

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



**Evaluación del extracto de orégano en células mononucleares
de la sangre periférica como una posible alternativa de
tratamiento para inflamación**

Trabajo de graduación presentado por Michelle Alexandra Maaz Rosales
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Biomédica

Guatemala,

2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería




**Evaluación del extracto de orégano en células mononucleares
de la sangre periférica como una posible alternativa de
tratamiento para inflamación**

Trabajo de graduación presentado por Michelle Alexandra Maaz Rosales
para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería Biomédica


Guatemala,


2024


Vo.Bo.:

(f) 
M. Sc. Carlos Esquit

Tribunal Examinador:

(f) 
M.Sc. Carlos Esquit

(f) 
Dr. Luis Alberto Rivera Estrada

(f) 
Ing. Kurt Emmanuel Kellner

Fecha de aprobación: Guatemala, 13 de febrero de 2025.

A lo largo de mis estudios en la Universidad del Valle de Guatemala, he sido testigo de la importancia de la innovación en el ámbito de la salud. Esta experiencia me ha llevado a desarrollar una profunda convicción de que la ingeniería biomédica puede ser una herramienta transformadora para mejorar la calidad de vida de las personas. Con esta visión, decidí enfocar mi proyecto de graduación en la evaluación del extracto de orégano en células mononucleares de la sangre periférica como una posible alternativa de tratamiento para la inflamación, con el objetivo de contribuir al inicio de una solución innovadora en este campo y generar un impacto social para estudios futuros. En primer lugar, agradezco a Dios, quien ha sido mi guía y fortaleza en todo momento. Sin su presencia y apoyo, este logro no habría sido posible. A mi familia, les expreso mi más sincero agradecimiento por su apoyo incondicional, confianza y amor, que me han motivado a superar cada desafío y a buscar siempre la excelencia. A mis amigos, gracias por su apoyo constante y los momentos compartidos que me han recordado el valor de la compañía. A mi novio, por su motivación constante, palabras de aliento y por recordarme siempre de mis capacidades, incluso en los momentos más difíciles. Quiero expresar un especial agradecimiento a mi asesor de tesis, PhD. Diego Archila, por su paciencia, conocimientos y orientación invaluable a lo largo de este proyecto. Su dedicación y compromiso fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo. También extiendo mi gratitud al Departamento de Electrónica, Mecatrónica y Biomédica de la Universidad del Valle de Guatemala, por proporcionar las herramientas, equipos y conocimientos necesarios para llevar a cabo este proyecto. Finalmente, reconozco que este logro no habría sido posible sin la suma de todos estos apoyos, y espero que este trabajo sea el inicio de nuevos avances en el ámbito de la salud y la ingeniería biomédica.

Prefacio	V
Lista de figuras	VIII
Lista de cuadros	IX
Resumen	X
Abstract	XI
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
3. Justificación	4
4. Objetivos	6
5. Alcance	7
6. Marco teórico	8
7. Metodología	20
7.1. Obtención del extracto de orégano	20
7.1.1. Recolección, secado del material vegetal y preparación	20
7.1.2. Filtrado y evaporación del disolvente	20
7.1.3. Liofilización del extracto	21
7.2. Obtención y preparación de muestras biológicas	21
7.2.1. Recolección de muestras de sangre de sujetos humanos	21
7.2.2. Aislamiento de PBMC	21
7.2.3. Descongelación y preparación celular	22
7.2.4. Cultivo celular expuesto a extracto de orégano	22
7.3. Extracción de ARN y síntesis de cADN	22
7.3.1. Extracción de ARN	22

7.3.2. Síntesis de ADN complementario (cADN)	23
7.3.3. Diluciones de ADNc	23
7.4. Cuantificación y análisis de expresión génica	23
7.4.1. PCR en tiempo real	23
8. Resultados	25
8.1. Extracción etanólica de <i>Origanum vulgare</i>	25
8.2. Aislamiento de células PBMC	25
8.3. Concentración de ARN bajo diferentes condiciones y tiempos de incubación	26
8.3.1. Pureza del ARN: relación A260/A230 en diferentes condiciones y tiempos	27
8.3.2. Evaluación de la pureza del ARN: relación A260/A280 en diferentes condiciones y tiempos	27
8.4. Concentración de cADN en diferentes tiempos de incubación	28
8.4.1. Pureza del cADN: relación A260/A280 en diferentes tiempos de incubación	28
8.4.2. Pureza del cADN: relación A260/A230 en diferentes tiempos de incubación	29
8.5. Resultados de las expresiones de las citoquinas por medio de qPCR en tiempo real	30
9. Discusión	33
9.1. Extracción etanólica y liofilización del orégano	34
9.2. Aislamiento de PBMC	35
9.3. Extracción de ARN	36
9.4. Extracción de cADN	37
9.5. qPCR análisis	38
10. Conclusiones	40
11. Recomendaciones	41
12. Bibliografía	43
13. Anexos	53
13.1. Cuadros de resultados	53

Lista de figuras

1.	<i>Representación general de la inflamación ante una lesión de un tejido y su proceso natural de mecanismo de defensa.</i>	8
2.	<i>Representación gráfica de las funciones de las células durante la respuesta inflamatoria.</i>	10
3.	<i>Planta de orégano, <i>Origanum vulgare</i>. Conocido también como orégano de hoja pequeña.</i>	11
4.	<i>Estructura química de los principales componentes en orégano.</i>	12
5.	<i>Esquema de la extracción; antes de la extracción (izquierda) y después de la extracción (derecha).</i>	15
6.	<i>Diagrama de fases del agua en el que se muestra el fenómeno de la sublimación del hielo.</i>	16
7.	<i>Expresión relativa de IL-1 Beta con respecto a GAPDH y ratios en 24 y 48 horas.</i>	30
8.	<i>Expresión relativa de IL-6 con respecto a GAPDH y ratios en 24 y 48 horas.</i>	31
9.	<i>Expresión relativa de IL-8 con respecto a GAPDH y ratios en 24 y 48 horas.</i>	32

Lista de cuadros

1.	<i>Extracto de orégano obtenido.</i>	25
2.	<i>Concentración de células PBMC obtenidas en el aislamiento.</i>	26
3.	<i>Concentración de ARN en diferentes condiciones y tiempos de incubación</i>	26
4.	<i>Media de absorbancia A260/A280 en diferentes condiciones y tiempos de incubación</i>	27
5.	<i>Concentración de cADN en diferentes tiempos de incubación</i>	28
6.	<i>Media de A260/A280 en diferentes tiempos de incubación.</i>	29
7.	<i>Media de A260/A230 en diferentes condiciones y tiempos de incubación.</i>	29
8.	<i>Media de absorbancia A260/A230 en diferentes condiciones y tiempos de incubación</i>	53
9.	<i>Muestras de ARN con diferentes concentraciones y relaciones de absorbancia de los cultivos celulares de 24 horas</i>	54
10.	<i>Muestras de ARN con diferentes concentraciones y relaciones de absorbancia de los cultivos celulares de 48 horas</i>	55
11.	<i>Muestras con diferentes concentraciones de cADN y relaciones de absorbancia de los cultivos celulares de 24 horas</i>	56

La inflamación es un proceso biológico subyacente en numerosas enfermedades, desde desórdenes autoinmunes hasta condiciones cardiovasculares. La inflamación es un objetivo clave en el desarrollo de nuevas terapias. En los últimos años, el interés por los compuestos naturales como agentes antiinflamatorios ha crecido mundialmente, dada su menor toxicidad y costos potencialmente más bajos en comparación con los fármacos sintéticos. Dentro de estos compuestos, el orégano ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antioxidantes y antifúngicas. Sin embargo, la evidencia sobre sus efectos directos en la regulación de citoquinas proinflamatorias en células humanas es limitada, lo cual representa una brecha en el conocimiento actual sobre sus mecanismos de acción. Este estudio tiene como objetivo investigar el potencial antiinflamatorio del extracto de orégano en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas. Para ello, se llevó a cabo el proyecto para poder evaluar la expresión de citoquinas, como IL-6, IL-1 e IL-8, mediante la técnica de qPCR en tiempo real, bajo condiciones de inflamación inducida. Esta investigación podría dar las bases para el uso del orégano como alternativa terapéutica en enfermedades inflamatorias, aportando evidencia científica sólida que respalde su efecto y viabilidad en aplicaciones clínicas.

Inflammation is an underlying biological process in numerous diseases, ranging from autoimmune disorders to cardiovascular conditions. It represents a key target in the development of new therapies. In recent years, interest in natural compounds as anti-inflammatory agents has grown worldwide, given their lower toxicity and potentially reduced costs compared to synthetic drugs. Among these compounds, oregano has been widely studied for its antioxidant and antifungal properties. However, evidence regarding its direct effects on the regulation of pro-inflammatory cytokines in human cells is limited, representing a gap in the current understanding of its mechanisms of action. This study aims to investigate the anti-inflammatory potential of oregano extract in human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). To achieve this, the project evaluated the expression of cytokines, such as IL-6, IL-1, and IL-8, using real-time qPCR under conditions of induced inflammation. This research could lay the groundwork for the use of oregano as a therapeutic alternative in inflammatory diseases, providing robust scientific evidence to support its effects and feasibility for clinical applications.

La inflamación se conforma de un mecanismo fisiológico de defensa esencial para la reparación del organismo. Sin embargo, cuando no se posee un control o esta se manifiesta de manera crónica, puede llegar a desencadenar alteraciones celulares que contribuyen al desarrollo de diversas patologías. Este desequilibrio impulsa la búsqueda de posibles alternativas capaces de modular la respuesta antiinflamatoria.

Las posibles alternativas de origen natural han generado interés, en especial aquellas que se derivan de plantas con potencial bioactivo. Entre ellas, el orégano ha sido reconocido por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. No obstante, su efecto directo sobre las células mononucleares periféricas humanas vinculadas al proceso inflamatorio permanece poco explorado.

Se planteó la necesidad de evaluar el impacto del extracto de orégano sobre parámetros moleculares en la inflamación celular y la expresión de citoquinas proinflamatorias. En este contexto, se tuvo como finalidad analizar la influencia sobre la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias en cultivos celulares, con el objetivo de generar evidencia que sustente su posible uso como un agente modulador en procesos inflamatorios.

La inflamación es una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos, es una respuesta compleja del sistema inmune ante diversos patógenos o irritantes. Actúa como un mecanismo de defensa que involucra una serie de eventos celulares y moleculares [1]. Desde el punto de vista inmunológico, la inflamación se caracteriza por la activación de diversas células como los macrófagos, neutrófilos y linfocitos, los cuales liberan citoquinas proinflamatorias como la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6) [2].

El tratamiento de la inflamación suele seguir pautas médicas que varían según la causa del problema. Entre los fármacos más utilizados se encuentran los *antiinflamatorios no esteroideos* (AINE) y los *corticosteroides* [3]. Los AINE inhiben la ruta de la ciclooxigenasa (COX), reduciendo la síntesis de prostaglandinas, la inflamación y el dolor [4]. Los AINE más comunes y utilizados son el diclofenaco, *ibuprofeno*, *ketoprofeno*, *meloxicam*, *naproxeno*, entre otros [5].

La reducción de inflamación con extractos de plantas se puede rastrear a lo largo de la historia [6]. A diferencia de los AINE, se cree que las plantas medicinales inhiben rutas inflamatorias distintas, como se observó en un estudio que demostró la inhibición de la vía de *NF-κB* por la cúrcuma (*Curcuma longa*), siendo este un ejemplo notable [7]. Otras plantas medicinales con propiedades antiinflamatorias incluyen el jengibre (*Zingiber officinale*), que ha demostrado reducir la producción de citoquinas proinflamatorias, el sauce blanco (*Salix alba*), conocido por su contenido de *salicina* similar a los AINE, y la *boswellia* (*Boswellia serrata*), que inhibe la síntesis de *leucotrieno* [8], [9].

Además de los AINE, otros medicamentos como los *corticosteroides* y los inhibidores de *TNF-α* e *IL-6* también tienen funciones antiinflamatorias [9].

Desde la antigua civilización humana, las plantas medicinales se han utilizado para curar diversas dolencias. Las plantas medicinales y sus derivados constituyen la mayoría de los fármacos utilizados clínicamente para tratar enfermedades [6]. Los *compuestos naturales* se han utilizado durante mucho tiempo con fines antiinflamatorios, el conocimiento de la *farmacología* ha mejorado el conocimiento sobre los extractos naturales y sus usos clínicos

[10]. La *medicina herbaria* se ha utilizado para poder tratar diversas enfermedades y ha sido efectiva debido a sus múltiples mecanismos de acción.

Un gran número de estudios han informado sobre los efectos antiinflamatorios y antimicrobianos de hierbas, en su mayoría de origen chino [11]. Existen datos *etnofarmacológicos* de plantas medicinales, los cuales forman parte de un estudio *etnobotánico* a gran escala sobre plantas útiles de las tribus *Bakongo*, el cual respalda el uso tradicional de algunas de las especies contra la inflamación [12]. En el contexto del orégano se han realizado estudios en donde se centran en la resistencia bacteriana abordando los efectos del orégano en células bacterianas [11].

La inflamación es la causa principal de discapacidad y mortalidad en la mayoría de la población a nivel mundial [13]. Este tipo de respuesta inmune implica la activación y regulación de diversas células, el no regular esta respuesta puede llegar a provocar enfermedades crónicas, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas[14]. Las citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 e IL-8 son mediadores inflamatorios cuya sobreproducción puede ocasionar un daño tisular, sin embargo el cuerpo cuenta con mecanismos de inactivación de la inflamación con la liberación de citoquinas antiinflamatorias y linfocitos T reguladores que ayudan a disminuir esta respuesta, sin embargo no siempre es efectivo este mecanismo[2].

Los tratamientos convencionales sintéticos suelen en muchos casos provocar efectos secundarios no deseados. Estos medicamentos, aunque son eficaces para reducir la inflamación y aliviar el dolor en muchas personas, también están asociados con una serie de efectos secundarios no deseados que pueden comprometer la salud a mediano y largo plazo[15]. Los fármacos antiinflamatorios AINE suelen utilizarse habitualmente, sin embargo estos pueden causar perforaciones gastrointestinales, úlceras pépticas, enteropatía del intestino delgado, hipertensión arterial y aumento del riesgo de eventos cardiovasculares[15][5].

La búsqueda de alternativas para el tratamiento de la inflamación se ha vuelto crucial debido a los potenciales efectos adversos que pueden acompañar el uso de fármacos comerciales antiinflamatorios[16]. Los extractos de plantas medicinales han demostrado ser una posible alternativa debido a los múltiples mecanismos de acción y su menor riesgo a efectos secundarios. El orégano (*Origanum vulgare*) es una de estas plantas, conocida por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes[17]. El orégano se mencionó por primera vez en la biblia, fue una parte importante de los ritos de purificación y se usaba como medicina antiinflamatoria[18].

El orégano se caracteriza principalmente por la presencia dominante de carvacrol y/o timol, el cual es un agente antiinflamatorio[19]. Se demostró una marcada actividad analgésica del extracto de la planta como aceite esencial de orégano utilizando como método la respuesta de la cola en ratones albinos machos[19]. Se han estudiado los efectos de los

extractos de metanol en el extracto de orégano en la actividad antiagregante plaquetaria humana, que está relacionada con el conocido mecanismo de acción de los AINE mediante la inhibición de la vía metabólica de las prostaglandinas[20].

El acceso mundial a medicamentos antiinflamatorios asequibles representa un desafío significativo para una parte considerable de la población, especialmente para aquellos con recursos económicos limitados. Aproximadamente 2 mil millones de personas no tienen acceso a medicamentos básicos[20]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve el desarrollo de listas de medicamentos esenciales (LME) nacionales con el fin de mejorar la disponibilidad y el uso de los medicamentos considerados esenciales dentro de los sistemas de atención de salud. Sin embargo, a pesar de más de tres décadas de esfuerzos internacionales, los estudios muestran un patrón inconsistente en la disponibilidad de medicamentos esenciales[21].

La producción global del orégano es estimada en alrededor de 15,000 toneladas, siendo Turquía el principal productor seguido de México, por lo que es una planta que se encuentra con facilidad y es económicamente accesible. Es una planta aromática cultivada en varias regiones del mundo, cuyo valor comercial se debe a sus características como especia, condimento y propiedades medicinales[22].

El orégano es una hierba comúnmente disponible y económicamente accesible, por lo que ha sido objeto de interés debido a su posible potencial para mitigar procesos inflamatorios. La evidencia científica sobre su eficacia en cultivos celulares específicos, como las células mononucleares de la sangre periférica, es limitada. Por lo que explorar las posibles propiedades antiinflamatorias del orégano emerge como una oportunidad prometedora para ofrecer una posible alternativa y/o complemento de tratamiento accesible a la población.

4.1 Objetivo general

Evaluar el potencial antiinflamatorio de extractos del orégano en cultivos de células mononucleares de la sangre periférica como una posible alternativa de tratamiento para inflamación.

