



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO®



---

---

## TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

---

---

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Evaluación de la actividad antiinflamatoria de sistemas  
nanoestructurados formulados con postbióticos obtenidos de  
bacterias ácido-lácticas específicas utilizando un modelo de  
inflamación**

### TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

Lady Christiam Valera Molina

Director:

Hugo Sergio García Galindo

Codirectores:

Adrián Hernández Mendoza

Rebeca García Varela



"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

H. Veracruz, Veracruz, 16 de diciembre 2019  
Div. Estudios de Posgrado e Investigación  
OFICIO: ITV/DEPI/No.527/2019

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

**C. LADY CHRISTIAM VALERA MOLINA  
PRESENTE**

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada:

**"Evaluación de la actividad anti-inflamatoria de sistemas nanoestructurados formulados con postbióticos obtenidos de bacterias ácido-lácticas específicas utilizando un modelo de inflamación"**

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica®  
Antorcha y Luz de Fuego Permanente®*

**EL. H. JURADO**

**BENIGNO ORTIZ MUÑIZ  
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST**



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ  
DIVISION DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**DR. HUGO SERGIO GARCÍA GALINDO  
PRESIDENTE**

**DRA. PATRICIA G. MENDOZA GARCÍA  
SECRETARIO**

**DRA. CLAUDIA YURITZI FIGUEROA HERNÁNDEZ  
VOCAL**

**DR. ADRIÁN HERNÁNDEZ MENDOZA  
SUPLENTE 1**

**DRA. REBECA GARCÍA VARELA  
SUPLENTE 2**

c. p. Expediente del Estudiante  
Archivo  
BOM\*





"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

El presente trabajo de tesis titulado **"Evaluación de la actividad anti-inflamatoria de sistemas nanoestructurados formulados con postbióticos obtenidos de bacterias ácido-lácticas específicas utilizando un modelo de inflamación"** presentado por el (la) **C. Lady Christiam Valera Molina** ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**DIRECTOR**

**DR. HUGO SERGIO GARCÍA GALINDO**

**CO-DIRECTOR**

**DR. ADRIÁN HERNÁNDEZ MENDOZA**

**CO-DIRECTORA**

**DRA. REBECA GARCÍA VARELA**

**REVISORA**

**DRA. PATRICIA G. MENDOZA GARCÍA**

**REVISORA**

**DRA. CLAUDIA YURITZI FIGUEROA HERNÁNDEZ**



## DEDICATORIA

### **A mis padres**

*Con todo el cariño y amor para las personas que han hecho  
todo en esta vida para que yo pueda lograr mis sueños.*

*Gracias por su apoyo incondicional, por su paciencia y  
por esas palabras sabias que siempre tienen para mis enojos,  
mis tristezas y mis momentos felices.*

*Los amo*

### **Mami**

*Mi energía positiva y mi inspiración,  
para ti que estás conmigo siempre, gracias por  
ser quien ilumina mi camino y me da fuerza  
necesaria cuando la vitalidad se esfuma.*

*Te amo*

### **Dani**

*Con todo mi amor para ti Chaparrito  
que has sido mi motivación y mi inspiración día a día,  
gracias por tu apoyo ilimitado, ayuda y paciencia.*

*Te amo*

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico recibido durante mis estudios de Maestría, haciendo posible el desarrollo de este trabajo.

A **Dr. Hugo Sergio García Galindo, al Dr. Adrián Hernández Mendoza, y Dra. Rebeca García Varela.**

Se **reconoce** y **agradece** el apoyo brindado por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD) de Hermosillo, Sonora, para el desarrollo de etapas experimentales claves para el cumplimiento de los objetivos planteados en el proyecto. Al **Dr. Adrián Hernández Mendoza**, a la **Dra. Belinda Vallejo**, al **Dr. Aarón F. González Córdova**, y en especial a la **Dra. Lourdes Santiago López**, por su invaluable colaboración. Debo destacar su disponibilidad y paciencia. No cabe duda que sus aportaciones enriquecieron el trabajo realizado.

Especialmente agradezco:

Al **Dr. Julio César** debo mi inmensa gratitud por la confianza, por su comprensión, apoyo incondicional, por su enfoque optimista a cada problema, por las palabras bonitas que tiene para mí y por presentarme al mundo de la ciencia.

Al **Dr. Hugo Sergio** por permitirme realizar esta tesis de maestría bajo su dirección. Su apoyo, sus conocimientos y su paciencia han sido un aporte invaluable. Agradezco también el haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo las actividades propuestas y por guiar el grupo de trabajo bajo un ambiente de respeto y compañerismo, que hicieron más agradable este largo camino. ¡Muchas gracias Doctor!

Al **Dr. Andrés Acosta Osorio** por su apoyo brindado a mi persona desde que cursé prerrequisitos. Gracias por sus palabras de aliento que sin que usted lo notara, para mí significaron mucho, sobre todo en los momentos más complicados de esta larga etapa.

A los miembros del comité revisor **Dra. Claudia** y **Dra. Paty** por la revisión y observaciones realizadas a la presente investigación.

A mis invaluable amigos Adán Montalvo Mata, Nadia Contreras Delfín, gracias por su apoyo, realidad sarcástica y sincera amistad.

A mis Amigos y compañeros que formaron (Lucero, Paco y Luis) y forman (Alaina, Luz, Jesús, Sarita, Wendy y demás) parte del Laboratorio de postcosecha, en especial a **Dalia Santos Luna**, la persona que me enseñó y con paciencia infinita, cuyos consejos y opiniones siempre me resultaron útiles y de la que jamás obtuve palabras de reproche. Gracias por haber podido contar siempre contigo en cualquier momento de manera incondicional. Sabes que para mí eres la mejor, conocerte ha sido un privilegio y un gran honor.

A mis compañeros del CIAD, Laura, Nico, Paúl, Ildé, Adilene, Principe, Lulú y en especial a ti Rojito, por su hospitalidad, autenticidad y amistad desde el primer momento. Además, tanto en los momentos de ocio como en temas de trabajo, me ofrecieron su atención y me echaron una mano ante cualquier duda o situación adversa.

A mis compañeros de maestría, Adán, Nadia, Fany, Montse, Eli, Paco, Oscar, Jeffrey, Eric y Ana.

A mis padres Estela, Didier y Faustino a mis hermanos Antonio y Omar a mis sobrinos Ximenita y Neithan, por haber estado a mi lado durante todo este tiempo, animándome y apoyándome en los buenos y malos momentos, sin su comprensión y ayuda este proyecto no hubiese sido posible. Nuestro cariño a pesar de mis agobios ha sido el aliento y la fuerza que me ha guiado durante este tiempo.

## RESUMEN

Lady Christiam Valera Molina. M. en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Diciembre del 2019. **Evaluación de la actividad antiinflamatoria de sistemas nanoestructurados formulados con postbióticos obtenidos de bacterias ácido-lácticas específicas utilizando un modelo de inflamación.** Director, Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dr. Adrián Hernández Mendoza y Dra. Rebeca García Varela

La exposición excesiva a la radiación UV provoca la inflamación de la piel aumentando el riesgo de padecer cáncer. . Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vivo* el potencial efecto antiinflamatorio de sistemas nanoestructurados preparados con postbióticos utilizando un modelo de inflamación inducida por irradiación UV. Para la obtención de postbióticos (contenido intracelular) y pared celular, se utilizaron 3 bacterias con potencial probiótico (*Lactobacillus pentosus* J24, *Lactobacillus fermentum* J20, *Enterococcus faecium* E16) y 3 cepas probióticas (*Lactobacillus paracasei casei subsp. paracasei* 431, *Lactobacillus casei* Shirota; *Bacillus coagulans* BC30). Se seleccionaron aquellos postbióticos con mejores propiedades antioxidantes y antiinflamatoria *in vitro*. Finalmente, se desarrollaron y caracterizaron sistemas nanoestructurados formulados con los postbióticos seleccionados previamente y se evaluó *in vivo* su potencial actividad antiinflamatoria empleando un modelo murino que recibió un proceso de radiación con luz UVB. De acuerdo a los resultados de los ensayos *in vitro*, el contenido intracelular de *Lb. fermentum* J20 mostró la mayor ( $p < 0.5$ ) actividad antioxidante y antiinflamatoria, por lo que fue seleccionado para la formulación de los sistemas nanoestructurados. El sistema de nanoemulsión (5% de fosfatidilcolina, 20% de amplitud) con postbióticos preparados con cuatro ciclos de trabajo produjo el menor tamaño de partícula (107.6 nm). En el modelo *in vivo*, no se observaron cambios significativos en la actividad antioxidante, pero los grupos que fueron tratados con el postbiótico, NG con postbiótico, y protector solar presentaron menor actividad en los mediadores (óxido nítrico, y actividad de lipoxigenasa) evaluados en muestras de tejido, con respecto al testigo positivo (únicamente recibió la radiación UVB). Adicionalmente, las citocinas

proinflamatorias, IL-12p70, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y la citocina reguladora IL-10 no mostraron diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. En contraste, para IL-6 se encontró que el tratamiento con NE c/postbiótico fue menor que el testigo (+), además de un incremento significativo para mCP-1. Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron demostrar la posible aplicación tópica del sistema nanoestructurado con el contenido intracelular de *Lactobacillus fermentum* J20 al reducir mediadores de inflamación y la citocina proinflamatoria IL-6 y por su actividad antioxidante.

## ABSTRACT

**Lady Christiam Valera Molina. Master of Science in Biochemical Engineering. Technological Institute of Veracruz. December 2019. Evaluation of the anti-inflammatory activity of nanostructured systems formulated with postbiotics obtained from specific lactic acid bacteria using an inflammation model". Advisers: Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dr. Adrián Hernández Mendoza, Dra. Rebeca García Varela.**

Excessive exposure to UV radiation causes skin inflammation, which can increase the risk of cancer. Because of this, the objective of this work was to evaluate *in vivo* the potential anti-inflammatory effect of nanostructured systems prepared with postbiotics using a model of inflammation induced by UV irradiation. To obtain postbiotics (intracellular content) and cell wall, 3 bacteria with probiotic potential (*Lactobacillus pentosus* J24, *Lactobacillus fermentum* J20, *Enterococcus faecium* E16) and 3 probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* casei subsp. paracasei 431, *Lactobacillus casei* Shirota; *Bacillus coagulans* BC30) were used. Post-biotics with the best antioxidant and anti-inflammatory properties *in vitro* were selected. Finally, nanostructured systems formulated with the postbiotics selected *in vitro* were developed and characterized and their potential anti-inflammatory activity was evaluated *in vivo* using a murine model that received a radiation exposure with UVB light. According to the results of the *in vitro* assays, the intracellular content of *Lb. fermentum* J20 produced the highest ( $p < 0.5$ ) antioxidant and anti-inflammatory activity; hence it was selected for the formulation of nanostructured systems. The nanoemulsion system (5% phosphatidylcholine, 20% amplitude) with postbiotics prepared with four cycles of work had the smallest particle size (107.6 nm). In the *in vivo* model, no significant change in antioxidant activity was observed, but the groups that were treated with postbiotic, NG with postbiotic, and sunscreen showed less activity in the mediators (nitric oxide, and lipoxigenase activity) evaluated in tissue samples, with respect to the control (+) that received only UVB radiation. Additionally, proinflammatory cytokines, IL-12p70, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  and the regulatory cytokine IL-10 showed no significant differences between the different treatments, in contrast, for IL-6 it was found that treatment with NE c/postbiotic was less than the

control (+), in addition to a significant increase for mCP-1. The data in this work demonstrated the possible topical application of the nanostructured system with the intracellular content of *Lactobacillus fermentum* J20 by reducing inflammation mediators and the pro-inflammatory cytokine IL-6 and by its antioxidant activity.

## CONTENIDO

<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>I ANTECEDENTES</b> .....	3
1.1 Exposición a la radiación UV y sus efectos en la piel .....	3
1.2 Mecanismos de respuesta por la exposición a la radiación UV .....	4
1.2.1. Activación de queratinocitos .....	4
1.2.2. Producción de histaminas .....	5
1.2.3 Generación de especies reactivas de oxígeno.....	6
1.2.4. Producción de óxido nítrico.....	7
1.2.5. Producción de Prostaglandinas .....	7
1.2.6. Respuesta inmune .....	8
1.3 Estrategias para prevenir el daño de la radiación UV en la piel .....	9
1.3.1 Respuesta antioxidante .....	11
1.3.2 Bacterias ácido lácticas probióticas .....	11
1.3.3 Mecanismos de la acción de las bacterias probióticas .....	12
1.3.4 Probióticos y Cosmécuticos .....	13
1.4 Postbióticos .....	14
1.4.1 Postbióticos en Cosmécuticos .....	15
1.5 Sistemas nanoestructurados.....	15
1.5.1 Geles .....	15
1.5.2 Geles transdérmicos .....	16
1.5.3 Nanogeles .....	16
1.5.4 Nanoemulsión.....	20
1.5.5 Caracterización morfológica de sistemas nanoestructurados .....	21
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	25

4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos .....	25
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
5.1 Reactivos de trabajo .....	26
5.1.1. Cultivos de trabajo .....	26
5.2 Obtención del contenido intracelular y pared celular (postbióticos) .....	28
5.3 Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los postbióticos obtenidos. ....	28
5.3.1 Evaluación de la capacidad antioxidante .....	28
5.4 Determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> .....	30
5.4.1 Inhibición de la desnaturalización proteica inducida por calor .....	30
5.4.2 Inhibición de la actividad de tripsina.....	31
5.4.3 Producción de dienos conjugados (inhibición de hemólisis).....	32
5.4.4 Inhibición de la actividad de la enzima lipooxigenasa .....	33
5.5 Formulación y caracterización de sistemas nanoestructurados adicionados con postbióticos .....	33
5.5.1 Diseño experimental para la formación de nanoemulsiones .....	33
5.5.2 Desarrollo de nanoemulsiones y tamaño de partícula.....	34
5.5.3 Preparación de nanogeles y prueba de tubo invertido .....	36
5.5.4 Caracterización microscópica de los sistemas nanoestructurados (nanoemulsiones y nanogeles) preparados con postbióticos .....	36
5.6 Evaluación de la actividad antiinflamatoria en un modelo murino.....	37
5.6.2 Irradiación y Obtención de muestras de tejido .....	38
5.6.3 Capacidad antioxidante en tejidos .....	40
5.6.4 Determinación de mediadores de inflamación .....	40
5.7 Análisis Estadístico .....	41
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
6.1 Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> del contenido intracelular y pared celular .....	42
6.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria .....	44
6.2.1 Inhibición de la actividad de Tripsina .....	44
6.2.2 Inhibición de la desnaturalización proteica inducida por calor .....	46

6.2.3 Ensayo de dienos conjugados (Inhibición de hemólisis) .....	48
6.2.4 Actividad de inhibición de lipoxigenasa. ....	49
6.3 Formulación de nanogeles adicionados con postbióticos y evaluación de su estabilidad .....	52
6.3.1. Desarrollo y caracterización de las nanoemulsiones.....	52
6.3.2 Desarrollo de nanogeles .....	55
6.3.3 Caracterización microscópica de los sistemas nanoestructurados.....	55
6.4 Evaluación de la potencial actividad antiinflamatoria de sistemas nanoestructurados con postbióticos, en un modelo murino con inflamación inducida con irradiación UV.....	58
6.4.1 Capacidad antioxidante en muestras de tejido.....	60
6.4.2 Mediadores de inflamación .....	63
6.4.3 Respuesta en el perfil de citocinas pro y anti-inflamatorias en muestras de tejido.....	66
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>72</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>73</b>

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1.5 Bacterias probióticas y con potencial probiótico empleadas en el presente estudio. ....	27
TABLA 2.5 Diseño factorial para la preparación de nanoemulsiones preparadas con postbióticos .....	34
TABLA 3.5 Diseño de los grupos experimentales para el ensayo <i>in vivo</i> .....	38

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 .....	4
FIGURA 3.1 Estructura del Carbopol 940® .....	18
FIGURA 4.5 Diseño del trabajo experimental para el modelo murino.....	39
FIGURA 5.6 Actividad antioxidante del contenido intracelular y pared celular de cada una de las bacterias de estudio por el método de ABTS (A), y ORAC (B). ...	43
FIGURA 6.6 Actividad inhibidora sobre la enzima tripsina del contenido intracelular y pared celular de las diferentes bacterias ácido lácticas de estudio.....	46
FIGURA 7.6 Efecto del contenido intracelular y pared celular de las diferentes bacterias de estudio para inhibir la desnaturalización proteica inducida por calor.	47
FIGURA 8.6 Efecto del contenido intracelular y pared celular de las diferentes bacterias de estudio para inhibir la producción de dienos conjugados. ....	49
FIGURA 9.6 Efecto del contenido intracelular y pared celular de las diferentes bacterias de estudio para inhibir la actividad de lipoxigenasa. ....	50
FIGURA 10.6 Apariencia de las nanoemulsiones preparadas con 0.25 g, 0.5 g, 1.0 g de PC y con 20 %, 20 % y 10 % de amplitud. ....	53
FIGURA 11.6 Efecto de la concentración de fosfatidilcolina (0.25, 0.5, 1.0 g) y % de amplitud (10, 20, 30 %) en el tamaño de partícula de las nanoemulsiones, después de 20 ciclos de trabajo. ....	53
FIGURA 12.6 Distribución de tamaño de partícula de la nanoemulsión .....	54
FIGURA 13.6 Concentración critica gelante del carbopol en la preparación de nanogeles .....	54
FIGURA 14.6 Nanogel desarrollado durante la prueba de tubo invertido .....	55
FIGURA 15.6 Micrografías obtenidas con SEM de A) Protector solar; B) Hidrogel con postbióticos; C) Nanoemulsión con postbióticos y D) Nanogel con postbióticos. ....	57

FIGURA 16.6 Las fotografías muestran las lesiones resultantes después de 4 días de exposición a la radiación UVB y con diferentes sistemas nanoestructurados. .	59
FIGURA 17.6 Análisis CIE L*a*b en imágenes del dorso de los ratones. Los valores representan la media $\pm$ DE. ....	60
FIGURA 18.6 Capacidad antioxidante por el método ABTS en muestras de tejido. ....	61
FIGURA 19.6 Capacidad antioxidante por el método ORAC en muestras de tejido. ....	62
FIGURA 20.6 Actividad lipoxigenasa en muestras de tejido.....	64
FIGURA 21.6 Concentración de ON en muestras de tejido tratados con el CI y los diferentes sistemas de entrega.. ....	65
FIGURA 22.6 Efecto de la administración tópica de diferentes tratamientos para inhibir la concentración de citocinas proinflamatorias (IL-12p70, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6) en muestras de tejido.....	67
FIGURA 23.6 Efecto de la administración tópica de diferentes tratamientos sobre la producción de IL-10 en muestras de tejido. ....	68
FIGURA 24.6 Efecto de la administración tópica de diferentes tratamientos sobre la producción de MCP-1 en muestras de tejido.....	70

## INTRODUCCIÓN

Los daños que se originan en la piel inducidos por la irradiación ultravioleta UV han tomado gran importancia en los últimos años, debido a los efectos que ocasionan en esta. Entre estos daños se pueden describir cambios estructurales y celulares en todos los compartimentos del tejido cutáneo. Entre los mecanismos reportados como consecuencia de la exposición a la radiación solar, es la proliferación de queratinocitos, producción de histaminas, óxido nítrico, activación de la respuesta inmunológica mediada tanto por la producción de citocinas y mediadores de inflamación como los eicosanoides, así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), donde este último pueden interactuar con macro-moléculas celulares como ADN, proteínas, ácidos grasos y polisacáridos, causando daño oxidativo.

Como alternativas para combatir los daños ocasionados por la radiación, es el uso de antiinflamatorios; protectores solares; así como el uso de cremas enriquecidos con compuestos antioxidantes o el uso de antioxidantes de manera aislada. Una alternativa reciente, es el uso de postbióticos o contenido intracelular libre de células. Estos han llamado la atención debido a su efecto potencial que se ha sugerido tanto en estudios *in vitro* como *in silico*. Algunas de las actividades que se han reportado son antiinflamatorias, inmunomoduladoras y antioxidantes, siendo éstas las principales involucradas en el mecanismo de respuesta del organismo ante la exposición a la radiación UV.

El uso de sistemas acarreadores podría ayudar a generar un mejor sistema de entrega de los postbióticos y de esta manera generar un mayor efecto de protección en la piel. Dentro de este tipo de vehículos, diversos estudios han mostrado que el uso de nanogeles ofrecen muchas ventajas, entre las que se encuentran el tamaño de partícula y sus propiedades viscoelásticas. Debido a esto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el potencial efecto antiinflamatorio de sistemas

nanoestructurados preparados con postbióticos antioxidantes utilizando un modelo murino con inflamación inducida por irradiación UV.

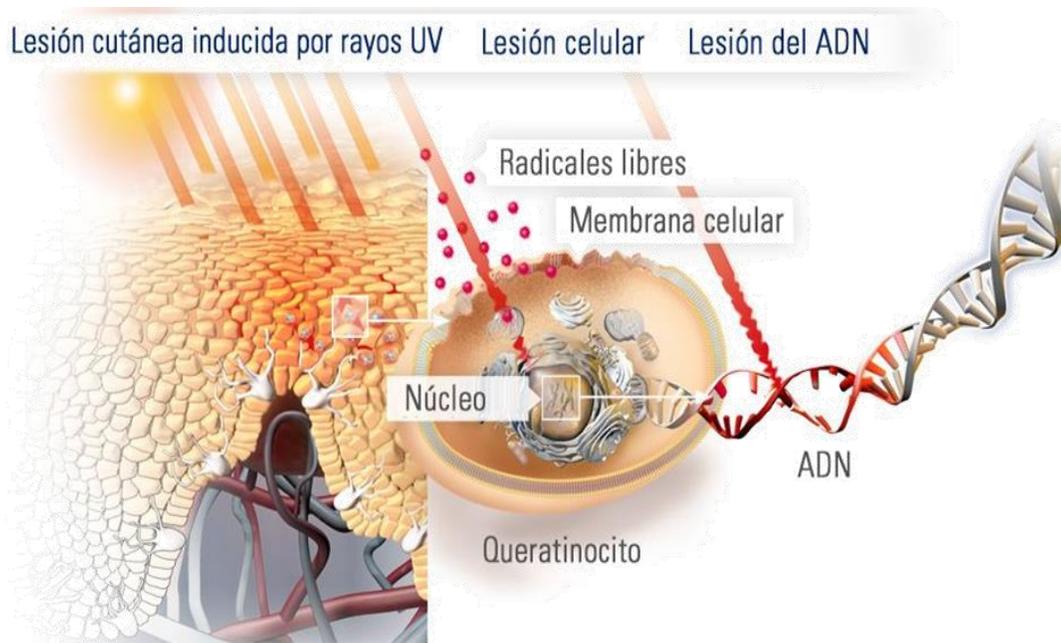
## I ANTECEDENTES

### 1.1 Exposición a la radiación UV y sus efectos en la piel

Históricamente, los humanos nos encontramos expuestos constantemente a la radiación UV principalmente por la exposición diaria a luz solar. Adicionalmente, otras formas de exposición se han generado por la exposición con fines cosméticos, como es el caso del bronceado artificial (camas de bronceado) (D'Orazio *et al.*, 2013).

La radiación UV está compuesta por fotones que se encuentran entre la longitud de onda de la luz visible y radiación gamma, y puede tener una variedad de efectos sobre las células, tejido y moléculas. La radiación que se clasifica como UV-A comprende longitudes de onda entre 315-400 nm; para UV-C entre 100-280 nm; y la UV-B entre 280-320 nm (D'Orazio *et al.*, 2013). Ésta última, se absorbe por la piel y es responsable de causar daños severos en la piel y desarrollar una respuesta inflamatoria, supresión inmunológica, mutaciones a nivel de ADN, y cáncer de piel (Clydesdale *et al.*, 2001; Ullrich 2005; Melnikova y Ananthaswamy 2005).

Además, los rayos UV-B modulan las vías de transducción de señales múltiples que conducen a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que inducen la transcripción de metaloproteasas (Brenneisen *et al.*, 2002). La radiación UVB aguda es seguida por daño queratinocítico epidérmico, agotamiento de las células de Langerhans, edema dérmico, edema endotelial, desgranulación de mastocitos e infiltración celular dentro de la dermis y la epidermis. Los cambios bioquímicos incluyen la liberación de histamina y la acumulación de productos derivados del ácido araquidónico, cininas y citocinas derivados de queratinocitos y fibroblastos (Meyskens *et al.*, 2001; D'orazio *et al.*, 2013) (Figura 1.1).



**FIGURA 1.1** Lesión cutánea inducida por radiación ultravioleta.

## 1.2 Mecanismos de respuesta por la exposición a la radiación UV

La exposición a la radiación UV es mediada por diversos mecanismos, que incluyen efectos directos sobre los queratinocitos y liberar citocinas proinflamatorias como IL-1 y factor de necrosis tumoral (TNF). También actúa de forma directa sobre los enlaces del ADN causando su rompimiento; muerte celular y generación de ERO incluyendo peróxido de hidrogeno, radicales hidroxilo y peroxilo; generación de prostaglandinas, histaminas y leucotrienos por células de la piel (Rhie *et al.*, 2001; Pillai *et al.*, 2005).

### 1.2.1. Activación de queratinocitos

La piel está compuesta de tres capas principales; la epidermis, dermis e hipodermis y cada una de estas capas está compuesta de células específicas. En este sentido, la epidermis es la primera capa que se encuentra expuesta a la radiación UV y es en esta capa donde se encuentran los queratinocitos, melanocitos y las células de Langerhans, las cuales juegan un papel importante como parte de la estructura y funcionalidad de la epidermis (Kulka, 2013).

Los queratinocitos de la epidermis llevan a cabo un proceso de diferenciación asegurando una constante renovación de la epidermis y permitiendo la formación de la capa córnea. Durante este proceso de diferenciación, existe un ordenamiento en la expresión de genes, incluyendo para la producción de queratina (Collin *et al.*, 1992).

El perfil de expresión de queratina varía con el tipo de epitelio: simple, estratificado o escamoso, así como del estado de diferenciación. Este proceso es regulado, sin embargo, se ve modificado bajo ciertas condiciones o perturbaciones como psoriasis o por la presencia de carcinomas (Weiss *et al.*, 1984; Paladini *et al.*, 1996). Así mismo, cuando la piel es expuesta a la radiación UV conlleva al desarrollo de cáncer o foto-envejecimiento (Elmets, 1992). Sin embargo, poco es conocido sobre la regulación de queratina. Un estudio documentó que la radiación UV permite un incremento de la queratina 5 y 14 (Horio *et al.*, 1993); mientras que en la piel en humanos disminuye la queratina 1 y 10 y un incremento de la queratina 5, 14, 1 y 10 por efecto de la radiación con UVB (Smith y Rens 1994).

