of IL-10". Scandinavian Journal of Immunology 67 (2), 152-159, 2008. Doi: 10.1111/j.1365-3083-2007.02051x
- 72) Stordeur, P.; Poulin, L.; Craciun, L.; Zhou, L.; Schandene, L.; Lavarelle, A.; Goriely, S.; Goldman, M.; "Cytokine mRNA quantification by real-time PCR". Journal of Immunological Methods 259 (2002) 55-60.
- 73) Tamay, L.; Ibarra, C.; Velasquillo, C.; "Fundamentos de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y de la PCR en Tiempo Real". Investigación en Discapacidad. Vol. 2, Núm. 2 Mayo-Agosto 2013 pp 70-78. Ciudad de México, México. 2013.

- 74) Thornton, B.; Basu, C.; “Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software”. *Biochemistry and Molecular Biology Education/ Volume 39, Issue 2/ p. 145-154.* <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>
- 75) Toche, P.; “Visión Panorámica del Sistema Inmune”. *Unidad de Inmunología. Rev. Med. Clin Condes 2012; 23(4) 446-457.* Chile, 2012.
- 76) Tormo, R.; “Probióticos. Concepto y Mecanismos de Acción”. *Gastroenterología y Nutrición Infantil. Hospital Vall d’Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España. 2006.*
- 77) Toyofuku, M.; Tashiro, Y.; Nomura, N.; Eberl, L.; “Functions of MVs in Inter-Bacterial Communication”. In: Karapakis, M.; Kufer, T. (eds) *Bacterial Membrane Vesicles.* Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-36331-4_5
- 78) Wang, X.; Thompson, C; Weidenmaier, C.; Lee, J.; “Release of *Staphylococcus aureus* Extracellular Vesicles and Their Applications As a Vaccine Platform”. *Nature Communications (2018) 9:1379 DOI: 10.1038/s41467-018-03847-z*
- 79) Warren. M.; Mclean. R.; Whiteley. M; “Gram-negative Outer Membrane Vesicles: Beyond the Cell Surfaces”. *Geobiology, 6(3), 214–219.* <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2008.00157.x>
- 80) Yang, G.; Liu, Z.; Yang, P.; “Treatment of Allergic Rhinitis with Probiotics: An Alternative Approach”. *North America Journal of Medical Sciences.* August 2013. Volume 5 Issue 8.
- 81) Yáñez, M., Siljander, P., Andreu, Z., et. al.; “Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions”. *Journal of Extracellular Vesicles. Vol4. 2015.* Disponible en: <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- 82) Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T.; “Primer-BLAST: A tool to design target specific primers for polymerase chain reaction”. *BMC Bioinformatics 13, Article number 134 (2012).* doi:10.1186/1471-2105-13-134
- 83) Zingl, F.; Kohl, P.; Cakar, F.; Leitner, D.; Mitterer, F.; Bonnington K.; Rechberger, G.; Kuehn, M.; Ziqiang, G.; Reidl, J.; Schild, S.; “Outer Membrane Vesiculation Facilitates Surface Exchange and *In Vivo* Adaptation of *Vibrio cholerae*”. *Cell Host Microbe.* 2020 Feb 12;27 (2): 225-237. Doi: 10.1016/j.chom.2019.12.002. Epub 2019.
- 84) Zucha, D.; Androvic, P.; Mikael, K.; Lukas, V.; “Performance comparison of reverse transcriptases for single-cell studies”. *bioRxiv, May 7 2019.* Doi: <https://doi.org/10.1101/629097>.