4.2 Objetivos específicos

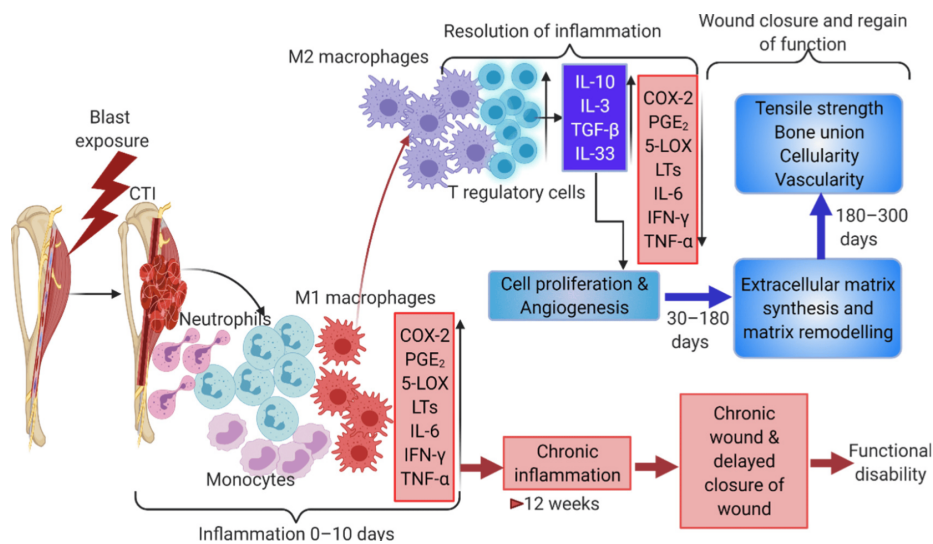
- Obtener el extracto de orégano por el método de extracción con solvente.
- Aislar células mononucleares de sangre periférica (PMBC) de donantes individuales.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto en cultivos celulares de PBMC.
- Analizar el efecto del orégano en la expresión génica de las citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6 y IL-8).

Este proyecto se centra en evaluar la expresión génica de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 e IL-8) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) expuestas a extractos de orégano, utilizando qPCR en tiempo real como principal método de análisis. Con esta metodología, buscamos determinar si el extracto de orégano tiene un efecto antiinflamatorio en términos de modulación de la expresión de estos mediadores inflamatorios, aunque sin profundizar en mecanismos moleculares específicos ni en respuestas celulares más amplias. Las células PBMC fueron expuestas a cuatro condiciones experimentales: (1) un grupo control sin ningún tratamiento, (2) un grupo tratado solo con extracto de orégano, (3) un grupo con inflamación inducida mediante fitohemaglutinina (PHA) y (4) un grupo expuesto tanto a PHA como al extracto de orégano simultáneamente. Este diseño experimental permite observar cómo el orégano influye en la expresión de citoquinas tanto en condiciones normales como en un entorno inflamatorio inducido, y explorar su potencial modulador de la inflamación. Es importante destacar que este estudio no pretende brindar una conclusión definitiva sobre la eficacia clínica del orégano como tratamiento antiinflamatorio en seres humanos. Las pruebas realizadas se limitaron a un ambiente de laboratorio en condiciones controladas. Este enfoque permite una aproximación inicial al potencial del orégano. No se incluyen evaluaciones de otros componentes bioactivos del orégano ni comparaciones con otros tratamientos antiinflamatorios. Tampoco se exploran efectos secundarios ni se realizan pruebas en modelos animales o humanos. Los métodos empleados se restringen a la observación de la expresión génica mediante qPCR en tiempo real, sin incluir análisis funcionales de las citoquinas producidas ni estudios que midan directamente la reducción de la inflamación en un contexto fisiológico. Este proyecto ofrece una visión preliminar y específica del posible efecto del extracto de orégano sobre la expresión génica de citoquinas en células humanas en condiciones controladas. Los resultados presentados en los siguientes capítulos deben ser interpretados en este contexto exploratorio y no como evidencia concluyente de una alternativa terapéutica. Estudios adicionales serán necesarios para investigar la aplicabilidad clínica del orégano, incluyendo modelos pre clínicos que evalúen su eficacia y seguridad en condiciones más controladas y en entornos biológicos más complejos.

6.1. Inflamación

La inflamación es una respuesta inmunitaria producida como un mecanismo de defensa del cuerpo [23]. Es un proceso en el cual el sistema inmunológico reconoce algún tipo de daño o infección producido en una célula[24]. La inflamación es una respuesta en la cual participan células inflamatorias las cuales se encargan de identificar los tejidos afectados para comenzar con el proceso de reparación en las partes dañadas de la célula [25]. En la Figura 1, se puede observar cómo se representa el proceso inflamatorio en una lesión de un tejido muscular.

Figura 1: Representación general de la inflamación ante una lesión de un tejido y su proceso natural de mecanismo de defensa.



Fuente: Extraído de [26]

6.1.1. Tipos de inflamación

La inflamación puede ser crónica o aguda. La crónica también se conoce como inflamación lenta y prolongada que dura periodos prolongados, de meses a años[23]. La crónica está asociada con una variedad de enfermedades crónicas, como la artritis, la enfermedad de Crohn y la obesidad. En la inflamación crónica las células inflamatorias, como los macrófagos, se activan y liberan mediadores inflamatorios que provocan un daño tisular progresivo. Este daño contribuye al desarrollo y progreso de las enfermedades crónicas[1]. La inflamación aguda es una respuesta rápida del cuerpo [27]. Se produce a causa de un daño tisular debido a traumatismos, invasiones microbianas o compuestos nocivos[23]. Es un tipo de inflamación que comienza rápidamente pero que se puede volver grave en poco tiempo. Los síntomas en este tipo de inflamación pueden durar unos días, un ejemplo puede ser una celulitis o neumonía aguda [23]. Un tipo de inflamación que se genera entre la inflamación aguda y crónica es llamada subaguda, la cual se presenta en un periodo de tiempo de 2 a 6 semanas.

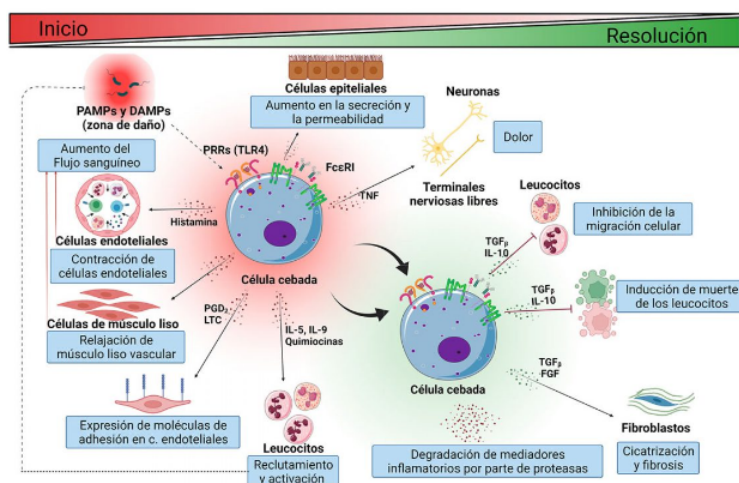
6.1.2. Mecanismos fisiológicos de la inflamación

La característica fisiológica de la inflamación es que comienza con una inflamación de tipo aguda continua y a medida que la inflamación persiste se vuelve crónica. Durante la fase inicial se produce la vasodilatación en los vasos sanguíneos cercanos al sitio afectado[28]. “Este proceso de inflamación se caracteriza por la expansión de los vasos sanguíneos, el aumento del flujo sanguíneo, la permeabilidad capilar y la migración de neutrófilos al tejido infectado a través de la pared capilar”[23]. En el área afectada es común ver la presencia de enrojecimiento, hinchazón y dolor [27].

6.1.3. Mecanismos moleculares y celulares de la inflamación

Durante la inflamación a nivel molecular este proceso está mediado por una serie de mediadores, algunos de los mediadores son las citocinas proinflamatorias, como lo es el factor de necrosis tumoral alfa ((TNF- α) y la interleucina-1 (IL-1)), al igual que los mediadores lipídicos como lo son las prostaglandinas y leucotrienos [29]. Los mediadores inflamatorios son los encargados de coordinar la respuesta inflamatoria modulando la función vascular, la migración, activación de los leucocitos y producción de otras moléculas inflamatorias[1]. La inflamación también activa los factores de transcripción, como lo es el factor NF- κ B, el cual se encarga de regular la expresión génica de los genes inflamatorios y contribuye a la persistencia del proceso de inflamación [30]. A nivel celular la composición de los glóbulos blancos cambia pronto y los macrófagos y linfocitos comienzan a reemplazar a los neutrófilos de vida corta[23]. Los linfocitos y demás células endoteliales se activan y migran hacia donde la lesión se ha producido, cada célula cumple un papel importante durante la inflamación[31]. Como se observa en la Figura 2, los macrófagos detectan los agentes patógenos y los neutrófilos eliminan a los microorganismos invasores. Las células endoteliales se encargan de regular la permeabilidad vascular en el sitio de la afección, esto permite facilitar la respuesta inflamatoria y la reparación de los tejidos dañados[32].

Figura 2: Representación gráfica de las funciones de las células durante la respuesta inflamatoria.



Fuente: Obtenido de [33]

6.1.4. Citoquinas inflamatorias IL-1, IL-6 e IL-8

Las citoquinas inflamatorias, como la interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-18 (IL-18), son secretadas como respuesta a estímulos inflamatorios y actúan como mediadores clave en la regulación y propagación de la respuesta inflamatoria [34]. La IL-6, producida principalmente por linfocitos, macrófagos y fibroblastos, tiene la capacidad de inducir la producción de proteínas involucradas en la regulación de la respuesta inmune. Esta citoquina desempeña un papel importante tanto en la inflamación aguda como en la crónica [34]. En presencia de antígenos, ya sean extraños o propios, las células inmunitarias del tejido, como los macrófagos y las células dendríticas, secretan citoquinas como la IL-1 y el TNF- α , que contribuyen a la activación de la respuesta inflamatoria [23]. La IL-1 tiene un rol central en la activación de células inmunitarias, mientras que la IL-8 participa tanto en el proceso inflamatorio como en la respuesta inmune adaptativa. Esta última es especialmente relevante en la inmunidad innata, proporcionando una defensa inmediata frente a patógenos [35]. La interacción entre estas citoquinas es fundamental, y su desregulación podría contribuir al desarrollo de enfermedades inflamatorias, evidenciando su importancia en la homeostasis del sistema inmunológico [35].

6.2. Orégano

El orégano (*Origanum vulgare*) es una planta perenne de la familia *Lamiaceae*, ampliamente conocida por su uso culinario y medicinal. Existen más de 50 especies comercializadas bajo el nombre común de orégano, predominando el orégano europeo (*O. vulgare*) y el orégano mexicano (*Lippia graveolens*). Taxonómicamente, el orégano tiene representantes en cuatro familias: *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae* y *Verbenaceae*, siendo las dos últimas las más reconocidas, con registros de 24 a 61 especies distribuidas en 16 a 27 géneros [36]. Es una planta originaria de Europa y Asia. Es una planta que se cultiva en diversas regiones del mundo [22]. Esta planta puede alcanzar una altura de entre 20 y 80 cm, y presenta tallos

erguidos y ramificados. Sus hojas son opuestas, ovaladas, color verde oscuro y pueden medir entre 2 y 4 cm de largo. Las flores del orégano son pequeñas y suelen ser de color rosado, morado o blanco, estas se agrupan en inflorescencias terminales tipo espiga. El orégano crece en climas templados y suelos bien drenados[36].

Figura 3: *Planta de orégano, Origanum vulgare. Conocido también como orégano de hoja pequeña.*

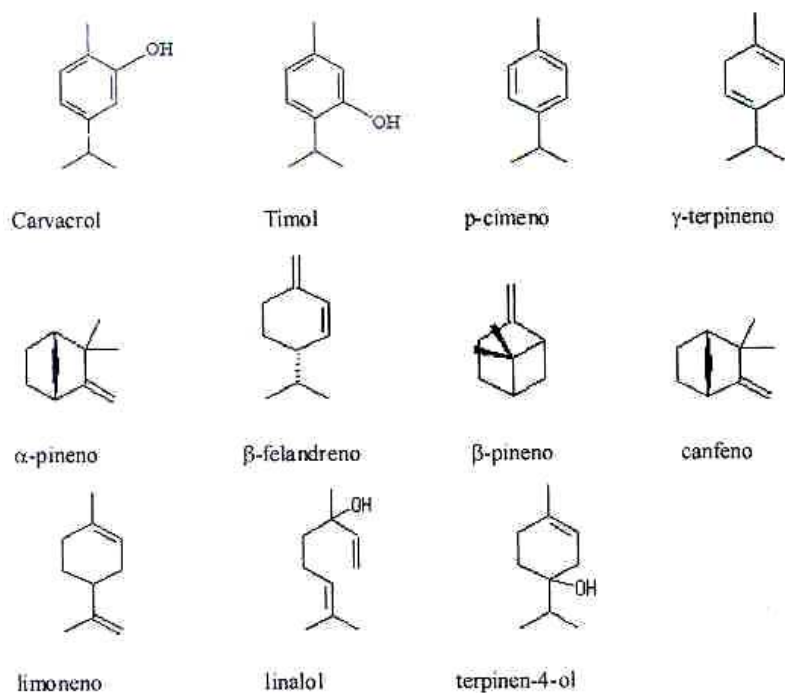


Fuente: Obtenido de [37]

6.2.1. Compuestos del orégano

La composición química del orégano es una amplia combinación de compuestos bioactivos, los cuales son responsables de sus propiedades aromáticas y medicinales. Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano[38]. El orégano tiene compuestos polifenólicos (PC) los cuales son la segunda categoría de compuestos más comunes en la naturaleza. Incluye una amplia gama de compuestos con al menos una unidad aromática o fenol y un grupo hidroxilo, correspondiendo una clasificación general a flavonoides y no-flavonoides[39]. Los flavonoides son los PC con mayor bioactividad y se cree que son potenciadores de la salud y suplementos preventivos con alto valor nutricional y terapéutico, los cuales sugieren una actividad antibacteriana y antiinflamatoria[39].

Figura 4: Estructura química de los principales componentes en orégano.



Fuente: Obtenido de [38]

6.2.3. Usos tradicionales y aplicaciones

El orégano se cultiva por su demanda en el sector farmacéutico, en el de los licores y cosméticos, además de la industria alimentaria[40]. Su mayor presentación de comercialización industrial y farmacéutica es su aceite esencial, el cual se emplea como fragancia en jabones, perfumes y cosméticos. También la herboristería lo consume ampliamente, por sus propiedades tónicas, digestivas, estomacales y antiasmáticas además de las propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, antimicrobianas y antioxidantes[36].

6.2.4. Propiedades medicinales

6.2.4.1. Propiedades antifúngicas

Existen múltiples estudios que respaldan la actividad antifúngica de los extractos de diferentes especies de orégano. Estas propiedades lo convierten en una opción prometedora en aplicaciones antimicóticas, especialmente por su capacidad para combatir infecciones causadas por hongos[41].

6.2.4.2. Propiedades antibacteriales

El orégano ha demostrado eficacia frente a diversas bacterias. Los aceites esenciales del género *Origanum* presentan actividad antibacteriana contra bacterias gramnegativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y otras especies [38]. En un estudio, el extracto etanólico de una línea clonal de orégano inhibió la acción de *Listeria monocytogenes* en medios de cultivo y productos cárnicos [42]. Además, en distintas culturas, se utiliza tradicionalmente para tratar enfermedades respiratorias como gripe, tos, asma y bronquitis [40]. Los monoterpenos oxigenados presentes en el orégano han demostrado actividad antibacteriana al inhibir el crecimiento de microorganismos [43]. Asimismo, posee propiedades antiinflamatorias, al reducir la producción de mediadores como las prostaglandinas. Este efecto se atribuye a su capacidad para inhibir enzimas clave en la respuesta inflamatoria, lo que respalda su uso como suplemento alimenticio para mejorar la salud y mitigar procesos inflamatorios [43].

6.2.3. Efectos antiinflamatorios de compuestos naturales

Los compuestos naturales desempeñan un papel crucial en la modulación de procesos inflamatorios. En particular, muchos alimentos contienen fitoquímicos como carotenoides, flavonoides y polifenoles, que están presentes en frutas y hortalizas como fresas, arándanos, manzanas, cítricos, granada, coles, coliflor, espinacas y acelgas, entre otros [44]. Estos compuestos poseen propiedades antiinflamatorias gracias a su capacidad antioxidante y su habilidad para modular las vías de señalización celular implicadas en la inflamación. En el caso de especias y hierbas, el ajo, el romero y el azafrán destacan por contener sustancias como bromelina, crocina y compuestos fenólicos, los cuales ofrecen potentes características antiinflamatorias [45]. Entre los compuestos más comunes con actividad antiinflamatoria se encuentran la curcumina (derivada de la cúrcuma), el gingerol (proveniente del jengibre), el parthenolide, las cucurbitacinas, el 8-cineol, el lyprinol y diversos flavonoides [46]. Estos compuestos han demostrado mecanismos de acción antiinflamatorios específicos, como la inhibición de enzimas clave en la inflamación, incluida NF- κ B [46]

6.2.3. Efectos antiinflamatorios de compuestos naturales

Los compuestos naturales desempeñan un papel crucial en la modulación de procesos inflamatorios. En particular, muchos alimentos contienen fitoquímicos como carotenoides, flavonoides y polifenoles, que están presentes en frutas y hortalizas como fresas, arándanos, manzanas, cítricos, granada, coles, coliflor, espinacas y acelgas, entre otros [44]. Estos compuestos poseen propiedades antiinflamatorias gracias a su capacidad antioxidante y su habilidad para modular las vías de señalización celular implicadas en la inflamación. En el caso de especias y hierbas, el ajo, el romero y el azafrán destacan por contener sustancias como bromelina, crocina y compuestos fenólicos, los cuales ofrecen potentes características antiinflamatorias [45]. Entre los compuestos más comunes con actividad antiinflamatoria se encuentran la curcumina (derivada de la cúrcuma), el gingerol (proveniente del jengibre), el parthenolide, las cucurbitacinas, el 8-cineol, el lyprinol y diversos flavonoides [46]. Estos compuestos han demostrado mecanismos de acción antiinflamatorios específicos, como la

inhibición de enzimas clave en la inflamación, incluida NF- κ B [46].

