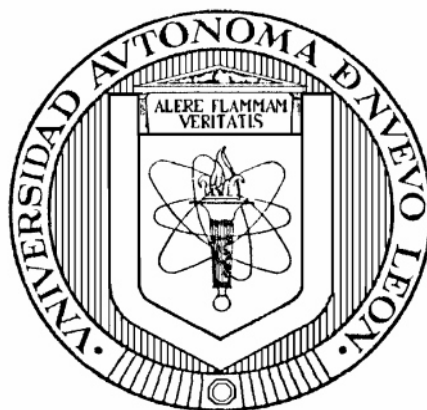


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“Evaluación del potencial inmunogénico del péptido MVTLINE de *Helicobacter pylori*, sólo o en combinación con extractos de plantas contra la infección en un modelo murino”

Por:

DAVID ALONSO ESPINOSA RAMOS

Como requisito para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN INMUNOBIOLOGÍA.

Mayo 2017

El desarrollo experimental de esta investigación se realizó en la Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

**“Evaluación del potencial inmunogénico del péptido MVTLINE de  
*Helicobacter pylori*, sólo o en combinación con extractos de plantas  
contra la infección en un modelo murino”**

**Comité de Tesis**



---

Dr. Ricardo Gómez Flores

Director Interno

---

Dra. Myriam de la Garza Ramos

Asesor Externo

---

Dra. Patricia Tamez Guerra

Secretaria

---

Dr. Edgar Mendoza Gamboa

Vocal

---

Dra. Diana Caballero-Hernández

Vocal

---

Dra. Lydia Rivera Morales

Vocal

## **DEDICATORIA**

A mi familia, especialmente a mi esposa Marcela Magdalena Guerra Lozano y a mi hijo David Alonso Espinosa Guerra.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimiento al Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores por aceptarme como su alumno, así como dirigir y asesorar este trabajo de investigación. También agradecer a la Dra. Myriam de la Garza Ramos, a la Dra. Patricia Tamez Guerra, a la Dra. Diana Caballero Hernández y la Dra. Lydia Rivera Morales, así como al Dr. Moisés Franco Molina y al Dr. Edgar Mendoza Gamboa por haber formado parte del Comité de tesis y por darme sugerencias, observaciones y correcciones para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco también al personal de la Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas especialmente a Enriqueta Monreal Cuevas por estar siempre pendiente, así como también apoyarme y enseñarme algunas de las técnicas necesarias para la realización de este trabajo. Mi agradecimiento también para con los estudiantes Luis Jerónimo Pérez Limón, Nancy Oliva y Jorge Dueñas por su apoyo durante los experimentos. A todo el personal del Laboratorio por hacerme sentir parte del mismo y apoyarme en todo lo necesario para la realización de este trabajo.

Agradecimiento especial a la Dra. Erika Coronado que aportó sus valiosos conocimientos y habilidades para la realización de la citometría de flujo.

A mis compañeros del laboratorio por hacer mi estancia muy amena y por apoyarme siempre.

A mis padres y hermanos por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo lo relacionado a mi vida escolar y familiar.

A mi esposa y a mi hijo muchas gracias.

## **TABLA DE CONTENIDO**

<b>CAPÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1.-INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>2.-HIPOTESIS</b>	<b>13</b>
<b>3.-OBJETIVO GENERAL</b>	<b>14</b>
<b>4.-OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>14</b>
<b>5.-ANTECEDENTES</b>	<b>15</b>
<b>6.-MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>7.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>38</b>
<b>8.-RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>8.-DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
<b>9.-CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>10.-PERPECTIVAS</b>	<b>57</b>
<b>11.-LITERATURA CITADA</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO 1 ARTÍCULO PUBLICADO</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO 2 PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO 3 DATOS PROLIFERACIÓN</b>	<b>70</b>
<b>12.-RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO</b>	<b>74</b>

## LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1 Grupos experimentales para el ensayo in vivo.	33
2 Calendarización del modelo de inmunización e infección	33
3 Inmunoglobulinas plasmáticas en ratón BALB/c	46
4 Efecto de extractos acuosos sobre el crecimiento in vitro de H. pylori 43504	47
5 Efecto de extractos metanólicos sobre el crecimiento in vitro de H. pylori 43504	47

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Micrografía electrónica de <i>Helicobacter pylori</i> con múltiples flagelos	16
2	Histopatología de infección por <i>Helicobacter pylori</i> en una foveola gástrica	18
3	Hojas secas y fruto de <i>Persea americana</i> Mill	24
4	<i>Gymnosperma glutinosum</i> (Spreng.) Less (Asteraceae)	25
5	Raíz de <i>Ibervillea sonora</i> Greene	26
6	<i>Pachycereus marginatus</i>	27
7	<i>Phoenix dactylifera</i>	27
8	Alojamiento de los animales experimentales.	35
9	Peso del bazo de ratones BALB/c bajo diferentes tratamientos	39
10	Proliferación de linfocitos de timo de ratón BALB/c bajo diferentes tratamientos	41
11	Cuantificación de citocinas TH1 en el plasma de ratones BALB/c bajo diferentes tratamientos.	43
12	Cuantificación de citocinas TH2 en el plasma de ratones BALB/c bajo diferentes tratamientos	44
13	Cuantificación de la citocina IL-17A en el plasma de ratones BALB/c bajo diferentes tratamientos	45
14	Efecto antimicrobiano del extracto metanólico de <i>G. glutinosum</i> sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i>	48
15	. Efecto antimicrobial del extracto metanólico de <i>G. glutinosum</i> sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i> .	49

## RESUMEN

*H. pylori* es una bacteria Gram-negativa en forma de espiral asociada con inflamación de la mucosa gástrica (gastritis crónica superficial), úlcera péptica y con el desarrollo de carcinoma gástrico, el cual es la causa de muerte más común por cáncer a nivel mundial. En la actualidad, el tratamiento indicado a pacientes con úlcera gástrica consiste en una serie de antibióticos, con efectos secundarios agresivos que pueden ocasionar graves daños a nivel sistémico. Es por ello que se han explorado otras estrategias para su tratamiento, incluyendo la evaluación de sustancias de origen natural o la vacunación para prevenir la infección utilizando péptidos obtenidos de la bacteria.

Algunos trabajos indican que compuestos fitoquímicos son capaces de inhibir el crecimiento de *H. pylori*, principalmente taninos, los cuales precipitan proteínas. Se ha demostrado que los extractos acuosos de plantas que contienen estos taninos, son capaces de eliminar esta bacteria sin afectar la viabilidad de las células epiteliales gástricas normales. Por otro lado, si bien se ha demostrado que el uso de proteínas de membrana de 52kDa de *H. pylori* sirve para inmunizar exitosamente contra el desarrollo de úlcera gástrica en modelos murinos; los estudios siguen siendo escasos.

El propósito de este proyecto fue evaluar la efectividad preventiva de la vacunación con el péptido MVTLINE, el cual forma parte de la región N-terminal de la proteína de 50-52 kD de *H. pylori*, en un modelo murino, sólo o en combinación con el efecto antimicrobiano de extractos de plantas. Los resultados de este trabajo sugieren que los extractos metanólicos de *G. glutinosum* tienen actividad inhibitoria de interés en la terapia. Sin embargo, la estrategia de vacunación empleada no mostró los resultados esperados, si bien fue posible observar una mayor respuesta inmunológica de tipo celular y humoral, no específica, en los animales inmunizados.

**Palabras Clave:** *H. pylori*, inmunógeno, úlcera péptica, modelo murino.

## **ABSTRACT**

*Helicobacter pylori* is a spiral Gram-negative bacterium associated with inflammation of the gastric mucosa, peptic ulcer, and gastric adenocarcinoma; it is one of the leading causes of cancer death worldwide. At present, the treatment indicated to patients with gastric ulcer consists of antibiotics, with aggressive side effects that can cause serious damages at systemic level. That is why other strategies have been explored for its treatment, including the evaluation of natural substances or vaccination to prevent infection using peptides obtained from the bacteria.

Some studies indicate that phytochemical compounds, mainly tannins, inhibit the growth of *H. pylori*. Aqueous plant extracts containing these tannins have been shown to be capable of removing this bacterium without affecting the viability of normal gastric epithelial cells. On the other hand, although the use of *H. pylori* 50-52kDa membrane peptides has been shown to successfully immunize the development of gastric ulcer in murine models, studies remain scarce.

The purpose of this study was to evaluate the preventive effectiveness of vaccination with the *H. pylori* peptide MVTLINE in a murine model, alone or in combination with treatment with plant extracts. The results of this work suggested that only the methanolic extracts of *G. glutinosum* possessed inhibitory activity against *H. pylori* in-vitro. However, our vaccination strategy did not show the expected results, although it was possible to observe a higher immunological non-specific cellular- type response in the immunized animals.

**Keywords:** *H. pylori*, peptide, peptic ulcer, murine model.

# 1 INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) fue originalmente descubierta por W. Jaworski, profesor de la Universidad de Jagiellonian en Cracovia a finales del siglo 19. Sin embargo, el reconocimiento patológico de inoculación de *H. pylori* en el tracto gastrointestinal superior lo realizaron los clínicos australianos Marshall y Warren quienes la aislaron por primera vez en 1982 (Dunn *et al.*, 1997).

*H. pylori* es una bacteria Gram-negativa en forma de espiral, la cual es el principal factor para el desarrollo de úlcera duodenal y se ha implicado en el desarrollo de úlcera gástrica, la cual incrementa el riesgo de cáncer de estómago, que es la neoplasia más frecuente del tubo digestivo en el mundo (Arana y Corona, 2009).