### **1.2.2. Producción de histaminas**

Se ha reportado que la producción de histaminas, juegan un papel importante en el edema, vasodilatación, contracción del músculo, regulación de moléculas de adhesión e hipersecreción de mucosa asociada con reacciones alérgicas (Bryce *et al.*, 2006). En particular, cuando se tiene exposición a la radiación UVB, se genera un proceso de desgranulación de los mastocitos, por lo tanto, conlleva a la liberación de histaminas, por ejemplo, en humanos se encontró la presencia de histamina después de 4 h de exposición a luz UV (Valtonen *et al.*, 1964; Gilchrest *et al.*, 1981). Estudios previos demostraron que al aplicar un antagonista del receptor de histamina antes y después de la radiación de UVB parcialmente revierte el efecto inmunosupresor de los efectos de la radiación (Hart *et al.*, 1997; Norval *et al.*, 1990). Los efectos de la liberación de histaminas se han evaluado en cultivo de tejidos que han sido expuestos a la luz UV, sugiriendo que la síntesis de PG es estimulada por la presencia de histaminas el cual es un mecanismo subyacente en la fase tardía

de la respuesta al eritema y que la presencia de inhibidores de histamina, inhiben la presencia de PG liberadas por la radiación UV (Pentland *et al.*, 1990).

### **1.2.3 Generación de especies reactivas de oxígeno**

La generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) por exposición a los rayos UV es uno de los mecanismos a través del cual la luz UV puede manifestar sus posibles efectos de deterioro sobre la salud. El estrés oxidativo puede originar daño celular (e.g. peroxidación lipídica y fragmentación de ADN), apoptosis y muerte celular. El proceso por el cual se puede iniciar la generación de EROs es a través de la afectación de la enzima catalasa y un desbalance del óxido nítrico sintasa (iNOS), causando, además un decremento en la expresión de la proteína quinasa incrementando de esta manera las EROs (Jager *et al.*, 2017). Adicionalmente, la exposición a la UV inicia y activa una cascada compleja de reacciones bioquímicas en la piel: causa un agotamiento de los antioxidantes celulares y enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, iniciando el daño en el ADN y a la formación de dímeros, además de la activación del sistema neuroendocrino; lo que conlleva a la inmunosupresión y liberación de mediadores neuroendocrinos, los que causan un incremento en la liberación de mediadores inflamatorios. Estos mediadores incrementan la permeabilidad de los capilares del torrente sanguíneo lo que permite la infiltración y activación de neutrófilos y otras células fagocíticas presentes en la piel (Pillai *et al.*, 2005).

Una gran producción de EROs se liberan por la presencia de macrófagos y linfocitos, las cuales expresan altas cantidades de NADPH oxidasa, la cual está involucrada en el mecanismo de respuesta contra las EROs (Chlopicki *et al.*, 2004). Adicionalmente, el estallido respiratorio de leucocitos infiltrados y macrófagos hacia el sitio de daño de la piel, produce a nivel local, una alta concentración de superóxido y libera iones catalíticos a partir de la ferritina, y la combinación con EROs aumenta el daño en la piel (Trenum *et al.*, 1992). Por el contrario, los radicales hidroxilo, tienen la capacidad de dañar macromoléculas biológicas como el DNA, carbohidratos, lípidos y proteínas. Los aldehídos lipídicos que se producen durante

la peroxidación pueden actuar con aminoácidos y ácidos nucleicos que causan daño celular (Pillai *et al.*, 2005).

#### **1.2.4. Producción de óxido nítrico**

Otro mecanismo de activación por radiación UV es el óxido nítrico (ON), el cual es un potente vasodilatador, que se genera por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (ONS). El óxido nítrico se producen a partir de los queratinocitos, melanocitos y células endoteliales en respuesta a citocinas proinflamatorias y radiación UV. El ON es una molécula activa entre las especies de radicales libres en la inducción a una respuesta vasodilatadora durante el proceso de inflamación. Es así que durante el proceso de exposición a la radiación UV, ésta induce la expresión de ONS inducible (iONS) (Goldsmith *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000). En particular, la generación de ON por los queratinocitos de la piel se identificaron hace 20 años en respuesta a un tratamiento con factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) o interferón alfa (IFN $\alpha$ ). Por lo que se podía atribuir que parte de esta respuesta es el mecanismo de defensa y reparación de la piel, ya que el ON está involucrada en la activación microbiana, la apoptosis y la cicatrización de heridas (Cals-Grierson y Ormerod 2004).

Debido a la importancia que tiene el ON como mediador de la respuesta inflamatoria en la piel, algunos estudios sugieren que la exposición a la luz UV incrementa los niveles de iON después de 8-10 h de exposición, aunque no es la única vía de inducción (Kuhn *et al.*, 1998), así como también la exposición a la luz UV puede ser inducido por un proceso no enzimático, incrementando los niveles de ON a concentraciones fisiológicamente relevantes (Paunel *et al.*, 2005).

#### **1.2.5. Producción de Prostaglandinas**

Los mediadores de ácidos grasos de cadena corta conocidos como eicosanoides, son sintetizados a partir del ácido araquidónico presente en las membranas de las células, y tienen un papel importante como mediadores de respuesta al proceso de eritema. El patrón de síntesis de eicosanoides inicia en respuesta a la intensidad de

la radiación (Hruza y Pentland 1993). Metabolitos del ácido araquidónico como prostaglandinas (PG)-E<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y ácido 12-hidroieicosatetraenoico (12-HETE) se incrementaron después de ser expuestos a radiación UVB y se mantuvieron por 48 h, con el máximo de concentraciones entre las 18 y 24 h. Además, el incremento de PG y HETE después de un proceso de radiación con luz UVB se podría deber al incremento en la liberación del ácido araquidónico de la membrana celular (Ziboh 1992). Al respecto, el papel que juegan las lipoxigenasas y ciclooxygenasas que se producen durante un proceso de radiación con UVB es evidenciado por la reducción de eritema utilizando inhibidores específicos (Levy *et al.*, 2001). Por ejemplo, la administración de aspirina e indometacina inhibe hasta un 50% la actividad de las enzimas durante las primeras 24 h de lesión; sin embargo, si el eritema continua, la indometacina no suprime el efecto (Woodward *et al.*, 1981).

Adicional al papel que juegan los eicosanoides durante el proceso de radiación con UVB, éstos pueden ser mediadores de otros cambios en tejido. Por ejemplo, la PGE<sub>2</sub> ha demostrado mediar *in vivo* el efecto de la piel sensible que se tiene después de ser expuesta a luz UV (Woodward *et al.*, 1981).

Por otro lado, el proceso de proliferación de queratinocitos *in vitro* e *in vivo* es regulado por la presencia de PGE<sub>2</sub> (Soter *et al.*, 1983). Además, la liberación de PGE<sub>2</sub>, en paralelo se ha encontrado la liberación de IL-1, sugiriendo una relación entre estos dos compuestos en este mecanismo de respuesta (Pentland y Mahoney, 1990).

### **1.2.6. Respuesta inmune**

Los efectos de la radiación UV sobre la epidermis, altera la barrera de protección que ésta genera, permitiendo de esta manera la entrada de sustancias hacia la parte interna de la piel y a la vez conlleva a que se genere una respuesta inmunológica. Esto promueve una respuesta inflamatoria que se ve expresada en la producción de citocinas tanto por células residentes como por células reclutadas (Hänel *et al.*, 2013).

Los queratinocitos son las células más abundantes en la epidermis, representando cerca del 95%, y éstos son las que se encuentran más expuestas a la radiación de la luz UV, particularmente la luz UVB, que es la que alcanza la epidermis donde se encuentran éstas células. Estas células tienen la capacidad de sentir y reaccionar al estímulo de la luz UVB y producir citocinas inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, IFN $\gamma$ , quimiocinas (IL-8, MCP-1), factores de crecimiento (GM-CSF, VEGF $\alpha$ ), péptidos antimicrobianos ( $\alpha$  y  $\beta$  defensinas, catelicidinas) (Cela *et al.*, 2018). Estas moléculas promueven la vasodilatación y un incremento en la permeabilidad vascular, permitiendo la formación del edema y el reclutamiento de diferentes células inmunológicas (neutrófilos, macrófagos, y linfocitos) hacia el área de exposición. De esta manera se refuerza la respuesta inmunológica. Adicionalmente, las células de Langerhans (Aberer *et al.*, 1981), son otro tipo de células que se encuentran expuestas a este proceso de radiación con luz UV, reportándose un incremento de estas células y promoviendo la activación de linfocitos y a la activación de moléculas co-estimuladoras (Rattis *et al.*, 1995; 1998). Otros marcadores de respuesta inmunológica por las células residentes y atraídas, son los mediadores solubles o reguladores como las citocinas IL-4, IL-10 y PG y el factor activador de plaquetas. Adicionalmente, la presencia del ácido urónico *cis*, estimula la producción de neuropéptidos por los queratinocitos, que a la vez estimula la liberación de histaminas, las cuales en consecuencia inducen la producción de PGE<sub>2</sub>, lo que conlleva a la producción de IL-4 por linfocitos y monocitos, potenciando la liberación de IL-10 por los queratinocitos. De esta manera, el proceso de respuesta converge en la producción de IL10 para restaurar el proceso de daño (Cela *et al.*, 2018).

### **1.3 Estrategias para prevenir el daño de la radiación UV en la piel**

La estrategia preventiva más simple de la naturaleza contra la radiación solar dañina es la absorción o refracción de la luz por un engrosamiento del estrato córneo y el espesor total de la epidermis. Las proteínas elastina y colágeno, melanina, quinonas y flavinas (en foto proteínas) están presentes en grandes cantidades en la epidermis y forman un filtro contra la radiación UV (Bailey, 2001).

A continuación se mencionan algunos sistemas de protección:

El uso de protectores solares ha sido una de las estrategias más utilizadas para proteger a la piel de los daños ocasionados por la radiación UV. El uso diario de cremas que contienen una combinación fotoestable de UVB y UVA, proporcionan protección durante un proceso de absorción continua de rayos UV, principalmente mediando la respuesta contra eritema, hiperpigmentación, y regulación de MMP-2 (Selte *et al.*, 2000).

Otras estrategias es el uso de antiinflamatorios (esteroidales y no esteroidales), los cuales han demostrado proteger a la piel del proceso inflamatorio ocasionado por la radiación UV, al suprimir la generación de agentes o citocinas inflamatorias. Los más comunes son la vitamina D (Griffiths, 1998), corticosteroides, tacrolimus y pimecrolimus (Niedner, 2003; Voorhees y Fisher, 1998).

Hay inhibidores que ejercen sistemas de protección contra las EROs como:

- a) Inhibidores de metaloproteasas. Este efecto es mediado principalmente por los retinoides que comprenden al retinol, retinal y retinil ésteres, los cuales al ser aplicados de manera tópica previenen la inducción de metaloproteasas (MMP) al prevenir la acumulación de proteínas c-Jun (Fisher *et al.*, 2002).
  
- b) Inhibidores de proteasas leucocitarias. Principalmente enfocados en la inhibición de elastasas y cetepsina G. Esto con el fin de bloquear la degradación de la matriz extracelular de la piel, además de prevenir el desbalance de proteasas-antiproteasas que se observa en el proceso de inflamación ocasionado por la radiación UV (Ying *et al.*, 1991; Sartor *et al.*, 2002). Como ejemplo se tiene el uso del ácido ursólico como inhibidor de elastasas (Ying *et al.*, 1991); ácidos grasos; ácidos biliares (Simon *et al.*, 1988; Tyagi y Simon 1990; 1991).

El uso de antioxidantes tópicos es una de las estrategias a la que se ha recurrido en los últimos años, reduciendo de esta manera la concentración de ERO generados por la exposición a la radiación UV.

### **1.3.1 Respuesta antioxidante**

Los antioxidantes tópicos pueden prevenir la generación de ERO y subsecuentemente disminuir la respuesta inflamatoria. La exposición a la radiación UV genera un exceso de electrones en la cadena respiratorio para la generación de aniones superóxido o por la conversión no enzimática del oxígeno molecular a radicales de anión superóxido (Pillai *et al.*, 2005). Estudios recientes han demostrado que las enzimas antioxidantes disminuyen cuando existe un proceso de fotoenvejecimiento (Rhie *et al.*, 2001), así como, las actividades que se generan por acción de la glutatión reductasa y glutatión peroxidasa (Weber *et al.*, 2000; Thiele 2001; Sander *et al.*, 2002; Thiele 2002).

En este sentido, la adición de antioxidantes exógenos podría coadyuvar a disminuir ERO y la respuesta inflamatoria. La aplicación tópica, por ejemplo, de vitamina E, ácido ascórbico, y carotenoides han demostrado contribuir a disminuir la respuesta de ERO (Dreher y Maibach 2001), muchos de estos compuestos provenientes de plantas (Podda y Grundmann-Kollmann 2001). Por ejemplo, la aplicación de quercitina (Skaper *et al.*, 1997) y compuestos polifenólicos (Zhao *et al.*, 1999), los cuales se encuentran ampliamente documentados sobre sus efectos antioxidantes y prevenir el daño inducido por la radiación UV (Svobodava *et al.*, 2003; Pillai *et al.*, 2005)

Es así, que el uso de compuestos naturales ya sea solos o incorporados con algún acarreador sea una buena alternativa para combatir estos daños. Una de las opciones que se han reportado como alternativa a combatir los daños ocasionados por la radiación UV es el uso de bacterias ácido lácticas probióticas.

### **1.3.2 Bacterias ácido lácticas probióticas**

Las bacterias ácido láctica (BAL) representan un grupo diverso de bacterias Gram-positivas en forma de cocos, o bacilos agrupadas en función de sus características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Las BAL se caracterizan por la ausencia

de las enzimas oxidasa y catalasa, son asporogénicas (Carr et al., 2002; Von Wright y Axelsson, 2012). En especial las cepas del género *Lactobacillus* (*Lb*) son bacterias microaerofílicas, que incluye más de cien especies diferentes; e.g. *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. salivarius*, las cuales se utilizan en la industria de alimentos y farmacéutica (Kleerebezem y Vaughan, 2009). Los *Lactobacillus* habitan diferentes nichos ecológicos. Se pueden encontrar en las mucosas de los mamíferos, en productos fermentados, o en la superficie de las plantas incluso en el suelo (Barrangou et al., 2012).

Basado en una gran diversidad, los microorganismos son una fuente potencial para la búsqueda de nuevas moléculas de interés farmacológico. Actualmente, se puede decir que entre el 20 y el 50% de los medicamentos presentes en el mercado farmacéutico contienen moléculas aisladas de bacterias (Kingston, 2011).

### **1.3.3 Mecanismos de la acción de las bacterias probióticas**

Los probióticos ejercen sus efectos positivos a través de diferentes mecanismos como la actividad antimicrobiana, la unión a toxinas, competencia por nutrientes, la actividad inmunomoduladora, la capacidad de adhesión a mucosas (Vanderpool et al., 2008; Oelschlaeger, 2010). En este sentido, uno de los grupos representativos de bacterias probióticas, es el grupo de *Lactobacillus*, los cuales se caracterizan por la producción de ácidos orgánicos (acético, láctico y propiónico), peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Vanderpool et al., 2008; Nes et al., 2012).

El fortalecimiento de la barrera epitelial y la inmunomodulación se generan a través de la interacción de los probióticos con las células epiteliales intestinales y las células inmunes localizadas en lámina propia, los cuales son reconocidos por receptores TLR (receptores tipo Toll) y NLR (receptores de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos), los cuales activan diferentes vías de señalización y se induce producción de citocinas como respuesta final (Leeber et al., 2010). Sin embargo, recientemente se ha recurrido al uso de bacterias probióticas para ser incorporados en productos cosmeceúticos.

### 1.3.4 Probióticos y Cosmecéuticos

El microbioma de la piel está influenciado por el pH, el contenido de sebo, la función de barrera y la hidratación. (Zeeuwen, 2013). Un ligero pH ácido favorece el crecimiento de *Propionobacterium*, y son más abundantes donde hay presencia de glándulas sebáceas. Las áreas secas de la piel tienen la mayor diversidad de especies. Además, factores extrínsecos como la ubicación geográfica, la ocupación y el uso de antibióticos o cosméticos pueden influir en la microbiota de la piel (Holland, 2002). Los estudios indican que las alteraciones de ésta en la piel juegan un papel importante en afecciones como la dermatitis atópica, la psoriasis, el acné, inflamación y el cáncer de piel (Salva, 2004).

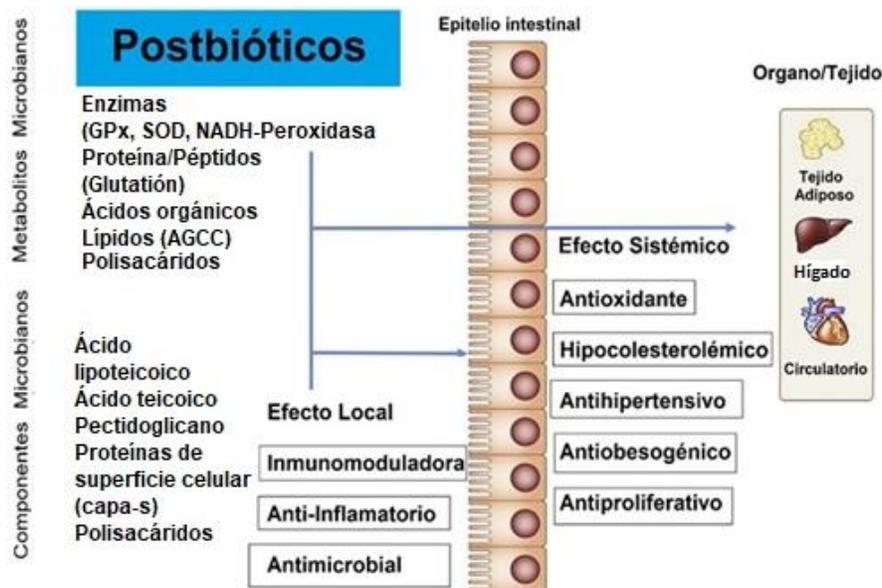
La primera mención de los probióticos tópicos como un tratamiento terapéutico para las afecciones de la piel apareció en la literatura médica en 1912, y se denominó "bacterioterapia tópica". No fue hasta 1999 que los investigadores pudieron conocer exactamente cómo la aplicación de probióticos a la piel podría mejorar la salud dermatológica. Descubrieron que el *S. thermophilus*, microorganismo que se encuentra en el yogurt, aumentaba la producción de ceramida por queratinocitos, lo que fortalece la barrera lipídica de la piel y la hace más resistente a la sequedad (Bockmuhl, 2016). El uso de un probiótico tópico que ofrece un escudo protector y desencadena la producción de humectantes naturales en la piel. También interactúan con el sistema inmune y protegen contra bacterias dañinas. Por ejemplo, se encontró que una crema que contiene el lisado de *S. thermophilus* aumenta significativamente los niveles de ceramida del estrato córneo en mujeres sanas después de dos semanas de aplicación (Marzio, 2008).

Un estudio reportado por Marzio *et al.* (2008), donde aplicaron una crema, que contenía lisados de *Streptococcus thermophilus*, a mujeres durante un periodo de dos semanas, demostraron el incremento de ceramida en el estrato córneo, además los niveles de hidratación fueron significativamente más altos. Los autores propusieron que ésta crema con lisado celular es capaz de mejorar la barrera

lipídica e incrementar la resistencia contra la serosis asociada al envejecimiento (Marzio, 2008).

### 1.4 Postbióticos

El término postbiótico hace referencia al contenido intracelular de las bacterias probióticas, los cuales se liberan después de la lisis bacteriana (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018).



**FIGURA 2.1** Efectos benéficos a nivel local y sistémico reportados para postbióticos (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018).

Los postbióticos pueden clasificarse de acuerdo a su origen; lipídico (butirato, propionato, plastrógeno derivado de dimetil acetilo), proteínas (lactocepina, molécula p40), carbohidratos (polisacáridos ricos en galactosa y ácidos teicoicos), vitaminas/cofactores (vitaminas del grupo B), ácidos orgánicos (ácido propiónico y 3-feniláctico) y péptidos derivados del peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos (Kostantinov, 2013; Tsilingiri y Rescigno, 2013).

Adicionalmente, las funciones fisiológicas que se han reportado incluyen inmunomodulación, antiinflamatorios, hipocolesterolémicos, antiobesogénicos, antihipertensivos, antiproliferativos y antioxidantes (ver Figura 2.1) (Nakamura, 2016; Shin, 2010). En general, los postbióticos poseen varias propiedades atractivas, como estructuras químicas definidas, parámetros de dosis de seguridad y larga vida útil (hasta 5 años, cuando se utilizan como ingrediente para alimentos y bebidas o como suplementos nutricionales (Shigwedha, Sichel, Jia , y Zhang, 2014; Tomar, Anand, Sharma, & Sangwan, 2015).

### **1.4.1 Postbióticos en Cosmecéticos**

En los últimos años, la demanda de los consumidores de productos cosmecéticos con funciones protectoras y terapéuticas derivadas de fuentes naturales ha provocado que la industria busque ingredientes activos alternativos (Aguilar-Toalá *et al.*, 2019). El auge de los postbióticos ha sido impulsado la tendencia en la que el reposicionamiento de la belleza como un problema de estilo de vida, trata a la piel como una expresión visible de la salud interna y externa. Los formuladores buscan cada vez más formas de mantener el microbioma en equilibrio y recurren a los probióticos, o "bacterias buenas", como la mejor opción. Los lisados de células bacterianas proporcionan una amplia actividad biológica y podrían traer efectos benéficos en la piel. Algunos cosméticos con lisados de células bacterianas ya se han posicionado en el mercado (Cuero, 2018). Este hecho justifica la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas y el potencial de los postbióticos tópicos utilizando como vehículo un sistema de entrega nanoestructurado específico para la liberación de componentes bioactivos.

## **1.5 Sistemas nanoestructurados**

### **1.5.1 Geles**

Un gel es un material semisólido compuesto de un agente gelificante que, en la presencia del solvente adecuado se ensamblan mediante interacciones físicas o químicas en una red tridimensional y forma una tensión superficial la cual limita el fluido entrelazando e inmovilizando las moléculas del solvente (Vintiloiu y Leroux, 2008; Debnath *et al.*, 2014).

### 1.5.2 Geles transdérmicos

La definición de sistemas de administración transdérmica de fármacos fue propuesto por Alejandro Zaffaroni a principios de la década de los 70's (Chaudhary *et al.*, 2011). Este tipo de geles son preferibles cuando los medicamentos tienen una baja biodisponibilidad oral debido a que es rápidamente metabolizada en el hígado y/o una vida media corta, o si los medicamentos producen algunos efectos secundarios adversos tras la administración oral (Kaur y Singh, 2015). El objetivo final de la administración transdérmica de los fármacos es asegurar que los compuestos se administren a una velocidad específica y pasen a circulación sistémica.

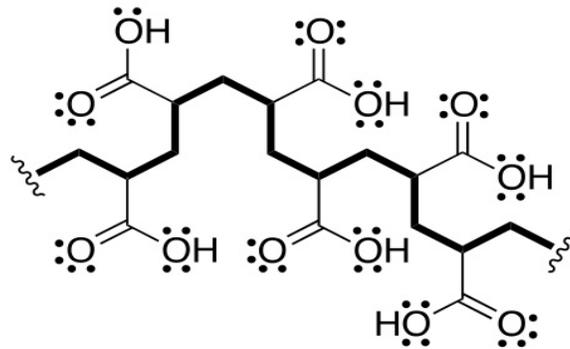
### 1.5.3 Nanogeles

Los nanogeles (NG's) pueden definirse como hidrogeles de tamaño nanométrico compuestos de co-polímeros o monómeros que pueden ser iónicos o no iónicos. El tamaño de los nanogeles oscila entre 20-200 nm. Otra definición es que los nanogeles son redes hidrofílicas tridimensionales de tamaño nanométrico que tienen la tendencia a embeber agua o un fluido fisiológico en gran cantidad, sin cambiar en la estructura interna de la red (Yadav *et al.*, 2017). Esta composición conlleva un módulo elástico en el intervalo de 0.1-100 kPa (Buwalda *et al.*, 2017).

Para preparar un nanogel a partir de una nanoemulsión, se debe dispersar la cantidad apropiada de Carbopol 940® en la nanoemulsión y mantener en agitación constante (mediante un agitador magnético), teniendo cuidado de evitar la formación de grumos; finalmente se deja hidratar durante 4 a 5 horas. Pasado este tiempo, la dispersión se neutraliza con trietanolamina para ajustar el pH a 7, el cual es cercano al pH de la piel y no causa irritación (Arora *et al.*, 2014). Incorporar la nanoemulsión dentro de nanogeles, puede reducir la coalescencia entre las partículas durante el proceso de emulsificación, debido al incremento en la viscosidad de la fase acuosa (Restrepo *et al.*, 2016). En otro estudio, se mostró que la concentración del agente gelificante (Carbopol 940®) en intervalos de 0.5 a 2.0 afectan ligeramente la velocidad de liberación de los fármacos (Altunbas *et al.*, 2011). El agregar Carbopol 940® a una nanoemulsión ayuda a que las gotas se

distribuyan en la red del gel, lo que puede contribuir a mejorar la estabilidad de las gotas en la nanoemulsión, además de lograr restringir el movimiento browniano. Finalmente, se ha reportado recientemente que los nanogeles cambian las propiedades reológicas de las nanoemulsiones para su administración tópica (Mou *et al.*, 2008; Arora *et al.*, 2014). Es importante mencionar que en un sistema de nanogeles con nanoemulsiones contenidas, la estabilidad realmente depende de las nanoemulsiones.

El Carbopol 940® es un derivado poliacrílico aniónico, en el que el grado de ionización depende significativamente del pH del medio. Es uno de los excipientes más ampliamente utilizados para el espesamiento de sistemas tópicos como lociones, cremas y geles, y pueden formar un nanogel en agua o solución alcalina debido a la ionización de los grupos carboxílicos. El Carbopol 940® posee propiedades deseables como gelificación, alta viscosidad a baja concentración y es estable al calor con una variabilidad insignificante de lote a lote. En la Figura 3.1 se puede observar su estructura. Además, aumenta la estabilidad de la formulación, y no es compatible con el crecimiento bacteriano o fúngico, y la formulación resultante tiene una textura agradable y no es irritante (Oliveira *et al.*, 2011; De Vargas *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2015) encontraron que los geles que contienen Carbopol 940® son adecuados para gelificar nanoemulsiones debido a su consistencia, sensación y alta capacidad de extensión. La estructura de los geles de Carbopol 940® puede ser determinada por el nivel en el que las macromoléculas se conectan y forman los entrecruzamientos (Alves *et al.*, 2005).