6.2.3.1. Compuestos naturales en la medicina

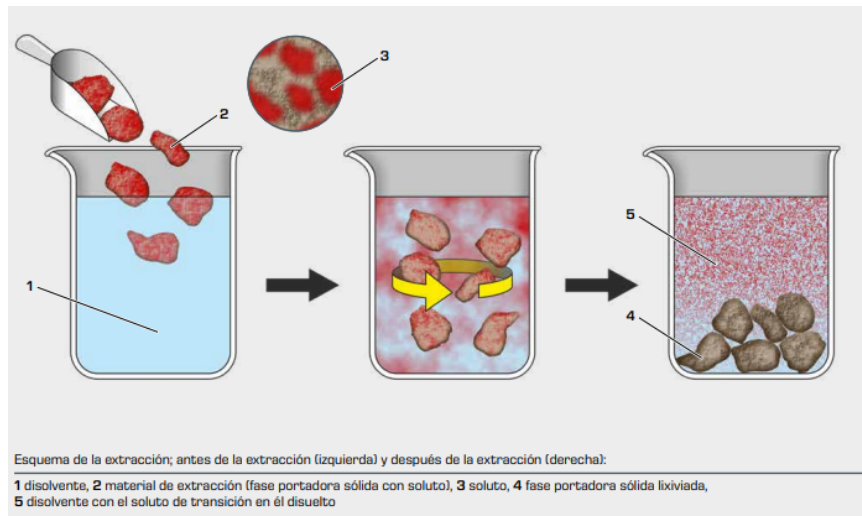
En la medicina convencional actualmente se utilizan diversos compuestos naturales como fármacos. Un ejemplo de esto es la aspirina, la aspirina es derivada de plantas con silicatos[45]. Otro compuesto natural utilizado es el 8-cineol como tratamiento de enfermedades respiratorias como el asma y bronquitis. La goma de resina de *Boswellia* (incieso) se utiliza en formulaciones farmacéuticas también para aliviar problemas de artritis[46]. En la medicina comercial los compuestos naturales se han integrado junto con los tratamientos convencionales. La utilización de plantas medicinales se ha implementado significativamente para poder combatir enfermedades y lograr mejorar la calidad de vida. El uso de este tipo de medicina es global y en especial se centra en las comunidades rurales donde no tienen acceso a la medicina moderna[46].

6.3. Método de extracción del orégano

6.3.1. Extracción con solvente

La extracción con solvente consiste en realizar una separación de componentes por medio de la extracción sólido-líquido, en donde se extrae un soluto de un sólido[47]. En este método de extracción el solvente fluye a través del sólido disolviendo los componentes y permitiendo la separación de los componentes[47]. Con la extracción sólido-líquido se puede extraer componentes solubles de sólidos con ayuda de un solvente como el etanol o metanol. Un ejemplo de la vida cotidiana es la preparación de la infusión de café. En este proceso, la sustancia aromática del café (soluto) se extrae con agua (disolvente) del café molido (material de extracción, formado por la fase portadora sólida y el soluto)[48].

Figura 5: Esquema de la extracción; antes de la extracción (izquierda) y después de la extracción (derecha).



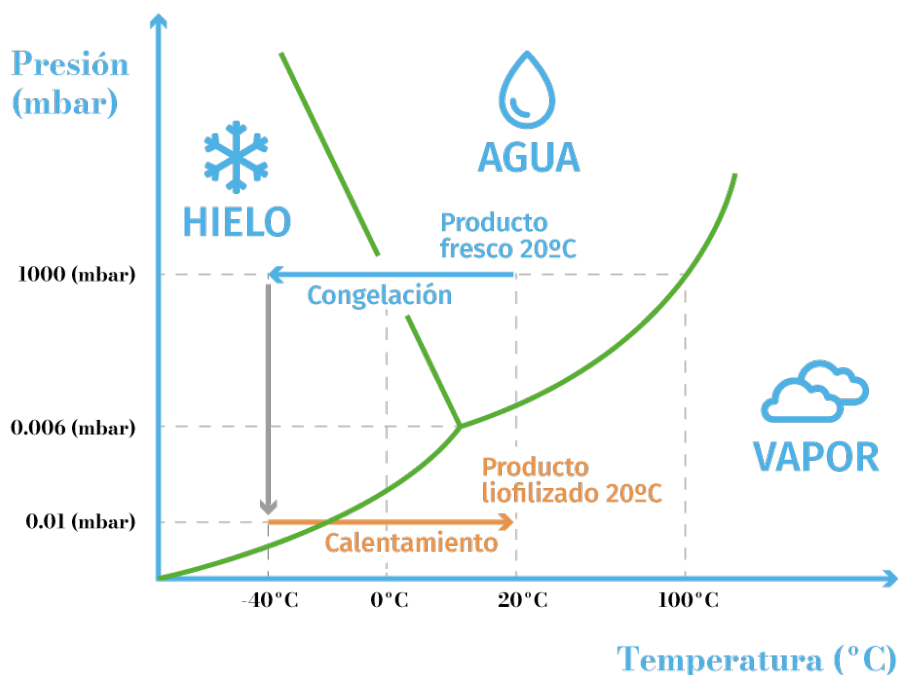
Fuente: Obtenido de [49]

Para la extracción de plantas se puede utilizar etanol o metanol, estos disolventes son capaces de tener un balance entre su capacidad de disolución y su toxicidad. El material vegetal debe de ser macerado previamente para facilitar su extracción. Al finalizar con el proceso de extracción y luego de dejarlo reposar entre 48 a 72 horas , el disolvente se evapora, se filtra el extracto para finalizar para obtener un producto final de calidad[50].

6.3.2. Liofilización

La liofilización es un proceso de deshidratación, se caracteriza por conservar la forma, volumen, composición y cualidades internas de la muestra, lo que permite conservarla. Este proceso consta de congelar una muestra y luego reducir su presión para que el agua congelada se sublima directamente de la fase sólida a gaseosa sin pasar por el estado líquido[51]. Este proceso consta de varias etapas, en la primera etapa se inicia con el congelamiento de la muestra a una temperatura entre los $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ó $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. En la segunda etapa se reduce la presión hasta crear un vacío cercano a los 0.001mbar y se finaliza con el calentamiento de la muestra que produce la sublimación del agua y la recuperación del material liofilizado[52].

Figura 6: Diagrama de fases del agua en el que se muestra el fenómeno de la sublimación del hielo.



Fuente: Obtenido de [52]

6.4. Expresión génica

La expresión génica es el proceso por el cual la información codificada por un gen se utiliza para producir moléculas de ARN que codifican proteínas o moléculas de ARN no codificantes con funciones específicas [53]. Este proceso es fundamental, ya que permite la conversión de la información genética contenida en el ADN en proteínas funcionales. La célula utiliza la expresión génica para producir las moléculas necesarias mediante la lectura del código genético en el ADN, y este proceso varía según las necesidades del organismo. Los genes pueden activarse o desactivarse en diferentes momentos, y su expresión puede ser influenciada por factores químicos o ambientales [54]. La expresión génica está regulada en diferentes niveles, incluyendo la transcripción, la traducción y la modificación postraduccional. A nivel transcripcional, los factores de transcripción desempeñan un papel central al unirse a secuencias específicas del ADN llamadas elementos promotores o potenciadores. Un ejemplo destacado es el factor de transcripción $\text{NF-}\kappa\text{B}$, que se activa en respuesta a estímulos inflamatorios, como la presencia de citoquinas proinflamatorias ($\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$). Este factor regula la transcripción de genes clave involucrados en procesos inflamatorios, como IL-6 y COX-2 [55]. Otro factor relevante es STAT3 , que actúa en la vía JAK-STAT en respuesta a señales de citoquinas como IL-6 , promoviendo la expresión de genes relacionados con la inflamación y la proliferación celular [56]. Además, los receptores extracelulares son esenciales para la regulación de la expresión génica. Los receptores *Toll-like* (TLR) detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y activan cascadas intracelulares

que culminan en la activación de factores de transcripción como NF- κ B. Por otro lado, los receptores de citoquinas, como el receptor de IL-6, median respuestas inflamatorias a través de vías de señalización como JAK-STAT y MAPK, regulando tanto genes proinflamatorios como antiinflamatorios [57].

6.4.1. Estudios en los que se evalúa la expresión génica

Existen diversas técnicas que se utilizan actualmente para evaluar la expresión génica, permitiendo detectar y cuantificar la presencia de ARN mensajero (ARNm) específico. Entre las técnicas más comunes se encuentran el Northern blot, la protección de RNasa, la RT-PCR y la hibridación in situ. Estas herramientas son ampliamente empleadas para estudios diagnósticos y de investigación, ya que permiten detectar transcritos incluso en niveles bajos. Esto es particularmente valioso en el análisis de enfermedades infecciosas, genéticas, metabólicas, neoplásicas e inmunes [58]. Además, métodos como la RT-PCR han demostrado ser útiles para cuantificar cambios relativos en la expresión génica, lo que ha fortalecido su aplicación en estudios biomédicos y diagnósticos clínicos. En la actualidad, la investigación sobre el efecto de compuestos naturales en la regulación de la expresión génica ha crecido significativamente. Por ejemplo, se ha demostrado que el orégano (*Origanum vulgare*) posee propiedades antiinflamatorias atribuidas a sus compuestos bioactivos, como el carvacrol y el timol. En un estudio in vitro, el tratamiento con estos compuestos en macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) mostró una reducción significativa en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 y TNF- α . Este hallazgo destaca el potencial de los compuestos del orégano para modular genes clave en procesos inflamatorios [59]. Otros compuestos naturales también han sido objeto de estudio debido a su capacidad para influir en la expresión génica. La curcumina, un componente bioactivo de la cúrcuma (*Curcuma longa*), ha demostrado inhibir la activación de NF- κ , lo que reduce la transcripción de genes proinflamatorios. Estudios preclínicos han evidenciado que este compuesto disminuye significativamente la expresión de IL-1 y TNF- α en modelos de inflamación inducida [7]. De manera similar, el resveratrol, un polifenol presente en uvas, ha sido identificado como un modulador epigenético al activar SIRT1. Esto resulta en la supresión de NF- κ y en el aumento de la expresión de genes antiinflamatorios, como IL-10, destacando su papel protector en procesos inflamatorios y enfermedades asociadas [60].

6.5. ARN y su rol en la expresión génica

El ARN (ácido ribonucleico) es una biomolécula esencial que desempeña un papel crucial en la transferencia de información genética, la síntesis de proteínas y la regulación de múltiples procesos celulares. A diferencia del ADN, el ARN es una molécula de cadena sencilla compuesta por ribosa como azúcar y bases nitrogenadas que incluyen uracilo en lugar de timina. Existen diferentes tipos de ARN, como el ARN mensajero (mRNA), ARN de transferencia (tRNA) y ARN ribosomal (rRNA), así como ARN no codificantes, que cumplen funciones regulatorias fundamentales [61]. En el contexto de la regulación de la expresión génica, el ARN es el intermediario esencial entre el ADN y las proteínas. Durante la transcripción, el ARN mensajero (mRNA) se sintetiza como una copia complementaria del ADN, llevando la información genética necesaria para la síntesis de proteínas en los ribosomas. En procesos inflamatorios, se ha observado un aumento en los niveles de mRNA de genes que

codifican para citoquinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- α , lo que refleja la activación de vías moleculares que median la respuesta inflamatoria frente a estímulos como infecciones o lesiones tisulares [62]. Además del mRNA, los ARN no codificantes, como los microARN (miARN), desempeñan un papel clave en la regulación postranscripcional de la expresión génica. Los miARN son pequeñas moléculas de ARN de aproximadamente 20-25 nucleótidos que regulan la expresión génica al unirse a secuencias complementarias en el mRNA, lo que puede conducir a su degradación o a la inhibición de su traducción. Este mecanismo permite un control fino de los niveles de proteínas expresadas por un gen [63]. En el contexto de la inflamación, los miARN tienen funciones destacadas en la modulación de la respuesta inmune. Por ejemplo, el miR-146a actúa como un regulador negativo al inhibir la vía de señalización de NF- κ B, un factor de transcripción clave en la expresión de genes proinflamatorios. Este miARN también regula otras moléculas implicadas en la inflamación, como TRAF6 (factor asociado al receptor de TNF) e IRAK1 (quinasa asociada al receptor de IL-1), reduciendo así la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria [64]. Otros ARN no codificantes, como los ARN largos no codificantes (lncRNA), también están implicados en la regulación de procesos inflamatorios. Estos lncRNA pueden interactuar directamente con factores de transcripción, actuar como plataformas de ensamblaje molecular o funcionar como esponjas moleculares para secuestrar miARN, modulando su función. Por ejemplo, el lncRNA MALAT1 ha mostrado regular la expresión de genes relacionados con la inflamación en enfermedades crónicas [65]. En conjunto, el ARN no solo actúa como intermediario en la síntesis de proteínas, sino que también desempeña roles regulatorios fundamentales en la homeostasis celular y en la respuesta inflamatoria. El estudio del ARN ha permitido avances significativos en la comprensión de patologías inflamatorias, lo que abre la puerta al desarrollo de terapias innovadoras basadas en ARN, como los ARN interferentes pequeños (siRNA) o los antagomiRs, diseñados para modular la actividad de miARN específicos [66].

6.6. RT-PCR: técnica y aplicaciones

La RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) es una técnica ampliamente utilizada para estudiar la expresión génica. Esta metodología convierte ARN en ADN complementario (cDNA) mediante la acción de la transcriptasa inversa, seguida de la amplificación del ADN por PCR. Su alta sensibilidad permite detectar niveles bajos de mRNA, lo que la hace ideal para analizar la regulación de genes relacionados con la inflamación [67]. En estudios de inflamación, esta técnica se utiliza frecuentemente para medir los niveles de expresión de genes como IL-6, TNF- α e IL-1 β en células tratadas con extractos naturales.

6.7. PCR cuantitativa (qPCR) y sus variantes

La PCR cuantitativa (qPCR) permite medir la cantidad de ADN amplificado en tiempo real, proporcionando información precisa sobre la expresión génica. Esta técnica puede realizarse mediante dos métodos principales. El primero utiliza SYBR Green, un colorante que se une al ADN de doble cadena y emite fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN amplificado. Aunque económica, esta técnica puede ser inespecífica debido a la unión del colorante a cualquier ADN de doble hebra. El segundo método emplea sondas TaqMan, que son específicas para una secuencia diana, ofreciendo mayor precisión y especificidad [67]. Además, la PCR digital (dPCR) es una variante más reciente que permite cuantificación

absoluta dividiendo la muestra en miles de compartimentos individuales, lo que mejora la sensibilidad en la detección de genes expresados a niveles muy bajos [68].

7.1. Obtención del extracto de orégano

7.1.1. Recolección, secado del material vegetal y preparación

Se recolectaron varios tallos de orégano fresco (*Origanum Vulgare*) en el vivero El Pilar ubicado en la zona 10 de la ciudad de Guatemala. Las muestras se secaron al aire libre en un área sombreada y ventilada durante 96 horas, evitando exposición a la luz solar directa. Una vez secas, las hojas se separaron de los tallos y se pesaron utilizando una balanza, obteniendo, 50 g de peso seco de hojas deshidratadas. Para la obtención del extracto de orégano, se utilizó etanol absoluto (Merck, Alemania), como disolvente y se utilizó una relación de 10:1 (10 g de orégano por 100 ml de etanol). Esta proporción fue elegida para maximizar la eficiencia de la extracción, asegurando una inmersión completa del material vegetal [69]. Para la extracción con etanol se añadieron gradualmente 500 ml de etanol a las hojas de orégano secas mientras se iba macerando con un mortero y pistilo. El proceso se optimizó agregando más etanol debido a la cantidad de masa en hojas, se agregaron gradualmente otros 500 ml. Seguidamente, se transfirió la mezcla a un frasco de vidrio sellado, el cual fue cubierto con aluminio para evitar la exposición a la luz. Finalmente, la mezcla se dejó macerar a temperatura ambiente durante 72 horas.

7.1.2. Filtrado y evaporación del disolvente

Después de la maceración, la mezcla se filtró 4 veces utilizando filtros de café y tela fina hasta obtener un filtrado claro a manera de eliminar cualquier residuo sólido. Este proceso se repitió hasta asegurar la claridad del filtrado. Posteriormente, se procedió a evaporar el etanol contenido en el extracto. Para esto se transfirió el extracto a un vaso precipitado de vidrio borosilicato y se calentó gradualmente bajo una campana de extracción utilizando una estufa. La temperatura se monitoreó constantemente hasta alcanzar los 78 °C, el cual es el punto de ebullición del etanol. Se mantuvo esta temperatura por dos minutos para asegurar

la completa evaporación del disolvente, este proceso tomó aproximadamente 20 minutos. El extracto concentrado resultante se recolectó con una espátula pequeña de acero inoxidable y se almacenó en tubos de ensayo de 5 ml con tapa de rosca a -40 °C.