A pesar de la disminución de la incidencia del carcinoma gástrico por *H. pylori* en los últimos años, esta enfermedad todavía es la causa de muerte más común por cáncer en todo el mundo. A nivel mundial, es la cuarta causa de casos nuevos de cáncer por año, según un reporte del año 2000, con 945,000 casos nuevos (Arana y Corona, 2009).

En países desarrollados, del 70 al 90% de la población adquiere la infección antes de los 10 años de edad y sus vías de transmisión son oral-oral o fecal –oral, aunque también por iatrogenia al momento de realizar endoscopia con un tubo contaminado de persona a persona (Dunn *et al.*, 1997; Dye *et al.*, 2002).

Además de la cirugía que incluye gastrectomía parcial, se han propuesto una gran variedad de antibióticos para el tratamiento de úlcera gástrica aceptados por la FDA (Food and Drug Administration), entre los que destaca el uso de subsalicilato de bismuto, metronidazol y tetraciclina, además del uso de un agente antiácido; sin embargo, esto puede ocasionar daños a nivel sistémico, como colitis pseudo-membranosa en un 11% y candidiasis vaginal por arriba del 10% en mujeres bajo tratamiento (Dunn *et al.*, 1997).

En estudios experimentales se ha observado que el uso de péptidos de membrana de 52 kDa de *H. pylori* evaluados como vacuna, sirven para inmunizar exitosamente contra el desarrollo de úlcera gástrica cuando se utiliza en modelos murinos. Sin embargo, el aislamiento y purificación de estas proteínas presenta retos importantes, por lo que el uso de péptido sintéticos diseñados a partir de proteínas inmunogénicas se ha convertido en una opción para el desarrollo de métodos de diagnóstico y prevención.

Además del uso de péptidos de membrana de 52 kDa, existen trabajos en los que se han empleado sustancias naturales como extractos acuosos y metanólicos de plantas para inhibir el efecto de *H. pylori* y por ende sus consecuencias.

En cuanto al diagnóstico de esta enfermedad, existe una variedad de exámenes para detectar la infección por *H. pylori*, como el examen histológico de tejido gástrico, el cultivo bacteriano, el test rápido de ureasa, el uso de sondas de DNA complementado con análisis por PCR, los cuales requieren de endoscopia para la toma de muestra. En contraste, se encuentran el examen de aliento, el análisis del jugo gástrico por PCR y la excreción urinaria de amonio, que son exámenes no invasivos y que no requieren de endoscopia.

El propósito de este proyecto fue evaluar la efectividad preventiva de la vacunación con el péptido MVTLINE, diseñado a partir de una proteína inmunogénica de 52 kD de *H. pylori*, en un modelo murino, así como el potencial antimicrobiano de extractos obtenidos de plantas contra esta bacteria.

## **2 HIPÓTESIS**

El uso del péptido MVTLINNE de la región N-terminal de una proteína de 52 kD de *H. pylori* es inmunogénico en ratones y los extractos de plantas inhiben el crecimiento bacteriano.

### **3 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el potencial de la inmunización con un péptido sintético de *H. pylori* para prevenir su infección en un modelo murino, evaluar la actividad antibacteriana de extractos de plantas.

### **4 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar en un modelo murino la inmunización con el péptido MVTLINE de *H. pylori* como vacuna preventiva.
2. Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de extractos acuosos y metanólicos de plantas contra *Helicobacter pylori*.

## 5 ANTECEDENTES:

### 5.1 *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* es una bacteria Gram-negativa microaerófila en forma de espiral que mide 2.5 a 3  $\mu\text{m}$  de longitud y de 0.5 a 1.0 de ancho, además de tener de 4 a 6 flagelos de 30  $\mu\text{m}$  de largo, los cuales son esenciales para la movilidad (Shahid, 2012; Dunn *et al.*, 1997). *H. pylori* ha desarrollado un conjunto único de factores de virulencia que le permiten la sobrevivencia en un nicho ecológico único y hostil, como lo es el estómago (Montecucco y Rappuoli, 2001).

Entre los factores de virulencia de *H. pylori* se encuentran la producción de ureasa y la movilidad por flagelos. La ureasa metaboliza urea a dióxido de carbono y amonio para amortiguar el ácido gástrico. Los flagelos permiten que la bacteria se mueva hacia la mucosa gástrica y reaccione con el pH neutro por debajo de la mucosa. Una vez debajo de la mucosa, el *H. pylori* se adhiere estrechamente a las células subyacentes. Varias estructuras se han implicado en la adhesión, incluyendo lípidos, gangliósidos y carbohidratos sulfatados. Una de las mejores proteínas caracterizadas de *H. pylori* son las BabA y SabA, las cuales se unen a los antígenos de Lewis b en el epitelio gástrico y protegen a esta bacteria (Covacci *et al.*, 1999; Atherton, 1998; Cover *et al.*, 1995).

Los aislamientos de *H. pylori* se pueden clasificar como cag+ y cag- dependiendo de la presencia de la isla de patogenicidad del cromosoma (PAI) que contiene de 27 a 31 genes, denominado cag PAI, muchos de los cuales son responsables de la síntesis del sistema de secreción tipo IV (T4SS), que inyecta la oncoproteína CagA en las células epiteliales, la cual altera las uniones célula-célula del epitelio gástrico, la motilidad y la disposición del citoesqueleto e induce la expresión de un gen pro-inflamatorio y anti-apoptótico mediante la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$  B y la secreción y activación de citocinas proinflamatorias como interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),

IL-6 y IL8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Avilés-Jiménez *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori* con múltiples flagelos. Tinción negativa. Atribuible a Yutaka Tsutsumi, M.D. Professor del Departamento of Patología de la Escuela de Medicina de la Universidad Fujita.

La proteína activadora de neutrófilos (*cagA*) es una proteína de 128kDa, que está presente en un 60% de los pacientes con *H. pylori* y está asociada con el desarrollo de úlcera péptica y con la inducción de la interleucina 8 (IL-8) de las células epiteliales gástricas (Covacci *et al.*, 1999; Atherton, 1998; Cover *et al.*, 1995)

La proteína vacuolizante (*vacA*) es un polipéptido de 87kDa que se encuentra en el medio ambiente de la mucosa gástrica y es activada por ácido, y en esta activación no solo ocasiona cambios epiteliales alterando las uniones *tight*, sino que también se hace resistente a los ácidos y a la pepsina (Atherton, 1998; Montecucco y Rappuoli, 2001).

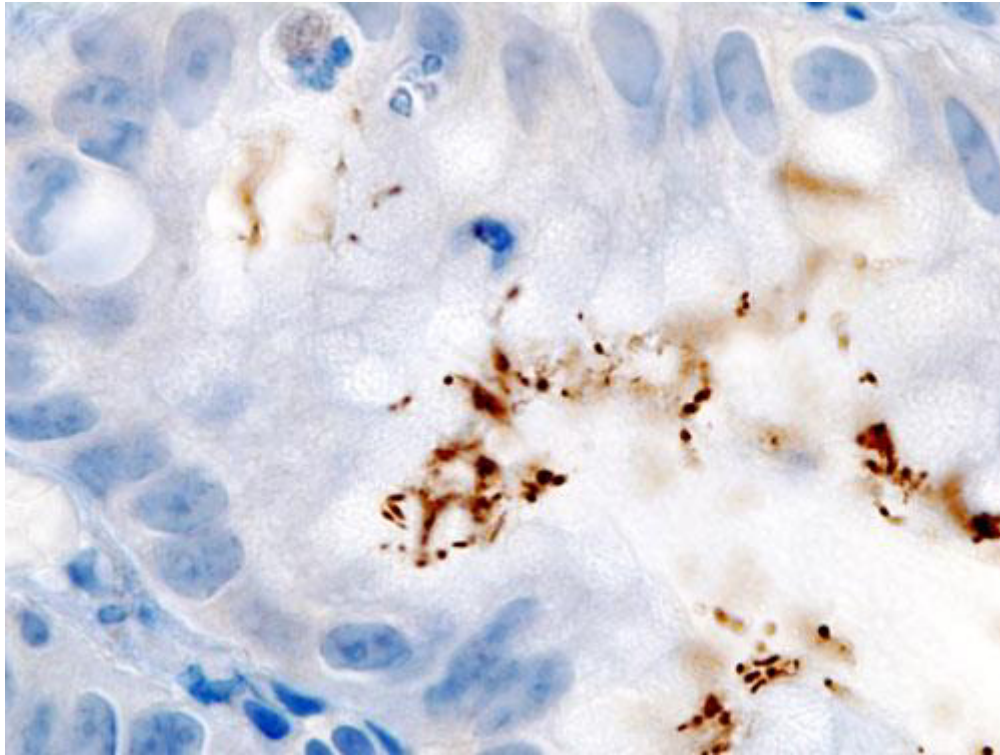
La manera en la que *H. pylori* coloniza la mucosa del estómago se debe principalmente a sus factores de virulencia. Durante la infección, la bacteria entra al lumen gástrico donde la ureasa permite la sobrevivencia de esta bacteria en un ambiente ácido por la producción de moléculas de amonio que amortiguan el pH periplásmico y del citosol, así como también del pH alrededor de la bacteria. Los flagelos impulsan a esta bacteria helicoidal hacia la capa de la mucosa y le permiten avanzar apicalmente de las células epiteliales gástricas, que mediante sus adhesinas BabA y SabA, se pegan a las células epiteliales gástricas (Montecucco y Rappuoli, 2001).

Después que *H. pylori* inyecta la proteína cagA dentro de las células huésped por el sistema de secreción tipo IV y de la liberación de otros factores como la proteína activadora de neutrófilos por *H. pylori* (HP-NAP), y de la VacA, la cual induce la alteración en las uniones *tight* y la formación de vacuolas (Montecucco y Rappuoli, 2001).