**FIGURA 3.1** Estructura del Carbopol 940®. (González, 2017)

La entrega transdérmica de fármacos a través de nanogeles mejora el potencial de permeabilidad de los diferentes componentes del sistema. Entre los mecanismos que ayudan a mejorar la capacidad de penetración de nanogeles por vía tópica, diversos autores han afirmado que las gotas con una carga modificada tienen influencia significativa en la afinidad y unión a la piel, lo que podría promover la biodisponibilidad y actuar como depósitos de fármacos, donde el compuesto se libera de la fase interna a la fase externa y luego sobre la piel. Debido a los pequeños diámetros de las gotas en las nanoemulsiones, éstas pueden incrustarse en el estrato córneo y las moléculas del compuesto bioactivo podrían ser liberadas directamente a través de la fase hidrófila de las nanoemulsiones. Además, el número de gotas que puede interactuar en el área fija del estrato córneo aumenta a medida que disminuye el tamaño de gota (Mou *et al.*, 2008; Arora *et al.*, 2014). Por otra parte, los nanogeles se han utilizado para crear depósitos que suministren los agentes bioactivos y lograr con esto aumentar la biodisponibilidad del fármaco, reducir los efectos secundarios, aumentar la facilidad de su uso y reducir el dolor de la administración (Altunbas *et al.*, 2011).

El método más simple para establecer la formación de un gel es llevar a cabo la prueba de tubo invertido. Después de homogeneizar la muestra, se invierte el tubo de ensayo; si el contenido del tubo de ensayo fluye, el sistema se considera como sol (o tal vez un gel débil), lo que indica que la composición particular ha fallado

para inducir la gelificación, por lo que el sistema se considerará como gel si el contenido del tubo de ensayo no fluye (Sagiri *et al.*, 2014).

La cantidad mínima de gelificante que se requiere antes de que pueda inducir la gelificación a temperatura ambiente se conoce como la concentración crítica gelificante. Si la concentración del gelificante está por debajo de esta concentración, el gelificante fallará al inducir la gelificación y el sistema permanecerá en la fase líquida. En el gel existe un límite crítico superior de acomodamiento en la fase acuosa; si este límite es superado, la gelificación no ocurre o se puede producir un sistema bifásico, donde el exceso de agua no es retenido dentro de la estructura en red (Kumar y Katare, 2005).

Los nanogeles se han utilizado ampliamente para el tratamiento tópico en los últimos años; esto por que poseen características favorables para utilizarlos como vehículos para la liberación controlada y selectiva de fármacos en el organismo: a) poseen una estructura tridimensional que permite almacenar moléculas pequeñas, b) pueden ser biocompatibles debido al gran contenido de agua que poseen en su estructura, c) reducen de esta forma la irritación producida por la fricción de los tejidos con los que entran en contacto, y d) logran disminuir la desnaturalización de proteínas (Ramirez y Astudillo, 2016). Para preparar el nanogel se pueden utilizar diversos polímeros basados en polisacáridos. Los polisacáridos son todos los polímeros de carbohidratos que contienen al menos veinte residuos de monosacáridos (Yadav *et al.*, 2017). Dentro de las redes del nanogel pueden quedar atrapadas las gotas de una nanoemulsión, para proporcionar una liberación prolongada de un compuesto bioactivo. Así mismo, una nanoemulsión se puede convertir en un gel con el fin de ser más adecuada para aplicaciones dérmicas; esto se logra mediante la adición de diferentes polímeros solubles en agua o matrices de nanogel tales como carbómero, Carbopol 940® y carragenina, de manera que sólo la fase de agua externa se gelifica, mientras que las gotas de la nanoemulsión internas permanecen líquidas (Hoare y Kohane, 2008).

#### 1.5.4 Nanoemulsión

La nanoemulsión es un sistema prometedor para la administración transdérmica de fármacos y se define como una solución líquida termodinámicamente estable con un diámetro de gota por lo general en el intervalo de 50- 300 nm, que consiste en aceite, un agente tensoactivo y una fase acuosa. Las nanoemulsiones son interesantes como vehículo para productos tópicos, ya que tienen partículas muy pequeñas que causan la reducción de la fuerza gravitatoria y evita que se produzca la sedimentación, además de que impide el proceso de floculación y coalescencia. También cabe destacar su baja tensión interfacial que aumenta la humectabilidad, la propagación y las propiedades de penetración (Oliveira *et al.*, 2011).

Algunas ventajas significativas incluyen la baja irritación de la piel, capacidad de permeación y alta capacidad para acarrear fármacos para el suministro tópico, en comparación con microemulsiones o liposomas. Cuando se utiliza para el suministro tópico de fármacos, posee otras ventajas. En primer lugar, los ingredientes pueden reducir la barrera de difusión de la capa córnea y aumentar la velocidad de permeación del fármaco a través de la piel al actuar como mejoradores de la permeación, y hay una mayor concentración del fármaco que entrará en contacto con la piel. Sin embargo, su baja viscosidad limita su administración transdérmica. La incorporación de una nanoemulsión en la matriz de un gel puede ser más relevante para la aplicación transdérmica en comparación con la nanoemulsión sola (De Vargas *et al.*, 2012; Arora *et al.*, 2014).

En un estudio llevado a cabo por Arora *et al.* (2014) se prepararon diversas formulaciones de nanoemulsiones que tuvieron bajas viscosidades y fueron inapropiadas para su uso dérmico. Con el fin de conferirle aplicabilidad a las nanoemulsiones, se incorporó en el sistema el carbomero 940 y se observó un aumento en la viscosidad, lo que mejoró su aplicación tópica. Una nanoemulsión hecha gel es preferible debido al efecto prolongado y una mayor viscosidad que mejora la aplicabilidad en la piel. En otro estudio Oliveira *et al.*, (2011) se desarrolló un nanogel a partir de nanoemulsiones con vitamina A; dichos sistemas mostraron

buena estabilidad, tamaño de gota pequeño y un aumento en la viscosidad, siendo posible utilizarlo como un sistema de administración para aplicación tópica.

La manera directa de evitar las inestabilidades de las emulsiones es conocer sus propiedades.

El tamaño de partícula en una nanoemulsión es una de las propiedades claves en su caracterización puesto que influye en el tiempo de almacenamiento y estabilidad, las propiedades ópticas, reológicas, biodisponibilidad, sabor y textura del producto (McClements, 2009). El número de partículas en una emulsión es extremadamente grande y aumenta al disminuir el tamaño de partícula (McClements, 2011; Acevedo, 2017). El tamaño de glóbulo de una emulsión es usualmente expresado como el diámetro de los glóbulos de la fase dispersa; considerando que todos estos tuvieran el mismo volumen en todo el sistema (Chávez, 2015).

Otra manera de caracterizar las nanoemulsiones es a partir de la polidispersidad del sistema, que indica la uniformidad de una distribución de tamaños, es decir, cuántos tamaños diferentes están presentes en el medio; los cuales pueden ser representados gráficamente en función al número de picos que están relacionados en la distribución del tamaño de partícula. Estos gráficos se definen como monomodal y multimodal (Loyo, 2017). Las distribuciones se conocen como "monodispersas" si la polidispersión es  $<0.2$ . Esta distribución es la deseada debido a que muestra una homogeneidad de tamaño de partícula, y esto se observa con una alta tasa de estabilidad. (McClements, 2011).

### **1.5.5 Caracterización morfológica de sistemas nanoestructurados**

La microscopía electrónica es de suma importancia para obtener información sobre la morfología de los sistemas con resolución atómica cercana. Entre las técnicas de microscopía electrónica más frecuentemente empleadas para esta tarea se encuentra la microscopía electrónica de barrido (SEM) (Klang *et al.*, 2013).

La característica esencial de un microscopio de barrido es que la imagen se forma punto por punto explorando con una sonda a través de la muestra. La sonda de un SEM es un haz de electrones enfocado, y una señal detectada se muestra como una imagen de tipo Dispositivo de Carga Acoplada (CCD). Los electrones primarios

penetran en el espécimen sólido y son afectados por un gran número de procesos de dispersión elástica. El espectro energético de los electrones que sale de la muestra es recogido por el sistema detector y da como resultado tres tipos de información específica. Los electrones secundarios (SE), los electrones retrodispersados (EEB) y los rayos X. La topografía superficial cuasi-3D puede registrarse principalmente debido a las SE, es decir, todos los electrones emitidos con energías de salida inferiores a 50 eV. Los instrumentos SEM generalmente emplean energías de electrones de unos 10 keV para proporcionar una resolución nanométrica, que es suficiente para muchos análisis (Klang *et al.*, 2013).

Las principales características del análisis SEM, es la resolución de la imagen y la profundidad de campo, lo cual permite obtener imágenes con apariencia 3D, determinando la topografía de la muestra en diferentes campos (Perez-Arategui y Mulvey 2005).

## II. JUSTIFICACIÓN

La exposición desmesurada y sin protección a la radiación UV estimula la liberación de diferentes metabolitos (radicales libres, óxido nítrico, citocinas) que pueden inducir daño celular y/o carcinogénesis a través de procesos inflamatorios.

Los cosmeceúticos preparados con postbióticos obtenidos de bacterias ácido lácticas específicas podrían ser una alternativa prometedora, ya que sus propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras podrían reducir el efecto perjudicial de la radiación UV.

Un sistema nanoestructurado (nanoemulsiones, nanogeles) adicionado con dichos postbióticos puede ser un sistema acarreador no invasivo, que ejerza efectos benéficos al equilibrar la homeostasis celular en la piel dañada.

### **III. HIPÓTESIS**

La aplicación tópica de postbióticos antioxidantes incorporados en un sistema nanoestructurado como sistema acarreador inhibe y/o reduce la inflamación generada por la exposición a la radiación UV.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar el potencial efecto antiinflamatorio de sistemas nanoestructurados preparados con postbióticos antioxidantes utilizando un modelo murino con inflamación inducida por radiación UV.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar las propiedades antioxidantes del contenido intracelular y pared celular (Postbióticos) de bacterias ácido-lácticas y pre-seleccionar aquellas con mayor capacidad antioxidante.
2. Determinar el efecto antiinflamatorio *in vitro* de los postbióticos pre-seleccionados, y elegir aquellos con mayor actividad antiinflamatoria.
3. Desarrollar y caracterizar un sistema nanoestructurado formulado con los postbióticos seleccionados.
4. Evaluar la potencial actividad antiinflamatoria del sistema nanoestructurado formulado con postbióticos en un modelo murino con inflamación inducida por radiación UV.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Reactivos de trabajo

Los reactivos que se utilizaron en el presente proyecto fueron: lisozima de clara de huevo, fluoresceína, AAPH (2,2'-azobis (2-aminopropano) dihidrocloruro, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU), ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (Sigma- Aldrich), tripsina, caseína, ácido perclórico, ácido salicílico (Aspirina®)(ácido linoleico, borato de sodio, Tween 80, lipoxigenasa de soya (Glycine max) tipo 1-B, Indometacina, (Sigma- Aldrich), reactivo de Griess (Sigma- Aldrich) benceno-acetonitrilo, glicerol grado reactivo (Sigma- Aldrich), persulfato de potasio (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EEUU), albumina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) (Merck KGaA 12018, Darmstadt Alemania), fosfatidilcolina (PC) (95 % PC de soya) Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), ácidos grasos de cadena media (Premiun brand 100% Pure MCT Oil) de la compañía Swanson Health Products (Fargo, Dakota del Norte, EEUU), trietanolamida (Sigma- Aldrich), el carbopol 940® fue adquirido de la droguería cosmopolita en CDMX.

#### 5.1.1. Cultivos de trabajo

Las seis bacterias (ver Tabla 1.5), de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Enterococcus*, utilizadas en esta investigación forman parte de la colección de cepas del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Hermosillo, México. Tres de las bacterias han mostrado previamente poseer propiedades probióticas (Santiago-López *et al.*, 2018), mientras que las otras tres son reconocidas probióticas y fueron empleadas como cepas de referencia.

**TABLA 1.5** Bacterias probióticas y con potencial probiótico empleadas en el presente estudio.

Cepas	Código	Fuente
<b>Cepas probióticas (bacterias de referencia)</b>		
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Lc-shi	Yakult™
<i>Lactobacillus paracasei casei</i> <i>subsp. paracasei</i> 431	CRL431	Maramor chocolates™
<i>Bacillus coagulans</i> BC30	BC30	Karma wellness water®
<b>Cepas con potencial probiótico</b>		
<i>Lactobacillus fermentum</i> J20	J20	Queso cocido artesanal de Sonora
<i>Lactobacillus pentosus</i> J24	J24	Queso cocido artesanal de Sonora
<i>Enterococcus faecium</i> 16	E16	Queso de Poro, Balancán, Tabasco

Las cepas fueron reactivadas en caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, Difco™, Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, Francia). Posteriormente, fueron propagadas mediante tres sub-consecutivos consecutivos (24, 18 y 12 h, respectivamente, 37 °C). Los paquetes celulares, recuperados por centrifugación (3600 g, 4 °C, 10 min) a partir del último sub-cultivo, fueron lavados dos veces con una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS, 0.5 mM, pH 7.2). Los paquetes celulares obtenidos se re-suspendieron en PBS hasta alcanzar un  $DO_{600\text{ nm}}=0.5$  (SpectraMax M3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU), equivalente a una concentración de ca.  $10^8$  UFC/mL (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018), y fueron empleados para la obtención de los postbióticos, como se describe a continuación.

### **5.2 Obtención del contenido intracelular y pared celular (postbióticos)**

Los postbióticos fueron obtenidos siguiendo el procedimiento descrito por Aguilar-Toalá y colaboradores, (2018), con algunas modificaciones. Para ello, se centrifugó (3600xg, 4 °C, 10 min) una alícuota de 10 mL de cada una de las bacterias resuspendidas en PBS. El paquete celular recuperado fue resuspendido en 1 mL de PBS adicionado con lisozima (1 mg/mL), y se dejaron incubar a 37 °C durante 150 min. Posteriormente, las células fueron lisadas por sonicación empleando un procesador ultrasónico (Aquasonic 50D, Ultraonic Cleaner, San José, CA, EEUU), configurado a una velocidad de 9 (60 Hz), cinco ciclos de 1 min, con un 1 min de reposo entre ciclos, a 10 °C. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas (3600xg, 4 °C, 10 min), y se recuperaron los sobrenadantes (contenido intracelular, CI), mientras que los paquetes de fragmentos celulares (pared celular, PC) fueron resuspendidos con PBS a su volumen inicial. Las muestras se almacenaron inmediatamente en condiciones de oscuridad a 4 °C para su posterior análisis.

### **5.3 Determinación *in vitro* de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los postbióticos obtenidos.**

Para realizar los ensayos *in vitro* de actividad antioxidante y antiinflamatoria, se ajustó la concentración de proteína (0.10 mg/mL) de los contenidos intracelulares y paredes celulares obtenido previamente. Para ello, primero se estimó el contenido de proteína de cada una de las muestras utilizando el Kit DC Protein Assay (BioRad Laboratories) basado en el método de Lowry *et al.* (1951). La absorbancia de cada muestra se registró leyendo a 750 nm en lector de microplacas SpectraMax M3. El contenido de proteína se determinó utilizando una curva estándar de albumina de suero bovino (0.25-1.25 mg/mL) como se muestra en el APENDICE A.

#### **5.3.1 Evaluación de la capacidad antioxidante**

La capacidad antioxidante de las muestras de pared celular y contenido intracelular fue determinada por dos técnicas: la capacidad de atrapar radicales mediante el 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>), y la capacidad de

absorbancia del radical de oxígeno (ORAC). Estos métodos fueron utilizados debido a sus diferentes mecanismos de acción: transferencia de electrones (ABTS), y transferencia de átomos de hidrogeno (ORAC), respectivamente (Zulueta *et al.*, 2009). Los resultados de la capacidad antioxidante de las muestras se expresaron en  $\mu\text{M}$  de equivalentes de Trolox, utilizando éste como estándar y en concentraciones de 0-500  $\mu\text{M}$  (APENDICE B).

### **5.3.1.1 Neutralización del radical catión ABTS**

Para éste ensayo se siguió la metodología descrita por Re *et al.* (1999). Para ello, se preparó, en condiciones de oscuridad, el radical ABTS mezclando una solución de 25 mL de ABTS (7 mM) y 440  $\mu\text{L}$  de persulfato de potasio (140 mM) disueltos en agua mili-Q; la mezcla se incubó en oscuridad durante 16 h a 30 °C. Una vez formado el radical, éste fue diluido con PBS (0.05 mM, pH 7.4) y ajustado a una absorbancia (734 nm) de  $0.7 \pm 0.02$  (SpectraMax M3). Para realizar el ensayo de neutralización del radical catión ABTS, se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución ajustada del radical ABTS en una microplaca transparente de 96 pocillos (Corning™, Costar®, Tewksbury, MA, EEUU) previamente incubada a  $30 \pm 1$  °C por 15 min con 15  $\mu\text{L}$  de la muestra, testigo o estándar (0-500  $\mu\text{M}$  de Trolox, y agitados durante 15 s. La absorbancia de esta mezcla fue registrada después de haber sido incubada por 7 min a  $30 \pm 1$  °C y agitada nuevamente por 15 s en un lector de microplacas.

### **5.3.1.2 Determinación de la capacidad de absorbancia del radical de oxígeno (ORAC)**

El ensayo de ORAC se realizó siguiendo la metodología descrita por Ou *et al.* (2001) y Zalueta *et al.* (2009). Para realizar el ensayo se preparó una solución madre de fluoresceína sódica (117 Mm) disuelta en PBS (pH 7.0) y almacenada en congelación bajo condiciones de oscuridad. Para preparar la solución de trabajo de fluoresceína sódica (78 nM), se tomó una alícuota (16.7  $\mu\text{L}$ ) de la solución madre; ésta fue disuelta en 25 mL de PBS (pH 7.0). Posteriormente, se tomó una alícuota (50  $\mu\text{L}$ ) de la solución de trabajo y 50  $\mu\text{L}$  de las muestras de CI y PC, testigo o estándar Trolox (0-500  $\mu\text{M}$ ), las cuales fueron colocadas en una microplaca de

fluorescencia (negra) de 96 pocillos e incubadas a  $37 \pm 1$  °C, durante 5 min. En paralelo, se preparó el radical AAPH (221 mM) en PBS (pH 7.0). Una alícuota (25  $\mu$ L) de ésta solución fue adicionada a la microplaca, la cual se agitó durante 5 s. Finalmente, las muestras se dejaron incubar durante 5 h y se registró la fluorescencia ( $\lambda_{em}$ : 535 nm y  $\lambda_{ex}$ : 485 nm) cada cinco minutos (SpectraMax M3). Se utilizó Trolox como patrón para crear una curva de referencia (0 a 500  $\mu$ M en PBS). Los datos de fluorescencia obtenidos fueron recopilados y procesados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel (Redmond, WA, EEUU.), para crear curvas para cada una de las muestras, y normalizarlas con respecto a la curva de Trolox. Posteriormente, los datos normalizados fueron graficados con respecto al tiempo con el fin de obtener las áreas bajo la curva de decaimiento de fluorescencia (ver APENDICE C). El área bajo la curva (ABC) se calculó de la siguiente manera:

$$ABC = 1 + \sum_{i=5}^{i=60} f_i/f_0$$

donde  $f_0$  corresponde a la fluorescencia inicial medida al tiempo 0 y  $f_i$  es la fluorescencia registrada después de 5 h. El área bajo la curva neta correspondiente a las muestras fue calculada restando el área de la curva testigo o estándar de Trolox. Aquellas muestras que mostraron mayor actividad antioxidante fueron seleccionadas para realizar los ensayos de actividad antiinflamatoria, como se describe a continuación.

#### **5.4 Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro***

##### **5.4.1 Inhibición de la desnaturalización proteica inducida por calor**

El ensayo se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Patel y Zaveri (2014), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción consistió en 450  $\mu$ L de BSA (5 % p/v) como sustrato y 50  $\mu$ L de cada una de las muestras. El pH de la mezcla se ajustó a 6.3 con HCl 1N. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 min y luego se sometieron a un tratamiento térmico (57 °C) en baño maría, durante 3 min. Posteriormente, las muestras se enfriaron a 37 °C, y se agregaron 2.5 mL de

PBS. La turbidez generada se registró a 600 *nm* (SpectraMax M3 Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU). Adicionalmente se registró la absorbancia de las muestras sin la adición de BSA, con el fin de restar la absorbancia de la muestra *per se*. El porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la proteína se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{DO (\text{Testigo}) - DO (\text{muestra})}{DO (\text{Testigo})} \times 100$$

Donde BSA sin muestra (CI o PC) representó al testigo (100% de desnaturalización). Los resultados fueron comparados contra indometacina (0.1 mg/mL), un fármaco antiinflamatorio reportado como inhibidor de esta actividad.

#### 5.4.2 Inhibición de la actividad de tripsina

Para determinar la capacidad de inhibir la actividad de tripsina por cada una de las muestras se siguió el método reportado por Patel y Zaveri (2014). La mezcla de reacción (2 mL) se preparó con 1 mL de Tris-HCl (25 mL, pH 7,4) y 1 mL de las diferentes muestras (CI y PC). La mezcla fue adicionada con tripsina a una concentración de 0.06 mg. Las muestras se dejaron incubar a 37 °C durante 5 min; posteriormente, se agregó 1 mL de caseína al 0.8% (p/v) y se dejaron incubar por 20 min a 37 °C. Finalmente, se agregaron 2 mL de ácido perclórico (60%, v/v) para detener la reacción. Las muestras se centrifugaron (4600xg, 5 min), se recuperó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 280 *nm*. El porcentaje de inhibición se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Absorbancia} (\text{Testigo}) - \text{Absorbancia} (\text{muestra})}{\text{Absorbancia} (\text{Testigo})} \times 100$$

Donde el testigo representó la absorbancia de la enzima sin muestra (CI o PC). Los resultados se compararon contra indometacina (60 µg/mL), un fármaco antiinflamatorio reportado como inhibidor de la actividad de tripsina.

#### 5.4.3 Producción de dienos conjugados (inhibición de hemólisis)

Para éste ensayo se siguió el método reportado por Bag *et al.* (2013) y Nile y Park (2014), con ligeras modificaciones. Se obtuvieron muestras de sangre (5 mL) de personas sanas (n=3) siguiendo las instrucciones descritas por la Organización Mundial de la Salud en la Carpeta de material sobre seguridad de las inyecciones y los procedimientos conexos sección 3, referente a las practicas optimas en flebotomía y extracción sanguínea (OMS, 2011). Las muestras de sangre se colocaron en tubos que contenían EDTA-K<sub>2</sub> (7.2 mg/mL) como anticoagulante.

Las muestras se centrifugaron (3000xg, 2 min), y se recuperaron los eritrocitos. Las muestras de eritrocitos se lavaron tres veces con solución salina (0.85%, pH 7.2). Posteriormente, se agregaron 10 mL de solución salina (85%) fría y se dejó en refrigeración (4 °C) durante 12 h. Los eritocitos fueron recuperados por centrifugación (3600xg, 30 min, 10 °C) y lavados dos veces con solución salina, y finalmente se centrifugaron por 20 min bajo las condiciones antes descritas. Finalmente, las muestras se re-suspendieron en 10 mL de Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4). Esta muestra fue designada como solución de membrana (HRBC, por sus siglas en ingles).

Para el ensayo de inhibición, 1 mL de la solución HRBC se mezcló con 5 mL de cloroformo:metanol (2:1) y 1 mL de cada muestra (CI o PC). Las mezclas se centrifugaron a 3600xg, durante 30 min, para obtener dos fases. La fase orgánica fue removida calentando las muestras a 45 °C en baño María. El residuo lipídico se recuperó y se disolvió en 1.5 mL de ciclohexano, y los hidroperóxidos generados se detectaron a 233 nm (SpectraMax M3), utilizando ciclohexano como blanco. Se utilizó como testigo positivo de la prueba ácido salicílico (1:05, p/v), como fármaco antiinflamatorio. El porcentaje de actividad se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de actividad } (1 - T/C) \times 100$$

donde, *T* y *C* representan la absorbancia de las muestras de prueba y testigo, respectivamente.

#### 5.4.4 Inhibición de la actividad de la enzima lipooxigenasa

Para este ensayo se utilizó la metodología reportada por Eshwarappa *et al.* (2016). La enzima lipoxidasa de *Glycine max* (Soya) tipo 1B se disolvió en una solución amortiguadora de borato (0.1 M, pH 9.0) a una concentración final de 20,000 U/mL. Ácido linoleico (0.6 mM) con Tween 80 (0.005%) se empleó como sustrato. Para realizar el ensayo; la mezcla de reacción consistió de 12.5 µL de muestra (CI o PC), 50 µL sustrato, y 1 mL de la solución amortiguadora de borato. Posteriormente, se agregaron 1.5 µL de la enzima lipoxigenasa y se dejó incubar a 37 °C por 5 min, y la absorbancia se registró a 234 nm (SpectraMax M3). Se utilizó indometacina, como antiinflamatorio no esterooidal reportado como inhibidor de lipoxigenasa. La solución de indometacina (60 µg/mL) se preparó en una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M). El porcentaje de inhibición se calculó con la ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Absorbancia (testigo)} - \text{Absorbancia (muestra)}}{\text{Absorbancia (control)}} \times 100$$

Donde el testigo representó la absorbancia de la actividad de la enzima sin muestra (CI o PC). Los resultados se compararon contra indometacina (60 µg/mL), un fármaco antiinflamatorio reportado como inhibidor de la actividad de lipooxigenasa. Aquellas muestras que mostraron mayor actividad antiinflamatoria fueron seleccionadas para la formulación del sistema nanoestructurado como acarreadores.

### 5.5 Formulación y caracterización de sistemas nanoestructurados adicionados con postbióticos

#### 5.5.1 Diseño experimental para la formación de nanoemulsiones

Para la preparación de las formulaciones, primero se llevó a cabo la evaluación del efecto de 3 factores (porcentaje de emulsificante, porcentaje de amplitud y ciclos de trabajo) en las características de las nanoemulsiones, potencial zeta e índice de

polidispersidad (PDI, por sus siglas en ingles), mediante un diseño factorial 2<sup>3</sup>x1 (Tabla 2.5).