7.1.3. Liofilización del extracto

El extracto de orégano se sometió a un proceso de liofilización utilizando un liofilizador (*Pro Freeze Dryer, Harvest Right, Utah, USA*). Para esto, la muestra se transfirió a cajas petri de vidrio estériles y se liofilizó a una presión de 0.1 a 0.2 bar durante 24 horas. Después de la liofilización, la muestra se molió hasta obtener consistencia de polvo y se transfirió a un tubo cónico estéril previamente pesado con una balanza analítica. La balanza analítica se taró luego de ya tener el dato del peso del tubo cónico para poder pesar la muestra dentro del tubo. La muestra final se almacenó a -40 °C hasta su posterior análisis.

7.2. Obtención y preparación de muestras biológicas

7.2.1. Recolección de muestras de sangre de sujetos humanos

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 6 individuos estudiantes adultos de la Universidad Del Valle de Guatemala (UVG), sanos, a quienes se les extrajeron 10 cc de sangre mediante flebotomía realizada por la doctora de la UVG. El estudio se llevó a cabo respetando las normas éticas, con la aprobación del Comité de Ética en Investigación (CEI) del Centro de Estudios en Salud (CES) bajo el número de protocolo 315-09-2024. El protocolo fue establecido para el proyecto titulado “*Evaluación del extracto de orégano en células mononucleares de la sangre periférica como una posible alternativa de tratamiento para la inflamación.*”

7.2.2. Aislamiento de PBMC

Se transfirió 4 ml de sangre a tubos cónicos estériles de 15 ml bajo condiciones asépticas y se añadió 5 ml de Ficoll-Paque (Cytiva) cuidadosamente a cada tubo cónico utilizando una pipeta serológica estéril. Seguidamente, se superpuso un volumen adicional de 6 ml de Ficoll-Paque sobre el primer volumen, asegurando una perturbación mínima al retirar lentamente la pipeta del tubo. Este proceso se repitió para todas las muestras para facilitar la formación óptima del gradiente. Los tubos preparados fueron centrifugados a 2000 RPM durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de la centrifugación, se recolectó la capa de PBMC, caracterizada por una nube blanca de células. Para asegurar un adecuado lavado de células, el sobrenadante que contenía las células blancas fue transferido a tubos cónicos nuevos, sin tener contacto de la capa de glóbulos rojos en el fondo de los tubos originales. Seguidamente, se añadió PBS (solución salina tamponada con fosfato) a cada tubo, ajustando el volumen total a 15 ml. Se realizó una segunda centrifugación a 1,000 RPM durante 8 minutos para sedimentar las PBMCs. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue completamente descartado, dejando en el fondo el residual el cual fue resuspendido suavemente en 1 ml de medio FD (medio criopreservante) para preservar las células. Finalmente, las PBMC

resuspendidas en 1 ml de medio FD y se transfirieron a crioviales y se almacenaron a -80 °C para su preservación hasta su análisis posterior.

7.2.3. Descongelación y preparación celular

Las células fueron descongeladas siguiendo un protocolo estandarizado para garantizar su viabilidad. Inicialmente, los crioviales con las células fueron retirados del congelador -80 °C y colocados inmediatamente en un baño maría a 37 °C. Los crioviales se agitaron suavemente en el agua para acelerar el descongelamiento, monitoreando continuamente hasta que quedara una pequeña bola de hielo en su interior, momento en el cual se consideró que estaban listas para el siguiente paso. Una vez descongeladas, las células fueron transferidas a un tubo de centrifuga de 15 mL que contenía 10 mL de medio de cultivo precalentado para diluir el crioprotector (DMSO). Esta mezcla fue centrifugada a 1500 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente para remover el exceso de crioprotector. El sobrenadante fue descartado cuidadosamente, y el pellet celular resultante fue resuspendido en 5 mL de medio de cultivo fresco. Para el conteo celular, se tomó una alícuota de la suspensión celular y se mezcló con una solución de azul de tripano en una proporción 1:1 para realizar el conteo mediante exclusión celular. Utilizando el microscopio, se contaron las células viables, lo que permitió calcular el número total de células disponibles.

7.2.4. Cultivo celular expuesto a extracto de orégano

Se sembraron 350,000 células totales por condición experimental. Las condiciones son las siguientes: control: medio de cultivo sin aditivos. Condición con orégano: medio suplementado con extracto de orégano. Condición inflamatoria: medio suplementado con fitohemaglutinina (PHA). Condición mixta: medio suplementado con extracto de orégano y PHA. Previo a la siembra, se prepararon los medios de cultivo correspondientes a las cuatro condiciones experimentales: A cada pocillo se le añadieron 1 mL del medio correspondiente según su condición experimental. Una vez preparadas las células y los medios se agregaron cuidadosamente las mezclas de las condiciones a los pocillos respectivos. Cada pocillo fue rotulado para su identificación, y las dos placas se identificaron como "24 horas" y "48 horas" según el tiempo de incubación planificada. Finalmente, las placas fueron incubadas en condiciones estándar de cultivo celular (37 °C, 5% CO₂) para los tiempos establecidos, garantizando que cada condición fuera adecuadamente manejada y diferenciada durante todo el proceso experimental.

7.3. Extracción de ARN y síntesis de cADN

7.3.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN fue realizada utilizando el kit *GenElute*[™] E Viral ARN/DNA (Sigma-Aldrich), siguiendo un protocolo adaptado para células PBMC sometidas a cuatro condiciones experimentales distintas. Inicialmente, se preparó la columna *GenElute* E-spin mediante un breve vortex y una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, seguida

de un centrifugado a velocidad máxima durante 1 minuto para eliminar el *buffer* residual. Posteriormente, se procedió con la lisis de las muestras, añadiendo 50 μL de suspensión celular de PBMC correspondientes a cada una de las cuatro condiciones experimentales a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, seguido de la adición de 50 μL de *SmartLyse Viral Buffer*. La mezcla resultante (90 μL) de cada condición fue transferida cuidadosamente a columnas individuales previamente preparadas, asegurando una aplicación uniforme. Finalmente, se centrifugó cada columna durante 1 minuto a velocidad máxima para recolectar el ARN en tubos de recolección. Las concentraciones de ARN de las muestras fueron medidas con un *Nanodrop* y almacenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para su posterior análisis.

7.3.2. Síntesis de ADN complementario (cADN)

Para la retrotranscripción, se utilizó un protocolo optimizado (*GenElute™ E Viral RNA/DNA Swab Kit*) de *Sigma-Aldrich* para obtener cADN a partir del ARN extraído. Se prepararon tubos de PCR con una mezcla inicial que incluía 5 μL de ARN (1 μg), 11 μL de agua, 1 μL de hexámeros, 1 μL de oligo dT, 1 μL de nucleótidos, 1 μL de MgCl_2 y 0.5 μL de *ARNSin*, alcanzando un volumen total de 20 μL . Estas cantidades se utilizaron por muestra, por lo que se multiplicaron por el número total de muestras (48). Los tubos fueron incubados en un termociclador a $70\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos y posteriormente enfriados en hielo. A esta mezcla se añadieron 11 μL de un *master mix* que contenía 10 μL de *buffer* de reacción 5X y 1 μL de transcriptasa reversa. La retrotranscripción se llevó a cabo mediante un protocolo térmico que incluyó un anillamiento inicial a $25\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos, seguido de una extensión a $42\text{ }^\circ\text{C}$ durante 90 minutos y una inactivación final a $70\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. El cADN obtenido fue analizado con un *Nanodrop*.

7.3.3. Diluciones de ADNc

Posteriormente, se procedió a la preparación de cADN diluido utilizando la fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$, con el objetivo de obtener una concentración final de al menos 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Este procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, empleando crioviales previamente etiquetados. Con micropipetas calibradas, se añadieron las cantidades necesarias de cADN y agua ultrapura según los cálculos realizados, asegurando precisión en la preparación. Las muestras diluidas fueron debidamente selladas y almacenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para su posterior análisis.

7.4. Cuantificación y análisis de expresión génica

7.4.1. PCR en tiempo real

Finalmente, se realizó una PCR en tiempo real utilizando el reactivo *LuminoCt SYBR Green qPCR ReadyMix* (*Sigma-Aldrich*) en la máquina *MicPCR* de *Bio Molecular Systems*. Para cada reacción, se añadieron 2 μL de cADN diluido y 18 μL de un *mastermix* que contenía *SYBR Green* y los reactivos específicos para la amplificación de las tres citoquinas estudiadas (IL-6, IL-8 e IL-1). Se prepararon tres *mastermix* diferentes, uno para cada

citoquina, y todo el proceso fue llevado a cabo en una campana de flujo laminar sin luz, dado que el reactivo *SYBR Green* es sensible a la luz. Las mezclas de reacción se distribuyeron en tubos de qPCR para *BMS MIC qPCR*, asegurando la correcta dosificación de cada reacción. Una vez preparados, las tapas de los tubos se colocaron utilizando la pinza correspondiente, asegurando un cierre hermético para evitar contaminación. Los tubos preparados fueron colocados en el rotor del *MicPCR* en un orden específico, y este mismo orden se registró en el software del equipo para nombrar las muestras de forma precisa y garantizar la correcta correlación entre los resultados obtenidos y las condiciones experimentales evaluadas. Una vez configurado, el equipo se programó según las condiciones estándar de qPCR para la evaluación de las muestras. Se realizó el análisis de resultados en *Excel* y se utilizó el software *GraphPad* para graficar los resultados obtenidos.

8.1. Extracción etanólica de *Origanum vulgare*

Con el objetivo de evaluar el efecto antiinflamatorio del orégano en cultivos con células mononucleares de la sangre periférica (PBMC), se utilizó un proceso de maceración con etanol, seguido de liofilización para obtener el extracto seco. Se utilizó un total de 50 gramos de material vegetal, obteniéndose un extracto con una masa final de 0.444 gramos con un rendimiento de 0.88 %. El rendimiento del proceso de extracción se calcula como el porcentaje de masa obtenida del extracto en relación con la masa inicial del material vegetal (Cuadro 1).

Cuadro 1: *Extracto de orégano obtenido.*

Especie	Masa de limbo (g)	Masa del extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>Origanum vulgare</i>	50	0.444	0.88

8.2. Aislamiento de células PBMC

Con el objetivo de evaluar la capacidad antiinflamatoria de extractos de orégano mediante cultivos celulares se realizó el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sujetos humanos sanos. Este aislamiento se realizó utilizando un método de gradiente de densidad con Ficoll-Paque, descrito en detalle en la sección correspondiente de la Metodología (ver Sección 7.2.2.). Los valores obtenidos de 10 cc de 6 individuos variaron entre (valor pequeño) a (valor grande) con una media de (Cuadro 2). El número total de células obtenidas por individuo se calculó multiplicando la concentración celular por

Cuadro 2: *Concentración de células PBMC obtenidas en el aislamiento.*

Muestra	Células totales por individuo (x10 ⁶)
LH	2.31
DA	1.64
EH	1.91
OH	2.45
J	3.65
V	4.17
Media / desviación estándar	2.69 / 1.00

el volumen de sangre procesado (10 cc). Los valores obtenidos en total fueron de 16.13 millones de células, con una media de 1 millón de células por individuo. Estos resultados muestran variaciones individuales que podrían reflejar diferencias fisiológicas o técnicas en la recolección y procesamiento de las muestras. Es importante resaltar que a pesar de que los conteos variaran entre individuos se obtuvo suficiente cantidad de células para realizar los cultivos de cada condición y cada tiempo de incubación.

8.3. Concentración de ARN bajo diferentes condiciones y tiempos de incubación

Pasando las 24 y 48 horas de incubación se recolectaron las células de los cultivos y se procedió a extraer el ARN para cada condición de cultivo. Una vez aislado el ARN se procedió a cuantificar el contenido derivado de cada condición experimental y tiempo de incubación. En el Cuadro 3, se observa que la concentración de ARN vario entre $254.3 \pm$

Cuadro 3: *Concentración de ARN en diferentes condiciones y tiempos de incubación*

Tiempo de incubación	Condición	Media de concentración de ARN (ng/ μ l)
24	Control	254.3 ± 0.25
	Extracto de Orégano	279.32 ± 47.51
	PHA	340.02 ± 148.10
	Extracto de Orégano + PHA	342.42 ± 87.22
48	Control	350.12 ± 42.65
	Extracto de Orégano	323.58 ± 78.46
	PHA	362.15 ± 31.42
	Extracto de Orégano + PHA	381.70 ± 32.40

0.25 a 381.70 ± 32.40 para ambas condiciones. Se observa que existe una mayor concentración de ARN en las muestras de 48 horas con respecto a 24 horas (340.12 ± 47.82 ng/ μ l a las 24 horas y 362.15 ± 32.40 ng/ μ l a las 48 horas).

8.3.1. Pureza del ARN: relación A260/A230 en diferentes condiciones y tiempos

La relación A260/A230 se utiliza como un indicador de la pureza del ARN, donde valores cercanos a 2.0 sugieren una ausencia de contaminantes orgánicos y sales. En este experimento, los valores de esta relación en las muestras se resumen en el Cuadro 8 y 9 en Anexos. En el Cuadro 8 de Anexos se observa diferencias en la relación A260/A230, especialmente en las muestras de control y en el tratamiento de extracto de orégano + PHA a las 24 horas, que presentan valores anómalos (69.20 ± 157.40 y -259.10 ± 571.09 , respectivamente). Estos valores podrían reflejar una interferencia en la pureza de las muestras debido a contaminantes o a una interacción específica entre los componentes del extracto de orégano y el proceso de extracción de ARN. En cambio, el extracto de orégano y el PHA en ambas incubaciones mantienen valores más consistentes y cercanos al rango esperado, aunque todavía por debajo del rango ideal de pureza (>2.0), lo cual sugiere la necesidad de ajustes en el protocolo de extracción para mejorar la pureza.

8.3.2. Evaluación de la pureza del ARN: relación A260/A280 en diferentes condiciones y tiempos

La relación A260/A280 es otro indicador de la pureza del ARN, que idealmente debería estar cerca de 2.0 para indicar una pureza adecuada. Esta relación es particularmente sensible a la presencia de proteínas y otros contaminantes en la muestra. Los resultados se muestran en el Cuadro 4. Los valores en el Cuadro 4 indican que la relación A260/A280

Cuadro 4: *Media de absorbancia A260/A280 en diferentes condiciones y tiempos de incubación*

Tiempo de incubación	Condición	Media de absorbancia A260/A280
24	Control	0.49 ± 0.03
	Extracto de orégano	0.51 ± 0.02
	PHA	0.42 ± 0.02
	Extracto de orégano + PHA	0.47 ± 0.05
48	Control	0.48 ± 0.014
	Extracto de orégano	0.49 ± 0.038
	PHA	0.48 ± 0.023
	Extracto de orégano + PHA	0.50 ± 0.023

se mantuvo consistentemente por debajo del rango ideal de 2.0 en todas las condiciones y tiempos de incubación, con valores entre 0.42 y 0.53. Esto sugiere una presencia considerable de contaminantes, posiblemente proteínas, en todas las muestras de ARN, lo cual podría afectar la precisión de los análisis posteriores. La menor pureza observada en el tratamiento con PHA a las 24 horas (0.42 ± 0.02) y el Extracto de Orégano + PHA (0.45 ± 0.08) resalta la necesidad de una optimización del protocolo de purificación para asegurar ARN de alta calidad.

8.4. Concentración de cADN en diferentes tiempos de incubación

Con el objetivo de evaluar la síntesis de ADN complementario (cADN) derivado del ARN extraído, se realizó la cuantificación de la concentración de cADN bajo diferentes tiempos de incubación (24 y 48 horas). El proceso de síntesis de cADN se llevó a cabo utilizando una reacción de transcripción inversa basada en protocolos previamente establecidos (ver Sección 7.3.2 de la metodología). En el Cuadro 5 se observa qué la concentraciones de cADN a las 24

Cuadro 5: *Concentración de cADN en diferentes tiempos de incubación*

Tiempo de incubación	Muestra	Media ng/ μ l
24	1	893.43 ± 103.31
	2	893.07 ± 29.42
	3	904.82 ± 101.27
	4	874.92 ± 184.81
48	1	952.18 ± 71.850
	2	931.92 ± 52.395
	3	884.95 ± 34.685
	4	924.15 ± 15.088

horas oscilaron entre 874.92 ± 184.81 y 904.82 ± 101.27 ng/ μ l. Por otro lado, las muestras incubadas durante 48 horas presentaron concentraciones medias ligeramente más altas, con un rango de 884.95 ± 34.685 a 952.18 ± 71.85 ng/ μ l. Estos valores reflejan una variabilidad en las concentraciones de cADN entre las diferentes muestras y tiempos de incubación, con desviaciones estándar que destacan la consistencia relativa del proceso de síntesis.

8.4.1. Pureza del cADN: relación A260/A280 en diferentes tiempos de incubación

La relación A260/A280 se utiliza para evaluar la pureza del cADN respecto a contaminantes proteicos. Valores cercanos a 2.0 suelen indicar ADN de alta pureza, mientras que valores menores sugieren la presencia de contaminantes. Los resultados de esta relación en diferentes muestras y tiempos de incubación se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6: *Media de A260/A280 en diferentes tiempos de incubación.*

Tiempo de incubación (h)	Muestra	Media A260/A280
24	1	1.21 ± 0.18
	2	1.22 ± 0.44
	3	1.19 ± 1.00
	4	1.25 ± 1.52
48	1	1.21 ± 0.12
	2	1.24 ± 0.44
	3	1.16 ± 0.99
	4	1.17 ± 1.54

Se presentan las medias de la relación A260/A280 junto con sus desviaciones estándar para cada muestra. Las muestras de 24 horas mostraron valores que oscilaron entre 1.19 ± 1.00 y 1.21 ± 0.18 , mientras que las muestras de 48 horas presentaron valores similares, con un rango de 1.21 ± 0.12 a 1.26 ± 1.54 . Estos resultados sugieren que la pureza del cADN es consistente entre las muestras y los tiempos de incubación, aunque se mantienen valores por debajo del rango ideal de pureza (>2.0), indicando la posible presencia de contaminantes proteicos en las muestras, lo cual podría impactar en la precisión de análisis posteriores como la qPCR.