Las HP-NAP cruzan el revestimiento epitelial y reclutan neutrófilos y monocitos, los cuales al extravasarse dañan el tejido por la liberación de intermediarios de oxígeno reactivo (ROIs). La inyección de proteínas CagA causan alteración del citoesqueleto de las células epiteliales y mandan señales al núcleo para liberar citocinas proinflamatorias, las cuales amplifican la reacción inflamatoria con el reclutamiento de linfocitos que inducen la liberación de ROIs. La actividad tóxica combinada de VacA y ROIs provoca daños en el tejido y pérdida de la capa mucosa, produciendo úlcera gástrica (Montecucco y Rappuoli, 2001).

Las células de defensa que intervienen en la respuesta inflamatoria son neutrófilos, linfocitos y células dendríticas (DCs). Estas células se dirigen hacia la mucosa gástrica en donde la interacción inicial entre *H. pylori* y la respuesta inmune innata del huésped es mediada por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como los receptores tipo Toll (TLR) expresados en las células del epitelio gástrico, y a

través de los factores de virulencia de *H. pylori* CagPAI. Se ha demostrado que los receptores tipo Toll que intervienen en el reconocimiento de patrones son los TLR2 y TLR4 (Mitchell *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Histopatología de infección por *Helicobacter pylori* en una foveola gástrica obtenida por biopsia gástrica endoscópica. Inmunotinción anti-*Helicobacter*.

El reclutamiento de células dendríticas en la lámina gástrica permite presentar el antígeno por extensión de sus dendritas a través de la capa epitelial. Se demostró que la activación de células dendríticas por *H. pylori* conduce a la producción de IL-10, IL-23 y una cantidad limitada de IL-12 que estimulan la producción de IFN- $\gamma$  en células T inmaduras (Mitchell *et al.*, 2012).

Sin embargo, células T reguladoras como CD4+CD25<sup>hi</sup>FOXP3+(Treg) son capaces de suprimir la proliferación de células T efectoras como CD4+CD25-(Teff) y la producción de citocinas. Esto juega un papel crítico en el mantenimiento de una tolerancia periférica, en donde su ausencia resulta en severas enfermedades

autoinmunes. Las células T reguladoras, al mantener este balance con las células T efectoras, permiten la persistencia del patógeno (Mitchell *et al.*, 2012).

La infección por *H. pylori* resulta de la expansión de las células T reguladoras con el fin de limitar la respuesta inflamatoria en el sitio de la infección, permitiendo con esto la supresión de las células T efectoras, dando como resultado la persistencia del patógeno (Mitchell *et al.*, 2012).

## **5.2 Tratamientos antibióticos para erradicar *H. pylori*.**

Para combatir la infección por *H. pylori* existen tratamientos que involucran antibióticos, extractos de plantas, y distintos tipos de inmunización con el objetivo de evitar la colonización de esta bacteria así como también de erradicarla cuando esta se ha establecido en las células epiteliales gástricas.

Se han propuesto diferentes drogas antibióticas para erradicar *H. pylori* con un porcentaje alto; entre los antibióticos que destacan es el uso de 10 a 14 días de 20 mg de omeprazol dos veces por día o bien el uso de 1gr de amoxicilina plus, 2 veces por día pueden erradicar de un 80 al 90% esta bacteria (Ramakrishnan *et al.*, 2007).

En otro estudio se utilizó un esquema antibiótico de 7 días en pacientes infectados con *H. pylori* a base de 400 mg de ranitidina, 500 mg de metronidazol y 500 mg de claritromicina antes de las comidas, en los que observaron que el 91% de 47 pacientes erradicaron la presencia de *H. pylori* (Hoffman *et al.*, 1999).

Actualmente se sugiere el uso de 30 mg de lansoprazol, 11gramo de amoxicilina, 500 mg de claritromicina y 500 mg de metronidazol 2 veces al día durante 10 días ya que tiene una efectividad del 85.9%, así como también en pacientes alérgicos a algún medicamento el uso de 300 mg de dicitrato tripotasico de bismuto 4 veces al día, 30mg de lansoprazol 2 veces al día, 500mg de tetraciclina 4 veces al día y 500mg de metronidazol 3 veces por día durante 10 días, con una efectividad del

90.4% También el esquema tradicional para compararlos con los anteriores y consiste en el uso de 30 mg de lansoprazol, 1 gramo de amoxicilina y 500 mg de claritromicina 2 veces al día por 14 días con una erradicación del 83.7%.

En el caso de la claritromicina, se ha incrementado la resistencia de *H. pylori*, hay esencialmente tres mutaciones puntuales que pueden ocurrir en las dos posiciones de nucleótidos 2142(A2142G Y A2142C) y 2143(A2143G) en el espiral del gen peptidil transferasa 23s rRNA; estas mutaciones cambian o evitan la unión de la droga al microorganismo (Mégraud. 2012).

La *Food and Drug Administration* (FDA) aceptó otro régimen antibiótico para los pacientes con úlcera péptica, entre los que destaca el consumo de 2 tabletas de subsalicilato de bismuto (262mg), metronidazol (250mg) y tetraciclina (500mg) todos estos medicamentos tomados 4 veces al día durante 14 días para erradicar *H. pylori*, además del uso de un agente antiácido (Dunn *et al.*, 1997).

A pesar de que estos antibióticos pueden erradicar a *H. pylori*, pueden ocasionar efectos adversos en un 50% de los casos cuando se emplea una triple dosis antibiótica. Colitis pseudomembranosa en un 11% de los casos y candidiasis vaginal por arriba del 10% de los casos en mujeres (Dunn *et al.*, 1997).

### **5.3 Inmunización de ratones contra *H. pylori*.**

Se han realizado estudios en los que el objetivo principal es formar infección en ratones por medio de la inoculación de proteína activadora de neutrófilos (cagA) y proteína vacuolizante (vacA) positivas y negativas de *H. pylori* por vía intragástrica a ratones BALB/c con el fin de crear una úlcera gástrica; ellos detectaron que los ratones producían citocinas como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , que son citocinas que se liberan al activarse cagA. (Konturek *et al.*, 1999).

Se han infectado ratones BALB/c con *Lactobacillus salivarius* y *L. brevis* para determinar si estos lacto bacilos tienen algún efecto inhibitorio en la colonización de

*H. pylori* en el estómago. Se han inmunizado vía oral a estos ratones con *H. pylori* y observaron que *L. salivarius*, *L. brevis* y *L. acidophilus* evitan la colonización de *H. pylori* en el estómago de ratones BALB/c (Kabir et al.,1997).

Así mismo, con el propósito de crear tratamientos en contra de *H. pylori* en modelos murinos se desarrolló un protocolo de inmunización oral, el cual provee una respuesta vigorosa de Inmunoglobulina A anti-*H. pylori*. Ratones BALB/c y hurones se inmunizaron oralmente 4 veces por día, por un periodo de 4 semanas. Se utilizó un sonicado para obtener péptidos de membrana a las cuales se les agregó adyuvantes como la toxina del cólera (CT), en donde encontraron que los ratones inmunizados con la CT inducen significativamente la presencia de anticuerpos anti-*H. pylori* en ratones y en hurones (Czinn y Nedrud, 1991).

Se han desarrollado vacunas con péptidos de membrana de 50-52 kDa de *H. pylori* que sirven para inmunizar exitosamente contra el desarrollo de úlcera gástrica cuando se utiliza en modelos murinos, en los que se ha observado que en ratones inmunizados en las placas de Peyer disminuyen las CFU de *H. pylori* hasta en un 91 % (Dunkley et al.,1999).

Además de lo anterior, el equipo de trabajo de Dunkley identificó esta proteína de 50-52 kDa como un homólogo de la citrato sintasa, utilizando secuenciación del extremo amino, la secuencia de 17 aminoácidos obtenida fue la siguiente SVTLINNENNERYYFET, la cual además es idéntica en las subunidades de 50 y 52 kDa de la citrato sintasa.

La citrato sintasa, por su parte, es una proteína que ha sido descrita como inmunógena en patógenos como *Burkholderia multivorans* (Shinoy et al, 2013) y *Scedosporium prolificans* (Pellon et al, 2014), lo que sustenta su uso como inmunógeno, Smith y colaboradores solicitaron en 1996 la patente para proteger el uso de un péptido inmunógeno para el diagnóstico y el tratamiento de *H. pylori*, dicha propuesta se basó en los resultados de Dunkley con la proteína de 50-52 kDa, pero con modificaciones, Smith y colaboradores seleccionaron un fragmento de 8 aminoácidos de la secuencia

amino terminal original y realizaron una sustitución de una serina por una metionina, lo que produce el péptido MVTLINE que se empleó en este estudio.

#### **5.4 Tratamiento a base de extractos de plantas para eliminar *H. pylori*.**

El interés por la medicina botánica se ha incrementado en los últimos años, médicos y público en general parecen mostrar preferencia por los productos que contienen “extractos naturales” que por los productos basados en sustancias “sintéticas” (Borchers *et al.*, 2000; Torrado-Truiti *et al.*, 2003).

La variedad formidable (de 250 a 500 mil especies) y la distribución mundial de las plantas son las características deseables para explorar una nueva fuente barata y al alcance de las manos (Cowan, 1999; Fabricant y Farnsworth, 2001; Moy *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 2006; Torrado-Truiti *et al.* 2003).

En el caso específico de *H. pylori*, existen numerosos trabajos en los cuales se describen sustancias inhibitoras del crecimiento de la bacteria procedentes de plantas.