**TABLA 2.5** Diseño factorial para la preparación de nanoemulsiones preparadas con postbióticos

Tratamientos	Surfactante (PC) (g)	% Amplitud	Ciclos de trabajo
1	0.25	10	4
2	0.25	20	
3	0.25	30	
4	0.50	10	
5	0.50	20	
6	0.50	30	
7	1.0	10	
8	1.0	20	
9	1.0	30	

Las nanoemulsiones a las diferentes condiciones evaluadas fueron realizadas por duplicado. Las condiciones del proceso de emulsificación para la formulación de nanoemulsiones se seleccionaron de acuerdo a la presencia de tamaños de partícula dentro del rango establecido para ser consideradas nanoemulsiones (<500 nm) (Oliveira *et al.*, 2011).

### 5.5.2 Desarrollo de nanoemulsiones y tamaño de partícula

Antes de comenzar a desarrollar las nanoemulsiones se liofilizaron las muestras de contenido intracelular obtenidas de las diferentes cepas, las cuales fueron recuperadas en tubos Falcon y se conservaron a una temperatura de 0° previo a liofilizar, se empleó la Liofilizadora Labconco FreeZone (Freeze-Dry Systems 4.5 L), con especificaciones de 0.01 mBar unidades de presión, a una temperatura de -40°C durante un lapso de 48 h.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de las nanoemulsiones se mezclaron las fases oleosa y acuosa en una proporción 5:95, siguiendo la metodología de Santos Luna (2019) con algunas modificaciones. Cada una de las fases fue preparada por separado; para la fase dispersante (acuosa) se disolvieron 0.25, 0.50, o 1.0 g de fosfatidilcolina Avanti en agua Mili-Q a 45 °C, y se adicionó glicerol. Primero se homogenizaron de forma manual y después se sometieron a un baño ultrasónico Aquawave 9376 (Barnstead/Labline) por 1 min. Por otro lado, en la fase dispersa (oleosa) se agregaron 25 mg de contenido intracelular liofilizado, 0.5 g de ácidos grasos de cadena media (Premiun brand 100% Pure MCT Oil) y se homogeneizaron igual que la fase dispersante.

La mezcla de ambas fases (oleosa:acuosa) fue homogeneizada empleando un rotor-stator Ultraturrax (T25 digital, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen Germany) a 15,000 rpm durante tres minutos por intervalos de un minuto, y se obtuvo una emulsión gruesa. Una vez obtenida la emulsión, se sometieron a un proceso de sonicación en el equipo Sonicador Branson Digital S-450D (Emerson Electric Co., St. Louis MO) con diferentes amplitudes 10, 20, 30% (45, 90, 125 watts) durante cuatro minutos con pausas de un minuto en baño de hielo (Tabla 2.5), logrando con esto, disminuir el tamaño de partícula y obtener la nanoemulsión (<500 nm).

El tamaño de partícula y el PDI fueron determinados usando el equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments Limited, Grovewood Road, Malvern, Worcestershire, UK). Éste equipo emplea la técnica de Dispersión de Luz Dinámica que permite determinar estos dos parámetros, el rango de detección de partícula es de 0.3 nm a 5 µm. Antes de someter las muestras al análisis, estas se prepararon de acuerdo a lo reportado por Loyo (2017) y Acevedo (2017). Lo que incluyó diluir las muestras con agua mili-Q, utilizando un factor de dilución 1:100 (nanoemulsión:agua). Posteriormente, las muestras diluidas fueron colocadas en la celda Versa Flour Cuvette 170-2415 para la determinación de tamaño de partícula y PDI. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente con un ángulo de

dispersión de 90° inmediatamente después de su preparación ( $T_0$ ) hasta después de la semana 1 de almacenamiento.

### **5.5.3 Preparación de nanogeles y prueba de tubo invertido**

Una vez que se desarrollaron y caracterizaron las nanoemulsiones, se procedió a la preparación de los nanogeles. Para ello, se siguió la metodología de polimerización de nanoemulsión de González Ortega (2017) y Santos Luna (2019). Como primer paso se adicionó Carbopol 940® (80.5 %, p/v) a la nanoemulsión previamente elaborada, y se mezcló con un agitador magnético durante 10 min y posteriormente se dejó reposar por 24 h, a 25 °C, para propiciar la activación del polímero. Después del periodo de activación, se adicionó trietanolamina y se neutralizó a pH  $7.0 \pm 0.4$ , mezclando manualmente para fomentar la formación de las redes poliméricas que forman al gel. Finalmente, los sistemas se almacenaron 24 h para permitir su estabilización antes de ser caracterizados.

El método del tubo invertido es el método más empleado para confirmar la gelificación. En este método, la cantidad pesada del gel se tomó en un tubo de ensayo; este fue calentado cuidadosamente a 110 °C para fundir completamente el sistema. A continuación, se dejó enfriar el vial durante tres horas en una cámara de refrigeración a 15°C, para posteriormente retirar los nanogeles e invertirlos una hora a temperatura ambiente (Balasubramanian *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2014). Posterior a la inversión, durante una hora, la ausencia de flujo indicó la formación de gel, siendo en este punto donde la muestra ha logrado formar la red entrecruzada que evita el flujo del líquido atrapado (Sagiri *et al.*, 2012).

### **5.5.4 Caracterización microscópica de los sistemas nanoestructurados (nanoemulsiones y nanogeles) preparados con postbióticos**

Para analizar la estructura de los nanogeles se utilizó un microscopio electrónico de barrido (FE-SEM, modelo MIRA3 marca TESCAN Brno, 162300, República Checa) de alta resolución (1.5 nm). El modo de operación del microscopio fue bajo vacío con el detector de electrones secundarios (SE), los voltajes que se trabajaron, en diferentes campos fueron entre 9 y 10 kV, con distancias de trabajo de  $\pm 9$  mm, las imágenes se capturaron en formato TIF. Como requisito las muestras deben estar

exentas de líquido, ser planas para que se genere una imagen homogénea. Además, ser conductora ya que, de lo contrario la irradiación por una acumulación de carga desvía el haz electrónico y como consecuencia aparecen distorsiones en la imagen.

### **5.6 Evaluación de la actividad antiinflamatoria en un modelo murino**

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se trabajaron con ratones machos (n=46) BALB/c de 8 a 10 semanas de edad, con peso aproximado de 25 a 30 g, los cuales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Cristóbal Colón, Campus Veracruz. Los animales se mantuvieron a temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  y con ciclos de 12 h de luz y oscuridad, y tuvieron una dieta estándar (Teklad Global Rodent Diets, ENVIGO) y agua *ad libitum*. EL trabajo fue aprobado por el Comité de Investigación de la UNIDA-ITVER (APÉNDICE D). El manejo de los animales se realizó de acuerdo a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana-NOM-062-ZOO-1999 y Guide for the Care and Use of Laboratory Animal: Eighth Edition 2011.

#### **5.6.1 Grupos experimentales**

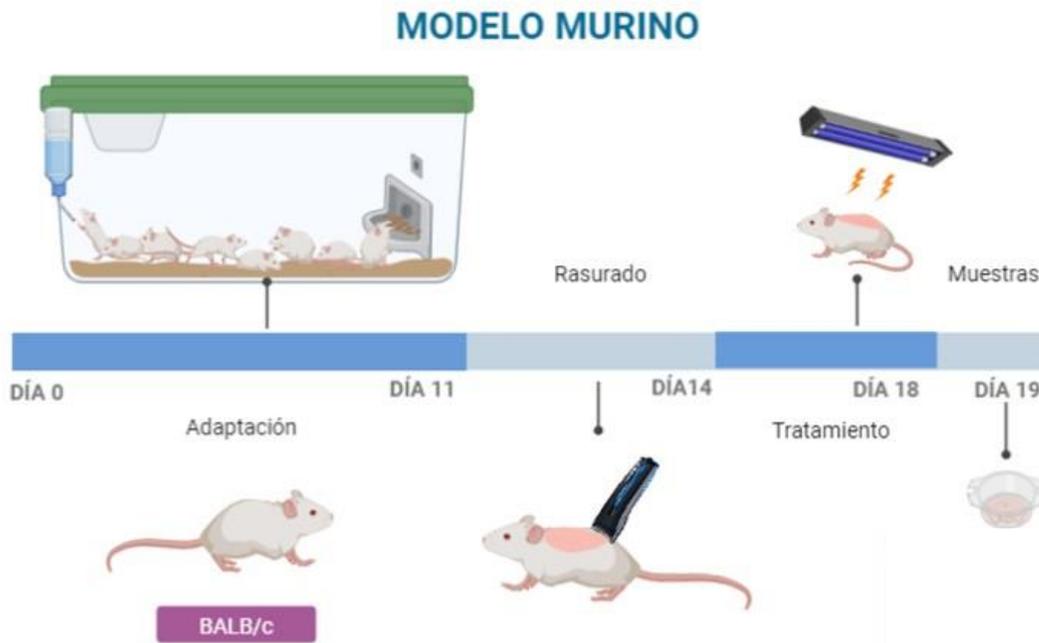
Los animales fueron asignados al azar a los 8 tratamientos; el tratamiento Testigo negativo y Testigo positivo con 5 animales por grupo, mientras que los tratamientos del 3 al 8 con 6 animales (Tabla 3.5).

**TABLA 3.5** Diseño de los grupos experimentales para el ensayo *in vivo*

<b>Grupos</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Códigos</b>
1	Sin inflamación	TESTIGO (-)
2	Radiación UVB	TESTIGO (+)
3	Postbiótico	POSTB
4	Nanogel con postbiótico	NG C/POSTB
5	Hidrogel con postbiótico	HID C/POSTB
6	Nanogel sin postbiótico	NG S/POSTB
7	Nanoemulsión con postbiótico	NE C/POSTB
8	Protector solar comercial (Avène®)	PROT SOLAR

### 5.6.2 Irradiación y Obtención de muestras de tejido

Previo a recibir el tratamiento de irradiación Figura 4.5, los animales tuvieron una semana de adaptación. A los 11 días, se rasuraron (Recortadora Conair T-Blade HC18ES) 6 cm<sup>2</sup> en la parte dorsal de cada animal. Al día 14, los animales fueron irradiados con luz UVB, por grupo, a una distancia de 20 cm entre la posición de la lámpara y los ratones. El tiempo de exposición fue de 20 min durante cuatro días. Para la inducción de la inflamación dorsal en modelos murinos se ocupó una lámpara de luz UVB (Lámpara Philips TL /12 RS 40W). Las condiciones de irradiación fueron a una longitud de onda entre 270 y 400 nm con una emisión pico a 320 nm, equivalente a una irradiación de 0.384 mW/cm<sup>2</sup>, lo que representó 4.14 J/cm<sup>2</sup>.

**FIGURA 4.5** Diseño del trabajo experimental para el modelo murino

Determinación de color del dorso de los ratones.

Para esto se utilizó una cámara Sony® α37 montada en un tripie y la captura de la imagen fue en una plataforma de tal manera que no hubiese efectos de iluminación que ocasionaran distorsión del color. Las imágenes fueron leídas con la aplicación ColorSync en Mac OS X en escala CIE L\*a\*b.

Los animales fueron sacrificados (por dislocación cervical) 12 h posteriores al último día de radiación para obtener los fragmentos de 6 cm<sup>2</sup> de la piel dorsal de cada ratón. Estos fueron inmediatamente colocados en 5 mL solución de PBS con BSA (1%) y se mantuvieron en frío. Posteriormente, las muestras de tejido fueron homogeneizadas con un ULTRATURRAX (IKA®T10 basic; Werke GmbH & Co. KG, Staufen Germany) y centrifugadas (2800 g, 10 min). Los extractos obtenidos fueron almacenados a -80 °C hasta su uso en las determinaciones que se describen a continuación.

### **5.6.3 Capacidad antioxidante en tejidos**

La capacidad antioxidante en las muestras de tejido fue determinada con los métodos ABTS y ORAC siguiendo las metodologías descritas previamente en la sección 5.3.1.

### **5.6.4 Determinación de mediadores de inflamación**

#### **5.6.4.1 Determinación de óxido nítrico**

Para la determinación del óxido nítrico (ON), se siguió el método reportado por Rao *et al.* (2016). Para este ensayo, 15 min antes de realizar la prueba, se preparó el reactivo de Griess en agua mili-Q (1% p/v) y se mantuvo en oscuridad. Para realizar el ensayo de ON, se utilizaron 50  $\mu$ L de la muestra de tejido y 50  $\mu$ L del reactivo de Griess (1% p/v), y se dejó incubar a 37 °C durante 15 min. Posterior al proceso de incubación, se registró la absorbancia a 540 *nm* (SpectraMax M3). La concentración de NO se determinó de acuerdo a una curva estándar de NaNO<sub>2</sub> (0-15  $\mu$ M), (APENDICE E).

#### **5.6.4.2 Inhibición de la actividad de la enzima lipoxigenasa**

La inhibición de la actividad de la enzima lipoxigenasa en muestras de tejido se determinó siguiendo la metodología descrita en la sección 5.4.4.

#### **5.6.4.3 Análisis de citocinas en muestras de tejido**

Las muestras de tejido obtenidas al final del sacrificio (sección 5.5.2) fueron descongeladas y centrifugadas a 2800xg durante 10 min. El sobrenadante obtenido fue utilizado para la cuantificación de citocinas. Previo a iniciar el ensayo, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente 30 min, se preparó la curva estándar, y la mezcla de perlas de cada una de las citocinas, siguiendo las recomendaciones proporcionadas por el proveedor.

Se determinaron las citocinas inflamatorias (IL-6, IFN, TNF, IL-12p70), anti-inflamatorias (IL-10) y la quimiocina MCP-1. Las citocinas fueron determinadas por citometría de flujo (BD FACSI Canto, California, EEUU) empleando el kit BD

Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation. Se realizó la adquisición de 10000 eventos y los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa FACSArray™ Bionalyzer (Becton Dickinson, San José, California, EEUU). Los resultados fueron expresados como picogramos por mL.

### **5.7 Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos para la determinación de capacidad antioxidante y anti-inflamatoria fueron analizados utilizando un diseño completamente al azar y un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), y en caso de presentar diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) se realizó la comparación de medias por la técnica de Tukey-Kramer. Los valores representan la media  $\pm$  DE ( $n=3$ ).

Para el ensayo del modelo murino, se utilizó un diseño completamente al azar. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  error estándar (EE) para  $n=6$  ratones/grupo. Se realizó un análisis de varianza de una sola vía, y la comparación de medias utilizando la prueba de Fisher con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Todas las comparaciones estadísticas se analizaron utilizando el software estadístico MINITAB 18 (LEAD Technologies, Inc. EE.UU).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

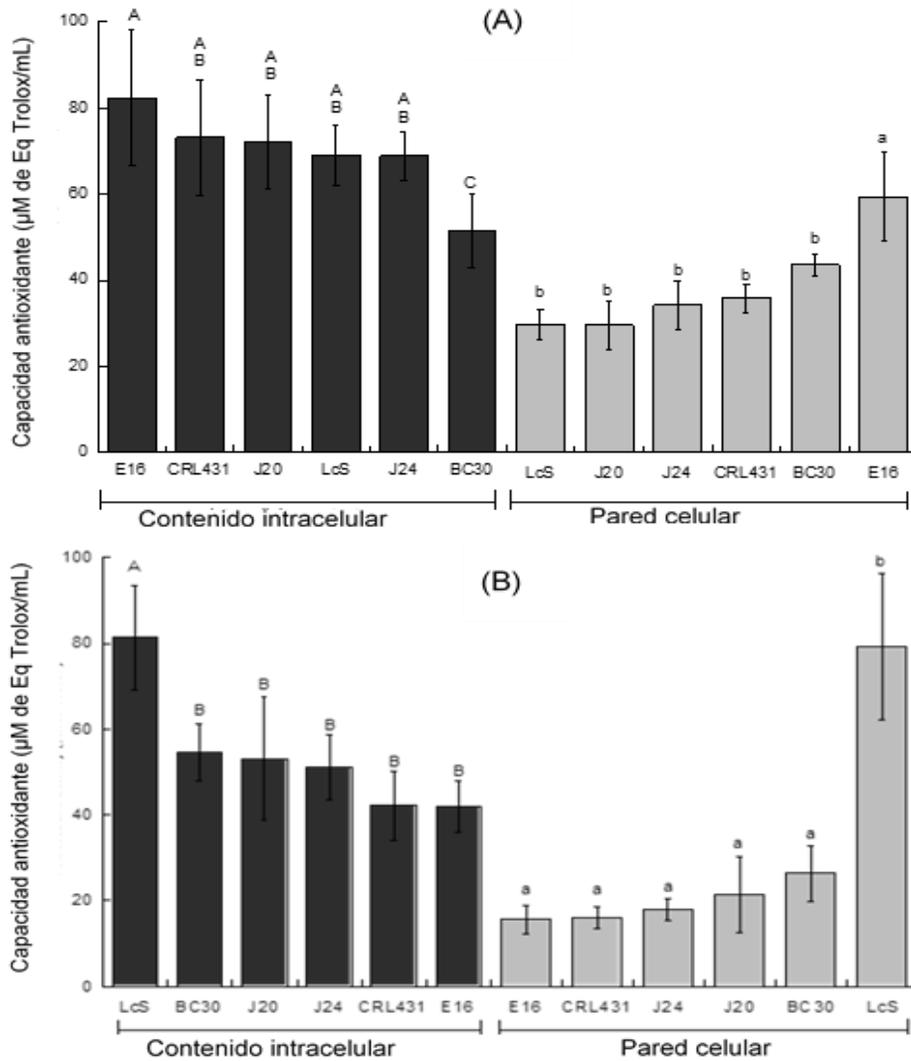
### 6.1 Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* del contenido intracelular y pared celular

Los resultados de actividad antioxidante obtenidos por los métodos: ABTS y ORAC de las muestras evaluadas se presentan en la Figura 5.6A y 5.6B, respectivamente. Los resultados mostraron que todas las cepas presentaron capacidad antioxidante. El CI mostró una mayor ( $p < 0.05$ ) capacidad antioxidante por ambos métodos con valores de  $69.60 \pm 2.4$   $\mu\text{mol/L}$  de Trolox y  $53.48 \pm 3.8$   $\mu\text{mol/L}$  de Trolox, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Para la pared celular los valores fueron de  $38.99 \pm 5.3$  y  $29.85 \pm 2.1$   $\mu\text{mol/L}$  de Trolox, respectivamente. La capacidad antioxidante del contenido intracelular por el método de ABTS de las cepas E16, CRL431, J20, LcS, J24 y BC30 fue de  $82.39 \pm 15.81$ ,  $73.17 \pm 13.38$ ,  $72.22 \pm 10.99$ ,  $69.11 \pm 6.85$ ,  $68.89 \pm 5.56$  y  $51.80 \pm 8.60$ . El contenido intracelular de LcS mostró el valor más alto ( $p < 0.05$ ) por el método ORAC ( $81.29 \pm 12.20$ ), en comparación con los valores de BC30, J20, J24, CRL431 y E16 ( $54.47 \pm 6.69$ ,  $53.06 \pm 14.41$ ,  $51.12 \pm 7.50$ ,  $42.09 \pm 7.94$  y  $41.88 \pm 6.10$   $\mu\text{mol/L}$  de Trolox).

Por otro lado, la pared celular de LcS mostró los valores más altos por el método de ORAC ( $76.51 \pm 16.53$   $\mu\text{mol/L}$  de Trolox) ( $p < 0.05$ ), mientras que por el método de ABTS los valores fueron de  $59.71 \pm 10.36$ ,  $43.97 \pm 2.53$   $\mu\text{mol/L}$  de Trolox para E16 y BC30, respectivamente. Considerando las cepas LcS, BC30 y CRL431 como probióticos de referencia, el CI de J20, cepa aislada de productos lácteos artesanales, fue el más alto por ambos métodos. Estudios previos con la cepa CRL431 demostraron que el tratamiento con butionina removió las fracciones proteínicas y lipídicas, disminuyendo la capacidad antioxidante total en 13.1, 22.6 y 25.5 % respectivamente, pero se observó la interacción sinérgica entre el glutatión y los componentes proteínicos, lo que sugiere que estos compuestos no enzimáticos podrían estar implicados en la capacidad antioxidante del CI de CRL431 (Aguilar-Toalá *et al.*, 2019). Además, la presencia de ácidos grasos como el láurico, mirístico,

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

palmítico, esteárico, oleico y linoleico podría mejorar el estatus antioxidante del CI de CRL431 (Aguilar-Toalá *et al.*, 2019), y estas actividades dependen de la longitud de la cadena y/o del grado de insaturación (Henry *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 2008).



**FIGURA 5.6** Actividad antioxidante del contenido intracelular y pared celular de cada una de las bacterias de estudio por el método de ABTS (A), y ORAC (B). Los valores representan la media  $\pm$  DE. Letras mayúsculas representan diferencia significativa entre el contenido intracelular, y letras minúsculas representan diferencia significativa entre la pared celular de las cepas de estudio (n=2). Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Adicionalmente, algunos estudios han evidenciado que el CI exhibe mayores propiedades antioxidantes en comparación a las células bacterianas completas y los fragmentos de pared de diversas bacterias ácido lácticas tales como *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Li y Chang, 2000), *Lactobacillus fermentum* E-3 y E18 (Kullisaar *et al.*, 2002), *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei* KCTC 3260, 01 y KCTC 3109 (Lee *et al.*, 2005), *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111, *Lactobacillus johnsonii* KCTC 3141, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3151 y *Lactobacillus brevis* KCTC 3498 (Kim *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que la actividad antioxidante del contenido intracelular podría estar relacionada con las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)-oxidasa y NADH-peroxidasa, las cuales son consideradas como una defensa antioxidante contra el estrés en diversos microorganismos (Kullisaar *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Lin y Chang, 2000).

Debido a que no se observaron diferencias significativas entre los resultados del contenido intracelular y pared celular de las cepas J20, J24 y E16; respecto a las cepas de referencia, se procedió a realizar la determinación de la actividad antiinflamatoria en ambos tipos de muestras.

### **6.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria**

Se evaluó la actividad antiinflamatoria del contenido intracelular y pared celular obtenidos de las diferentes cepas de bacterias ácido lácticas, utilizando como testigo la cepa LcS y como control indometacina, antiinflamatorio no esterooidal con propiedades analgésicas.

#### **6.2.1 Inhibición de la actividad de Tripsina**

Cuando se genera un proceso de inflamación, existe un reclutamiento de diferentes tipos de células (p ej., macrófagos, neutrófilos) hacia el sitio de infección y que serán las encargadas de restaurar el daño. En este sentido, la interacción de los

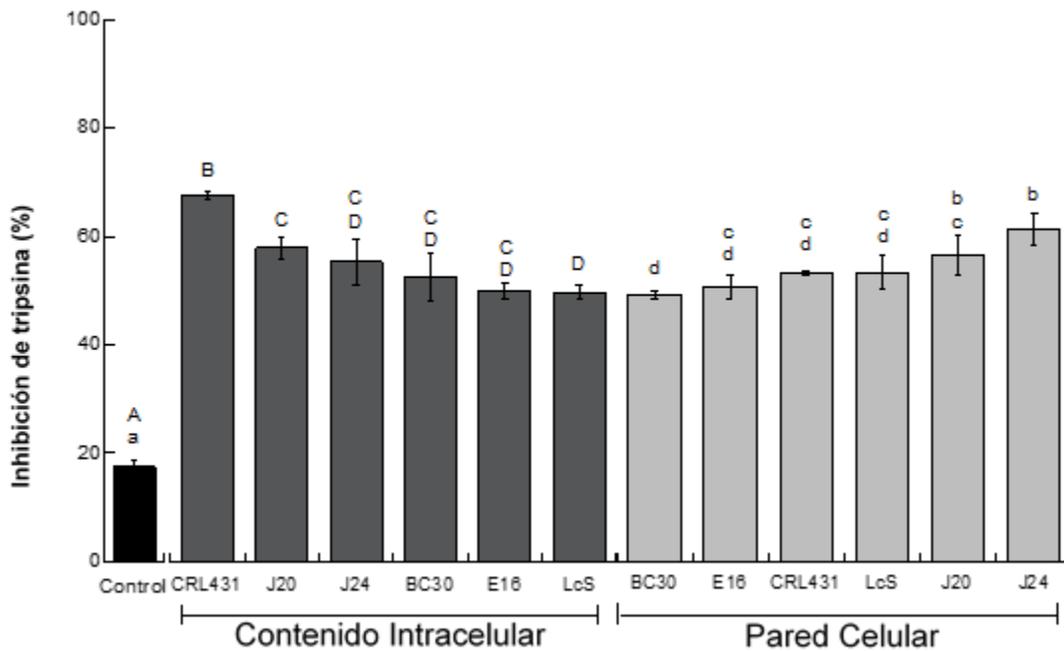
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

neutrófilos en el sitio de inflamación con las células residentes, los mediadores inflamatorios locales y la matriz extracelular, puede conducir a la producción de citocinas, aminas vasoactivas, eicosanoides, productos de cascadas proteolíticas, enzimas, y especies reactivas de oxígeno (EROs) y nitrógeno (ERN) (Medzhitov, 2008).

Se sabe que los neutrófilos son una fuente rica de serín proteinasas, que se localizan en los lisosomas y tienen un papel importante en el daño tisular durante las reacciones inflamatorias, principalmente la tripsina humana se activa en enfermedades como la artritis reumatoide (Leelaprakash y Mohan 2011; Patel y Zaveri 2014). Estudios previos han demostrado que los inhibidores de la serina proteasa pueden tener propiedades antiinflamatorias. Por lo tanto, los inhibidores de tripsina se han utilizado ampliamente como vía alterna para pacientes con trastornos inflamatorios, shock y coagulación intravascular diseminada (Inoue-Takano, 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio evidenciaron que los postbióticos del CI y pared celular evaluados exhibieron actividad inhibidora de tripsina Figura 6.6, lo que sugiere que estos compuestos pueden ser inhibidores de proteasas específicas. El efecto sobre la inhibición de tripsina entre el contenido intracelular (54.47-74.06 %) y la pared celular (52.70%-65.60%) no mostraron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ); sin embargo, ambos porcentajes fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) que los mostrados por la indometacina ( $17.46 \pm 1.27\%$ ). En general, el mayor ( $p < 0.05$ ) porcentaje de inhibición de tripsina lo presentó el contenido intracelular una de las cepas de referencia (CRL431), seguido por la cepa J20 ( $63.39 \pm 2.27\%$ ). En contraste, los resultados de la pared celular mostraron que las cepas potencialmente probióticas tuvieron mayor ( $p > 0.05$ ) porcentaje de inhibición de tripsina que las cepas de referencia. Los resultados obtenidos sugieren que los componentes del contenido intracelular y pared celular podrían tener la capacidad de disminuir la actividad serin-proteasas liberadas por las células fagocíticas, una vez que éstas son actividades por un proceso inflamatorio, y de esta manera

disminuir las rutas de señalización que conllevan a la producción de otras moléculas inflamatorias (Patel y Zaveri 2014).