8.4.2. Pureza del cADN: relación A260/A230 en diferentes tiempos de incubación

La relación A260/A230 es otro indicador de pureza del ADNc, especialmente en relación con contaminantes orgánicos y sales. Idealmente, un valor cercano a 2.0 indica una buena pureza. En este experimento, los valores de la relación A260/A230 en muestras incubadas por 24 y 48 horas se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7: *Media de A260/A230 en diferentes condiciones y tiempos de incubación.*

Tiempo de incubación	Muestra	Media A260/A230
24	1	0.28 ± 0.18
	2	0.29 ± 0.44
	3	0.24 ± 1.00
	4	0.34 ± 1.52
48	1	0.24 ± 0.12
	2	0.29 ± 0.44
	3	0.22 ± 0.99
	4	0.22 ± 1.54

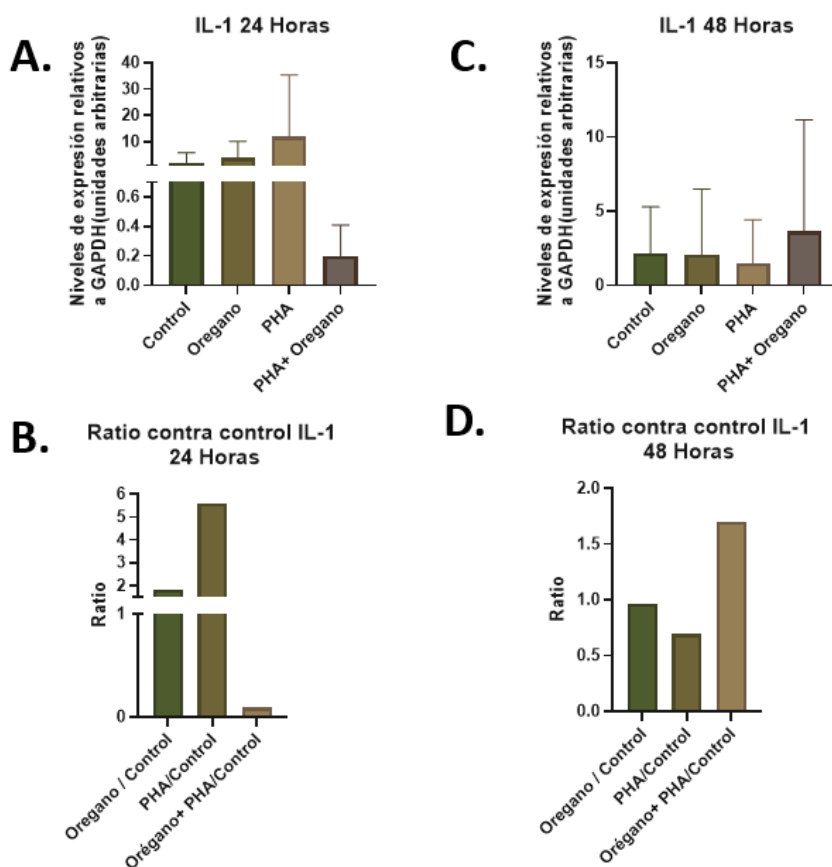
En el Cuadro 7 se presentan los valores medios de la relación A260/A230 para cada muestra y tiempo de incubación. Las muestras de 24 horas mostraron valores entre 0.28 ± 0.18 y 0.34 ± 1.52 , mientras que las muestras de 48 horas presentaron valores similares, con

un rango de 0.22 ± 1.54 a 0.34 ± 1.25 . Estos resultados indican que la relación A260/A230 se mantuvo baja en todas las muestras, lo que sugiere la presencia de contaminantes orgánicos o sales en las muestras de cADN sintetizado.

8.5. Resultados de las expresiones de las citoquinas por medio de qPCR en tiempo real

Con el objetivo de evaluar las propiedades antiinflamatorias del orégano sobre la expresión génica de 3 citoquinas inflamatorias, IL-1 Beta, IL-6 e IL-8 se realizaron cultivos de PBMC en diferentes condiciones: condición control (con medio de cultivo únicamente), condición con orégano, condición con PHA y condición con PHA + orégano durante 24 y 48 horas.

Figura 7: Expresión relativa de IL-1 Beta con respecto a GAPDH y ratios en 24 y 48 horas.

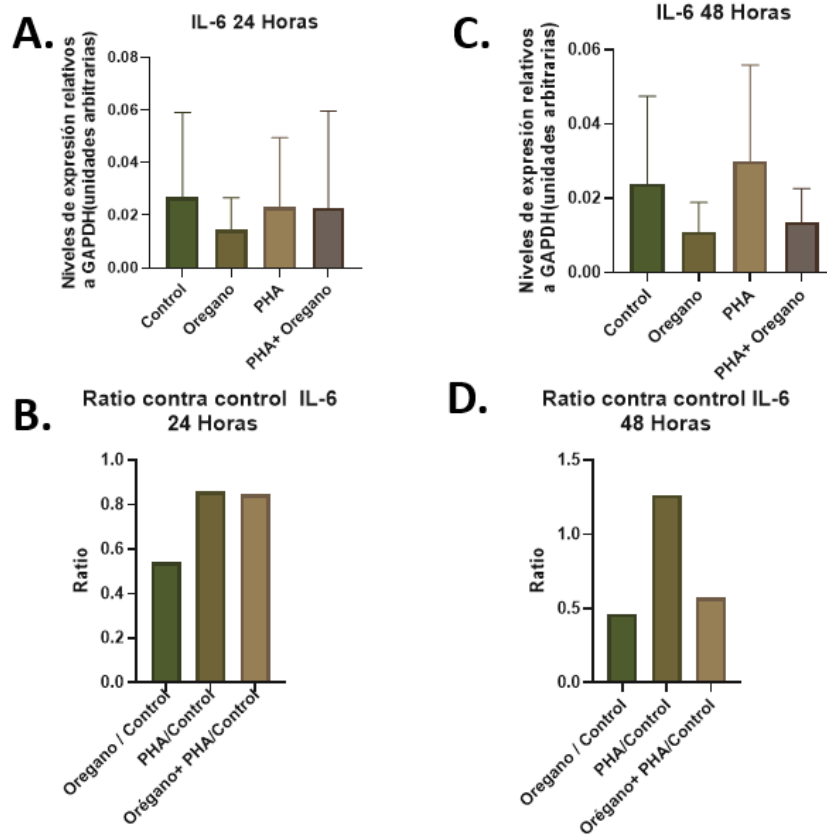


Fuente: Elaboración propia

La expresión génica de IL-1 se mantuvo constante durante las 24 horas en todas las condiciones experimentales (Figura 7 A), excepto en la condición de PHA + orégano, donde se observó una pequeña disminución en la expresión. En el ratio, se puede observar una disminución de aproximadamente 6 veces en la condición de PHA + orégano con respecto

a PHA únicamente (Figura 7B). Por otro lado, a las 48 horas, se observa una tendencia a la disminución en todas las condiciones (Figura 7C), sugiriendo que su expresión disminuye en 48 horas de cultivo sin importar la condición. Sin embargo, al observar el ratio, la condición de PHA + orégano muestra un aumento de 1.5 veces en comparación con el control (Figura 7D). A pesar que las diferencias no son estadísticamente significativas, se observa una tendencia a la reducción del nivel basal de IL-1 a las 24 horas. Estos resultados indican que el extracto de orégano puede modular la expresión génica de IL-1 a las 24 horas, pero no a las 48 horas.

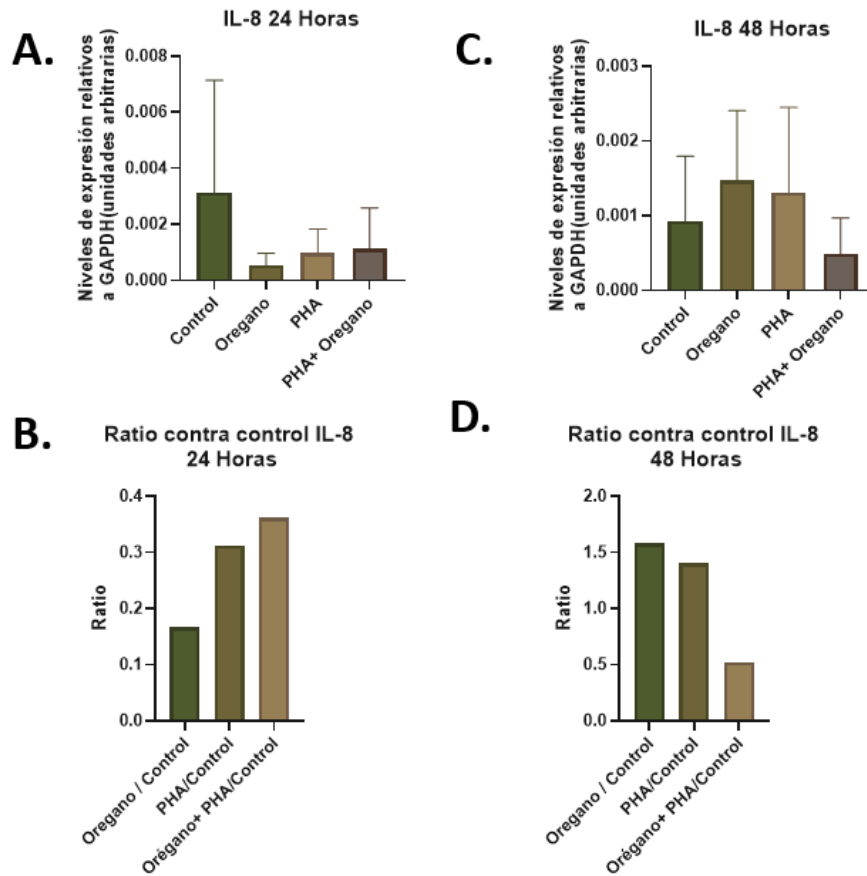
Figura 8: *Expresión relativa de IL-6 con respecto a GAPDH y ratios en 24 y 48 horas.*



Fuente: Elaboración propia

La expresión génica de IL-6 se mantuvo constante durante las 24 horas para todas las condiciones experimentales (Figura 8A). A pesar que se observa una tendencia en la disminución de la expresión génica de IL-6 en la condición expuesta a el ratio es similar a las otras condiciones (Figura 8B). Por otro lado, a las 48 horas se observa una reducción de hasta 1 en las condiciones experimentales que contenían orégano con respecto a la condición con PHA (Figura 8C), mientras que la condición de PHA aumentó 1.5 veces con respecto al control (Figura 8D). A pesar que la diferencia no es significativa, se observa una tendencia en la reducción del nivel basal de IL-6. Estos resultados indican que el extracto de orégano puede modular la expresión génica de IL-6 a las 48 pero no a las 24 horas.

Figura 9: *Expresión relativa de IL-8 con respecto a GAPDH y ratios en 24 y 48 horas.*



Fuente: Elaboración propia

En la expresión génica de IL-8, se logró observar una tendencia a disminuir en la condición tratada con el extracto de orégano, mientras que en las condiciones de PHA y PHA + orégano no se evidenciaron cambios significativos (Figura 9A). La expresión génica de IL-8 en el ratio se mantuvo similar entre las condiciones, con excepción de la condición con el extracto de orégano, donde se observó una disminución (Figura 9B). Por otro lado, a las 48 horas se observaron cambios similares, pero más marcados. La condición PHA + orégano mostró una disminución respecto a las demás condiciones, como se puede observar en la Figura 3D, donde el ratio indica que la expresión disminuyó en aproximadamente 1 unidad en comparación con el control. Estos resultados indican que el extracto de orégano puede modular la expresión génica de IL-8 tanto a las 24 como a las 48 horas, aunque el efecto es más evidente a las 48 horas.

Muchas enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal y la sepsis, generan inflamación incontrolable que puede llegar a afectar gravemente la calidad de vida y, en algunos casos, ser fatal para el individuo[70]. Estas patologías están estrechamente relacionadas con la desregulación de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 beta, IL-6 e IL-8, entre otras que son responsables de amplificar la respuesta inflamatoria y perpetuar el daño tisular[23]. Aunque los medicamentos antiinflamatorios no esteroides (AINE) son ampliamente utilizados para controlar la inflamación, su uso prolongado está asociado a efectos secundarios significativos, como úlceras gástricas, daño renal y alergias a medicamentos[14]. Esto ha llevado a un creciente interés en la búsqueda de alternativas terapéuticas basadas en compuestos naturales que puedan ofrecer un perfil más seguro y eficaz. Además, que tengan influencia directamente sobre el sistema inmune y no otras rutas. Los AINE ejercen su efecto antiinflamatorio principalmente a través de la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), que son responsables de la síntesis de prostaglandinas, moléculas clave en la amplificación de la respuesta inflamatoria. La inhibición de COX-2, en particular, reduce la producción de prostaglandinas proinflamatorias, lo que alivia los síntomas inflamatorios como el dolor, la hinchazón y la fiebre. Sin embargo, la inhibición de COX-1, que tiene un papel protector en el tracto gastrointestinal y la función renal, es la responsable de los efectos secundarios mencionados, como las úlceras gástricas y el daño renal[71]. En cuanto a su relación con el sistema inmune, los AINE modulan indirectamente la respuesta inmunitaria al reducir la producción de mediadores inflamatorios derivados de las prostaglandinas. Aunque no actúan directamente sobre células inmunitarias como linfocitos o macrófagos, su capacidad para disminuir las señales proinflamatorias puede influir en el reclutamiento y la activación de estas células. Esto implica que los AINE afectan rutas inflamatorias relacionadas con el sistema inmune de manera indirecta, pero no interrumpen otras vías inmunológicas fundamentales para la defensa del organismo[15]. La vía de las ciclooxigenasas forma parte de un sistema más amplio que incluye rutas como la de la lipoxigenasa (LOX) y el factor nuclear kappa B (NF- κ B). Mientras que las ciclooxigenasas regulan la síntesis de prostaglandinas, la vía LOX está involucrada en la producción de leucotrienos, que también son mediadores inflamatorios importantes en condiciones alérgicas e inflamatorias. Por otro lado, NF- κ B es un regulador maestro de la inflamación, controlando

la expresión de numerosas citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-1, IL-6 e IL-8. Estas rutas están interconectadas y contribuyen colectivamente a la amplificación de la respuesta inflamatoria, siendo objetivos terapéuticos clave en el manejo de enfermedades inflamatorias crónicas[55]. La inflamación es una respuesta compleja del sistema inmunológico que involucra eventos celulares y moleculares que resultan en la activación celular y la secreción de citoquinas como la IL-1 beta, IL-6 e IL-8, las cuales desempeñan un papel crucial en el inicio y la amplificación del proceso inflamatorio[23]. Estas citoquinas son objetivos clave en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas debido a su papel central en la inflamación. En este contexto, el objetivo principal de este estudio fue evaluar la expresión génica de estas tres citoquinas inflamatorias en células mononucleares derivadas de la sangre periférica de sujetos humanos sanos para explorar el potencial antiinflamatorio de extractos de orégano, una planta rica en compuestos bioactivos con propiedades moduladoras de la inflamación.