Existen compuestos fitoquímicos denominados taninos que precipitan proteínas y se ha demostrado que extractos acuosos de plantas que contienen estos compuestos, son capaces de eliminar *H. pylori* además de comprobar que estos compuestos no afectan la viabilidad de las células epiteliales gástricas (Annuk *et al.*, 1999; Funatogawa *et al.*, 2004).

Se ha observado que extractos fenólicos combinados de orégano y arándano tienen inhibición de *H. pylori* en placas de agar, inhibiendo la actividad ureasa (Lin *et al.*, 2005).

Extractos acuosos y metanólicos de plantas mexicanas tienen efecto inhibitorio en contra de *H. pylori*. Algunos extractos acuosos de *Artemisia ludoviciana* Nutt,

*Cuphea aequipetala* Cav, *Ludwigia repens* Foster y *Mentha piperita* Linn, así como también extractos metanólicos de *Persea americana* Mill, *Annona cherimola* Mill, *Guajacum coulter* A. Gray y *Moussonia deppeana* (Gesneriaceae), demostraron un efecto en contra de *H. pylori* (Castillo *et al.*, 2009).

Entre los mecanismos de acción de las plantas en contra de *H. pylori* existe la inhibición de la ureasa, actividad anti-adhesión, daño al DNA, inhibición de la síntesis proteica, así como estrés oxidativo.

Se han descrito hasta 131 compuestos fotoquímicos sintetizados por plantas capaces de tener un efecto en contra de *H. pylori* entre los que se encuentran alcoholes, fenoles simples, polifenoles, flavonoides, quinonas, coumarinas, terpenoides y alcaloides.

Los compuestos fenólicos se encuentran distribuidos en plantas y se clasifican como fenólicos, fenoles simples y polifenoles, el ácido cinámico y el ácido clorogénico son los más representativos. Los taninos son un grupo de sustancias fenólicas los cuales están divididas en taninos hidrolizables y condensados, entre los mecanismos de acción de estos compuestos son la inhibición enzimática, rompimiento de la membrana celular, así como también la inactivación de enzimas.

Existen también los terpenoides y aceites esenciales los cuales actúan a nivel de la membrana celular rompiéndola debido a sus componentes lipofílicos. En este trabajo se evaluaron los extractos de las plantas *Persea americana*, *Gymnosperma glutinosum*, *Pachycereus marginatus*, *Ibervillea sonora* y *Phaenix dactylifera*.

### ***Persea Americana* Mill**

También llamada árbol de aguacate y este puede ser recto y crece de 9 a 18 metros con un tronco de 30 a 60 centímetros de diámetro. Sus hojas son verdes oscuras y de superficie lustrosa y blanquizca en la parte posterior.

De todo el árbol se utiliza la pulpa del fruto, entre sus compuestos fitoquímicos se encuentran saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides, fenoles y esteroides, posee actividades antiinflamatorias y antifúngicas similar a *Gymnosperma glutinosum* y es usada para el tratamiento de diarrea (Gómez-Flores *et al.*, 2008; Arukwe *et al.*, 2012)



**Figura 3.** Hojas secas y fruto de *Persea americana* Mill

Se ha utilizado *Persea americana* Mill en extractos acuosos y metanólicos los cuales han demostrado tener actividad anti *H.pylori* mediante el método de dilución en agar (Castillo-Juárez *et al.*, 2009).

### ***Gymnosperma glutinosum***

Es una planta que crece aproximadamente 1.5 metros de hojas largas y delgadas, las flores crecen en racimo en la punta de la hierba y son de color amarillo, *Gymnosperma glutinosum* conocida también como como tatalencho, jarilla, mota, hierba pegajosa, escobilla y pegajosa es usada para tratar la diarrea, úlceras y reumatismo. No se han reportado estudios *in vitro* ni tampoco *in vivo* que en donde utilicen extractos acuosos y metanólicos de *Gymnosperma glutinosum* para inhibir *H.pylori* actualmente.



**Figura 4.** *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae),

### ***Ibervillea Sonorae* Greene**

Esta planta pertenece a la familia de las cucurbitáceas, la parte vegetativa de mayor importancia de *Ibervillea sonora* es la raíz de aspecto tuberculoso, que usualmente es la parte más característica y la que se comercializa. El wereke es una planta generalmente distribuida en la zona árida del norte de México. Los usos etnobotánicos de esta planta incluyen el tratamiento de padecimientos dérmicos, artritis, reumatismos y afecciones cardiacas. Dentro de la composición química reportada para esta planta cabe mencionar a los alcoholes, cetonas, alcanos y amidas, al ácido palmítico y al palmitato de metilo los cuales se asocian con actividades hipoglucemiantes (Sinagawa-Garcia *et al.*, 2015).



**Figura 5.** Raíz de *Ibervillea sonorae* Greene

Se ha evaluado el efecto anti-*H. pylori* de la raíz de *Ibervillea sonorae* Greene, la cual se ha utilizado para el tratamiento empírico de trastornos gastrointestinales. El efecto anti - *H. pylori* de extractos metanólicos de *Ibervillea sonorae* Greene mediante el método de microdilución de caldo demostró que las concentraciones mínimas oscilan entre 200 a 400µg/ mL (Robles-Zepeda *et al.*, 2011).

### ***Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose**

*Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose, es una especie fanerógama perteneciente a la familia de las Cactaceae. En México se le conoce como Cactus Órgano o Chilayo. Tiene la estructura de un árbol con un solo tallo, raramente ramificado, erguido, columnar que alcanza diámetros de 8 a 20 centímetros y una altura de 3-4 metros. Entre los compuestos fitoquímicos destacan los alcaloides y se usa principalmente en infecciones gastrointestinales y diabetes (Hernández-Martínez *et al.*, 2016).



**Figuras 6 y 7.** *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose se emplea como cerco en comunidades. Actualmente no se han realizado trabajos con extractos de esta planta que demuestren su efectividad contra *H. pylori*. **B)** *Phoenix dactylifera* Linn. Entre sus compuestos fitoquímicos se encuentran fenoles, flavonoides, taninos y antioxidantes, los cuales hacen que esta planta tenga propiedades antibacterianas, antioxidantes y antiinflamatorias (Arema *et al.*, 2013; Rahmani *et al.*, 2014).

### ***Phoenix dactylifera* Linn**

De nombre común palma (o palmera) datilera, palma común. Es una palmera frutal cuyo fruto, comestible, es el dátil, Es una palmera de tronco único a menudo con brotes en su base, de hasta 30 m de altura y 20 a 50 cm de diámetro, cubierto con los restos de las hojas viejas. Hojas espinosas, de 1,5 hasta 5 m de longitud.

La fruta y la semilla poseen actividad antioxidante. La fruta ha mejorado las úlceras gástricas mediante el aumento de la mucina gástrica y la reducción de histamina y gastrina. Se han utilizado extractos acuosos y metanólicos, así como el aceite de la semilla de la fruta de *Phoenix dactylifera* Linn para demostrar sus propiedades antioxidantes in vitro sin embargo no se han realizado estudios con extractos

acuosos y metanólicos de la hoja de esta planta para demostrar su actividad anti *H. pylori* (Hosein Farzaei *et al.*, 2013).

### **5.5 Presencia de Inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG en infecciones con *H. pylori***

En un estudio realizado por (Li *et al.*, 2003) se determinó la prevalencia de la infección por *H. pylori* y la respuesta de anticuerpos de IgG e IgM en donde la infección se detectó a 209 pacientes mediante cortes histológicos en donde se diagnosticaron 76 pacientes con gastritis atrófica crónica leve, 22 con gastritis atrófica severa, 76 con metaplasia intestinal leve, 58 con metaplasia intestinal severa y 31 con displasia intestinal. La presencia de inmunoglobulinas anti-*H. pylori* IgA e IgG se detectó mediante ELISA con kits (Bioseed Co, USA). Se observó altos niveles de inmunoglobulinas IgG e IgA en los pacientes con la infección activa. El nivel de IgG fue mayor en pacientes con severa gastritis atrófica crónica que en los pacientes con gastritis atrófica leve, en cambio los niveles de IgM e IgA incrementaron en pacientes diagnosticados con metaplasia intestinal severa comparados con aquellos diagnosticados con metaplasia intestinal leve. No se observó diferencia significativa entre los niveles de IgA e IgG en metaplasias leves y severas en presencia de la infección con *H. pylori*.

En otro estudio se analizó si la infección por *Helicobacter pylori* da lugar a respuestas específicas de células B contra factores de virulencia como la ureasa, la flagelina, y la superficie antigénica bacteriana diferente en la mucosa gástrica. Esto se estudió en biopsias de 11 pacientes infectados por *H. pylori* con úlcera duodenal, 11 pacientes portadores asintomáticos de *H. pylori* y 13 pacientes controles no infectados. Las células mononucleares se aislaron para medir la cantidad total de células secretoras de anticuerpos (ASCs) por medio de la técnica de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISPOT). Los pacientes infectados por *H. pylori* presentaron mayor cantidad de células secretoras de inmunoglobulina IgA e IgM que los sujetos no infectados, mientras células secretoras de IgG eran las mismas en los distintos grupos. En este estudio demostraron que la infección por *H. pylori* induce la

respuesta de anticuerpos en pacientes asintomáticos con la infección y en pacientes con úlcera duodenal (Mattsson *et al.*, 1998).

Khuroo *et al.*, 2011 realizaron un estudio del año 2005 al 2010 en donde siguieron a pacientes con hiperplasia linfoide nodular duodenal. Se midieron las inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG por inmunturbidometria. Los pacientes infectados con *H. pylori* recibieron 10 días de antibioticoterapia además se les realizó una endoscopía antes del tratamiento y ausencia de la infección se evaluó por medio del examen de aliento de urea C 4 a 6 semanas después de la terapia antibiótica. A estos pacientes se les realizo una endoscopia para evaluar la mucosa gástrica, 26 pacientes presentaron niveles normales de inmunoglobulinas, 14 pacientes presentaron elevados niveles de inmunoglobulinas (IgG en 6 pacientes, IgM 5 pacientes e IgA en 3 pacientes). Los niveles de inmunoglobulinas se presentaron 1.5 veces por arriba de lo normal en estos pacientes.