**FIGURA 6.6** Actividad inhibidora sobre la enzima tripsina del contenido intracelular y pared celular de las diferentes bacterias ácido lácticas de estudio. Los valores representan la media  $\pm$  DE. Testigo (Indometacina). Letras mayúsculas representan diferencia significativa entre el contenido intracelular, y letras minúsculas muestran diferencia significativa entre la pared celular de las cepas de estudio (n=3). Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

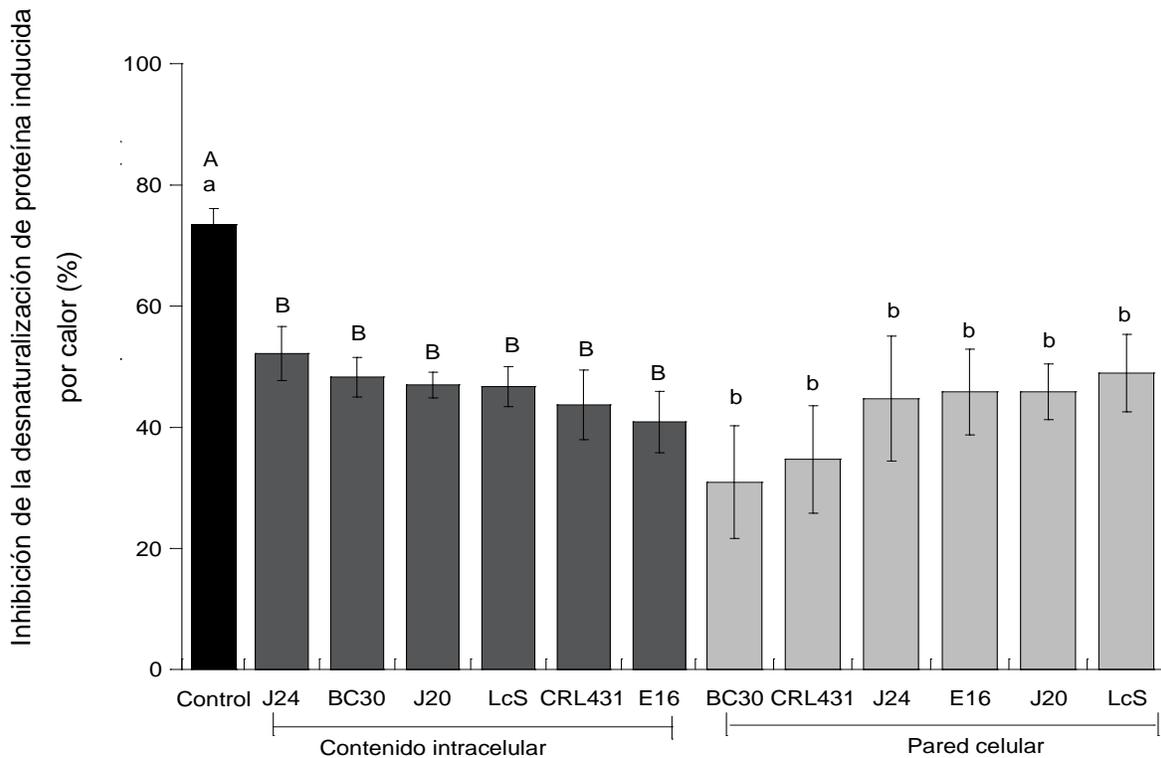
### 6.2.2 Inhibición de la desnaturalización proteica inducida por calor

La desnaturalización de proteínas es un proceso que se presenta principalmente en la artritis reumatoide, lo que conlleva a la generación de autoantígenos (Umapathy *et al.*, 2010). Este proceso implica la pérdida de la estructura terciaria y cuaternaria de proteínas por diferentes condiciones de estrés; la aplicación de compuestos

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

como ácidos o bases fuertes, solventes orgánicos o calor. De esta manera, las proteínas pierden su función biológica (Chandra *et al.*, 2012).

Los resultados de la inhibición sobre BSA se muestran en la Figura 7.6. El contenido intracelular mostró valores de 40.65 a 51.88% de inhibición, mientras que la pared celular fue de 30.07 a 47.56%. En general, el contenido intracelular mostró los mayores porcentajes de inhibición ( $p > 0.05$ ) con respecto a la pared celular ( $p < 0.05$ ). Individualmente, el contenido intracelular de J24 y BC30 (cepa de referencia) mostraron los porcentajes más altos  $51.88 \pm 4.44\%$  y  $47.98 \pm 3.23\%$ , respectivamente.



**FIGURA 7.6** Efecto del contenido intracelular y pared celular de las diferentes bacterias de estudio para inhibir la desnaturalización proteica inducida por calor. Los valores representan la media  $\pm$  DE. Testigo (Indometacina). Letras mayúsculas muestran diferencia significativa entre el contenido intracelular, y letras minúsculas muestran diferencia significativa entre la pared celular de las cepas de estudio ( $n=3$ ). Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de Tukey-kramer ( $p < 0.05$ )

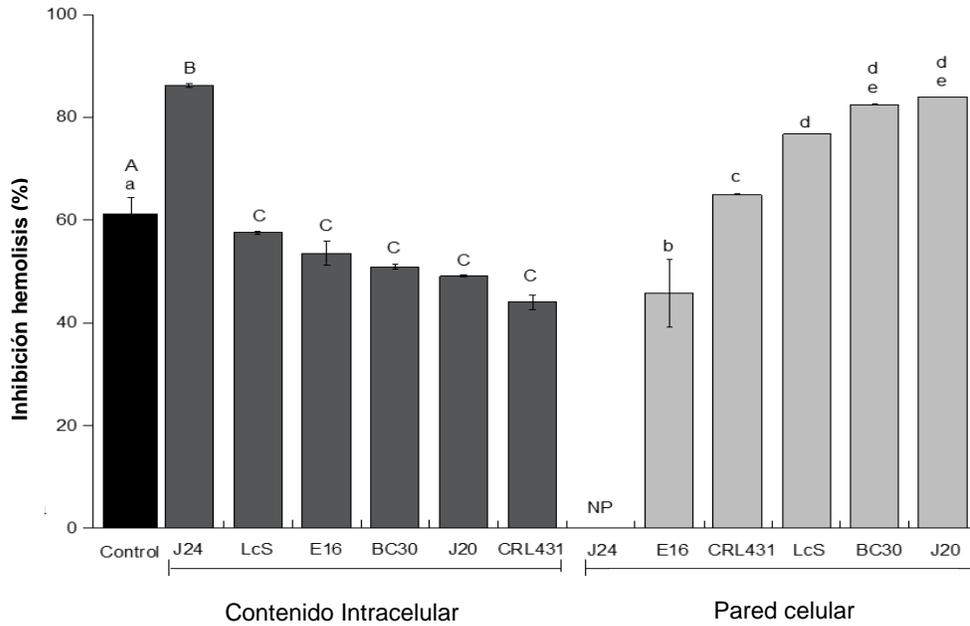
Los resultados mostraron la capacidad de los componentes intracelulares para mediar la desnaturalización de proteínas *in vitro*, donde un incremento en la absorbancia de las muestras tratadas con el CI o pared celular respecto al testigo (BSA) indicó la estabilización de la proteína. Los componentes presentes en el CI como proteínas, aminoácidos, y enzimas antioxidantes (Aguilar- Toalá *et al.*, 2018), podrían contribuir a proteger la desnaturalización de BSA y controlar la producción de autoantígeno. Este efecto de protección es importante porque en el organismo, las proteínas biológicas pierden su función biológica cuando se desnaturalizan (Leelaprakash y Mohan 2011). Por ejemplo, un estudio demostró el potencial del extracto de café en la protección de la albúmina, atribuyéndose principalmente al contenido de polifenoles (Chandra *et al.* 2012).

### **6.2.3 Ensayo de dienos conjugados (Inhibición de hemólisis)**

Por otro lado, durante el proceso de inflamación, especies como iones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo inducen peroxidación lipídica en las membranas celulares, lo que conlleva a tener membranas celulares disfuncionales y pueden verse atenuadas por la capacidad redox de los agentes antioxidantes (Facundo *et al.* 2004). El radical de carbono de los ácidos grasos poliinsaturados se estabilizan mediante un reordenamiento molecular que forma dienos conjugados, productos que reflejan la fase inicial de la peroxidación lipídica.

En este sentido, la evaluación de inhibición de producción de dienos conjugados se muestra en la Figura 8.6. Los resultados entre el contenido intracelular y pared celular mostraron valores de  $64.72 \pm 4.44$  y  $67.10 \pm 4.9\%$ , respectivamente ( $p < 0.05$ ). Los datos mostraron una mayor actividad de inhibición por el contenido intracelular de J24 y LcS ( $98.09 \pm 0.30\%$  y  $65.520 \pm 0.33 \%$ ), siendo mayor que el ácido acetilsalicílico ( $p < 0.05$ ). Los porcentajes de inhibición del contenido intracelular fueron en un rango de 50.10 a 98.09%, mientras que para la pared celular fueron de 52.13 a 95.47%. Mientras que la pared celular de J20 y BC30 mostró un porcentaje de  $95.47 \pm 0.07\%$  y  $93.90 \pm 0.04\%$ , respectivamente, siendo estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) con respecto al testigo. Los resultados

mostraron que el efecto de protección es dependiente del CI de la cepa siendo éstos los más altos. Nuestros resultados mostraron un mayor efecto de protección con respecto al ácido salicílico.



**FIGURA 8.6** Efecto del contenido intracelular y pared celular de las diferentes bacterias de estudio para inhibir la producción de dienos conjugados. Los valores representan la media  $\pm$  DE. Testigo (indometacina). Las letras mayúsculas muestran diferencia significativa entre el contenido intracelular, y las letras minúsculas muestran diferencia significativa entre la pared celular de las cepas de estudio (n=3). Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

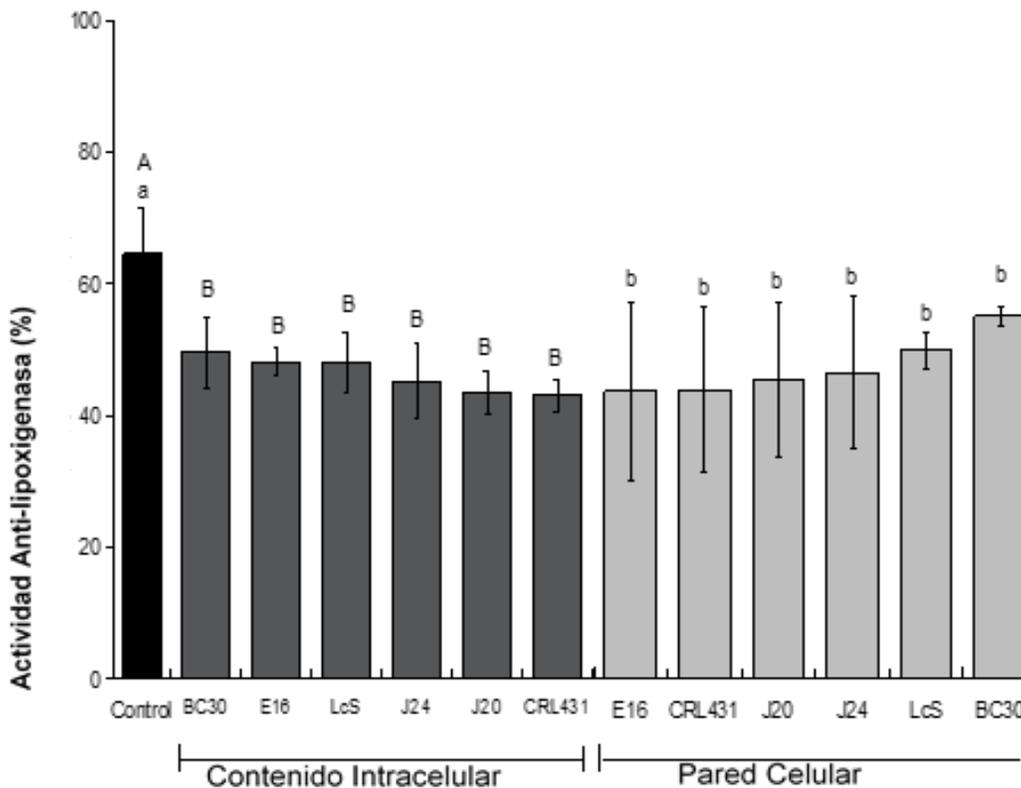
El efecto hemolítico está relacionado con la acumulación excesiva de líquido en la célula, lo que resulta en la ruptura de la membrana de los eritrocitos promovida por la peroxidación lipídica.

#### 6.2.4 Actividad de inhibición de lipoxigenasa.

El contenido intracelular y la pared celular mostraron capacidad de inhibición de lipooxigenasa en un rango de 45.66 al 52.53 %, aunque no se observaron

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre ambos tipos de muestras (Figura 9.6). Los valores más altos observados para las muestras del contenido intracelular fueron de  $52.53 \pm 5.86$ ,  $51.17 \pm 2.35$  y  $51.02 \pm 4.78$ , correspondientes a las cepas BC30, E16 y LcS. Los valores para las muestras de pared celular fueron de  $55.22 \pm 1.47\%$  y  $49.93 \pm 2.81\%$ , correspondientes a las cepas BC30 y LcS ( $p > 0.05$ ), respectivamente.



**FIGURA 9.6** Efecto del contenido intracelular y pared celular de las diferentes bacterias de estudio para inhibir la actividad de lipoxigenasa. Los valores representan la media  $\pm$  DE. Testigo (indometacina). Las letras mayúsculas muestran diferencia significativa entre el contenido intracelular, y las letras minúsculas muestran diferencia significativa entre la pared celular de las cepas de estudio ( $n=3$ ). Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de Tukey-kramer ( $p < 0.05$ ).

Las lipoxigenasas son enzimas oxidativas que participan en el metabolismo del ácido araquidónico, el cual está asociado con la regulación de la respuesta inflamatoria a través de la generación de leucotrienos (proinflamatorios) o lipoxinas

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(anti-inflamatorios) (Wisastra y Dekker, 2014). Estos metabolitos se producen por leucocitos y macrófagos, y una producción excesiva de leucotrienos (LT), por ejemplo, LTB<sub>4</sub> conlleva a incrementar la respuesta inflamatoria (Sharma y Mohammed, 2006). Al respecto, en un estudio se reportó una menor concentración del leucotrieno LTB<sub>4</sub>, inducido por *Lactobacillus helveticus* Bc-10 (células completas y de pared celular), en presencia de ionóforo de Ca<sup>2+</sup>. Este hallazgo mostró que la presencia de carbohidratos solubles, como parte de la composición estructural de la bacteria, podrían estar involucrados en el proceso de activación de lipooxigenasas y con esto inhibir la producción de LTB<sub>4</sub> (Kimoto- Nira *et al.* 2009). Estos resultados son similares a los encontrados en esta investigación, donde el contenido intracelular y pared celular mostraron porcentajes similares de inhibición para la actividad de la enzima lipoxigenasa, lo que sugiere que los mecanismos de inhibición son dependientes de la cepa y del contenido intracelular.

Muchos componentes de la pared celular bacteriana, como los lipopolisacáridos, peptidoglicanos y ácidos lipoteicoicos, se unen a receptores ubicados en la superficie celular de los monocitos y macrófagos, e inducen la producción de citocinas proinflamatorias, y la liberación de algunos mediadores como elastasas, prostaglandinas y ERO (Erickson y Hubbard 2000; Hessele, Andrsson y Wold 2005).

Los resultados encontrados en este estudio mostraron que el contenido intracelular y pared celular tienen la capacidad de regular mediadores de inflamación. Estos resultados sugieren que algunos componentes del contenido intracelular como ácidos grasos, proteínas, aminoácidos pueden bloquear la ruta de activación de lipoxigenasas complementario a esto, Henry *et al.* (2002), reportaron que la presencia de ácidos grasos insaturados mostró buena actividad inhibidora de ciclooxigenasas como medicamento antiinflamatorio no esteroideos (AINE) para aliviar el dolor inflamatorio y el edema en los pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria (EII) y manifestaciones reumatológicas (*p.ej.* artritis). Además, el muro péptido específico de la pared celular de *Lactobacillus salivarius* Ls33 es detectado

por la hormona del receptor NOD2 y de esta manera disminuye la respuesta inflamatoria *in vitro* de la mucosa intestinal (Fernández, Pot y Grangette 2011).

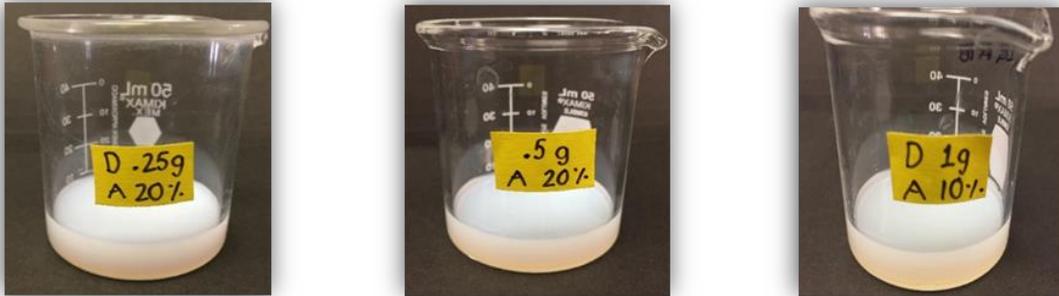
Considerando los resultados obtenidos de la actividad antioxidante y antiinflamatoria, se encontró que el contenido intracelular de las cepas E16, Lc-CRL 431, y J20, fueron los que mostraron mayor capacidad antioxidante, destacando el contenido intracelular de *Lactobacillus fermentum* J20 para ambas bioactividades evaluadas, por lo que el contenido intracelular de esta cepa fue la que se seleccionó para la elaboración de los sistema nanoestructurado (nanoemulsiones y nanogeles), como sistema de entrega para evaluar su efecto tópico protector, e inhibir la respuesta inflamatoria generada por la radiación de luz UV.

### **6.3 Formulación de nanogeles adicionados con postbióticos y evaluación de su estabilidad**

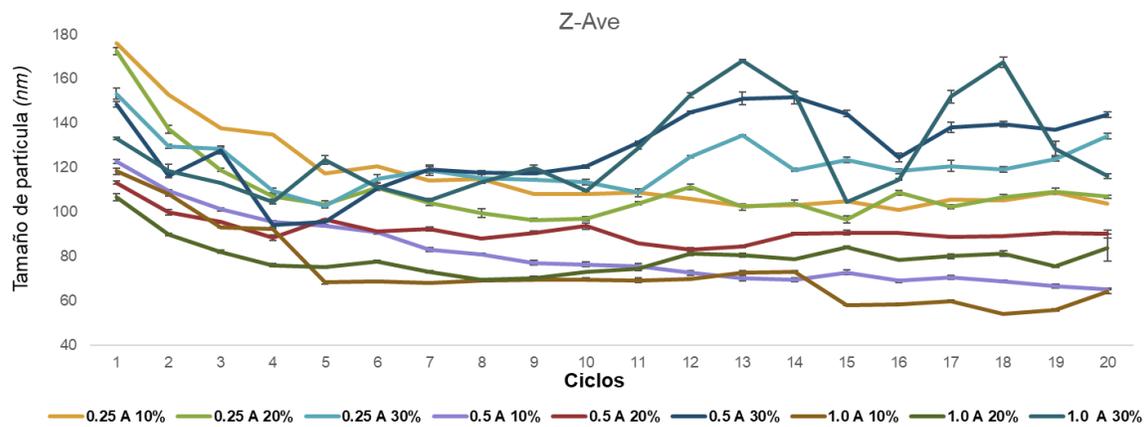
#### **6.3.1. Desarrollo y caracterización de las nanoemulsiones**

La apariencia visible de las nanoemulsiones en la Figura 10.6 es lechosa. El análisis de las formulaciones en la Figura 11.6 mostró la presencia de partículas nanométricas con un tamaño de partícula que variaba desde 100.3 hasta 110.6 *nm* después de diluirlo en agua destilada, con un promedio de  $110.3 \pm 1.96$ , después de 20 ciclos de trabajo. Se tomó como la mejor nanoemulsión la que se obtuvo con una concentración de fosfatidilcolina de 0.5 g, el 20 % de amplitud al cuarto ciclo de trabajo, donde el tamaño de partícula fue de 107.6 *nm*, el índice de polidispersidad (PDI)=0.17. Valores cercanos a 1 en el PDI de las nanoemulsiones indican una baja calidad y una gran inestabilidad (Klang *et al.*, 2011). Se pudo apreciar un comportamiento monomodal en la Figura 12.6, el cual es deseado debido a que muestra una homogeneidad de tamaño de partícula, y esto se relaciona con una alta estabilidad (McClements, 2011).

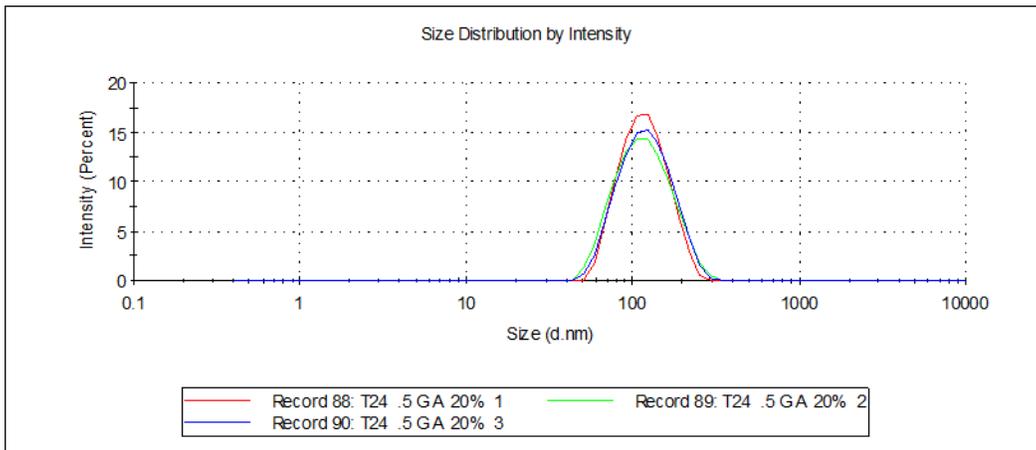
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**FIGURA 10.6** Apariencia de las nanoemulsiones preparadas con 0.25 g, 0.5 g, 1.0 g de PC y con 20 %, 20 % y 10 % de amplitud.



**FIGURA 11.6** Efecto de la concentración de fosfatidilcolina (0.25, 0.5, 1.0 g) y % de amplitud (10, 20, 30 %) en el tamaño de partícula de las nanoemulsiones, después de 20 ciclos de trabajo.



**FIGURA 12.6** Distribución de tamaño de partícula de la nanoemulsión

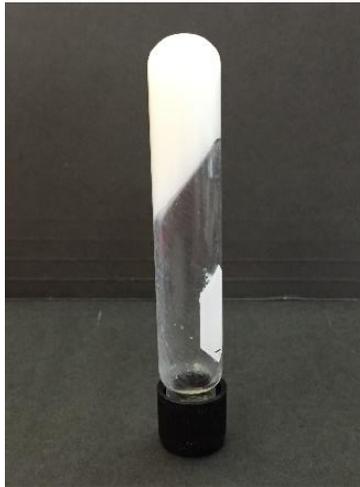
Para la concentración crítica gelante (CCG), se obtuvo la concentración de 0.5% de Carbopol de Gonzalez (2017), quien desarrolló un nanogel a partir de una nanoemulsión utilizando Carbopol® como agente reticulante como se observa en la Figura 13.6.



**FIGURA 13.6** Concentración crítica gelante del carbopol en la preparación de nanogeles

### 6.3.2 Desarrollo de nanogeles

Los nanogeles formulados tuvieron una apariencia turbia y de color blanco con aspecto liso, dependiendo de la cantidad de polímero presente en las formulaciones (Figura 14.6). Todas las formulaciones tuvieron valores de pH entre 6.9 a 7.5, lo cual concuerda con lo reportado por Atul *et al.* (2012). Estos valores se consideran aceptables para evitar el riesgo de irritación después de la aplicación sobre la piel. Bajo estas condiciones de pH y utilizando Carbopol 940<sup>®</sup> se tiene mayor viscosidad y bioadhesividad. Esto se debe a que a este pH se produce la ionización completa de la cadena principal polimérica, lo que produce una repulsión entre las cargas nativas, que a su vez aumenta el hinchamiento del polímero hasta 1000 veces el volumen original y como resultado se forma un gel fuerte.