9.1. Extracción etanólica y liofilización del orégano

La extracción de compuestos bioactivos del orégano se llevó a cabo mediante un método etanólico, considerado uno de los más seguros y ampliamente recomendados para preservar la integridad de los metabolitos secundarios. Generalmente, la literatura sugiere una proporción de 10:1 (10 g de material vegetal por 100 ml de etanol) para la extracción eficiente de estos compuestos, incluso con asistencia de ultrasonido [69]. Sin embargo, en nuestro estudio, fue necesario ajustar esta proporción debido a las características físicas de la masa del orégano utilizada. Al aplicar la proporción sugerida, el volumen de etanol no cubría completamente el material vegetal, lo cual limitaba la eficiencia de la extracción a través de la maceración. Por ello, se incrementó el volumen de etanol para garantizar una adecuada inmersión del material. Entre los metabolitos secundarios más relevantes presentes en el orégano, reconocidos por su actividad biológica, se encuentran los compuestos fenólicos, como el ácido rosmarínico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico, que destacan por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias[72]. Asimismo, los flavonoides, como la apigenina, la luteolina y la quercetina, contribuyen con efectos antioxidantes, antimicrobianos y moduladores del sistema inmune[73]. Otro grupo importante son los monoterpenos, entre los que se encuentran el carvacrol y el timol, los cuales son responsables de muchas de las propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias del orégano[74]. Además, los triterpenos, aunque presentes en menor proporción, como el ácido ursólico, también aportan beneficios antiinflamatorios y antioxidantes[75]. Finalmente, los taninos, conocidos por sus propiedades astringentes, antioxidantes y antimicrobianas, complementan el perfil bioactivo del orégano[76]. Estos metabolitos secundarios sugieren ser responsables de las múltiples propiedades terapéuticas del orégano, sino que también explican su interés en la investigación de alternativas naturales para tratar enfermedades inflamatorias y microbianas. La extracción etanólica utilizada en este estudio permitió preservar y concentrar estos compuestos, aunque las condiciones del proceso, como el volumen de solvente y la proporción material-solvente, demostraron ser factores críticos para optimizar la eficiencia y la calidad del extracto obtenido. Este ajuste en el volumen de etanol no debería tener un impacto considerable en la extracción, ya que el solvente ayuda a que la maceración sea más efectiva y así los compuestos activos se disuelvan en él. Además, si se lleva a cabo un paso de evaporación, va a mantener el equilibrio de saturación[77]. Aunque este cambio no corresponde exactamente a la proporción estándar reportada, las modificaciones en los métodos de ex-

tracción son comunes en estudios experimentales y permiten adaptarse a las particularidades del material utilizado[77]. En nuestro estudio, el rendimiento obtenido no alcanzó los valores óptimos reportados en la literatura, que se mantienen entre el 24-31.45 %[78], también dependiendo de la cantidad de orégano a utilizar (ver Cuadro 1, resultados), lo que podría atribuirse a la ausencia de asistencia durante la extracción, como el uso de ultrasonido, que según [69] puede incrementar el rendimiento hasta en un 33.93 %. Otro factor relevante es que, aunque el método etanólico es efectivo y seguro, puede subextraer metabolitos secundarios como flavonoides y compuestos fenólicos debido a su solubilidad limitada[79]. Si bien se reconoce que el metanol podría mejorar la extracción de estos compuestos, este solvente fue descartado por ser considerado peligroso para aplicaciones relacionadas con productos de consumo[80]. Es importante destacar que la optimización realizada en este estudio de aumentar el volumen de etanol para cubrir completamente la masa vegetal resalta la importancia de adaptar las metodologías a las condiciones experimentales particulares. Este tipo de modificaciones permite maximizar la eficiencia dentro de las limitaciones del diseño experimental, sin comprometer la integridad de los compuestos extraídos. Para evitar que residuos de etanol afectaran a los cultivos celulares, se realizó la evaporación del etanol del extracto y, posteriormente, se realizó una liofilización que permitió poder concentrar en su totalidad el extracto sin alterar su estado bioquímico y para minimizar la degradación térmica y oxidativa, al mismo tiempo asegurando que se elimine el agua al 100 %[81]. Como se menciona en el estudio de Krim,2021[82], los compuestos como el carvacrol y timol, los cuales son característicos del orégano, podrían disminuir durante el liofilizado, lo que podría haber reducido ligeramente la bioactividad del extracto final obtenido. Es importante considerar que la presencia de residuos de etanol en los cultivos celulares puede ser citotóxica, afectando la viabilidad y proliferación de las células. Incluso bajas concentraciones de etanol pueden alterar la morfología celular y comprometer la integridad de las membranas plasmáticas[83]. Un estudio publicado en Journal of Biological Chemistry evaluó los efectos del etanol en células de hepatocarcinoma humano (HepG2) y encontró que concentraciones tan bajas como 0.5 % inducen apoptosis y necrosis, además de alterar la función mitocondrial y aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno[83]. Estos hallazgos subrayan la importancia de eliminar completamente los residuos de etanol en experimentos con cultivos celulares para evitar efectos citotóxicos no deseados. Aunque la extracción etanólica demostró ser segura y adecuada para obtener un extracto compatible con aplicaciones celulares, el rendimiento y la composición final del extracto podrían mejorarse mediante la implementación de métodos alternativos como la extracción metanólica o una extracción secuencial combinada con solventes polares y no polares[84]. Estas alternativas deben evaluarse cuidadosamente en función de su impacto en la seguridad, viabilidad y calidad del producto final.

9.2. Aislamiento de PBMC

La obtención de PBMC mediante el procesamiento de las muestras sanguíneas fue un paso crucial para el desarrollo del experimento. Los resultados, resumidos en el Cuadro 2, reflejan recuperación celular y viabilidad. La media y la desviación estándar obtenidas para el conteo celular muestran valores aceptables dentro de los rangos reportados en la literatura para el método de gradiente de densidad con Ficoll-Paque[85]. Ya que normalmente se obtiene 1×10^6 células por cada cc obtenido. Este método fue eficiente en la separación de las PBMC del plasma y los eritrocitos, aunque factores como la variabilidad individual

entre los donantes y ligeros ajustes en las condiciones experimentales pudieron haber influido en las diferencias observadas entre las muestras[84]. La variabilidad individual entre los donantes, como lo son la edad, el sexo, el estado de salud y el estilo de vida, o enfermedades autoinmunes, puede influir significativamente en la concentración y viabilidad de las PBMC presentes en la sangre periférica, generando diferencias importantes entre las muestras[86]. Las condiciones experimentales, tales como la temperatura, el tiempo de procesamiento y la fuerza relativa aplicada durante la centrifugación, también pueden impactar considerablemente el rendimiento del método. Además, la manipulación incorrecta de las muestras podría dañar las células o reducir su viabilidad[87]. Otro factor importante a resaltar es la técnica de extracción, que incluye la correcta superposición de las capas en el gradiente de densidad y la recolección cuidadosa de la capa de PBMC. Este es un factor clave para minimizar pérdidas celulares y mantener la consistencia de los resultados[88]. La viabilidad de las células fue generalmente alta, como se observa en el Cuadro 2, lo que asegura la calidad del material biológico para los ensayos realizados. Este resultado refleja un manejo adecuado de las muestras desde la flebotomía hasta el aislamiento celular, incluyendo la minimización del tiempo entre cada etapa del proceso, como lo recomienda Grievink[89] en su estudio. Un aspecto relevante fue la ligera variación en los rendimientos entre donantes. Esto puede explicarse por factores fisiológicos individuales, como el recuento basal de leucocitos en sangre periférica y la composición específica del plasma[90], que pueden deberse a infecciones, metabolismo, nutrición y la presencia de enfermedades autoinmunes. En algunas muestras, como se puede observar en el Cuadro 2, se observaron pequeñas concentraciones de células. Esto puede ser debido a una activación temprana de monocitos y plaquetas, ya que según estudios previos, esta activación puede ser desencadenada por el uso de anticoagulantes o por la misma manipulación de las muestras[91]. Esto coincide con estudios previos que identifican que la activación plaquetaria y monocítica puede desencadenarse fácilmente por estímulos físicos o químicos durante el manejo de las muestras[92]. Es importante recalcar que, a pesar de que los donantes se catalogaron como personas sanas, estos podrían estar predispuestos a padecer alguna afección y alterar los resultados. La variación biológica en patologías puede reflejarse en fluctuaciones de los constituyentes de los fluidos humanos, incluso en ausencia de síntomas clínicos evidentes. Estas variaciones pueden impactar en la interpretación de los datos obtenidos y deben considerarse al analizar los resultados experimentales[93]. La alta viabilidad celular obtenida en este estudio asegura que los resultados de las etapas posteriores no se vean comprometidos por factores relacionados con el aislamiento de las células. No obstante, optimizar la consistencia en el rendimiento podría mejorar la reproducibilidad del experimento en futuros estudios.

9.3. Extracción de ARN

El aislamiento de ARN de las 48 muestras procesadas fue esencial para la evaluación de la expresión génica. Este proceso se realizó utilizando un protocolo de extracción estándar basado en la disrupción celular y la purificación de ARN, el cual mostró resultados satisfactorios en términos de cantidad y calidad, aunque también presentó algunas limitaciones que merecen discusión. Este método permitió obtener ARN con una pureza confiable para realizar una posterior retrotranscripción. El uso de *kits* específicos y estandarizados permitió minimizar la contaminación genómica. Este tipo de estrategias es eficaz para garantizar que el ARN sea apto para análisis moleculares sensibles, como la amplificación de genes

específicos[94]. Sin embargo, la variabilidad en el rendimiento de las muestras sugiere que factores experimentales, como la cantidad inicial de células y la eficiencia del deterioro de una célula debido a una lesión en su membrana, influyeron en los resultados. Este fenómeno se ha documentado en estudios que destacan cómo la manipulación de las células y el tiempo transcurrido entre la recolección y la extracción pueden afectar la recuperación de ARN[95]. El análisis de pureza mediante el cociente A260/A280 y A260/A230 (Cuadro 4 y 5) mostró valores variables según las condiciones y tiempos de incubación. Se puede observar pureza en la mayoría de las muestras. Sin embargo, algunas muestras presentaron indicios altos de contaminación, posiblemente debido a una eliminación incompleta de los reactivos durante los pasos de lavado o por una mala práctica. Esto se puede asociar con estudios previos que sugieren la importancia de optimizar los pasos de centrifugación y el uso de buffers adecuados para minimizar la contaminación[96]. En este estudio se utilizó el GenElute™-E Viral RNA/DNA Swab Kit de Sigma-Aldrich, diseñado específicamente para la extracción rápida y eficiente de ADN y ARN viral a partir de hisopos. Este *kit* emplea una tecnología de membranas de sílice, la cual es altamente selectiva para ácidos nucleicos, permitiendo la eliminación de proteínas, sales y otros contaminantes que podrían interferir en la pureza del producto final. Además, se caracteriza por un tiempo de extracción reducido y protocolos simplificados, lo que lo hace ideal para aplicaciones de alto rendimiento[97]. Comparado con otros *kits* comerciales, el GenElute™-E *Kit* tiene ventajas en su capacidad para procesar muestras directamente de hisopos sin pasos intermedios complicados. Sin embargo, *kits* como el QIAamp Viral RNA Mini *Kit* de Qiagen ofrecen una mayor capacidad de recuperación de ácidos nucleicos en muestras con baja concentración, lo que podría haber mejorado los valores de pureza en las muestras que presentaron contaminación[98]. Otra alternativa podría ser el Monarch® Total RNA Miniprep *Kit* de New England Biolabs, que proporciona ventajas en la eliminación de contaminantes secundarios como el ARN genómico o ARN de cadena corta, lo que podría haber reducido aún más las variaciones en las relaciones de absorbancia[99]. La elección de un *kit* de extracción depende tanto de las características específicas de la muestra como de los requisitos experimentales. Si bien el *GenElute™-E Viral RNA/DNA Swab Kit* ofreció resultados satisfactorios en la mayoría de las muestras, la implementación de controles adicionales en los pasos de lavado, junto con el ajuste de parámetros críticos como la centrifugación y el volumen de buffer, podría reducir las variaciones observadas y optimizar los valores de pureza en futuras aplicaciones. En el Cuadro 4 se evidencia una variabilidad alta en relación con A260/A280, particularmente en las muestras de control y en el tratamiento de extracto de orégano + PHA a las 24 horas, donde se observaron valores extremos de pureza. Estos valores pueden indicar presencia de contaminantes significativos o que los compuestos del extracto podrían haberse unido al ARN, alterando la absorbancia en los espectros evaluados[100].

9.4. Extracción de cADN

La síntesis de ADN complementario (cADN) a partir del ARN extraído fue una etapa crucial para la evaluación de la expresión génica mediante qPCR. Este proceso se llevó a cabo siguiendo un protocolo estandarizado de transcripción inversa, que permitió obtener cADN en concentraciones adecuadas para los análisis posteriores. Como se muestra en el Cuadro 6, las concentraciones oscilaron entre 874.92 ± 184.81 y 952.18 ± 71.85 , dependiendo de los tiempos de incubación, lo que refleja una variabilidad entre las muestras que debe ana-

lizarse. Los tiempos de incubación previos a la extracción de ARN influyeron directamente en la cantidad de cADN obtenido. Las muestras incubadas durante 48 horas mostraron, en promedio, concentraciones más altas que las incubadas durante 24 horas, lo cual puede atribuirse a una mayor estabilización de las células y, en consecuencia, a una mejor calidad del ARN inicial. Este comportamiento es consistente con la literatura, que señala que el ARN de mejor calidad suele traducirse en una mayor eficiencia durante la retrotranscripción[101]. Sin embargo, esta variabilidad también podría estar relacionada con factores técnicos, como la actividad de la transcriptasa reversa y las condiciones de la reacción de transcripción inversa, que afectan directamente la cantidad de cADN sintetizado[102]. En cuanto a la pureza del cADN, evaluada mediante la relación A260/A280 (Cuadro 7), los valores obtenidos estuvieron por debajo del rango ideal (>2.0), oscilando entre 1.16 ± 0.99 y 1.26 ± 1.54 . Esto sugiere la presencia de contaminantes proteicos residuales en las muestras, lo cual puede atribuirse a una eliminación incompleta durante la extracción de ARN o al efecto de componentes derivados de las condiciones de incubación, como el PHA o el Extracto de Orégano. Aunque estos valores no imposibilitan el uso del cADN en qPCR, podrían afectar la precisión y reproducibilidad de las reacciones, como lo han reportado estudios previos[96]. La relación A260/A230 (Cuadro 8), que evalúa la presencia de contaminantes orgánicos y sales, también mostró valores fuera del rango ideal (<2.0), con un rango de 0.22 ± 0.99 a 0.34 ± 1.52 . Esto indica una posible interferencia de compuestos fenólicos o sales residuales, que no fueron completamente eliminados durante el proceso de purificación. Este tipo de contaminantes puede inhibir las reacciones enzimáticas en los ensayos de qPCR, comprometiendo la cuantificación de la expresión génica[95]. Aunque la síntesis de cADN produjo concentraciones suficientes para los análisis posteriores, las limitaciones en la pureza, particularmente en las relaciones A260/A280 y A260/A230, destacan la necesidad de optimizar los pasos de extracción y purificación del ARN inicial. Estas mejoras podrían reducir la variabilidad y asegurar una mayor reproducibilidad en los resultados de los análisis moleculares.

9.5. qPCR análisis

Para evaluar las propiedades antiinflamatorias del extracto de orégano, se seleccionaron las citoquinas IL-1, IL-6 e IL-8, las cuales son mediadores proinflamatorios clave involucrados en diversas enfermedades inflamatorias. Estas citoquinas desempeñan funciones críticas en la amplificación de la respuesta inflamatoria, participando en enfermedades como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal y la sepsis[103], [104]. Su estudio permite comprender el potencial modulador de compuestos bioactivos sobre la inflamación mediada por las células mononucleares (PBMC). IL-6 es una citoquina multifuncional que participa en la transición de la inflamación aguda a la crónica. Su producción excesiva está asociada con enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes, como la artritis y el lupus eritematoso sistémico[105]. En este estudio, aunque no se observaron diferencias significativas, se identificó una tendencia a la reducción del nivel basal de IL-6 a las 48 horas en la condición tratada con Extracto de Orégano, mientras que a las 24 horas la expresión se mantuvo constante. Estos resultados sugieren que el extracto de orégano puede ejercer un efecto modulador sobre la expresión génica de IL-6 a las 48 horas y no a las 24 horas, indicando que a tiempos mayores se puede regular esta citoquina. Esto es consistente con estudios que han reportado efectos antiinflamatorios de extractos vegetales sobre esta citoquina en modelos de PBMC[106]. IL-8 es una citoquina quimioatrayente que facilita el reclutamiento de neu-

trófilos al sitio de inflamación y es crucial en la respuesta inflamatoria aguda[107]. En este estudio, se observó una tendencia a disminuir la expresión de IL-8 en la condición tratada con Extracto de Orégano a las 24 y 48 horas, con un efecto más evidente a las 48 horas (Figura 3A). En las condiciones de PHA y PHA + Orégano, no se evidenciaron cambios significativos. Esto podría atribuirse a la capacidad del orégano para inhibir vías de señalización proinflamatorias, como NF- κ B y MAPK, responsables de la inducción de IL-8[11]. Estos hallazgos son consistentes con otros estudios que han reportado una disminución en la expresión de IL-8 tras el tratamiento con extractos de té blanco y rosa ricos en compuestos fenólicos en modelos de inflamación celular[108]. Los resultados obtenidos indican que el extracto de orégano puede modular la expresión génica de las citoquinas IL-1, IL-6 e IL-8, mostrando efectos diferenciados según la citoquina y el tiempo de incubación. Aunque las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas, se identificaron tendencias claras hacia la reducción de la expresión basal de estas citoquinas, especialmente a las 48 horas. Es posible que un mayor número de réplicas experimentales hubiera permitido alcanzar una significancia estadística mayor. Estos hallazgos resaltan el potencial del extracto de orégano como modulador de la inflamación, aunque se requieren estudios adicionales para confirmar estos efectos y explorar sus mecanismos moleculares subyacentes.

- La elección de no utilizar solventes como el metanol, debido a su toxicidad, tiene mucha importancia al balancear entre la seguridad y la eficiencia en protocolos experimentales de extracción.
- El proceso de aislamiento de PBMC fue efectivo y produjo resultados alineados con los estándares esperados, como se observa en el Cuadro 2. Aunque se identificaron ligeras variaciones en la recuperación y la pureza de las células, estos resultados no afectan significativamente las etapas posteriores del experimento.
- La extracción de ARN fue exitosa en general, pero presentó desafíos relacionados con la pureza bajo ciertas condiciones. Los resultados descritos en el Cuadro 4 y el Cuadro 5 destacan la necesidad de ajustar el protocolo de extracción y purificación para minimizar la interferencia de contaminantes, especialmente en muestras tratadas con PHA o extracto de orégano + PHA.
- Las muestras tratadas con PHA presentaron la menor pureza en el ARN; esto puede deberse a la interacción del ARN con proteínas o compuestos inducidos por el tratamiento, afectando la relación de absorbancia.
- El orégano influye en la expresión en las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6 e IL-8, mostrando un efecto de disminución en su expresión.
- El orégano influye en la inflamación y reduce la expresión de las citoquinas proinflamatorias al haber inducido inflamación en las células.