## 6 MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Evaluación de extractos acuosos y metanólicos

*Persea americana* Mill (Lauraceae) conocida como aguacate, *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae), *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose, *Ibervillea sonora* Green y *Phaenix dactylifera* Linn se adquirieron en el Laboratorio de Fitoquímica perteneciente a la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, misma que fue identificada en el laboratorio de fanerógamas del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. por la bióloga Ma. Consuelo González de la Rosa y la identificación fue corroborada por personal del herbario institucional de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

### 6.2 Obtención de los extractos acuosos de *Persea americana*, *Gymnosperma glutinosum*, *Pachycereus marginatus*, *Ibervillea sonora* y *Phaenix dactylifera*.

Se dejaron hervir 80ml de agua destilada en un vaso de precipitado y se colocaron 5g de pulverizado de hojas. Se homogenizó la mezcla con un agitador de vidrio y se dejó reposar durante diez minutos a temperatura ambiente. Terminado este tiempo se filtró el sobrenadante utilizando un embudo de vidrio y un papel filtro, la muestra obtenida se refrigeró (aprox. 13°C) hasta su posterior uso. Se pesaron 16 viales de vidrio de 5ml estériles sin tapón realizando las debidas anotaciones, se etiquetaron y se depositaron en ellos 2ml del filtrado previamente obtenido. Posteriormente se congelaron utilizando hielo seco en acetona, procurando que el filtrado quedará adherido a las paredes del vial. Inmediatamente después se sometieron al proceso de liofilización (Freeze dry system 7750020, LABCONCO corp., Kansas City, MI), el proceso duró aproximadamente cuatro horas. Una vez obtenido el liofilizado se pesaron de nuevo los viales sin tapón y se calculó la cantidad de extracto obtenido.

Se refrigeraron los viales hasta su uso posterior, procurando evitar contaminación, en este caso se sellaron con parafilm (Akihisa *et al.*, 2005; Holetz *et al.*, 2002; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003; Rai y Acharya, 1999).

### **6.3 Obtención de los extractos metanólicos**

Se pesaron 5g del pulverizado de hojas previamente secas al aire, el material pesado se transfirió a una gasa (10cm X 10cm) y se formó un saquito asegurándolo con un alambre. En un vaso de precipitados se depositaron aproximadamente 80ml de metanol, en este se sumerge el saquito asegurándolo a la orilla con un clip y se agregó un agitador magnético. Se selló el vaso con parafilm, se aseguró con cinta adhesiva y se colocaron sobre una base agitadora (Laboratory Stirrer PC-410, Corning, N.Y. 14831) y se mezclaron por 24 h. Mientras tanto se etiquetaron y pesaron 20 viales de 1.5 mL vacíos y estériles, y se realizaron las anotaciones necesarias. Terminadas las 24 h se transfirió un mililitro del extracto a cada vial y se refrigeró (aprox. 13°C) hasta su uso posterior. Se sometieron los extractos a un proceso de secado utilizando el SpeedVac (Desecador Centrivac de la marca Labconco), este proceso duró aproximadamente cuatro horas, al terminar se pesaron de nuevo los tubos de 1.5 mL y se realizaron los cálculos para conocer la cantidad de extracto obtenido. Se refrigeraron los extractos hasta su uso posterior, procurando evitar contaminación, en este caso se utilizó parafilm (Akihisa *et al.*, 2005; Betoni *et al.*, 2006; Holetz *et al.*, 2002; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2003; Rai y Acharya, 1999).

### **6.4 Modelo *in vivo* de inmunización e infección en el ratón BALB/c**

#### **6.4.1. Equipo y reactivos**

Solución de penicilina-estreptomicina, L-glutamina, y medios RPMI 1640 se obtuvo de Life Technologies (Grand Island, NY). Suero fetal bovino (FBS), DMSO, metanol, buffer de lisis para glóbulos rojos, PBS, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio (MTT), concanavalina A (Con A), dimetilformamida (DMF),

dodecil sulfato de sodio (SDS) y tinción de Giemsa fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

#### **6.4.2 Animales experimentales**

Se emplearon 20 ratones BALB/c, hembras libres de patógenos, de 12-14 semanas de edad al inicio del experimento, proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas (U.A.N.L.) los cuales se alojaron en jaulas con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo luz/oscuridad de 12 h (6AM-6PM), una temperatura ambiental controlada de 26-30°C y humedad relativa de 45°C.

El protocolo de uso de ratones se sometió a revisión para su aprobación por parte del Comité de Ética y Cuidado de Animales de Experimentación de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

#### **6.4.3 Péptido antigénico MVTLINNE**

El antígeno, un péptido de 8 aminoácidos, se mandó sintetizar a Genscript (Nanjing, China) con un >85% de pureza y con dos modificaciones, acetilación en el extremo amino y amidación en el extremo carboxilo (Nanjing, China). El péptido liofilizado se almacenó a -20°C hasta su uso, para la inmunización se resuspendió a una concentración de 1 mg/mL en solución salina estéril.

La secuencia del péptido evaluado es la siguiente: Metionina-Valina-Treonina-Leucina-Isoleucina-Asparagina-Asparagina-Ácido glutámico (glutamato) que de aquí en adelante se referirá por el sistema de una letra como el péptido MVTLINNE.

#### **6.4.4 Protocolo de inmunización**

Se inmunizaron dos grupos de 5 ratones cada uno, uno de los grupos fue infectado posteriormente con *H. pylori* y el otro grupo se mantuvo como control de

inmunización. Se incluyó además un grupo control de infección (infectado) y un grupo control sano, no inmunizado y no infectado. Los grupos y sus tratamientos se sintetizan en la siguiente tabla.

<b>Tabla 1. Grupos experimentales para el ensayo <i>in vivo</i>.</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción del tratamiento</b>	<b>Dosis</b>
I	Control negativo	Ratones sin inmunización, sin infección	
II	Control inmunización	Ratones inmunizados	200µg del péptido
III	Tratamiento	Ratones + infección	( <i>H. pylori</i> ; 10 <sup>9</sup> bacterias)
IV	Tratamiento	Ratones inmunizados + infección	200µg del péptido + ( <i>H. pylori</i> ; 10 <sup>9</sup> bacterias)

Los ratones recibieron una inmunización por vía subcutánea de 100µg del péptido MVTLINE de *H. pylori* acompañada de adyuvante Sigma Adjuvant System (SIGMA Aldrich), posteriormente los animales recibieron dos refuerzos con adyuvante incompleto de Freund (SIGMA Aldrich).

<b>Tabla 2. Calendarización del modelo de inmunización e infección</b>	
<b>SEMANA</b>	<b>PROCEDIMIENTO</b>
1	Inmunización – vía intraperitoneal
4	Refuerzo (inmunización) – vía subcutánea
11	Infección
12	Infección
13	Infección
14	Suspensión de infección – inicio de sacrificio y toma de muestras
15	Sacrificio y toma de muestras

#### **6.4.5 Infección con *H. pylori***

Se empleó *Helicobacter pylori* cepa ATCC 700824 el cual se mantuvo en medio Brucella en condiciones microaerofílicas a 37° C (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub>). En el contexto de bioseguridad, *Helicobacter pylori* pertenece al grupo de riesgo 2; agentes asociados con enfermedades humanas raramente serias, para las cuales siempre hay disponibles medidas preventivas y/o terapéuticas. El riesgo de diseminación de la infección es limitado (Lara-Villegas, 2007). Se siguieron por lo tanto las medidas de bioseguridad apropiadas, que incluyen el uso de equipo de protección personal como bata y guantes, procedimientos para el trabajo seguro y el manejo de los residuos (Manual de Bioseguridad OMS, 2005)

Los ratones se infectaron con *H. pylori* 6 semanas después de la inmunización. La cepa utilizada, la ATCC 700824, se ha demostrado que coloniza los estómagos de los ratones BALB/c. Se prepararon cultivos de *H. pylori* en agar Brucella por 5 días en condiciones microaerofílicas a 37°C (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub>). La concentración de *H. pylori* se determinó por conteo en cámara de Neubauer. Los ratones se infectaron por vía oral, mediante la administración en bebedero de 10<sup>9</sup>/L UFC lo largo de 3 semanas (Boehnke, 2015). Se determinó la ingesta de agua por jaula cada tercer día durante el protocolo de infección. Al final de la exposición, los animales se sacrificaron por punción cardiaca terminal y además se colectaron el bazo, timo y el estómago.

#### **6.4.6 Preparación de las muestras para análisis**

La sangre se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, se colectó el plasma y almacenó a -20°C hasta su análisis. El timo y bazo se colocaron en PBS frío, ambos se utilizaron para bioensayos de función linfocitaria y medir función inmunitaria. El bazo además se pesó en balanza analítica y se registraron los resultados. Los estómagos se cortaron por la mitad, una de las cuales se colocó en formaldehído 5%

para su posterior análisis histológico, la otra mitad se congeló en el momento en nieve carbónica y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análisis posteriores.



**Figura 8.** Alojamiento de los grupos experimentales. Se siguieron las recomendaciones de bioseguridad para un patógeno de grupo de riesgo 2.