**FIGURA 14.6** Nanogel desarrollado durante la prueba de tubo invertido

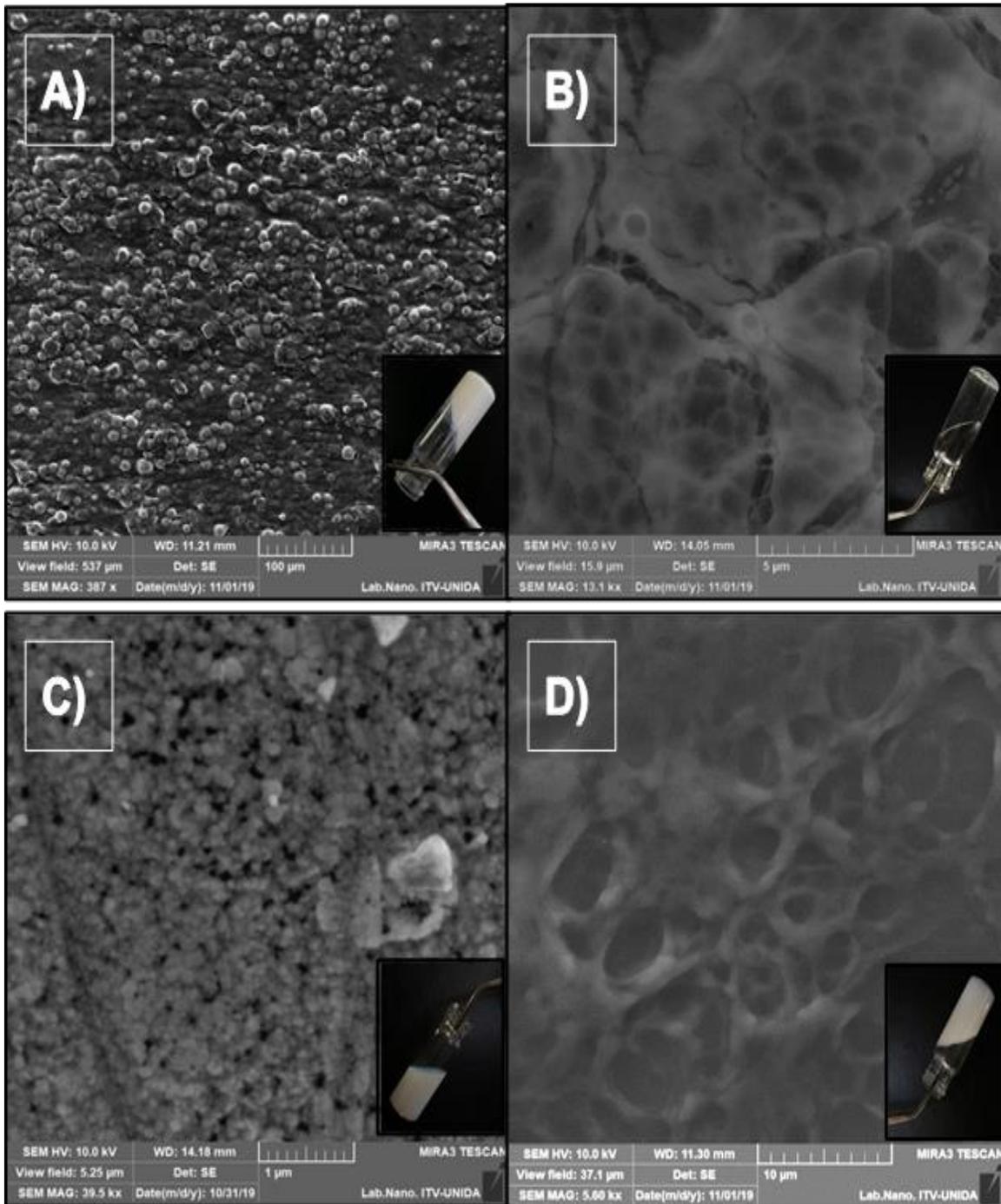
### 6.3.3 Caracterización microscópica de los sistemas nanoestructurados

Los sistemas nanoestructurados se colocaron en un pin (stub) con cinta de cobre y fueron secados previos a la observación, los cuales mostraron un efecto positivo en la resolución de las micrografías, sin afectar la estructura del sistema.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 15.6 se observan las imágenes tomadas con el SEM, de los diferentes tratamientos: A) Protector solar, B) Hidrogel con postbiótico, C) Nanoemulsión con postbióticos, D) Nanogel con postbióticos. La morfología de los hidrogeles que contienen el postbiótico mostraron una superficie altamente porosa, mientras que los nanogeles mostraron una estructura de red tridimensional con poros de tamaño pequeño en la sección transversal, y también se ubicaron pequeñas partículas en las superficies para formar una red densa, pero el orificio en las superficies de los nanogeles cargados con postbióticos fue menor. Esto se debe probablemente al resultado del complejo de inclusión NE/Carbopol.

La superficie de los nanogeles fueron relativamente planas, homogéneas y lisas; mientras que la sección transversal del protector solar fue densa y no porosa, la rugosidad de la red porosa en la superficie de la microestructura del protector solar expuesto puede ser causado por el proceso de gelificación (Klang y Valenta, 2011). Además, en la atracción electrostática, los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas, también pueden conducir a la estructura del esqueleto poroso. En el caso de las nanoemulsiones, éstas se pueden apreciar de forma esférica, las cuales se visualizaron con tamaños de diámetro por debajo de los 110 *nm*, corroborando con esto, que los sistemas obtenidos cumplen el rango de tamaño de partícula para ser clasificado como nano.



**FIGURA 15.6** Micrografías obtenidas con SEM de A) Protector solar; B) Hidrogel con postbióticos; C) Nanoemulsión con postbióticos y D) Nanogel con postbióticos.

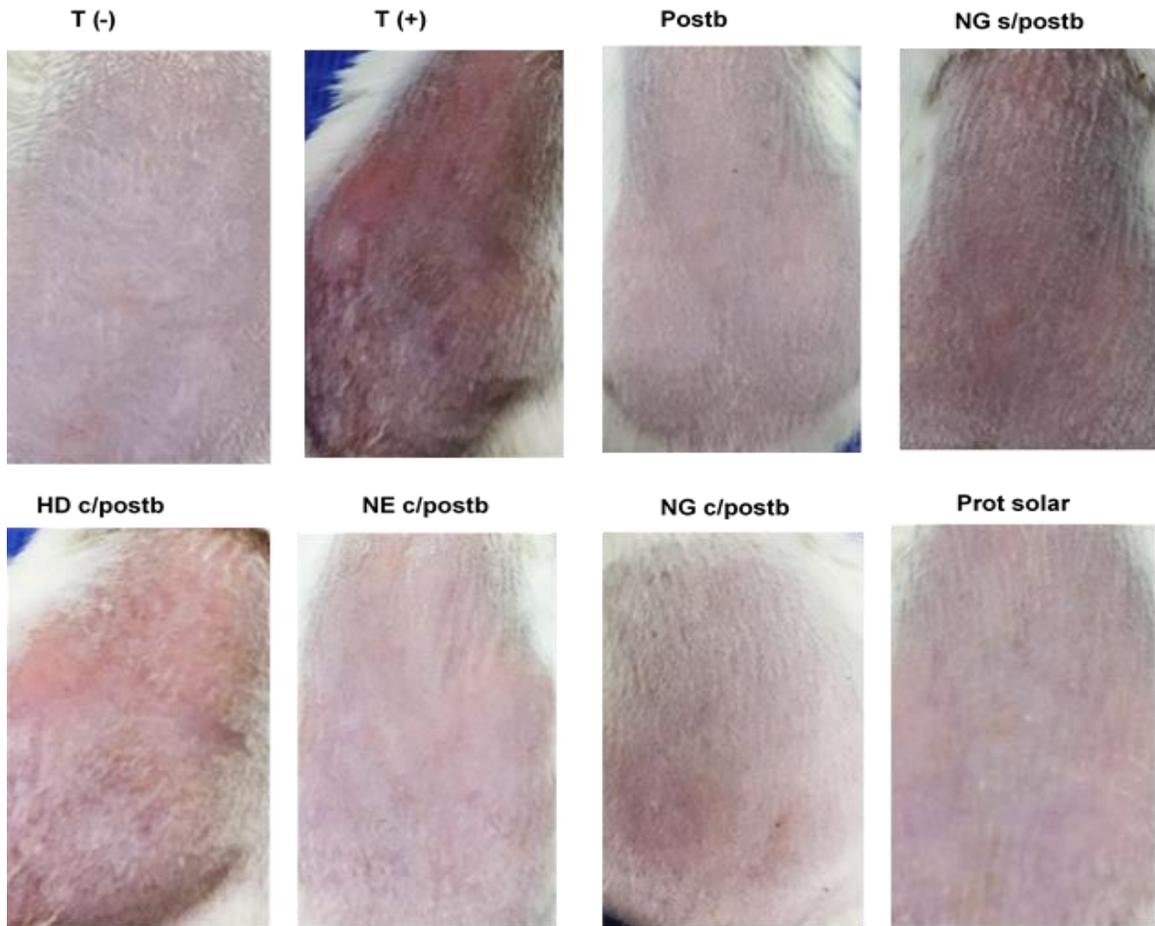
### **6.4 Evaluación de la potencial actividad antiinflamatoria de sistemas nanoestructurados con postbióticos, en un modelo murino con inflamación inducida con irradiación UV.**

El presente trabajo evaluó los efectos de los sistemas nanoestructurados, formulados con el postbiótico obtenido de *Lactobacillus fermentum* J20, en biomarcadores de estrés oxidativo y factores inflamatorios en ratones BALB/c irradiados con luz UVB durante 4 días (Fujimura *et al.*, 2015; Snur *et al.*, 2015). La dosis que se aplicó representa la dosis mínima que recibimos durante el día (Snur *et al.*, 2015).

#### **Observación macroscópica de las lesiones cutáneas en la piel de ratones irradiados, efecto de los diferentes tratamientos.**

En los días que se irradiaron los ratones se aplicaron diferentes tratamientos (Tabla 3) vía tópica en el dorso una vez al día, terminando al cuarto día. Se fotografió a cada animal, y se muestran imágenes de la piel dorsal de un ratón de cada grupo, (Figura 16.7) y se observa la lesión máxima prevista después de la exposición a la radiación UVB.

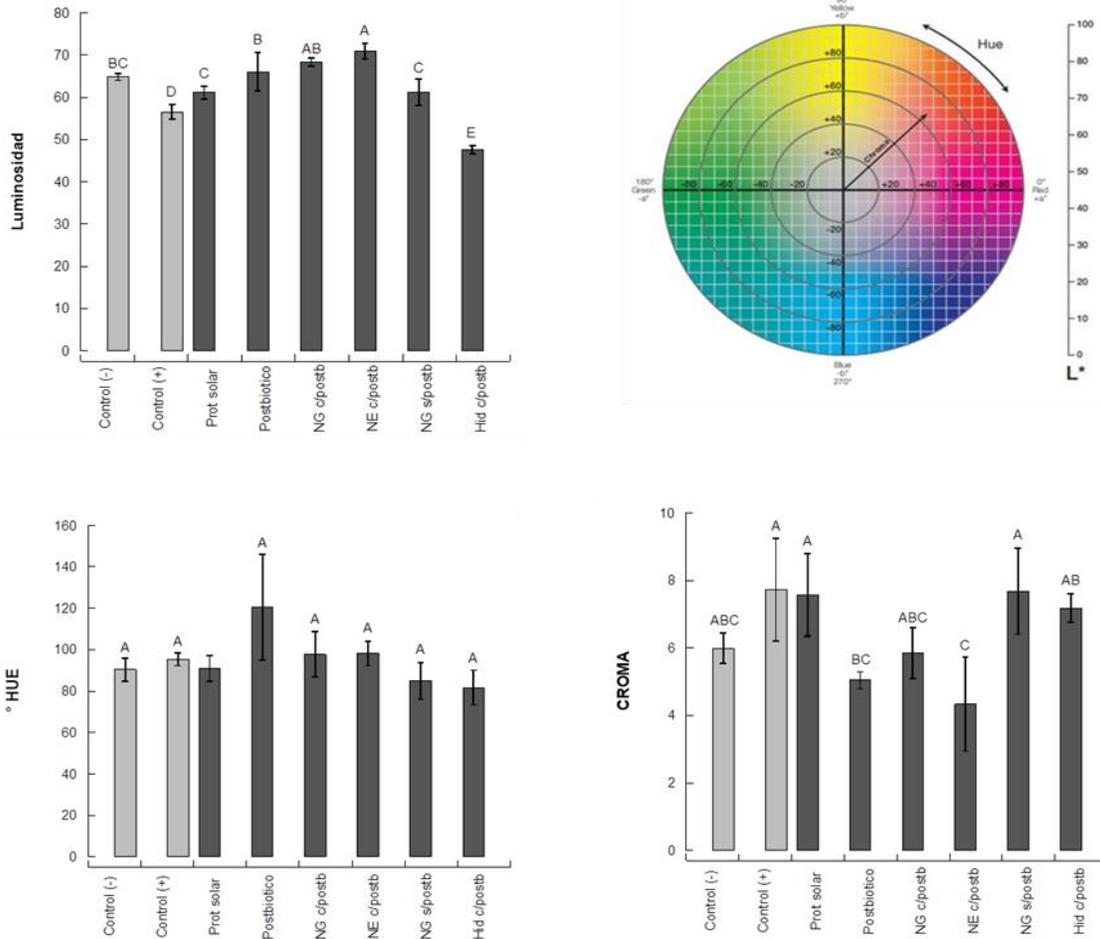
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**FIGURA 16.6** Las fotografías muestran las lesiones resultantes después de 4 días de exposición a la radiación UVB y con diferentes sistemas nanoestructurados.

Los rayos UV pueden causar daño en la piel, por lo que se probaron diferentes tratamientos de sistemas nanoestructurados con postbióticos y como referencia un protector solar (Avène FPS 30). Además, la sensibilidad de la piel mostró variaciones diarias, que pueden interferir en la detección de la eficacia de los tratamientos inclusive el protector solar. Por esto, se determinó la inflamación causada por la exposición a la radiación UVB en ratones BALB/c a los cuales se les quitó el vello dorsal, analizando las imágenes mediante un software CIE  $L^*a^*b$ . Los resultados indican que los valores de  $L^*a^*b$ , fueron mejor para el tratamiento NE c/postb (Figura 17.6).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



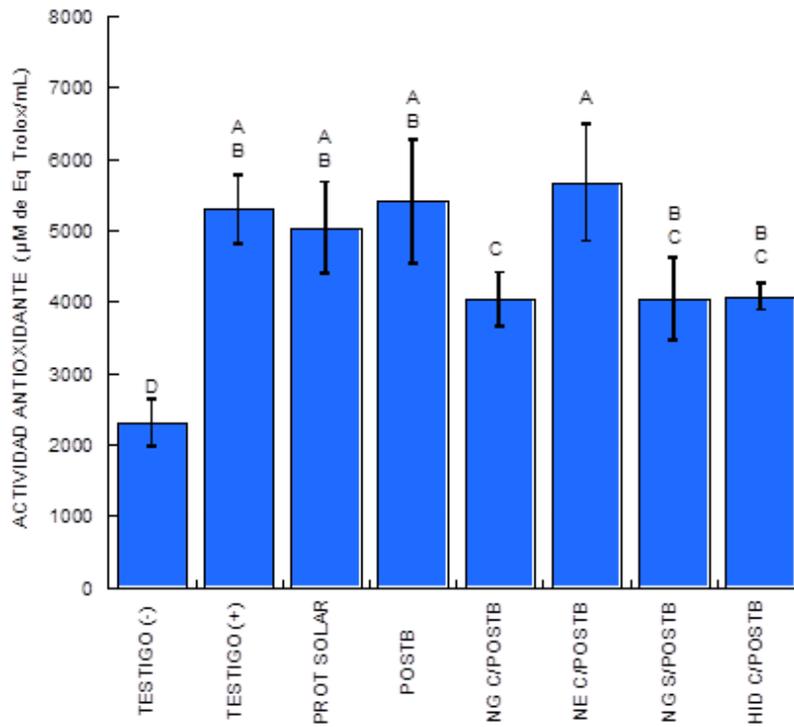
**FIGURA 17.6** Análisis CIE L\*a\*b\* en imágenes del dorso de los ratones. Los valores representan la media  $\pm$  DE. Las letras mayúsculas muestran diferencia significativa entre Luminosidad, °HUE y CROMA. Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

### 6.4.1 Capacidad antioxidante en muestras de tejido

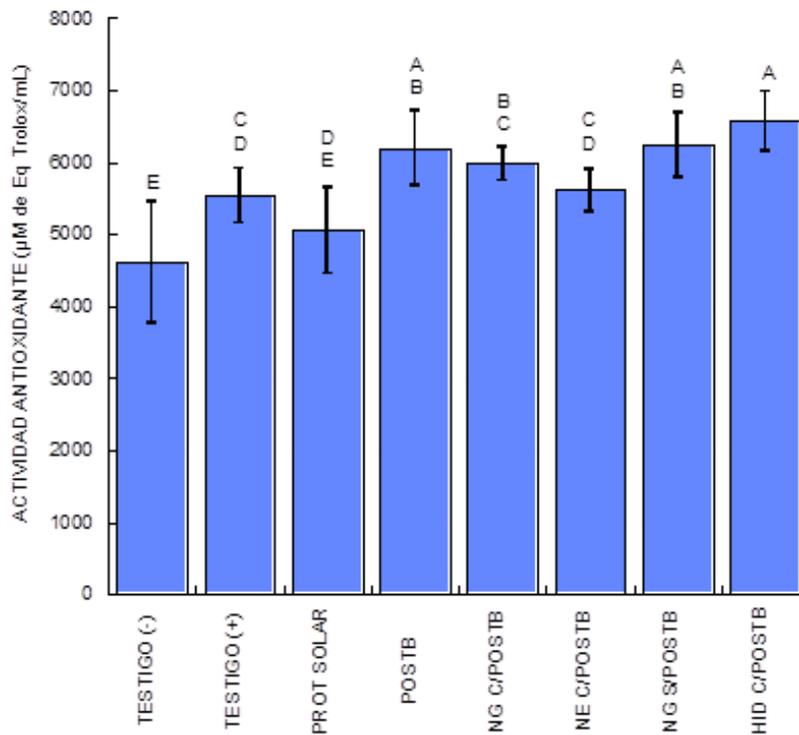
Los resultados de la capacidad antioxidante de muestras de tejidos se presentan en las Figuras 18.6 y 19.6. En general, los resultados mostraron un efecto positivo, aunque este resultado fue significativo ( $p > 0.05$ ), en los ratones tratados con POSTB y NE C/POSTB, respecto a los ratones del grupo testigo positivo. Considerando que los compuestos antioxidantes sirven como agentes protectores contra los efectos

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

nocivos de los radicales libres, éstos resultados sugieren que la aplicación de estos tratamientos podría ayudar a prevenir la disfunción vascular ocasionada por un desequilibrio entre la formación y eliminación de EROs (Kurutas, 2016).



**FIGURA 18.6** Capacidad antioxidante por el método ABTS en muestras de tejido. Los valores representan la media  $\pm$  EE. Las letras diferentes muestran diferencia significativa entre grupos. Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de LDS-Fisher ( $p < 0.05$ ).



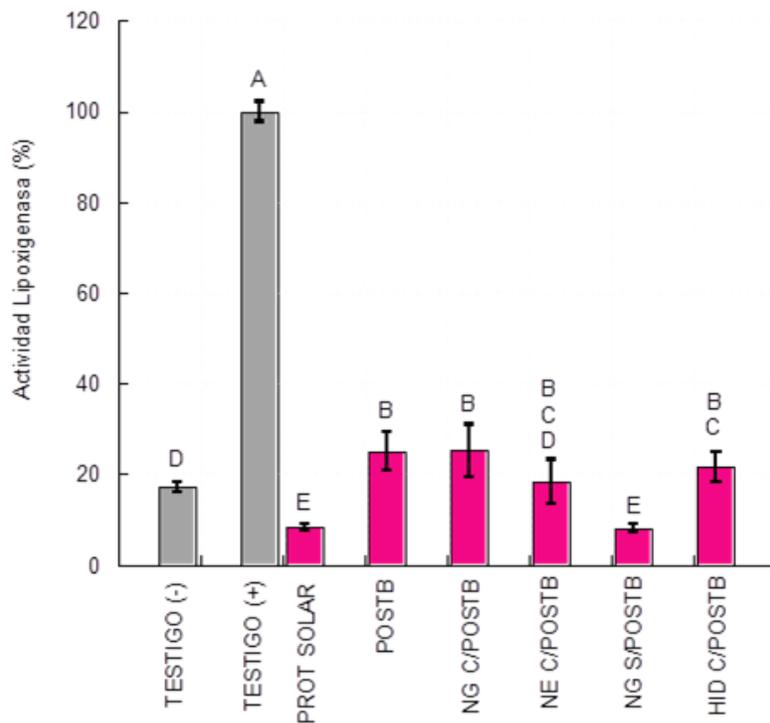
**FIGURA 19.6** Capacidad antioxidante por el método ORAC en muestras de tejido. Los valores representan la media  $\pm$  EE. Las letras diferentes muestran diferencia significativa entre grupos. Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de LDS-Fisher ( $p < 0.05$ ).

El efecto que se observó con el tratamiento NE C/POSTB en la capacidad antioxidante está asociado a que son emulsiones de tamaño nanométrico (107 nm) y su sistema de entrega es más preciso (Hui Zhang *et al.*, 2015), lo que podría permitir una mayor biodisponibilidad de los postbióticos intracelulares de la cepa J20 con propiedades antioxidantes. Se ha sugerido que la actividad antioxidante del contenido intracelular podría estar relacionada con las enzimas SOD, GPx, nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)-oxidasa y NADH-peroxidasa, las cuales son consideradas como mecanismos de defensa antioxidante contra el estrés oxidativo en diversos microorganismos (Kullisaar *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Lin y Chang, 2000). Adicionalmente, algunos estudios han reportado una correlación

positiva entre el contenido de GSH y GPx y la capacidad antioxidante de algunas bacterias ácido lácticas (Chen *et al.*, 2015; Yoon y Byun, 2004).

### **6.4.2 Mediadores de inflamación**

Los resultados de inhibición de la enzima lipooxigenasa (LOX) se muestran en la Figura 20.6. La actividad fue menor para los grupos que recibieron los tratamientos POST y NE C/POSTB comparadas con el testigo positivo, así como el protector solar y el NG S/POSTB, indicando que el protector solar ejerce un efecto de protección en la piel cuando es expuesto a la radiación. En el caso del tratamiento NG, se podría hipotetizar que los mismos componentes de la formulación tienen un efecto a disminuir la respuesta inflamatoria similar al que se ejerce por el protector solar. Las moléculas de tipo bencimidazol que contiene el protector solar tienen un efecto antiinflamatorio (López *et al.*, 1999). Estos resultados de inhibición de la enzima LOX son relevantes, ya que las lipooxigenasas metabolizan el ácido araquidónico formando diversos productos con el grupo hidroxiperóxido en distintas posiciones incrementando así la síntesis de leucotrienos, los cuales tienen una definida e importante participación en las diversas etapas del proceso inflamatorio (Ricciotti y Fitz, 2011).



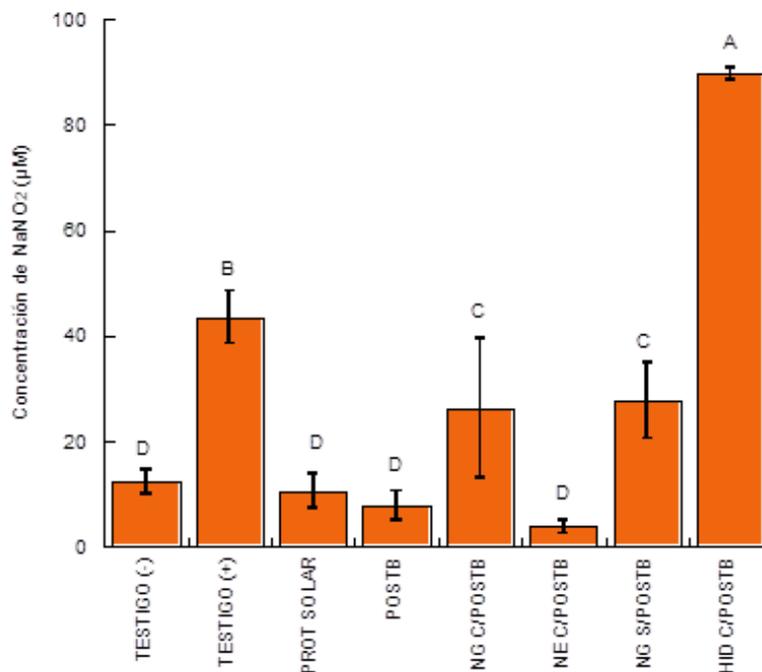
**FIGURA 20.6** Actividad lipoxigenasa en muestras de tejido. Los valores representan la media  $\pm$  EE. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre grupos. Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de LDS-Fisher ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, los grupos que recibieron los tratamientos PROT SOLAR, POSTB y NE C/POSTB presentaron menores concentraciones de ON (Figura 20.6) que los del grupo testigo positivo, e iguales al testigo negativo, destacando el efecto de inhibición que se generó por la aplicación de la NE C/POST. Esta vía destaca los importantes eventos moleculares que conducen a la producción de ON y EROs en células como macrófagos.

El ON (Figura 21.6) de  $\text{NOS}_2$  se identifica originalmente en macrófagos y contribuye a las acciones citotóxicas de estas células. El ON producido por  $\text{NOS}_2$  está implicado en la vasodilatación profunda del shock séptico, el estrés oxidativo, se inhibe la respiración celular y los tejidos se vuelven incapaces de utilizar el oxígeno disponible, conociendo este proceso como hipoxia metabólica. La presencia de la

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) o también denominada NOS<sub>2</sub> está muy expresada en macrófagos y su activación conduce a la destrucción de órganos en algunas enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Cheon *et al.*, 2006; Esposito y Cuzzucrea, 2007). Durante la inflamación, los macrófagos desempeñan un papel fundamental en el control de muchos fenómenos inmunopatológicos diferentes, incluida la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias y mediadores inflamatorios como IL-1 $\beta$ , IL-6, NO, iNOS, COX-2 LOX y TNF. De hecho, muchos de los estímulos inflamatorios, como el LPS y las citocinas proinflamatorias, activan las células inmunitarias para regularizar estos estados inflamatorios, por lo que éstos mediadores son moléculas claves para el desarrollo de nuevos fármacos antiinflamatorios, y en el estudio de los mecanismos moleculares antiinflamatorios de un fármaco (Murakami y Ohigashi, 2007; Zeilhofer y Brune, K, 2006).



**FIGURA 21.6** Concentración de ON en muestras de tejido tratados con el CI y los diferentes sistemas de entrega. Los valores representan la media  $\pm$  EE. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre grupos. Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de LDS-Fisher ( $p < 0.05$ ).

Esta evidencia proporciona una importante visión bioquímica de la capacidad de la NE C/POSTB para modular la homeostasis vascular mediada por el endotelio al incrementar las concentraciones de ON (Paunel *et al.*, 2005).

### **6.4.3 Respuesta en el perfil de citocinas pro y anti-inflamatorias en muestras de tejido**

Las citocinas son moléculas que se producen por activación de las células inmunológicas ante un proceso de inflamación. En el caso de la piel, las citocinas son producidas por células residentes como los queratinocitos, células de Langerhans, melanocitos, células M, macrófagos y por células que son reclutados como neutrófilos, eosinófilos, y linfocitos. La presencia de citocinas controlan toda la respuesta inmune, desde la inducción, fase efectora y terminación (Nedosytko *et al.*, 2014).