Para optimizar el proceso de extracción de orégano, se recomienda explorar variaciones en las condiciones de extracción que puedan incrementar el rendimiento de compuestos bioactivos. Aunque la extracción etanólica fue efectiva en obtener una cantidad mínima de extracto, su rendimiento fue bajo, lo cual limita la cantidad de material disponible para los ensayos. Para mejorar este proceso, sería conveniente evaluar diferentes proporciones de solvente y material vegetal, además de considerar el uso de otros solventes o mezclas, como combinaciones de etanol con acetona o metanol. Esto podría favorecer la solubilización de los compuestos de interés. Asimismo, ajustar el tiempo podría maximizar el rendimiento sin afectar la estabilidad de los metabolitos. Estas modificaciones permitirían obtener un extracto más abundante y posiblemente más concentrado en compuestos activos, mejorando así la viabilidad de los ensayos experimentales. En cuanto a la calidad del ARN y cADN extraído, se observó que las muestras contenían niveles elevados de contaminantes, lo cual se reflejó en las bajas relaciones A260/A230 y A260/A280. Para abordar este problema, se recomienda implementar pasos adicionales de purificación que aseguren una mejor eliminación de sales y compuestos orgánicos. La adición de columnas de limpieza específicas para ARN, o el uso de técnicas de precipitación selectiva, podrían ser soluciones eficaces para mejorar la pureza del ARN y, en consecuencia, del cADN. También sería beneficioso emplear reactivos de mayor pureza o adaptar el protocolo de lisis celular para minimizar la presencia de proteínas y otros contaminantes en la muestra. Estas mejoras en el proceso de purificación no solo aumentarían la calidad del material obtenido, sino que también contribuirían a la precisión de los análisis posteriores, como la cuantificación de la expresión génica. La síntesis de cADN mostró variabilidad en las concentraciones obtenidas entre las distintas muestras. Esta inconsistencia podría dificultar la interpretación de los resultados y afectar la reproducibilidad de los experimentos. Para mitigar este problema, se sugiere estandarizar la cantidad de ARN utilizada en la retrotranscripción, asegurando que todas las muestras partan de una misma cantidad de material. Además, se recomienda evaluar la eficiencia de las enzimas de retrotranscripción empleadas, considerando el uso de alternativas de mayor eficiencia, especialmente para muestras con ARN de calidad variable. Asimismo, la implementación de controles de calidad antes de la síntesis de cADN garantizaría que el ARN inicial cumpla con los estándares necesarios para una retrotranscripción efectiva. Es-

tas estrategias reducirían la variabilidad y permitirían obtener resultados más consistentes y comparables. Para mejorar la precisión en los análisis de absorbancia, se sugiere llevar a cabo mediciones en duplicado o triplicado, lo que ayudaría a minimizar errores de medición y a obtener datos más confiables. También es fundamental emplear espectrofotómetros calibrados y verificar periódicamente la calidad de los reactivos y solventes utilizados en los ensayos, ya que estos pueden introducir variabilidad en los resultados. Adicionalmente, la inclusión de controles internos de ARN de referencia con alta pureza permitiría comparar y validar los resultados de absorbancia obtenidos, asegurando que estos reflejen con precisión la pureza y concentración de las muestras. Estos pasos fortalecerían la validez de los datos de absorbancia y mejorarían la calidad del análisis de pureza del ARN y cADN. Dado que algunos de los resultados mostraron variabilidad considerable, especialmente en la concentración de ARN y cADN, es recomendable repetir los ensayos con un mayor número de muestras biológicas para obtener datos estadísticamente robustos y confiables. La repetición de los experimentos permitiría determinar si las diferencias observadas entre tratamientos son significativas desde el punto de vista estadístico, lo cual es esencial para interpretar con mayor precisión los efectos del extracto de orégano y el PHA en las muestras. Este enfoque también contribuiría a reducir el sesgo y a confirmar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

-
- [1] R. Medzhitov, “Origin and physiological roles of inflammation,” *Nature*, vol. 454, n.º 7203, págs. 428-435, jul. de 2008, ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature07201. dirección: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07201>.
- [2] E. H. Choy y G. S. Panayi, “Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis,” *New England Journal of Medicine*, vol. 344, n.º 12, F. H. Epstein, ed., págs. 907-916, mar. de 2001, ISSN: 1533-4406. DOI: 10.1056/nejm200103223441207. dirección: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200103223441207>.
- [3] L. Chen, H. Deng, H. Cui et al., “Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs,” *Oncotarget*, vol. 9, n.º 6, págs. 7204-7218, dic. de 2017, ISSN: 1949-2553. DOI: 10.18632/oncotarget.23208. dirección: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.23208>.
- [4] V. Daniel, “Anti-Inflammatory Activity,” en *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. Springer International Publishing, 2016, págs. 1905-2024, ISBN: 9783319053929. DOI: 10.1007/978-3-319-05392-9_42. dirección: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-05392-9_42.
- [5] I. Ghlichloo y V. Gerriets, “Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs),” en *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024, Accedido: 2 de abril de 2024. dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547742/>.
- [6] C. A. Dinarello, “Anti-inflammatory Agents: Present and Future,” *Cell*, vol. 140, n.º 6, págs. 935-950, mar. de 2010, ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/j.cell.2010.02.043. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.043>.
- [7] B. B. Aggarwal y K. B. Harikumar, “Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases,” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 41, n.º 1, págs. 40-59, ene. de 2009, ISSN: 1357-2725. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.06.010. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2008.06.010>.

- [8] B. H. Ali, G. Blunden, M. O. Tanira y A. Nemmar, "Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, n.º 2, págs. 409-420, feb. de 2008, ISSN: 0278-6915. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.085. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.085>.
- [9] Y. Takenoshita, Y. Kawano y M. Oka, "Pneumoparotitis, an unusual occurrence of parotid gland swelling during dental treatment," *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, vol. 19, n.º 8, págs. 362-365, nov. de 1991, ISSN: 1010-5182. DOI: 10.1016/S1010-5182(05)80280-x. dirección: [http://dx.doi.org/10.1016/S1010-5182\(05\)80280-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1010-5182(05)80280-X).
- [10] S. Tasneem, B. Liu, B. Li, M. I. Choudhary y W. Wang, "Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents," *Pharmacological Research*, vol. 139, págs. 126-140, ene. de 2019, ISSN: 1043-6618. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.11.001. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.001>.
- [11] R. A. Muluye, Y. Bian y P. N. Alemu, "Anti-inflammatory and Antimicrobial Effects of Heat-clearing Chinese Herbs: A Current Review," *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, vol. 4, n.º 2, págs. 93-98, abr. de 2014, ISSN: 2225-4110. DOI: 10.4103/2225-4110.126635. dirección: <http://dx.doi.org/10.4103/2225-4110.126635>.
- [12] L. Pompermaier, S. Marzocco, S. Adesso et al., "Medicinal plants of northern Angola and their anti-inflammatory properties," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 216, págs. 26-36, abr. de 2018, ISSN: 0378-8741. DOI: 10.1016/j.jep.2018.01.019. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.01.019>.
- [13] D. Furman, J. Campisi, E. Verdin et al., "Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span," *Nature Medicine*, vol. 25, n.º 12, págs. 1822-1832, dic. de 2019, ISSN: 1546-170X. DOI: 10.1038/s41591-019-0675-0. dirección: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>.
- [14] M. Feldmann y R. N. Maini, "TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases," *Nature Medicine*, vol. 9, n.º 10, págs. 1245-1250, oct. de 2003, ISSN: 1546-170X. DOI: 10.1038/nm939. dirección: <http://dx.doi.org/10.1038/nm939>.
- [15] S. M. Smith, A. T. Wang, N. P. Katz et al., "Adverse event assessment, analysis, and reporting in recent published analgesic clinical trials: ACTION systematic review and recommendations," *Pain*, vol. 154, n.º 7, págs. 997-1008, jul. de 2013, ISSN: 0304-3959. DOI: 10.1016/j.pain.2013.03.003. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2013.03.003>.
- [16] U. Juergens, "Anti-inflammatory Properties of the Monoterpene 1.8-cineole: Current Evidence for Co-medication in Inflammatory Airway Diseases," *Drug Research*, vol. 64, n.º 12, págs. 638-646, mayo de 2014, ISSN: 2194-9387. DOI: 10.1055/s-0034-1372609. dirección: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1372609>.
- [17] N. Leyva-López, E. Gutiérrez-Grijalva, G. Vazquez-Olivo y J. Heredia, "Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties," *Molecules*, vol. 22, n.º 6, pág. 989, jun. de 2017, ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules22060989. dirección: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22060989>.

- [18] A. Fleisher y Z. Fleisher, "Identification of biblical hyssop and origin of the traditional use of oregano-group herbs in the Mediterranean region," *Economic Botany*, vol. 42, n.º 2, págs. 232-241, abr. de 1988, ISSN: 1874-9364. DOI: 10.1007/bf02858924. dirección: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02858924>.
- [19] T. Bartol y D. Baricevic, "The biological/pharmacological activity of the *Origanum* Genus," en *The Design Life of Structures*. Spon Press, abr. de 1998, ISBN: 9780203168875. DOI: 10.4324/9780203168875.ch8. dirección: <http://dx.doi.org/10.4324/9780203168875.ch8>.
- [20] *Access to medicines: making market forces serve the poor*, <https://www.who.int/publications/m/item/access-to-medicines-making-market-forces-serve-the-poor>, Accedido: 5 de abril de 2024, 2024. dirección: <https://www.who.int/publications/m/item/access-to-medicines-making-market-forces-serve-the-poor>.
- [21] Y. T. Bazargani, M. Ewen, A. de Boer, H. G. M. Leufkens y A. K. Mantel-Teeuwisse, "Essential Medicines Are More Available than Other Medicines around the Globe," *PLoS ONE*, vol. 9, n.º 2, I. Choonara, ed., e87576, feb. de 2014, ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0087576. dirección: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087576>.
- [22] D. H. E. Jeréz et al., *Oregano, Origanum vulgare*, <https://www.export.com.gt/documentos/guia-de-cultivos/guia-de-cultivo-de-oregano.pdf>, SF. dirección: <https://www.export.com.gt/documentos/guia-de-cultivos/guia-de-cultivo-de-oregano.pdf>.
- [23] R. Pahwa, A. Goyal e I. Jialal, *Inflamación crónica*. Isla del Tesoro (FL): StatPearls Publishing, 2024, [Actualizado el 7 de agosto de 2023]. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>.
- [24] M. González-Costa y A. A. P. González, "La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI," *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, vol. 18, n.º 1, págs. 30-44, 2019. dirección: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2019000100030&lng=es&tlng=es.
- [25] A. Agita y M. Alsagaff, "Inflammation, Immunity, and Hypertension," *Acta Medica Indonesiana*, vol. 49, n.º 2, págs. 158-165, 2017.
- [26] N. B. Janakiram, M. S. Valerio, S. M. Goldman y C. L. Dearth, "The Role of the Inflammatory Response in Mediating Functional Recovery Following Composite Tissue Injuries," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, n.º 24, pág. 13552, dic. de 2021, ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms222413552. dirección: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222413552>.
- [27] C. Nathan y A. Ding, "Nonresolving Inflammation," *Cell*, vol. 140, n.º 6, págs. 871-882, mar. de 2010, ISSN: 0092-8674. DOI: 10.1016/j.cell.2010.02.029. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>.
- [28] C. Nathan, "Points of control in inflammation," *Nature*, vol. 420, n.º 6917, págs. 846-852, dic. de 2002, ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature01320. dirección: <http://dx.doi.org/10.1038/nature01320>.
- [29] C. N. Serhan y J. Savill, "Resolution of inflammation: the beginning programs the end," *Nature Immunology*, vol. 6, n.º 12, págs. 1191-1197, nov. de 2005, ISSN: 1529-2916. DOI: 10.1038/ni1276. dirección: <http://dx.doi.org/10.1038/ni1276>.

- [30] L. N. López-Bojorquez, “La regulación del factor de transcripción NF- κ B. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio,” *Revista de Investigación Clínica*, vol. 56, n.º 1, págs. 83-92, 2004, Recuperado en 05 de junio de 2024. dirección: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762004000100012&lng=es&tlng=es.
- [31] A. Mantovani, C. Garlanda y M. Locati, “Macrophage Diversity and Polarization in Atherosclerosis: A Question of Balance,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 29, n.º 10, págs. 1419-1423, oct. de 2009, ISSN: 1524-4636. DOI: 10.1161/atvbaha.108.180497. dirección: <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.180497>.
- [32] I. F. Charo y R. M. Ransohoff, “The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation,” *New England Journal of Medicine*, vol. 354, n.º 6, págs. 610-621, feb. de 2006, ISSN: 1533-4406. DOI: 10.1056/nejmra052723. dirección: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra052723>.
- [33] A. Vazquez, *Las células cebadas y su papel en la inflamación*, INVDES, feb. de 2022. dirección: <https://invdes.com.mx/los-investigadores/las-celulas-cebadas-y-su-papel-en-la-inflamacion/>.
- [34] T. Tanaka, M. Narazaki y T. Kishimoto, “IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 6, n.º 10, a016295-a016295, sep. de 2014, ISSN: 1943-0264. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295. dirección: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>.
- [35] C. A. Dinarello, “Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family,” *Annual Review of Immunology*, vol. 27, n.º 1, págs. 519-550, abr. de 2009, ISSN: 1545-3278. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612. dirección: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.
- [36] *Oregano*, ago. de 2002. DOI: 10.1201/b12591. dirección: <http://dx.doi.org/10.1201/b12591>.
- [37] S. Lin, *What is oregano?* Simply Recipes, mar. de 2023. dirección: <https://www.simplyrecipes.com/what-is-oregano-7111920>.
- [38] C. C. Arcila-Lozano, G. Loarca-Piña, S. Lecona-Urbe y E. González de Mejía, “El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes,” *Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN)*, vol. 54, n.º 1, págs. 100-111, 2004, ISSN: 0004-0622. dirección: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100015&lng=es&nrm=iso.
- [39] I. Bautista-Hernández, C. N. Aguilar, G. C. G. Martínez-Ávila et al., “Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) as Source of Bioactive Compounds: A Review,” *Molecules*, vol. 26, n.º 17, pág. 5156, 2021, Published 2021 Aug 25. DOI: 10.3390/molecules26175156.
- [40] M. Pascual, K. Slowing, E. Carretero, D. Sánchez Mata y A. Villar, “Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 76, n.º 3, págs. 201-214, 2001, ISSN: 0378-8741. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3). dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874101002343>.

- [41] S. Ksouri, S. Djebir, A. A. Bentorki, A. Gouri, Y. Hadeif y A. Benakhla, “Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis,” *Journal of Mycology and Medical Mycology*, vol. 27, n.º 2, págs. 245-249, 2017. DOI: 10.1016/j.mycmed.2017.03.004.
- [42] E. Apostolidis, Y. I. Kwon y K. Shetty, “Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 128, n.º 2, págs. 317-324, 2008. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.012.
- [43] R. Kotan, Ş. Kordali y A. Cakir, “Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes,” *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences*, vol. 62, n.º 7-8, págs. 507-513, 2007. DOI: 10.1515/znc-2007-7-808.
- [44] L. Caballero-Gutiérrez y G. F. Gonzáles, “Alimentos con efecto anti-inflamatorio,” *Acta Médica Peruana*, vol. 33, n.º 1, págs. 50-64, 2016. dirección: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172016000100009&lng=es&tlng=es.
- [45] H. A. Gómez Estrada, K. N. González Ruiz y J. D. Medina, “Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales,” *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 10, n.º 3, págs. 182-217, 2011, ISSN: 0717-7917. dirección: <http://www.blacpma.usach.cl>.
- [46] G. Yuan, M. L. Wahlqvist, G. He, M. Yang y D. Li, “Natural products and anti-inflammatory activity,” *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, vol. 15, n.º 2, págs. 143-152, 2006.
- [47] P. G. Ullauri, “Transporte de masa en extracción fase sólido-líquido,” *Revista ReCiTeIA*, 2010.
- [48] *Separation Processes*. New York: McGraw-Hill Book Company, Copyright © McGraw-Hill Book Company, ISBN: 978-84-291-9180-6. dirección: https://api.pageplace.de/preview/DT0400.9788429191806_A41179278/preview-9788429191806_A41179278.pdf.
- [49] E. I. Valarezo Tenesaca, J. S. Astudillo Echeverría, V. D. Ordóñez Paladinez, A. B. Cuenca Vaca y W. P. Leon Cueva, “Reactivos Usados para Mejorar la Lixiviación del Oro con Cianuro: Una Revisión,” *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, vol. 8, n.º 3, págs. 10874-10892, 2024. DOI: 10.37811/cl_rcm.v8i3.12248. dirección: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i3.12248.
- [50] M. G. Moreno Romero, “Elaboración de una crema orgánica con actividad antiinflamatoria a base de productos naturales,” Tesis de mtría., 2022.
- [51] S. Rodríguez-Barona, G. I. Giraldo y L. M. Montes, “Encapsulación de alimentos probióticos mediante liofilización en presencia de prebióticos,” *Información Tecnológica*, vol. 27, n.º 6, págs. 135-144, 2016.
- [52] A. S. Macassi y O. L. de Ugaz, “Liofilización,” *Revista de Química*, vol. 9, n.º 2, págs. 173-183, 1995.