#### **6.4.7 Ensayo de proliferación de timocitos de ratón**

La proliferación de linfocitos tímicos se determinó mediante la incorporación de MTT a las células en cultivo viables. Se prepararon suspensiones unicelulares al disgregar el timo en PBS, las suspensiones de linfocitos se lavaron en medio RPMI1640 completo (el cual contiene 10% de FBS, 1% de L-glutamina, y 0.5% de solución antibiótica), y las células finales se resuspendieron y ajustaron a  $5 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI completo. Las suspensiones celulares (100  $\mu\text{l}$ /pozo) se depositaron por triplicado en placas de 96 pozos de fondo plano (Becton Dickinson) las cuales contienen cultivos de RPMI 1640 completo el cual servirá como control no estimulado, o bien el mitógeno Concanavalina A (Con A) a la concentración de 6.25  $\mu\text{g/ml}$  para estimular la proliferación de linfocitos, en la presencia o ausencia del péptido MVTLINE.

Después de incubar por 44 horas a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire, se añadió MTT (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) a una concentración final de 0.5 mg/ml, y los cultivos se incubaron por cuatro horas adicionales. Se añadieron 100 µl de buffer para lisis celular (50% de DMF + 50% SDS al 20%) a cada pozo, y se incubaron durante toda la noche. Al terminar esta incubación, se leyeron las densidades ópticas a 540nm en un lector de microplacas. Se utilizaron las respuestas proliferativas de linfocitos tímicos expuestos a Con A para el análisis de datos.

#### **6.4.8 Evaluación de los niveles de citocinas Th1/Th2 en suero**

Después de sacrificar los ratones se determinó la concentración de interleucinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF por medio de citometría de flujo, utilizando el equipo Accuri C6 (BD, Ann Arbor, MI, USA), y el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences).

#### **6.4.9 Evaluación de los isotipos de inmunoglobulinas (IgA, IgM e IgG) en suero**

Se determinó la presencia de inmunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 IgM, IgA por medio de citometría de flujo, se utilizó el equipo Accuri C6 (BD, Ann Arbor, MI, USA), y el kit *BD*<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit.

#### **6.5 Determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC)**

Se tomaron 50 µl de la suspensión bacteriana en caldo Brucella, y se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning Incorporated), en presencia o ausencia de diluciones seriadas (1:2) de los extractos acuosos o metanólicos de *G. glutinosum* (50 µl), antibiótico control (tetraciclina 5 µg/ml) y controles del vehículo (metanol y medio de cultivo). Posteriormente, se prepararon diluciones 1:10,000 a partir de los pozos y se sembraron 100 µl en placas agar Brucella (Difco). Las placas se incubaron a 37°C por 24h, al final de las cuales se contaron las colonias en un contador de

colonias (ULB-100, Lightbox 37864-2000, Scienceware BEL-ART products, Pequannock, NJ). El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó como sigue:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \frac{A_{570} \text{ o CFU/ml de células tratadas con extracto}}{A_{570} \text{ o CFU/ml de células no tratadas}} \times 100$$

#### **6.6 Determinación de la viabilidad bacteriana mediante el método colorimétrico de reducción del bromuro de (3-4,5 dimetil-2 tiazol)-2,5 difenil- 2H tetrazolio (MTT).**

Se colocaron 100µL del extracto a una concentración de 1mg/ml en cada pozo de la fila A de la caja de 96 pozos (Becton Dickinson, Lincoln Park, N.J.) y se agregaron 50µL del medio de cultivo (caldo Brucella) en las 7 filas restantes (B, C, D, E, F, G y H), posteriormente se realizan diluciones seriadas con relación 1:2. A parte, en la misma placa se usaron tres réplicas del control positivo, que consistían en 50µL de tetraciclina a 5 µg/mL

Para el control negativo se agregaron 50 µL del medio de cultivo solamente. Se agregaron 50µL de la solución de  $2.5 \times 10^5$  bacterias/mL a todos los pozos, de manera que el volumen final fue de 100µL. La concentración final de los extractos es de 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 y 7.8µg/mL respectivamente. Se incubó la placa por 6 horas a 37°C. Se agregaron 10µL de MTT por pozo y se dejó a incubar aproximadamente 15 min, o bien, hasta que se presentó un cambio en la coloración de los controles positivos. Se colocaron 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) con el fin de disolver los cristales de azul de formazán y se realizó una homogenización y se midieron las absorbancias en un lector de microplacas a 540nm (Microplate autoreader, Molecular Devices Corporation, Palo Alto, CA) (Gomez-Flores *et al.*, 1995).

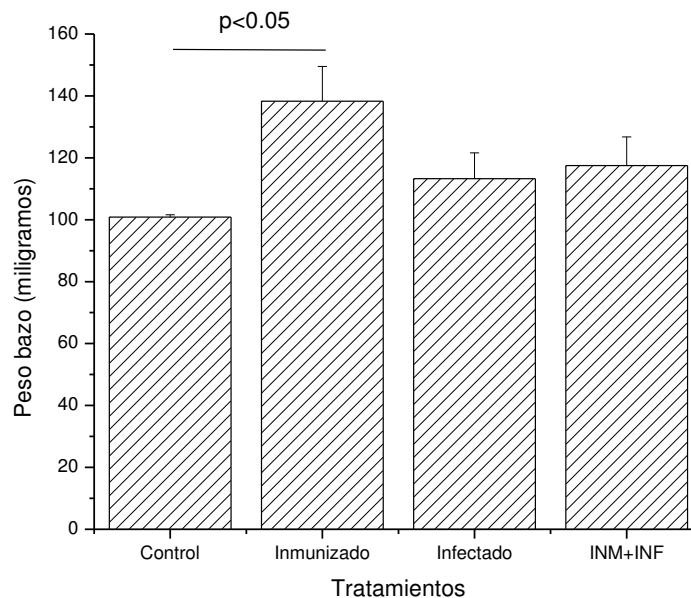
## 6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba ANOVA de una vía considerando una  $p \leq 0.05$  para determinar si existe diferencia entre los grupos experimentales para cada una de las determinaciones, en el caso de encontrar diferencia entre los grupos experimentales se realizó una prueba Tukey para comparación de medias. Se utilizó el website para análisis estadístico VassarStats, de libre acceso en el sitio at <http://vassarstats.net/>.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Modelo *in vivo*: inmunización e infección

En el modelo *in vivo* se emplearon 4 grupos experimentales con una  $n=5$ , el grupo control no recibió ningún tratamiento, el grupo inmunizado recibió una inmunización y un refuerzo, al grupo infectado se le administró durante 3 semanas *H. pylori* en el agua de beber y finalmente el grupo INM+INF fue inmunizado y recibió *H. pylori* en el agua de beber. Al finalizar el experimento, los animales fueron sacrificados para la toma de muestras, se extrajo con cuidado el bazo y se pesó en balanza analítica, los resultados se pueden ver en a Figura 9. Como se puede ver, el peso del bazo fue significativamente mayor en los animales inmunizados ( $138.3 \pm 11.23$  miligramos), cuando se le compara con el grupo control sin tratamiento ( $100.8 \pm 0.74$  miligramos). Aunque los animales infectados con *H. pylori* y los inmunizados e infectados también mostraron un mayor peso, esta diferencia no alcanzó significancia.



**Figura 9.** Peso del bazo de ratones BALB/c bajo diferentes tratamientos al finalizar el experimento. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 5 animales por

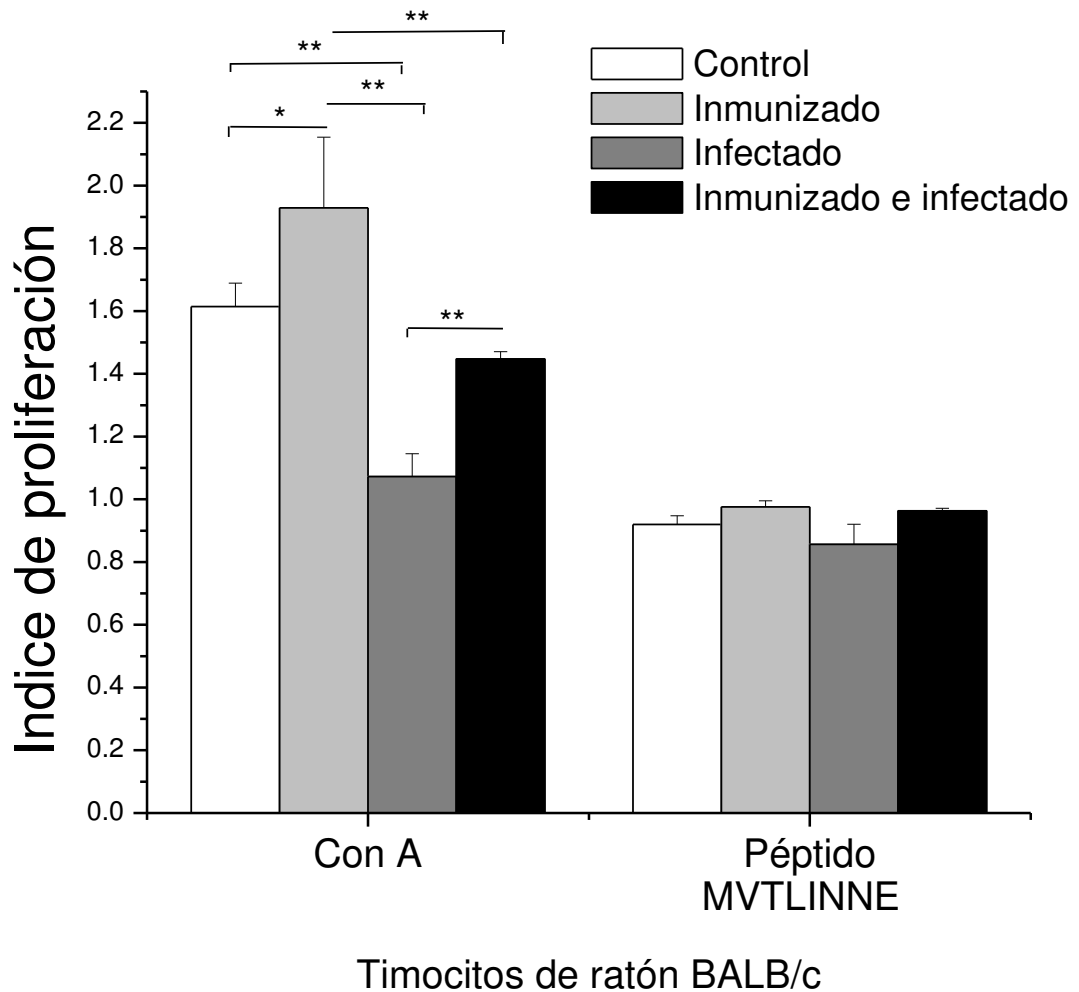
tratamiento. La significancia estadística se determinó considerando  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ .