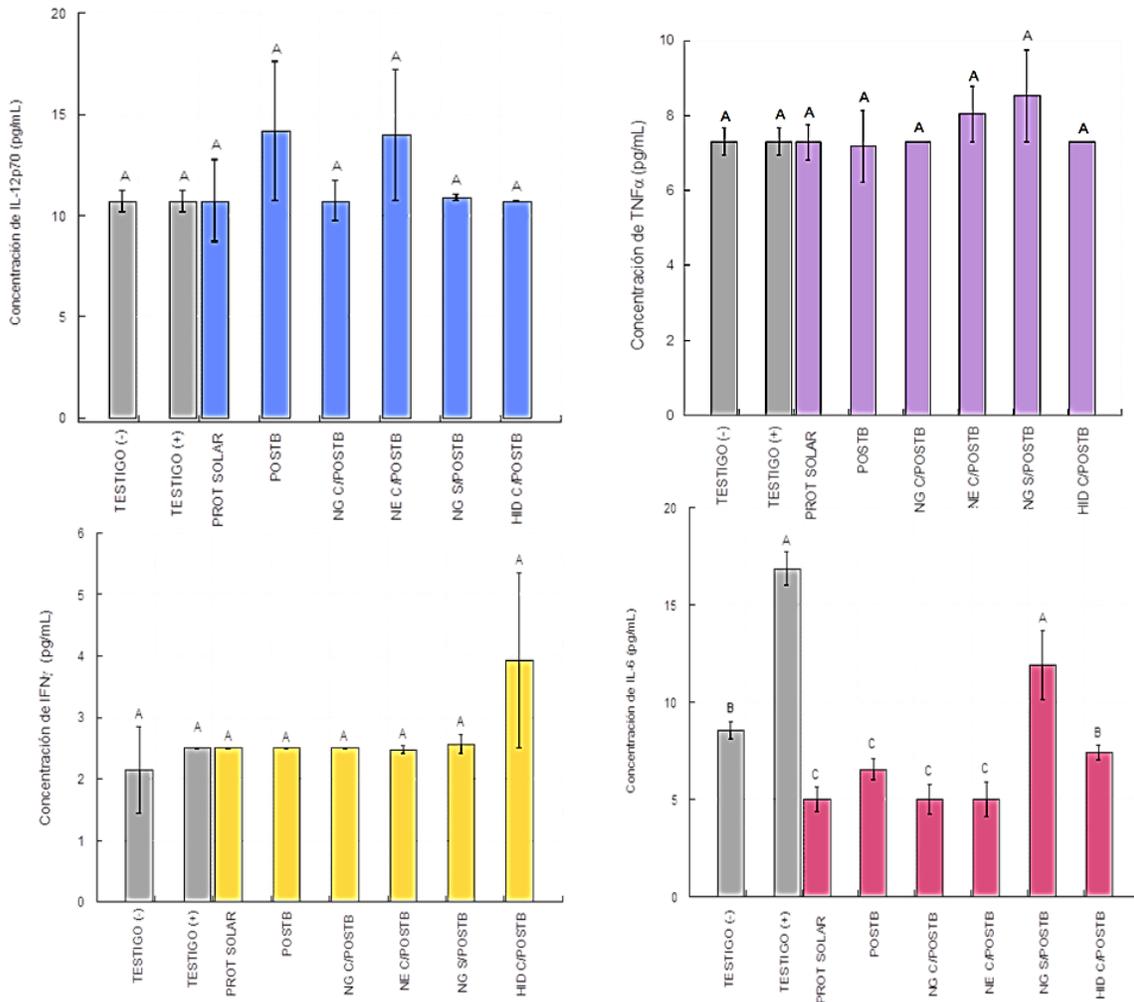
La presencia de citocinas proinflamatorias en muestras de tejido se muestran en la Figura 22.6. Los resultados no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la concentración de citocinas IL-12p70, TNF- $\alpha$ , e IFN $\gamma$ , con respecto al grupo testigo positivo. Estos resultados podrían indicar que el proceso de radiación, tiempo y dosis de exposición no conllevaron a generar un proceso de inflamación crónico.

Estudios han documentado que la sobreexpresión de las citocinas proinflamatorias, como IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  provoca el inicio, el mantenimiento y la recurrencia de lesiones cutáneas (Arican *et al.*, 2005). Adicionalmente, la presencia de IFN $\gamma$  induce a los macrófagos a liberar TNF $\alpha$ , generando de esta manera una mayor respuesta del sistema inmune ante un proceso de inflamación (Coondoo A., 2012).

Por el contrario, la citocina IL-6 mostró cambio significativo ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos y el grupo testigo positivo y negativo, y en particular los grupos tratados con el POSTB, NE C/POSTB Y NG C/POSTB mostraron la concentración más baja. La citocina IL-6 es conocida por ser una citocina pleiotrópica con numerosas actividades biológicas. Esta citocina juega un papel importante durante los procesos de inflamación ya que se produce en respuesta a infecciones y lesión de tejido

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

durante el proceso de inflamación aguda y su producción es mediada principalmente por neutrófilos y macrófagos, que son la primera línea de defensa del sistema inmune innato (Gonçalves *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2014).

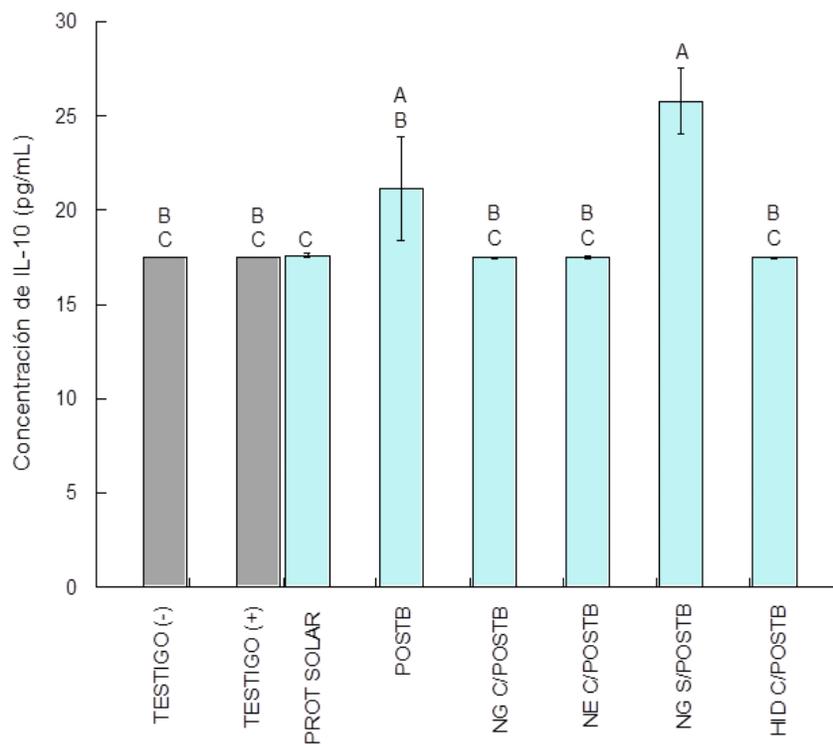


**FIGURA 22.6** Efecto de la administración tópica de diferentes tratamientos para inhibir la concentración de citocinas proinflamatorias (IL-12p70, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6) en muestras de tejido. Los valores representan la media  $\pm$  EE. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre grupos. Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de Fisher ( $p < 0.05$ ). Las concentraciones de las citocinas fueron determinadas por citometría de flujo utilizando el kit Bead Count Analysis (BCA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En contraste, los resultados para la citocina antiinflamatoria IL-10 no marcaron diferencias significativas entre los grupos tratados ( $p > 0.05$ ) (Figura 23.6).

En este sentido, IL-10 es una citocina que se produce por macrófagos y células dendríticas, pero también por linfocitos B y ciertos subtipos de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Debido a estos efectos, el descubrimiento de moléculas que estimulan la producción de IL-10 se considera un objetivo importante en los estudios de enfermedades inflamatorias, debido a que esta citocina juega un papel importante como citocina reguladora. Aunque nuestros resultados no mostraron diferencia significativa, a nivel biológico, un cambio en la concentración de ésta podría indicar un proceso de restauración del daño que se originó a nivel de tejido (Cela *et al.*, 2018).



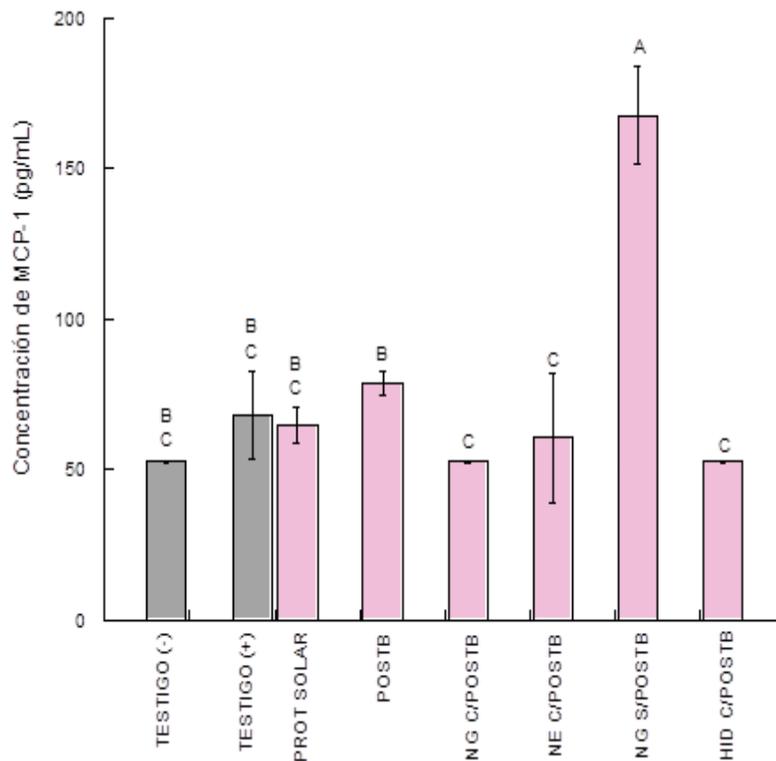
**FIGURA 23.6** Efecto de la administración tópica de diferentes tratamientos sobre la producción de IL-10 en muestras de tejido. Los valores representan la media  $\pm$  EE. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre grupos. Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de Fisher ( $p < 0.05$ ). Las

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

concentraciones de las citocinas fueron determinadas por citometría de flujo utilizando el kit Bead Count Analysis (BCA).

En el caso de la concentración de MCP-1 (quimiocina atrayente de monocitos), Figura 24.6, esta mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos, en especial el grupo tratado con el NG S/POSTB mostró un incremento significativo, incluso mayor que el testigo positivo. Esta citocina, que normalmente es conocida como una quimiocina, participa en el proceso de atracción y regulación de células leucocitarias hacia el sitio de infección, indicado la generación de una respuesta para mediar el proceso de inflamación (Nakamura *et al.*, 1995). Considerando que el tratamiento solo con el sistema acarreador (nanogel) mostró mayor nivel de MCP-1, se infiere que hubo una mayor atracción de células leucocitarias para restaurar el daño, lo cual no necesariamente es un efecto negativo ya que la reparación del daños sería realizado por dichas células leucocitarias. En el caso del tratamiento con el postbiótico, el mecanismo de restauración sería por un mecanismo diferente ya que los niveles de MCP-1, se infiere que hubo una menor infiltración celular (Nakamura *et al.*, 1995). Además, los bajos niveles de IL-6 sugieren que el mecanismo antiinflamatorio observado pudo ser mediante la inhibición de otros mediadores de inflamación como NO y actividad de lipooxigenasa (Cela *et al.*, 2018).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**FIGURA 24.6** Efecto de la administración tópica de diferentes tratamientos sobre la producción de MCP-1 en muestras de tejido. Los valores representan la media  $\pm$  EE. Letras diferentes muestran diferencia significativa entre grupos. Los valores de las medias fueron comparados utilizando la prueba de Fisher ( $p < 0.05$ ). Las concentraciones de las citocinas fueron determinadas por citometría de flujo utilizando el kit Bead Count Analysis (BCA).

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, encontramos que la aplicación tópica del postbiótico obtenido de *Lactobacillus fermentum* J20 en un sistema nanoestructurado, nanoemulsión con postbióticos, como vehículo de entrega demostró disminuir la inflamación generada por la irradiación UV en ratones, lo cual se puede observar por una disminución de mediadores inflamatorios (LOX y ON), y la regulación de citocinas, principalmente de IL-6 y MCP-1.

Los resultados obtenidos en la concentración de citocinas mediados por el sistema de entrega y el postbiótico de J20 sustentan los resultados previamente reportados, donde la presencia de la bacteria disminuye la respuesta inflamatoria mediada por

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

las citocinas de respuesta específica de Th1-Th17 en un modelo de inflamación localizado a nivel intestinal (Santiago-López *et al.*, 2018).

Al momento no se ha reportado cuál sería el mecanismo de acción de los postbióticos para inhibir la respuesta inflamatoria mediada por citocinas. Sin embargo, se ha documentado que las bacterias probióticas interactúan con receptores específicos (TLR) ubicados en la superficie de las células presentadoras de antígenos como dendríticas y macrófagos y a partir de esta interacción mediar la respuesta inflamatoria (Kerry *et al.*, 2018). Este mecanismo podría generarse con los componentes del contenido intracelular, en donde se tienen tanto de origen proteico, lipídico, o carbohidratos, al mismo tiempo que se puede mediar la producción de especies reactivas de oxígeno, la cual se ha reportado que incrementan cuando se tiene un proceso de inflamación.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten vislumbrar el potencial papel que juegan los postbióticos como compuestos de regulación de los procesos inflamatorios y de su posible aplicación en tratamientos tópicos

## VII. CONCLUSIONES

El contenido intracelular de la cepa *Lactobacillus fermentum* J20 tiene actividad antioxidante y antiinflamatoria, y disminuye la respuesta inflamatoria y estrés oxidativo en la piel de ratones

El sistema nanoestructurado con postbiótico obtenido de *Lactobacillus plantarum* J20 redujo la respuesta inflamatoria generada por la radiación ultravioleta en ratones. Estos resultados sugieren el uso potencial de los postbióticos y su incorporación en productos tópicos.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aberer W., Schuler G., Stingl G., Hönigsmann H y Wolff K. 1981. Ultraviolet light depletes surface markers of Langerhans cells. *The Journal of Investigative Dermatology*. **76**(3): 202-210.
- Abeyama K, Stern D.M. e Ito Y. 2005. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel anti-inflammatory mechanism. *The Journal of Clinical Investigation*. **115**: 1267 – 1274.
- Aguilar-Toalá, J. E., García-Varela, R., García, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Córdova, B. y Hernández-Mendoza, A. 2018. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*. **75**, 105–114.
- Aguilar-Toalá, J. E., Astiazarán-García, H., Estrada-Montoya, M. C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F. y Hernández-Mendoza, A. 2018. Modulatory Effect of the Intracellular Content of *Lactobacillus casei* CRL 431 Against the Aflatoxin B1-Induced Oxidative Stress in Rats. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. DOI: 10.1007/s12602-018-9433-8.
- Aguilar-Toalá, J. E., Hall, F. G., Urbizo-Reyes, U. C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., Liceaga, A. M. 2019. In Silico Prediction and In Vitro Assessment of Multifunctional Properties of Postbiotics Obtained From Two Probiotic Bacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. DOI: 10.1007/s12602-019-09568-z.
- Aguilar-Toalá, J. E., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B. y Liceaga, A. M. 2019. Potential role of natural bioactive peptides for development of cosmeceutical skin products. *Peptides*. 170170. DOI:10.1016/j.peptides.2019.170170.
- Altunbas, A., Lee, S. J., Rajasekaran, S., Schneider, J. y Pochan, D. 2011. Encapsulation of curcumin in self-assembling peptide hydrogels as injectable

- drug delivery vehicles. *Biomaterials*. **32** (25), 5906–5914.
- Alves, P., Pohlmann, A. y Guterres, S. 2005. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. *Pharmazie*. **60** (12): 900-904.
- Amin, S., Rathee, P. y Kumar, V. 2011. Optimization and Formulation Design of Gels of Diclofenac and Curcumin for Transdermal Drug Delivery by Box-Behnken, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **100**(2), 580–593. DOI:10.1002/jps.22292.
- Applegate, L. A. y Frenk, E. 1995. Oxidative defense in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes from sun-exposed and non-exposed skin. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. **11**(3), 95–101. DOI:10.1111/j.1600-0781.1995.tb00146.x.
- Arıcan, O., Aral, M., Sasmaz, S. y Ciragil, P. 2005. Serum Levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in Patients with Active Psoriasis and Correlation with Disease Severity. *Mediators of Inflammation*. **2005**(5), 273–279. DOI:10.1155/mi.2005.273.
- Arora, R., Aggarwal, G., Harikumar, S. L. y Kaur, K. 2014. Nanoemulsion based hydrogel for enhanced transdermal delivery of ketoprofen. *Advances in Pharmaceutics*. 1–12. DOI:10.1155/2014/468456.
- Backhed, F. 2005. Host-Bacterial Mutualism in the Human *Intestine Science*. **307** (5717), 1915–1920. DOI:10.1126/science.1104816.
- Bag, Anwesa, Subir Kumar Bhattacharyya, Nishith Kumar Pal. y Rabi Ranjan. 2013. Antioxidant and Membrane Stabilizing Activities of Hydroalcoholic Extract of *Terminalia chebula* Fruits. 2009.
- Bailey, A. 2001. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mechanisms of Ageing and Development*. **122** (7), Vol. 735–755. DOI: 10.1016/s0047-6374(01)00225-1.

- Barrangou, R., Lahtinen, S. J., Ibrahim, F. y Ouwehand, A. C. 2012. Genus *Lactobacillus*. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects, 4<sup>th</sup> ed. CRC Press, 77-86.
- Bockmuhl, D. 2016. Skin Innervation for Epidermal Rejuvenation. *IFSCC MAGAZINE*. **1,5**.
- Bogusław N., Sokołowska-Wojdyło, M., Ruckemann-Dziurdzińska, K., Roszkiewicz, J. y Nowicki, R. J. 2014. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Advances in Dermatology and Allergology*. **2**, 84–91. DOI:10.5114/pdia.2014.40920.
- Bors, W. y Buettner, G.R. 1997. The Vitamin C radical and its reactions. *Marcel Dekker Inc*. **75**, 94.
- Brenneisen, P., Sies, H. y Scharffetter-Kochanek, K. 2002. Ultraviolet-B Irradiation and Matrix Metalloproteinases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **973** (1), 31–43. DOI:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04602.x.
- Bryce, P. J., Mathias, C. B., Harrison, K. L., Watanabe, T., Geha, R. S. y Oettgen, H. C. 2006. The H1 histamine receptor regulates allergic lung responses. *The Journal of Clinical Investigation*. **116**, 1624 –1632
- Buwalda, S., Vermonden, T. y Hennink, W. 2017. Hydrogels for Therapeutic Delivery : Current Developments and Future Directions. *Biomacromolecules*. **18** (2), 316–330.
- Carr, F.J., Chill, D. y Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews Microbiology*. **28**, 281–370.
- Cals-Grierson, M. M. y Ormerod, A. D. 2004. Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide*. **10**, 179–193.

- Cela E. M., Paz, M. L., Leoni J. y González, M. D. H. 2018. Immune system modulation produced by ultraviolet radiation. IntechOpen, Capitulo 5. Pp, 103-121. DOI: 10.5772/intechopen.75450.
- Celia, C., Trapasso, E., Cosco, D., Paolino, D. y Fresta, M. 2009. Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **72**, 155–160.
- Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P. y Bhattacharya, S. 2012. Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **2**, 178–180. DOI:10.1016/S2221-1691(12)60154-3.
- Chaudhary, H., Kohli, K., Amin, S., Rathee, P. y Kumar, V. 2011. Optimization and Formulation Design of Gels of Diclofenac and Curcumin for Transdermal Drug Delivery by Box-Behnken. **100** (2), 580–593.
- Chávez Zamudio, R. 2015. Biodisponibilidad de ácido betulínico y curcumina en nanoemulsiones estabilizadas con lisofosfatidilcolina en un modelo murino. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
- Chlopicki, S., Olszanecki, R., Janiszewski, M., Laurindo, F. R. M., Panz, T. y Miedzobrodzki, J. 2004. Functional Role of NADPH Oxidase in Activation of Platelets. *Antioxidants & Redox Signaling*. **6** (4), 691–698. DOI:10.1089/1523086041361640
- Chua. J. 2017. Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases. *Current Opinion in Chemical Biology*. **8**, 16.
- Clydesdale, G. J, Dandie, G. W. y Muller, H. K. 2001. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunology & Cell Biology*. **79** (6):547-68.

- Collin C., Moll R., Kubicka S., Ouhayoun JP. y Franke WW. 1992. Characterization of human cytokeratin 2, an epidermal cytoskeletal protein synthesized late during differentiation. *Experimental Cell Research*. **202**, 132-141.
- Coondoo A. 2012. El papel de las citocinas en el patomecanismo de los trastornos cutáneos. *Revista India de Dermatología*. **57** (2), 90–96. DOI: 10.4103 / 0019-5154.94272
- Coussens, L. M. y Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*. **420** (6917), 860–867. DOI:10.1038/nature01322
- Cuero A. y J. Ospina 2018. Cali Diseño de un plan acción para la reducción del tiempo de ciclo en la línea de producción de cosméticos.
- Debnath, S., Vanitha, G., Bindu, H. y Babu, N. 2014. Applications of organogels in drug delivery. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*. **5674** (2), 976–981.
- Delfino, M., y Day, M. 2006. *Cancer: We Live and Die by Radiation*. Los Altos, CA.: MoBeta Publishing.
- De Jager TL., Cockrell AE. y Du Plessis SS. 2017. Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **996**, 15-23.
- De Vargas, B., Bidone, J., Oliveira, L., Koester, L. S., Bassani, V. L., y Teixeira, H. F. 2012. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. **8** (2), 330–336.
- Dridier, D., & Rivera, V. M. 2016. *Bacterias Ácido Lácticas. Fundamentos y aplicaciones*. México: Alfaomega.
- Donia, M.S., Cimermancic, P., Schulze, C.J., Wieland Brown, L.C., Martin, J., Mitreva, M., Clardy, J., Lington, R.G. y Fischbach, M.A., 2014. A systematic analysis of biosynthetic gene clusters in the human microbiome reveals a common family of antibiotics. *Cell*. **158**, 1402–1414.

- Dreher, F. y Maibach, H. 2001. Protective effects of topical antioxidants in humans. *Current Problems in Dermatology*. **29**, 157–164.
- Dünnhaupt, S., Kammona, O., Waldner, C., Kiparissides, C. y Bernkop-Schnürch, A. 2015. Nano-carrier systems: Strategies to overcome the mucus gel barrier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **96** (February), 447–453.
- D’Orazio J., Jarret S., Amaro-Ortiz A. y Scott T. 2013. UV Radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 12222-12248.
- Elmests CA. 1992. Cutaneous photocarcinogenesis. In: Mukhtar H, eds. *Pharmacology of the Skin, Series in Pharmacology and Toxicology*. Boca Raton, Fl: CRC Prss, 389-416.
- Eshwarappa, R. S., Ramachandra, Y. L., Subaramaihha, S. R., Subbaiah, S. G., Austin, R. S. y Dhananjaya, B. L. (2016). Anti-Lipoxygenase Activity of Leaf Gall Extracts of *Terminalia chebula* (Gaertn) Retz. (*Combretaceae*). *Pharmacognosy research*. **8** (1), 78–82. DOI:10.4103/0974-8490.171103.
- Fisher, G.J., Wang, Z., Datta., S.C., Varani, J., Kang, S., y Voorhees, J.J. 1997. Pathophysiology of premature skin ageing induced by ultraviolet light. *New England Journal of Medicine*. 1419-1428.
- Franssen M.E., Zeeuwen P.L., Vierwinden G., Van de Kerkhof P.C., Schalkwijk J. y Van Erp P.E. 2005. Diferencias fenotípicas y funcionales en subpoblaciones germinativas derivadas de epidermis normal y psoriásica. *Journal of Investigative Dermatology*. **124**: 373–8
- Gilchrest, B. A., N. A. Soter, J. S. Stoff y M. C. Mihm, Jr. 1981. The human sunburn reaction: histologic and biochemical studies. *Journal of the American Academy of Dermatology*. **5**: 411– 422.
- Gilchrest, B.A., Eller, M.S., Geller, A.C.1999. The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation. *The New England Journal of Medicine*. **340**, 1341-1348.

- Griffiths, C.E. 1998. Retinoids and vitamin D analogues action on nuclear transcription. *Journal of Hospital Medicine*. **59**, 12–16.
- Goldsmith P.C., Leslie T.A. y Hayes N.A. 1996. Inhibitors of nitric oxide synthase in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*. **106**: 113-118.
- Gomes, A. y Malcata, X. 1999. Bifidobacterium spp. And Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Foods & Technology* . 139-157.
- González Ortega L. 2017. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de curcumina acarreada en dos vehículos (organogel y nanogel) sobre el proceso inflamatorio de un modelo murino con edema auricular. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México
- González, S. y Pathak, M. A. 1996. Inhibition of ultraviolet-induced formation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, erythema and skin photosensitization by Polypodium leucotomos. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. **12** (2), 45–56. DOI:10.1111/j.1600-0781.1996.tb00175.x.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. 2011. National Research Council. Washington, DC. The National Academies Press. 246. DOI:10.17226/12910
- Gupta, V., Nagpal, M., Khan, I., Aggarwal, G. y Kaur, R. 2014. A Review on Non-Ionic Surfactant Based Organogel for Transdermal Delivery. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **3** (9), 150–163.
- Hadshiew, I., Eller, M., Moll, I. y Gilchrest, B. 2002. Photoprotective mechanisms of human skin. *Modulation by oligonucleotides*. 163-167.
- Haileselassie, Y. 2016. Postbiotic modulation of retinoic acid imprinted mucosal-like dendritic cells by probiotic *Lactobacillus reuteri* 17938 *in vitro*. *Frontiers in Immunology*. **1**, 11.