- [53] National Human Genome Research Institute, *Expresión génica*, <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Expresion-genica>, Consultado el 10 de junio de 2024, 2024.
- [54] *Control de la expresión génica*, <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2036&ionid=153037586>, Consultado el 10 de junio de 2024.
- [55] S. Ghosh y M. S. Hayden, “New regulators of NF-kappaB in inflammation,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, n.º 11, págs. 837-848, 2008. DOI: 10.1038/nri2423.
- [56] H. Yu, D. Pardoll y R. Jove, “STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3,” *Nat Rev Cancer*, vol. 9, n.º 11, págs. 798-809, 2009. DOI: 10.1038/nrc2734.
- [57] S. Akira, S. Uematsu y O. Takeuchi, “Pathogen recognition and innate immunity,” *Cell*, vol. 124, n.º 4, págs. 783-801, 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- [58] A. Hernández, P. M. Vasallo, A. Torres y E. Salido, “BIOLOGIA MOLECULAR Y NEFROLOGIA: Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica,” *Laboratorio de Medicina*, vol. 14, n.º 2, págs. 145-162, 1994, ISSN: 02116995. dirección: <https://www.revistanefrologia.com/es-analisis-del-rna-estudio-expresion-articulo-X0211699594006120>.
- [59] C. Cheng, Y. Zou y J. Peng, “Oregano Essential Oil Attenuates RAW264.7 Cells from Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response through Regulating NADPH Oxidase Activation-Driven Oxidative Stress,” *Molecules*, vol. 23, n.º 8, pág. 1857, 2018. DOI: 10.3390/molecules23081857.
- [60] J. A. Baur y D. A. Sinclair, “Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence,” *Nat Rev Drug Discov*, vol. 5, n.º 6, págs. 493-506, 2006. DOI: 10.1038/nrd2060.
- [61] R. D. Kornberg, “The molecular basis of eukaryotic transcription,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, n.º 32, págs. 12 955-12 961, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0704138104.
- [62] R. Medzhitov, “Origin and physiological roles of inflammation,” *Nature*, vol. 454, n.º 7203, págs. 428-435, 2008. DOI: 10.1038/nature07201.
- [63] D. P. Bartel, “MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function,” *Cell*, vol. 116, n.º 2, págs. 281-297, 2004. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- [64] K. D. Taganov, M. P. Boldin, K. J. Chang y D. Baltimore, “NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, n.º 33, págs. 12 481-12 486, 2006. DOI: 10.1073/pnas.0605298103.
- [65] J. B. Pierce, H. Zhou, V. Simion y M. W. Feinberg, “Long Noncoding RNAs as Therapeutic Targets,” *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1363, págs. 161-175, 2022. DOI: 10.1007/978-3-030-92034-0_9.
- [66] T. Yoshida, Y. Naito, H. Yasuhara y et al., “Evaluation of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides using human cells,” *Genes Cells*, vol. 24, n.º 12, págs. 827-835, 2019. DOI: 10.1111/gtc.12730.
- [67] S. A. Bustin, “Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems,” *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 29, n.º 1, págs. 23-39, 2002. DOI: 10.1677/jme.0.0290023.

- [68] B. J. Hindson, K. D. Ness, D. A. Masquelier et al., “High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number,” *Analytical Chemistry*, vol. 83, n.º 22, págs. 8604-8610, 2011. DOI: 10.1021/ac202028g.
- [69] S. B. Malpica-Acosta, A. A. Acosta-Osorio, J. J. Benedito-Fort y R. I. Castillo-Zamudio, “Efecto de tres métodos de extracción en el rendimiento, actividad antioxidante, fenoles totales y estabilidad de extractos de hojas de *Plectranthus amboinicus*,” *CienciaUAT*, vol. 18, n.º 2, págs. 91-106, 2024, Epub 16 de agosto de 2024. DOI: 10.29059/cienciauat.v18i2.1797. dirección: <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v18i2.1797>.
- [70] M. d. M. Calvo Bernal, E. Pérez Campos, A. Aparicio Mota y Á. Hernández Martínez, “Evaluación de la calidad de vida de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal,” *Gastroenterología y Hepatología*, 2024, ISSN: 0210-5705. DOI: 10.1016/j.gastrohep.2024.502192. dirección: <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-avance-resumen-evaluacion-calidad-vida-pacientes-con-S021057052400150X>.
- [71] J. R. Vane y R. M. Botting, “Mechanism of action of antiinflammatory drugs,” *International Journal of Tissue Reactions*, vol. 20, n.º 1, págs. 3-15, 1998.
- [72] M. Knez Hrnčič, D. Cör, J. Simonovska, Ž. Knez, Z. Kavrakovski y V. Rafajlovska, “Extraction Techniques and Analytical Methods for Characterization of Active Compounds in *Origanum* Species,” *Molecules*, vol. 25, n.º 20, pág. 4735, 2020. DOI: 10.3390/molecules25204735.
- [73] A. Michalaki, H. C. Karantonis, A. S. Kritikou, N. S. Thomaidis y M. E. Dasenaki, “Ultrasound-Assisted Extraction of Total Phenolic Compounds and Antioxidant Activity Evaluation from Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) Using Response Surface Methodology and Identification of Specific Phenolic Compounds with HPLC-PDA and Q-TOF-MS/MS,” *Molecules*, vol. 28, n.º 5, pág. 2033, 2023. DOI: 10.3390/molecules28052033.
- [74] E. P. Gutiérrez-Grijalva, M. A. Picos-Salas, N. Leyva-López, M. S. Criollo-Mendoza, G. Vazquez-Olivo y J. B. Heredia, “Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits,” *Plants (Basel)*, vol. 7, n.º 1, pág. 2, 2017. DOI: 10.3390/plants7010002.
- [75] J. D. Connolly y R. A. Hill, “ChemInform Abstract: Triterpenoids,” *ChemInform*, vol. 30, n.º 26, 1999. DOI: 10.1002/chin.199926302.
- [76] M. Iorizzo, B. Testa, S. J. Lombardi et al., “Antimicrobial Activity against *Paenibacillus* larvae and Functional Properties of *Lactiplantibacillus plantarum* Strains: Potential Benefits for Honeybee Health,” *Antibiotics (Basel)*, vol. 9, n.º 8, pág. 442, jul. de 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9080442.
- [77] J. Luisetti, H. Lucero y M. C. Ciappini, “Estudio preliminar para optimizar la extracción de compuestos fenólicos bioactivos de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd),” *Revista de Ciencia y Tecnología*, n.º 33, págs. 1-10, 2020. dirección: https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-75872020000100012&lng=es&tlng=es.
- [78] M. Salamanca García y M. Sánchez Bermúdez, *Extracción y caracterización de la oleorresina del orégano (Origanum vulgare)*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira, 2009, Disponible en línea. dirección: <https://hdl.handle.net/11059/1839>.

- [79] I. M. Bodea, G. M. Cătunescu, A. P. David et al., “Optimization of microwave assisted extraction of bioactive compounds in oregano and lovage ethanolic extracts,” *LWT*, vol. 212, pág. 116973, 2024, ISSN: 0023-6438. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116973>. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643824012568>.
- [80] Y. Li, D. Kong, Y. Fu, M. R. Sussman y H. Wu, “The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants,” *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 148, págs. 80-89, 2020. DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
- [81] N. Coşkun, S. Sarıtaş, Y. Jaouhari, M. Bordiga y S. Karav, “The Impact of Freeze Drying on Bioactivity and Physical Properties of Food Products,” *Applied Sciences*, vol. 14, pág. 9183, 2024. DOI: 10.3390/app14209183. dirección: <https://doi.org/10.3390/app14209183>.
- [82] S. Krim, R. Rihani, L. Marchal, A. Foucault, F. Bentahar y J. Legrand, “Two-phase solvent extraction of phenolics from *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum*,” *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, vol. 20, pág. 100273, 2021, ISSN: 2214-7861. DOI: 10.1016/j.jarmap.2020.100273. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214786120300346>.
- [83] D. Wu y A. I. Cederbaum, “Ethanol Cytotoxicity to a Transfected HepG2 Cell Line Expressing Human Cytochrome P4502E1,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, n.º 39, págs. 23914-23919, 1996, ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.271.39.23914. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818401676>.
- [84] A. Altemimi, N. Lakhssassi, A. Baharlouei, D. G. Watson y D. A. Lightfoot, “Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts,” *Plants (Basel)*, vol. 6, n.º 4, pág. 42, 2017. DOI: 10.3390/plants6040042.
- [85] A. Böyum, “Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g,” *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation Supplement*, vol. 97, págs. 77-89, 1968.
- [86] J. C. Illera, P. Millán, M. M. Martínez-Mateos et al., *Factores biológicos: repercusión sobre los resultados experimentales*, Accedido el 22 de noviembre de 2024, n.d. dirección: <https://www.racve.es/publicaciones/factores-biologicos-repercusion-en-los-resultados-experimentales/>.
- [87] P. Marco-Casanova, N. Lukashchuk, B. Lombardi et al., “Preparation of Peripheral Blood Mononuclear Cell Pellets and Plasma from a Single Blood Draw at Clinical Trial Sites for Biomarker Analysis,” *Journal of Visualized Experiments*, vol. 169, e60776, 2021. DOI: 10.3791/60776.
- [88] A. Puleo, C. Carroll, H. T. Maecker y R. Gupta, “Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Vacutainer® Cellular Preparation Tubes (CPT™),” *Bio-Protocol*, vol. 7, n.º 2, e2103, 2017. DOI: 10.21769/BioProtoc.2103.
- [89] H. W. Grievink, T. Luisman, C. Klufft, M. Moerland y K. E. Malone, “Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality,” *Biopreservation and Biobanking*, vol. 14, n.º 5, págs. 410-415, 2016. DOI: 10.1089/bio.2015.0104.

- [90] J. J. Anzinger, G. G. Olinger y G. T. Spear, “Donor variability in HIV binding to peripheral blood mononuclear cells,” *Virology Journal*, vol. 5, pág. 95, ago. de 2008. DOI: 10.1186/1743-422X-5-95.
- [91] S. Schreier, P. Sawaisorn, R. Udomsangpetch y W. Triampo, “Advances in rare cell isolation: an optimization and evaluation study,” *Journal of Translational Medicine*, vol. 15, n.º 1, pág. 6, 2017. DOI: 10.1186/s12967-016-1108-1.
- [92] HIV/AIDS Network Coordination (HANC), *Cross-Network PBMC Processing SOP*, n.d. dirección: <https://www.hanc.info/resources/sops-guidelines-resources/laboratory/cross-network-pbmc-processing-sop.html>.
- [93] M. V. Doménech, A. Hernández, C. Ricós et al., “Variación biológica en patologías: revisión de datos y consecuencias clínicas,” *Revista del Laboratorio Clínico*, vol. 1, n.º 1, págs. 17-23, 2008, ISSN: 1888-4008. DOI: 10.1016/S1888-4008(08)74950-X. dirección: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-del-laboratorio-clinico-282-articulo-variacion-biologica-patologias-revision-datos-S188840080874950X>.
- [94] P. Chomczynski y N. Sacchi, “Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction,” *Analytical Biochemistry*, vol. 162, n.º 1, págs. 156-159, 1987. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90021-2.
- [95] D. C. Rio, J. Ares M., G. J. Hannon y T. W. Nilsen, “Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent),” *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2010, n.º 6, pdb.prot5439, 2010. DOI: 10.1101/pdb.prot5439.
- [96] S. Lightfoot, R. Salowsky y C. Buhlmann, “RNA integrity number: towards standardization of RNA quality assessment for better reproducibility and reliability of gene expression experiments,” *Breast Cancer Research*, vol. 7, n.º Suppl 2, P7.05, 2005. DOI: 10.1186/bcr1197. eprint: 2005Jun17.
- [97] Sigma-Aldrich, *GenElute™-E Viral RNA/DNA Swab Kit*, 2024. dirección: <https://www.sigmaaldrich.com/>.
- [98] Qiagen, *QIAamp Viral RNA Mini Kit*, 2024. dirección: <https://www.qiagen.com/>.
- [99] New England Biolabs (NEB), *Monarch® Total RNA Miniprep Kit*, 2024. dirección: <https://www.neb.com/>.
- [100] B. Sultana, F. Anwar y M. Ashraf, “Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts,” *Molecules*, vol. 14, págs. 2167-2180, 2009. DOI: 10.3390/molecules14062167. dirección: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14062167>.
- [101] S. Fleige y M. W. Pfaffl, “RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance,” *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 27, n.º 2-3, págs. 126-139, 2006. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.003.
- [102] M. W. Pfaffl, “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR,” *Nucleic Acids Research*, vol. 29, n.º 9, e45, 2001. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.
- [103] C. A. Dinarello, “Proinflammatory cytokines,” *Chest*, vol. 118, n.º 2, págs. 503-508, 2000. DOI: 10.1378/chest.118.2.503.
- [104] W. Schulte, J. Bernhagen y R. Bucala, “Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2013, pág. 165974, 2013. DOI: 10.1155/2013/165974.

- [105] J.-F. Rossi, Z.-Y. Lu, M. Jourdan y B. Klein, “Interleukin-6 as a therapeutic target,” *Clinical Cancer Research*, vol. 21, n.º 6, págs. 1248-1257, 2015. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2291.
- [106] M. Działo, J. Mierziak, U. Korzun, M. Preisner, J. Szopa y A. Kulma, “The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, n.º 2, pág. 160, 2016. DOI: 10.3390/ijms17020160.
- [107] L. Shen, J. M. Smith, Z. Shen, S. B. Hussey, C. R. Wira y M. W. Fanger, “Differential regulation of neutrophil chemotaxis to IL-8 and fMLP by GM-CSF: lack of direct effect of oestradiol,” *Immunology*, vol. 117, n.º 2, págs. 205-212, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02280.x.
- [108] T. S. Thring, P. Hili y D. P. Naughton, “Antioxidant and potential anti-inflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells,” *Journal of Inflammation*, vol. 8, pág. 27, 2011. DOI: 10.1186/1476-9255-8-27.

13.1. Cuadros de resultados

Cuadro 8: *Media de absorbancia A260/A230 en diferentes condiciones y tiempos de incubación*

Tiempo de incubación	Condición	Media de absorbancia A260/A230
24	Control	69.20 ± 157.40
	Extracto de orégano	1.56 ± 13.61
	PHA	33.91 ± 120.34
	Extracto de orégano + PHA	-3.73 ± 21.98
48	Control	52.08 ± 124.49
	Extracto de orégano	-20.03 ± 23.75
	PHA	-2539.16 ± 5741.09
	Extracto de orégano + PHA	-15.12 ± 27.96

Cuadro 9: Muestras de ARN con diferentes concentraciones y relaciones de absorbancia de los cultivos celulares de 24 horas

Muestra		ng/ μ l	A260/A280	A260/A230
V	1	189.4	0.47	0.16
	2	236.1	0.48	0.25
	3	294.3	0.48	0.3
	4	135.9	0.39	0.11
EH	1	328.2	0.52	-12.59
	2	370.1	0.51	-11.49
	3	228	0.44	1.78
	4	265.7	0.48	25.8
OH	1	285.7	0.51	19.56
	2	626.4	0.52	20.01
	3	325.3	0.52	277.07
	4	152.2	0.47	0.29
LH	1	302.5	0.52	389.59
	2	262	0.48	13.91
	3	324.7	0.01	-43.72
	4	230.3	0.44	1.8
AD	1	294.2	0.44	1.81
	2	252.6	0.53	1.32
	3	405.4	0.54	-8.44
	4	542.2	0.53	-8.43
J	1	275.9	0.48	16.65
	2	292.9	0.52	-14.62
	3	476.8	0.52	-23.52
	4	316.9	0.52	-41.93

Cuadro 10: Muestras de ARN con diferentes concentraciones y relaciones de absorbancia de los cultivos celulares de 48 horas

Muestra		ng/ μ l	A260/A280	A260/A230
V	1	896.3	1.23	0.35
	2	883.5	1.16	0.28
	3	874.8	1.17	0.28
	4	916.3	1.22	0.33
EH	1	989.6	1.26	0.27
	2	883.4	1.15	0.33
	3	892.0	1.24	0.29
	4	888.1	1.17	0.24
OH	1	1037.6	1.13	0.25
	2	974.2	1.28	0.28
	3	941.6	1.18	0.22
	4	911.5	1.15	0.23
LH	1	851.8	1.20	0.31
	2	1039.6	1.31	0.31
	3	919.3	1.19	0.29
	4	921.2	1.18	0.27
AD	1	1011.7	1.20	0.22
	2	916.6	1.24	0.33
	3	865.0	1.05	0.17
	4	1010.7	1.11	0.21
J	1	926.1	1.21	0.30
	2	894.2	1.27	0.48
	3	817.0	1.12	0.28
	4	897.1	1.21	0.26

Cuadro 11: Muestras con diferentes concentraciones de cADN y relaciones de absorbancia de los cultivos celulares de 24 horas

Muestra		ng/ μ l	A260/A280	A260/A230
V	1	994.7	1.39	0.38
	2	906.1	1.24	0.34
	3	970.1	1.18	0.29
	4	980.9	1.35	0.63
EH	1	1010.0	1.36	0.43
	2	932.0	1.18	0.25
	3	770.5	1.11	0.28
	4	864.1	1.16	0.29
OH	1	823.9	1.13	0.21
	2	964.8	1.19	0.25
	3	900.1	1.26	0.32
	4	618.8	1.15	0.39
LH	1	892.0	1.24	0.32
	2	813.1	1.22	0.31
	3	807.6	1.21	0.27
	4	883.6	1.27	0.49
AD	1	880.2	1.24	0.49
	2	863.5	1.29	0.55
	3	1027.9	1.21	0.29
	4	950.4	1.26	0.25
J	1	759.8	0.92	0.16
	2	878.9	1.22	0.31
	3	952.7	1.17	0.22
	4	951.7	1.29	0.34