En la Figura 10, por su parte, pueden verse los resultados del análisis de la respuesta proliferativa de los timocitos de los ratones bajo los diferentes tratamientos. El timo, una vez extraído y pesado, se disgregó en medio RPMI completo y se prepararon cultivos de timocitos, como ya se describió en Material y Métodos. El objetivo de esta prueba fue, primero, determinar la capacidad proliferativa de los timocitos ante un mitógeno conocido, segundo, determinar si los timocitos de animales inmunizados o infectados respondían al antígeno utilizado como inmunógeno. De esta manera se evaluó el efecto de las diferentes condiciones sobre la respuesta inmunitaria de los animales.

La respuesta proliferativa de timocitos es una forma importante en que el sistema inmune responde a las infecciones. La concanavalina A es el mitógeno más empleado para estimular la proliferación de timocitos de ratón. En este trabajo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta a la concanavalina A. Los animales inmunizados mostraron índices de respuesta proliferativa significativamente mayor ( $1.92 \pm 0.22$ ) que los animales control sin tratamiento ( $1.61 \pm 0.074$ ). Por su parte, los animales infectados mostraron una respuesta significativamente menor ( $1.07 \pm 0.073$ ) cuando se les comparó con los controles no tratados y con los animales inmunizados con el péptido. Finalmente, los animales inmunizados y posteriormente infectados (INM+IFN) mostraron una respuesta proliferativa ( $1.44 \pm 0.023$ ) que no fue estadísticamente diferente a la de los controles no tratados, pero sí fue mayor a la de los animales infectados.

Los resultados indican que la inmunización con el péptido fue exitosa en estimular la inmunidad celular medida como la respuesta proliferativa de timocitos. Los resultados indican que la infección de 3 semanas con *H. pylori* suprime la respuesta proliferativa de timocitos y que esta supresión se revierte o previene en los animales inmunizados con el péptido inmunógeno (Fig. 10).

En cuanto a la respuesta proliferativa en presencia del péptido inmunogénico, no se observaron diferencias en ninguna de las condiciones con respecto a los animales no tratados, lo que sugiere que la estimulación de la respuesta proliferativa por la inmunización no es específica del inmunógeno (Fig. 6).



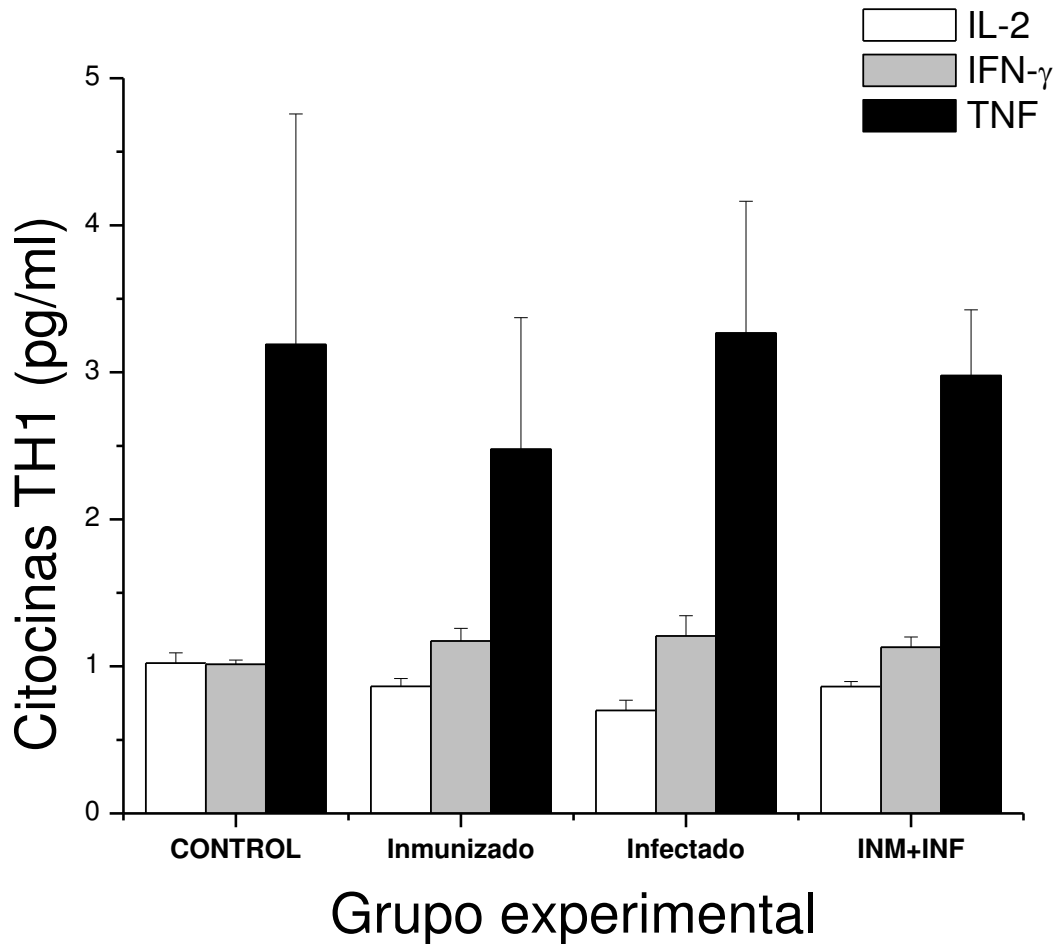
**Figura 10.** Proliferación de linfocitos de timo de ratón BALB/c bajo diferentes tratamientos. Se extrajo el timo, se maceró y se prepararon cultivos de timocitos, se determinó su respuesta proliferativa al mitógeno de concanavalina A (6µg/ml) y al péptido MVTLINE (10 µg/ml). El índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada condición con respecto al observado en el grupo control (células

solas) cuyo índice de crecimiento por lo tanto = 1. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de determinaciones por cuadruplicado de 5 ratones. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  en comparación con el control no inmunizado o infectado.

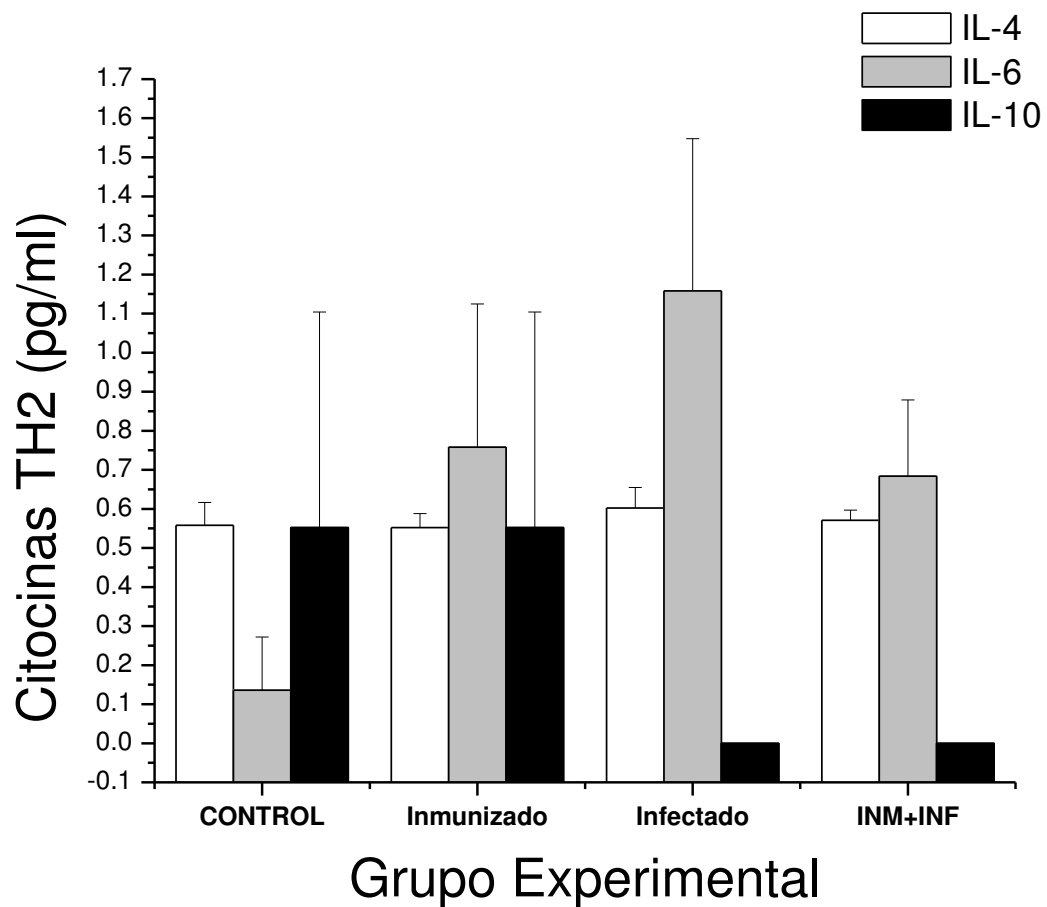
Se determinó también la concentración de citocinas circulantes en los animales experimentales, como una medida de la respuesta inmune celular. Las citocinas determinadas consistieron en las llamadas TH1 (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF) y TH2 (IL-4, IL-6 e IL-10) además de la citocina TH17. Las citocinas TH1 y TH2 reflejan el equilibrio entre la respuesta celular y humoral, respectivamente. En este estudio, no fue posible concluir algo a partir de estas determinaciones, ya que de acuerdo al análisis estadístico no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales, para ninguna de las citocinas medidas. Esta falta de respuesta pudo tener varios motivos, principalmente técnicos, los cuales se discutirán más adelante en este documento. A pesar de la estadística es posible apreciar algunas tendencias en los resultados.