- Hänel K.H., Cornelissen, C., Lüscher B. y Malte-Baron, J. 2013. Cytokines and skin barrier. *International Journal of Molecular Sciences*. **14**, 6720-6745.
- Hart, P. H., A. Jaksic, G. Swift, M. Norval, A. A. el-Ghorr y J. J. Finlay-Jones. 1997. Histamine involvement in UVB- and cis-urocanic acid-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses. *Immunology*. **91**, 601–608.
- Horio T, Miyauchi H, Sindhvananda J., Soh H., Kurokawa I. y Asada Y. 1993. The effect of ultraviolet (UVB and PUVA) radiation on the expression of epidermal keratins. *British Journal of Dermatology*. **128**, 10-15.
- Holland, K. 2002. Cosmetics- what is their influence on skin microflora. *American Journal of Clinical Dermatology*. 445-449.
- Hoare, T., y Kohane, D. 2008. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. **49** (8), 1993–2007.
- Hruza, L. L., y Pentland, A. P. 1993. Mechanisms of UV-Induced Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*. **100** (1), 35S–41S. DOI:10.1111/1523-1747.ep12355240.
- Kostantinov, S. R. 2013. Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 741–745.
- Kaur, D., y Singh, R. 2015. A Novel Approach: Transdermal Gel. *Internacional Journal of Pharma Research & Review*. **4** (10), 41–50.
- Kingston, D.G.I., 2011. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *Journal of Natural Products*. **74**, 496–511.
- Kerry, R., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S. y Das, G. 2018. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*. **26** (3), 927–939. DOI:10.1016/j.jfda.2018.01.002

- Klang, V. y Valenta, C. 2011. Lecithin-based nanoemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **21** (1), 55–76. DOI:10.1016/s1773-2247(11) 50006-1.
- Kleerebezem, M. y Vaughan, E.E., 2009. Probiotic and gut *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*: molecular approaches to study diversity and activity. *Annual Review of Microbiology*. **63**, 269– 290.
- Kuhn, A. 1998. Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus. *Journal of Investigative Dermatology*. **111**, 149–153.
- Kumar, S., Talegaonkar, S., Negi, L. y Khan, Z. 2012. Design and Development of Ciclopirox Topical Nanoemulsion Gel for the Treatment of Subungual Onychomycosis. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. **46** (4), 303–311.
- Kulka M. 2013. Mechanisms and Treatment of Photoaging and Photodamage. Using Old Solutions to New Problems. *Natural Drug Discovery in the 21<sup>st</sup> Century*. DOI: 10.5772/56425.
- Krutmann J. y Crewe M. 1995 Involvement of cytokines, DNA damage, and reactive oxygen species in ultraviolet radiation-induced modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression. *Journal of Investigative Dermatology*. **105**, 67S–70S.
- Kurutas EB. 2016. La importancia de los antioxidantes que juegan el papel en la respuesta celular contra el estrés oxidativo / nitrosativo: estado actual. *Diario de nutrición*. **15** (1), 71. DOI: 10.1186 / s12937-016-0186-5.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S.C.J., 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Natural Reviews Microbiology*. **8**, 171–184.
- Lee, S-C., Lee J-W., Lee H-W., Chun S D., Kang I.K., Wong, Y-H. y Kim Y.P. 2000. Protective role of nitric oxide-mediated inflammatory response against lipid

- peroxidation in ultraviolet B-irradiated skin. *British Journal of Dermatology*. **142**, 653-659.
- Levy, B. D. Clish, C. B., Schmidt, B Gronert K. y Serhan, C. N. 2001. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature Immunology*. **2**, 612–619.
- Li, X., Guo, J., Dai, S., Ouyang, Y., Wu, H., Sun, W. y Wang, G. 2009. Exploring and Exploiting Microbial Diversity through Metagenomics for Natural Product Drug Discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **9** (16), 1525–1535.
- López-Rodríguez ML, Benhamú B, Morcillo MJ, Tejada ID. y Orensanz L., 1999 Derivados de bencimidazol.2. Síntesis y relaciones estructura-actividad de los nuevos derivados del ácido azabicyclo bencimidazol-4-carboxílico con afinidad por los receptores serotoninérgicos 5-HT (3). *Journal of Medicine Chemistry*. **42** (24): 5020–8.
- Loyo Cruz, V. M. 2017. Caracterización fisicoquímica de nanoemulsiones de  $\alpha$ -Tocoferol evaluadas en un sistema de digestión in vitro. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
- Luciann Lisi Hruza y Alice P. Pentland, 1993. Mechanisms of UV-induced inflammation. *The journal of Investigative dermatology*. **100**, 35S-41S.
- Marzio. 2008. Increase of skin ceramide levels in aged subjects. *Immunopathology Pharmacol*, 137-143.
- McClements, D. J. 2009. Biopolymers in Food Emulsions. *Modern Biopolymer Science* (First Edition). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.00004-5>.
- McClements, D. J. 2011. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*. **7**(6): 2297. DOI. 10.1039/c0sm00549e
- Mehlhorn; R.J., Fuchs, J., Sumida, S. y Packer, L. 1990. Preparation of tocopheroxyl radicals for detection by electron Spin Resonance. *Methods in Enzymology* 197-205.

- Melnikova VO. y Ananthaswamy HN. 2005. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutation Research*. **571** (1-2), 91-106.
- Modi, J. D., y Patel, J. K. 2011. Nanoemulsion-Based Gel Formulation of Aceclofenac for Topical Delivery. *International Journal*. **1** (1), 6–12.
- Mou, D., Chen, H., Du, D., Mao, C., Wan, J., Xu, H. y Yang, X. 2008. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. **353** (1–2), 270–276.
- Mueller, M. M. 2006. Inflammation in epithelial skin tumours: Old stories and new ideas. *European Journal of Cancer*. **42** (6), 735–744.  
DOI:10.1016/j.ejca.2006.01.014
- Nakamura K., Williams IR. y Kupper TS. 1995. Keratinocyte-Derived Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1): Analysis in a Transgenic Model Demonstrates MCP-1 Can Recruit Dendritic and Langerhans Cells to Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. **105**, 635-643.
- Nakamura, F. 2016. Fragmented lactic acid bacteria cells activate peroxisome proliferator-activated receptors and ameliorate dyslipidemia in obese mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2549–2559.
- Netzker. 2015. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Frontiers in Microbiology*. **299**.  
DOI./10.3389/fmicb.2015.00299.
- Niedner, R. 2003. Topical corticosteroids versus topical inhibitors of calcineurin. *Der Hautarzt*. **54**, 338–341.
- Nile, Sh. y S W Park. 2014. “HPTLC Analysis, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antiproliferative Activities of *Arisaema tortuosumtuber* Extract.” *Pharmaceutical Biology*. **0209**, 221–27.

## BIBLIOGRAFÍA

- Norval, M., J. W. Gilmour y T. J. Simpson. 1990. The effect of histamine receptor antagonists on immunosuppression induced by the cis-isomer of urocanic acid. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. **7**, 243–248.
- Núñez S. 2015. Lactobacillus casei CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet induced obese mouse model. *Nutrition*. DOI:10.1016/j.nut.2015.02.006.
- Oliveira, J., Aguiar, T., Mezadri, H. y Henrique dos Santos, O. 2011. Attainment of hydrogel-thickened nanoemulsions with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) and retinyl palmitate. *African Journal of Biotechnology*. **10** (60), 13014–13018.
- OMS 2011. Carpeta de material sobre seguridad de las inyecciones y los procedimientos conexos. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75247/9789243599250\\_spa.pdf;jsessionid=F0976C25B7FB92FD9C0BE0A5E555EA2F?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75247/9789243599250_spa.pdf;jsessionid=F0976C25B7FB92FD9C0BE0A5E555EA2F?sequence=1).
- Oteo, M. 2013. Synthesis, characterization and study of supramolecular gel materials based on glycoamphiphiles. Tesis de Doctorado en Química Orgánica, Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza.
- Paladini RD, Takahashi K., Bravo NS. y Coulombe PA. 1996. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a recognition of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin. *Journal of Cell Biology*. **132**, 381-397
- Patel, S.S, and MN Zaveri. 2014. "Trypsin and protein denaturation inhibitory activity of different fractionation and isolated compound of leaf and root of *justicia gendarussa*." *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. **5**, 5564–71.
- Paunel, A. N., Dejam, A., Thelen, S., Kirsch, M., Horstjann, M., Gharini, P., Suschek, C. V. 2005. Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms. *Free*

- Radical Biology and Medicine.* **38** (5), 606–615.  
DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.018
- Pentland AP., Mahoney M., Jacobs SC. y Holtzman MJ. 1990. Enhanced prostaglandin synthesis after ultraviolet injury is mediated by endogenous histamine stimulation. *Journal of Clinical Investigation.* **86**, 566–574.
- Pillai, S., Oresajo, C. y Hayward J. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *International Journal of Cosmetic Science.* **27**, 17-34.
- Podda, M., Koh, B., Thiele, J., Milbrandt, R. y Packer, L. 1997. Ozone activates the transcription factor NF-κB in keratinocytes via reactive oxygen species. *Australian Journal of Dermatology.* **185**.
- Podda, M. y Grundmann-Kollmann, M. 2001. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clinical and Experimental Dermatology.* **26**, 578–582.
- Punnonen, K., Jansen, C.T. y Puntala, A. 1991. Effects of in-vitro UVA irradiation and PUVA treatment on membrane fatty acids and activities of antioxidants enzymes in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 255-259.
- Rajilić Stojanović, M. 2013. Function of the microbiota. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* **27**, 5–16.
- Ramirez, A. y Astudillo, L. 2016. Materiales polimeros de tipo hidrogeles : revisión sobre su caracterización mediante FTIR , DSC , MEB, MET. *Revista Latinoamericana de Metalurgia Y Materiales.* **36** (2),108-130.
- Rao, Bashir Ado Ahmad y Khamsah Suryati Mohd. 2016. *In vitro* nitric oxide scavenging and anti inflammatory activities of different solvent extracts of various parts of *Musa paradisiaca*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences.* **20** (5), 1191 - 1202. DOI: <http://dx.doi.org/10.17576/mjas-2016-2005-26>

- Rapaport, M., Nierenberg, A, Schettler, P., Kinkead, B., Cardoos, A, Walker, R. y Mischoulon, D. 2015. Inflammation as a predictive biomarker for response to omega-3 fatty acids in major depressive disorder: a proof-of-concept study. *Molecular Psychiatry*. **1**, 1–9.
- Rattis F-M., Péguet-Navarro J., Courtellemont P., Redziniak G. y Schmitt D. 1995. In vitro effects of ultraviolet B radiation on human Langerhans cell antigen-presenting function. *Cellular Immunology*. **164** (1):65-72.
- Rattis FM., Concha M., Dalbiez-Gauthier C., Courtellemont P., Schmitt D. y Péguet-Navarro J. 1998. Effects of ultraviolet B radiation on human Langerhans cells: Functional alteration of CD86 upregulation and induction of apoptotic cell death. *The Journal of Investigative Dermatology*.111(3):373-379.
- Rhie, G., Shin, M. y Seo, J.Y. 2001. Aging and photoaging dependent changes of enzymic and non-enzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. **117**, 1212– 1217.
- Rittie, L. 2002. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Research Reviews*. **1** (4), 705–720. DOI:10.1016/s1568-1637(02)00024-7.
- Skaper, S.D., Fabris, M., Ferrari, V., Dalle Carbonare, M. y Leon A. 1997. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free Radicals in Biology*. **22**, 669–678.
- Sagiri, S., Behera, B., Rafanan, R., Bhattacharya, C., Pal, K., Banerjee, I. y Rousseau, D. 2014. Organogels as Matrices for Controlled Drug Delivery: A Review on the Current State. *Soft Materials*. **12** (1), 47–72.
- Sagiri, S., Behera, B., Sudheep, T. y Pal, K. 2012. Effect of Composition on the Properties of Tween-80–Span-80-Based Organogels. *Designed Monomers & Polymers*. **15** (3), 253–273.
- Salva, A. 2004. Role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Clinical and Translational Allergy*. 4-33.

- Sander, C. S., Chang, H., Salzmann, S., Müller, C. S. L., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P. y Thiele, J. J. 2002. Photoaging is Associated with Protein Oxidation in Human Skin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. **118** (4), 618–625. DOI:10.1046/j.1523-1747.2002.01708.x.
- Sartor, L., Pezzato, E. y Garbisa, S. 2002. Epigallocatechin-3-gallate inhibits leukocyte elastase: potential of the phyto-factor in hindering inflammation, emphysema, and invasion. *Journal of Leukocyte Biology*. **71**, 73–79.
- Santiago-López L., Adrián Hernández-Mendoza, Verónica Mata-Haro, Belinda Vallejo-Cordoba y Aarón F. González-Córdova. 2018. Immune response induced by fermented milk with potential probiotic strains isolated from artisanal Cocido cheese. *Food and Agricultural Immunology*. **29**, 911-929.
- Santiago-López L., Adrián Hernández-Mendoza, Belinda Vallejo-Cordoba, Verónica Mata-Haro, Abraham Wall-Medrano y Aarón F. González-Córdova. 2018. Milk Fermented with *Lactobacillus fermentum* Ameliorates Indomethacin-Induced Intestinal Inflammation: An Exploratory Study. *Nutrients*. **11**, 1610. DOI: 10.3390/nu11071610.
- Santos Luna, D. 2019. Evaluación de la bioactividad de nanogeles de lanosterol y/o sus derivados sobre cataratas inducidas en un modelo murino. Tesis de Doctorado en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
- Sharma, D. 2016. Antiaging effects of probiotics. *Journal Drugs Dermatology*. 9-12.
- Shigwedha, N., Sichel, L., Jia, L. y Zhang, L. 2014. Probiotal cell fragments (PCFs) as “novel nutraceutical ingredients”. *Journal of Biosciences and Medicines*. 43-55.
- Seite, S., Colige, A. y Piquemal-Vivenot 2000. A full-UV spectrum absorbing daily use cream protects human skin against biological changes occur ring in Photoaging. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. **16**, 147–155.

- Seo, Y. R., Sweeney, C., & Smith, M. L. 2002. Selenomethionine induction of DNA repair response in human fibroblasts. *Oncogene*. **21** (23), 3663–3669. DOI:10.1038/sj.onc.1205468.
- Shin, H. 2010. Hypocholesterolemic effect of sonication-killed *Bifidobacterium longum* isolated from healthy adult Koreans in high cholesterol fed rats. *Archives of Pharmacal Research*. 1425–1431.
- Singh. 2017. Designer probiotics: paving the way to living therapeutic. *Trends in Biotechnology*. 679-682.
- Simon, S., Vered, M., Rinehart, A., Cheronis, J. y Janoff, A. 1988. Inhibition of human neutrophil elastase by polyguanylic acid and other synthetic polynucleotides. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **240**, 65–74.
- Skilling, K., Citossi, F., Bradshaw, T., Ashford, M., Kellam, B. y Marlow, M. 2014. Insights into low molecular mass organic gelators: a focus on drug delivery and tissue engineering applications. *Soft Matter*. **10** (2), 237–56.
- Siti, H., Kamisah, Y. y Kamsiah, J. 2015. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*. **71**, 40–56.
- Smith MD. y Rees JL. 1994. Wavelength-specific upregulation of keratin mRNS expression in response to ultraviolet radiation. *Journal Investigative of Dermatology*. **102**, 433-439.
- Stanton, W.R., Janda, M., Baade, P.D. y Anderson, P. 2004 Primary prevention of skin cancer: A review of sun protection in Australia and internationally. *Health Promotion International*. **19**, 369-378. DOI:10.1093/heapro/dah310.
- Soter NA., Lewis RA., Corey EJ. y Austen KF. 1983. Local effects of synthetic leukotrienes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>) in human skin. *Journal Investigative of Dermatology*. **80**, 115–119,
- Svobodova, A., Psotova, J. y Walterova, D. 2003. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage: a review. *BioMed*. **147**, 137–145.

- Takashima, A. y Bergstresser, P. R. 1996. Impact of UVB Radiation on the Epidermal Cytokine Network. *Photochemistry and Photobiology*. **63** (4), 397–400. DOI:10.1111/j.1751-1097.1996.tb03054.x.
- Tanaka, T. Narazaki, M. y Kishimoto, T. 2014. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **6** (10), 016295–016295.
- Thiele, J. 2001. Oxidative Targets in the stratum corneum. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*. **14**, 87-91.
- Tomar, S., Anand, S., Sharma, P. y Sangwan, V. 2015. Role of probiotic, prebiotics, synbiotics and postbiotics in inhibition of pathogens. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. 717-732.
- Trenum, C.W., Blake, D.R. y Morris, C.J. 1992. Skin inflammation: reactive oxygen species and the role of iron. *Journal Investigative of Dermatology*. **99**, 675–682.
- Tsilingiri, K. y Rescigno, M. 2013. Postbiotics: what else?. *Beneficial Microbes*. 101-107.
- Tyagi, S. y Simon, S.R. 1990. Parinaric acids as probes of binding domains in neutrophil elastase. *The Journal of Biological Chemistry*. **266**, 15185–15191.
- Tyagi, S. y Simon, S.R. 1991. Interaction of neutrophil elastase with hydrophobic polyanionic chelators. *Biochemistry and Cell Biology*. **69**, 624–629.
- Ullrich SE. 2005. Mechanisms underlying UV-induced immune suppression. *Mutation Research*. **571** (1-2), 185-205.
- Valtonen EJ., Janne J., y Siimes M. 1964. The effect of the erythematous reaction caused by Ultraviolet irradiation on mast cell degranulation in the skin. *Acta Dermato-Venereologica (Stockh)*. **44**, 269–272.
- Vermuri, R. (2016). Prebiotics. *International Journal of Medical*. 387-396.

## BIBLIOGRAFÍA

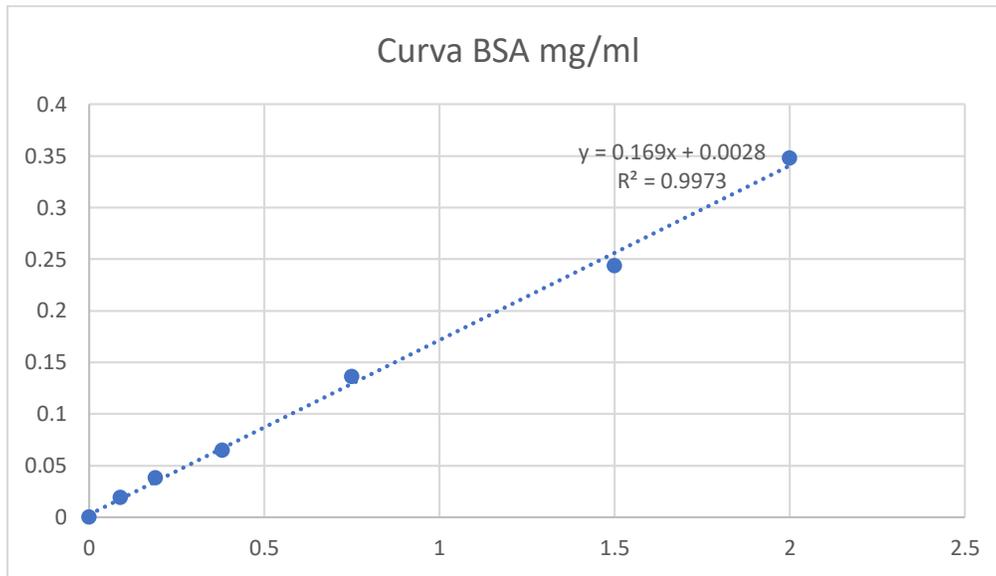
- Verna, A.K., Lowe, N.J. y Boutwell, R.K. 1979. Induction of mouse epidermal ornithine decarboxylase activity and DNA synthesis by ultraviolet light. *Cancer Research*. 1035-1040.
- Vieira, A., Fukumori, C. y Ferreira, C. 2016. New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases. *Clinical and Translational Immunology*. DOI.org/10.1038/cti.2016.38.
- Vintiloiu, A. y Leroux. 2008. Organogels and their use in drug delivery--a review. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*. 179-192.
- Voorhees, J.J. y Fisher, G.J. 1998. Method of inhibiting photoaging of skin. US Patent no. 5837224.
- Von Wright, A. y Axelsson L., 2012. Lactic acid bacteria: an introduction. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects, 4<sup>th</sup> ed. CRC Press, 2-14.
- Walsh, C.T., 2008. The chemical versatility of natural-product assembly lines. *Accounts of Chemical Research*. **41**, 4–10.
- Walter, J., 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environment Microbiology*. **74**, 4985–96.
- Weber, S. U., Han, N. y Packer, L. (2000). Ozone: An Emerging Oxidative Stressor to Skin. *Current Problems in Dermatology*. 52–61. DOI:10.1159/000060653.
- Weiss R.A., Eichner R. y Sun TT. 1984. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56- kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *Journal of Cell Biology*. **98**, 1397-1406.
- Wood, L.C., Elias, P.M. y Calhoun, C. 1996. Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*. **106**, 397–403.

## BIBLIOGRAFÍA

- Woodward DF, Raval P., Pipkin MA. y Owen DA: 1981. Re-evaluation of the effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on u.v.-induced cutaneous inflammation. *Agents Actions*. **11**, 711–717.
- Yadav., H., Anwar, N., Halabi, A. y Alsalloum, G. 2017. Nanogels as Novel Drug Delivery Systems - A Review. *Insights in Pharma Research*. **1**, 1–8.
- Ying, Q.L., Rinehart, A.R., Simon, S.R. y Cheronis, J.C. 1991. Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid: evidence for a binding site for pentacyclic triterpenes. *The Journal of Biochemistry*. **277**, 521–526.
- Zeeuwen, J. 2013. Microbiome and skin diseases. *Current Opinion in Allergy Clinical Immunology*. 420-514.
- Ziboh, V. A. 1992. Prostaglandins, leukotrienes, and hydroxy fatty acids in epidermis. *Seminars in Dermatology*. **11**, 114–120.
- Zhang, J. 2010 Glutathione protects *Lactobacillus sanfranciscensis* against freeze-thawing, freeze-drying, and cold treatment. *Applied and Environmental Microbiology*. 2989-2996.
- Zhang, C., Feng, F. y Zhang, H. 2018. *Emulsion electrospinning: Fundamentals, food applications and prospects*. *Trends in Food Science & Technology*. DOI:10.1016/j.tifs.2018.08.005.
- Zhao, J., Wang, J., Chen, Y. y Agarwal, R. 1999. Antitumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3 $\phi$ -gallate as the most effective antioxidant constituent. *Journal of Carcinogenesis*. **20**, 1737–1745.

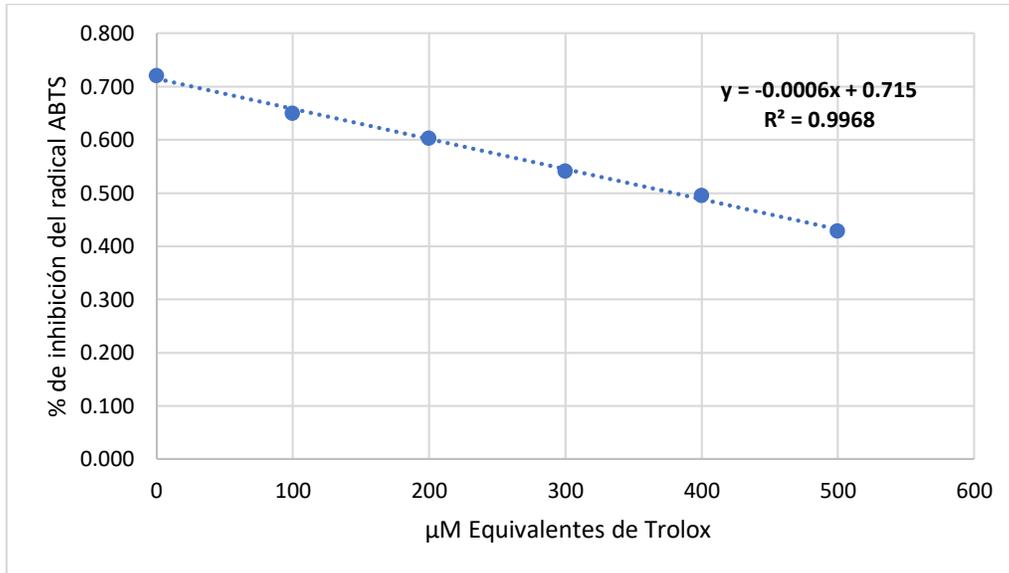
**APENDICE A**

**Curva estándar BSA para concentración de proteínas por Lowry**



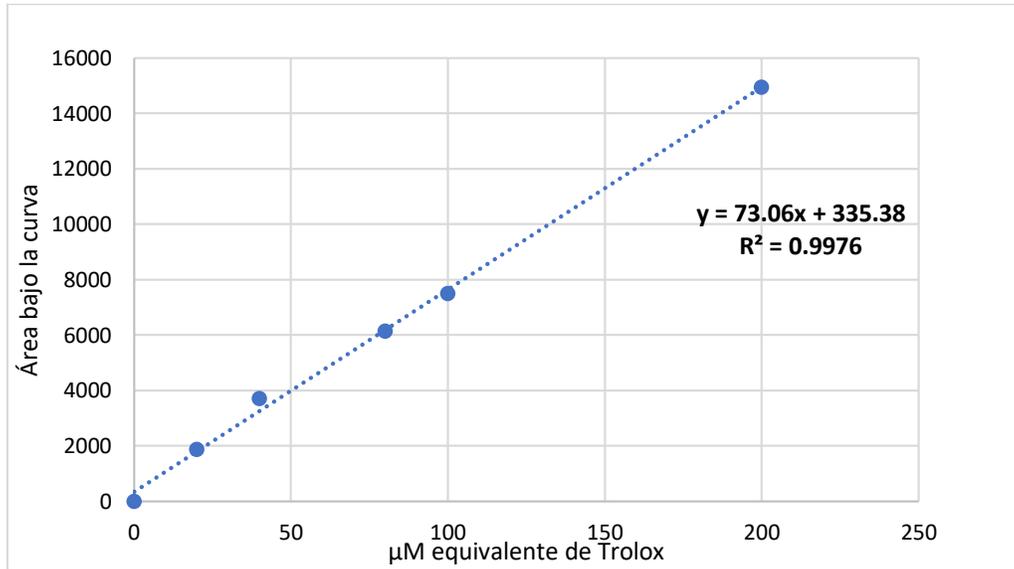
APENDICE B

Curva estándar representativa de Trolox para el método ABTS



APENDICE C

Curva estándar representativa de Trolox para el método ORAC



## APENDICE D

### Carta aprobación Comité de Investigación



COMITÉ DE INVESTIGACIÓN  
CI-ITVER/04/2019  
H. Veracruz, Ver., **2/mayo/ 2019**

Dr. Hugo Sergio García Galindo  
Profesor-Investigador  
Laboratorio Poscosecha  
UNIDA-ITVER

Por medio de la presente le informo que su proyecto "Evaluación de la actividad anti-inflamatoria de nanogel formulados con postbióticos obtenidos de bacterias ácido-lácticas específicas utilizando un modelo de inflamación" ha sido revisado por el Comité de Investigación del Instituto Tecnológico de Veracruz (CI-ITVER) y considerando las Normas y Reglamentos Oficiales que le acatan, ha establecido el siguiente dictamen:

#### **APROBADO PARA DESARROLLO**

Dictamen acordado en la sesión mensual del CI-ITVER del 12 de abril del 2019.

Considerando que el desarrollo del estudio queda bajo su responsabilidad y comprometiéndose a respetar las Normas Oficiales Mexicanas que establecen los procedimientos para el manejo de animales e informar lo relevante al manejo y disposición de sustancias químicas y de material biológico derivado de las actividades del proyecto.

Sin otro particular por el momento, le deseamos el mayor de los éxitos.

ATENTAMENTE

Dra. Cynthia Cano Sarmiento  
Secretaría del CI-ITVER

Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779,  
Col. Formando Hogar,  
C.P. 91897, H. Veracruz, Ver.  
Tel.: (229) 934 1500  
[www.itver.edu.mx](http://www.itver.edu.mx)  
<http://unida.itver.edu.mx>

APENDICE E

Curva estándar de NaNO<sub>2</sub>, para obtener la concentración de NO.