De acuerdo a los resultados, la respuesta inmunológica de los animales tendió al tipo TH2, ya que las citocinas TH1 mostraron poco o ningún cambio entre los tratamientos (Fig.11). En cuanto a la respuesta TH2, se puede observar que la IL-10 se encuentra ausente en el grupo infectado y en el grupo INM+IFN, a diferencia del grupo control y el grupo inmunizado donde si se observa producción de la misma. Por su parte, la IL-6 se presenta niveles más elevados en los animales inmunizados e infectados, a comparación del control, situación que se revierte en los animales inmunizados e infectados, de haber resultado significativo desde la estadística, esto sugiere que la infección por *H. pylori* induce un estado inflamatorio que se previene parcialmente con la inmunización (Fig. 8).

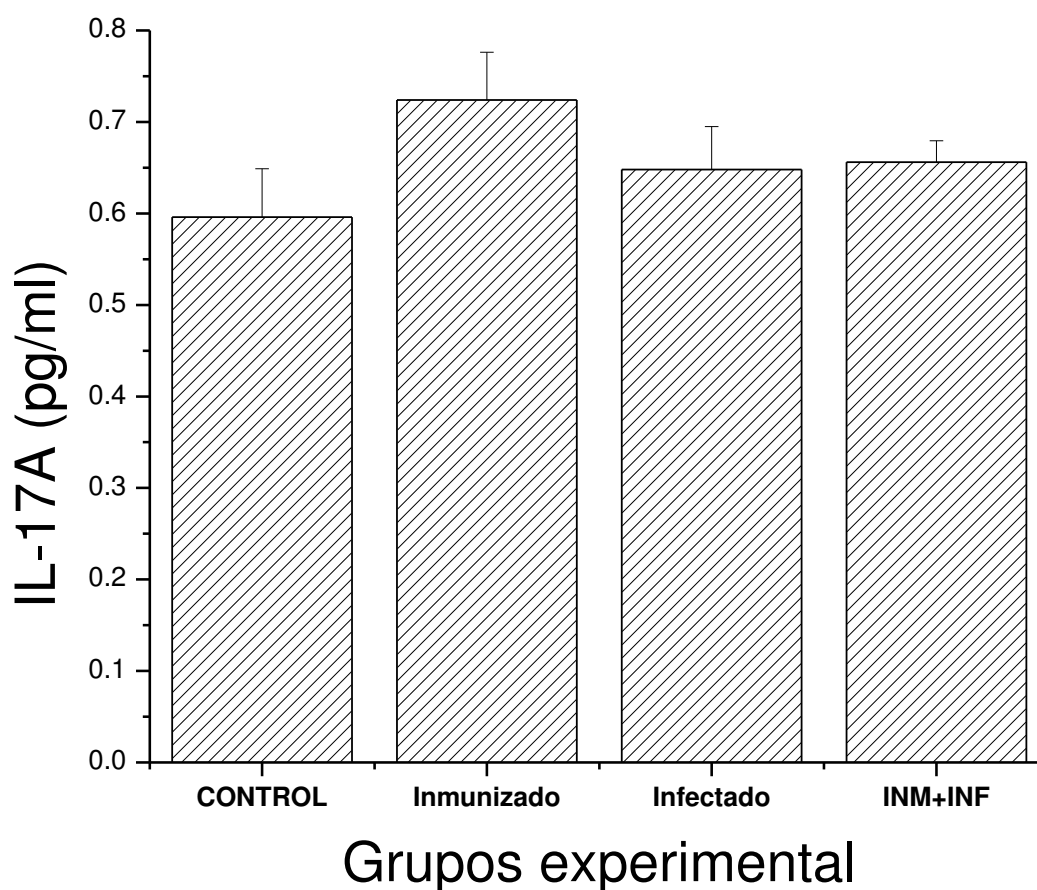
Finalmente la citocina IL-17 mostró niveles marginalmente mayores en animales inmunizados a comparación del control, sin embargo, de acuerdo al análisis no hay diferencias estadísticamente significativas para este parámetro (Fig. 9).



**Figura 11.** Cuantificación de citocinas TH1 en el plasma de ratones BALB/c bajo diferentes tratamientos. Al finalizar el experimento de inmunización e infección, se obtuvo sangre por punción cardiaca terminal. La sangre se centrifugó para obtener plasma, el cual se almacenó hasta su análisis. La cuantificación se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 5 ratones. La significancia estadística se determinó considerando \* $p < 0.05$ , \*\*  $< 0.01$



**Figura 12.** Cuantificación de citocinas TH2 en el plasma de ratones BALB/c bajo diferentes tratamientos. Al finalizar el experimento de inmunización e infección, se obtuvo sangre por punción cardiaca terminal. La sangre se centrifugó para obtener plasma, el cual se almacenó hasta su análisis. La cuantificación se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 5 ratones. La significancia estadística se determinó considerando  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$



**Figura 13.** Cuantificación de la citocina IL-17A en el plasma de ratones BALB/c bajo diferentes tratamientos. Al finalizar el experimento de inmunización e infección, se obtuvo sangre por punción cardiaca terminal. La sangre se centrifugó para obtener plasma, el cual se almacenó hasta su análisis. La cuantificación se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de 5 ratones. La significancia estadística se determinó considerando  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$

Los resultados del análisis de inmunoglobulinas plasmáticas muestran perfiles específicos a los diferentes tratamientos empleados, como se puede ver en la siguiente tabla. De acuerdo a estos resultados, la inmunización con el péptido induce una respuesta inmune de tipo secundaria, más diversa en el grupo inmunizado e infectado. Mientras que en los grupos control e infectado solo se observaron inmunoglobulinas tipo M.

<b>Tabla 3. Inmunoglobulinas plasmáticas en ratón BALB/c</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Isotipo</b>
I	Control negativo	Ratones sin inmunización, sin infección	IgM
II	Control inmunización	Ratones inmunizados	R1: IgM, IgA, IgG2a, IgG1 R2: IgM, IgA, IgG1 R3: IgM, IgA, IgG1 R4: IgM R5: IgM
III	Infección	Ratones + infección	IgM
IV	Tratamiento	Ratones inmunizados + infección	R1: IgM, R2: IgM, IgG3, IgG1 R3: IgM, IgA, IgG3, IgG2b, IgG2a, IgG1 R4: IgM, IgA, IgG2a, IgG1 R5: IgM, IgA, IgG2a, IgG1

## **7.2 Modelo *in vitro*: Evaluación de extractos acuosos y metanólicos**

Los compuestos fitoquímicos constituyen una opción importante en el combate de las enfermedades, su búsqueda y validación es por ello de gran importancia. En este trabajo se evaluó el potencial para inhibir el crecimiento *in vitro* de *Helicobacter pylori* de extractos acuosos y metanólicos de *Persea americana*, *Gymnosperma glutinosum*, *Pachycereus marginatus*, *Ibervillea sonora* y *Phaenix dactylifera* utilizando el método de UFC y el ensayo de reducción del MTT.

De las plantas evaluadas solo en *Gymnosperma glutinosum* se encontró actividad de interés contra *Helicobacter pylori*. En las tablas 4 y 5 pueden encontrarse los resultados para el resto de las plantas evaluadas.

**Tabla 4. Efecto de extractos acuosos sobre el crecimiento *in vitro* de *H. pylori* 43504**

Concentración (µg/ml)	<i>Persea americana</i>		<i>Gymnosperma glutinosum</i>		<i>Pachycereus marginatus</i>		<i>Ibervillea sonorae</i>		<i>Phaenix dactylifera</i>	
	Media	Error	Media	Error	Media	Error	Media	Error	Media	Error
0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
7.81	1.070	0.077	0.958	0.023	0.772	0.082	1.140	0.032	1.210	0.106
15.62	1.158	0.120	1.032	0.026	0.856	0.068	1.185	0.065	1.363	0.137
31.25	1.292	0.157	1.037	0.027	1.010	0.063	1.188	0.047	1.628	0.051
62.5	1.711	0.123	1.024	0.046	1.110	0.086	1.324	0.088	1.225	0.089
125	1.405	0.152	0.958	0.028	1.198	0.069	1.218	0.031	1.721	0.269
250	1.977	0.129	1.061	0.026	1.207	0.052	1.049	0.074	2.127	0.143
500	1.513	0.159	0.232	0.041	1.446	0.062	0.985	0.120	2.080	0.295

El índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo índice de crecimiento = 1. Los datos se presentan como la media ± error estándar de tres experimentos representativo con 6 repeticiones.

**Tabla 5. Efecto de extractos metanólicos sobre el crecimiento *in vitro* de *H. pylori* 43504**

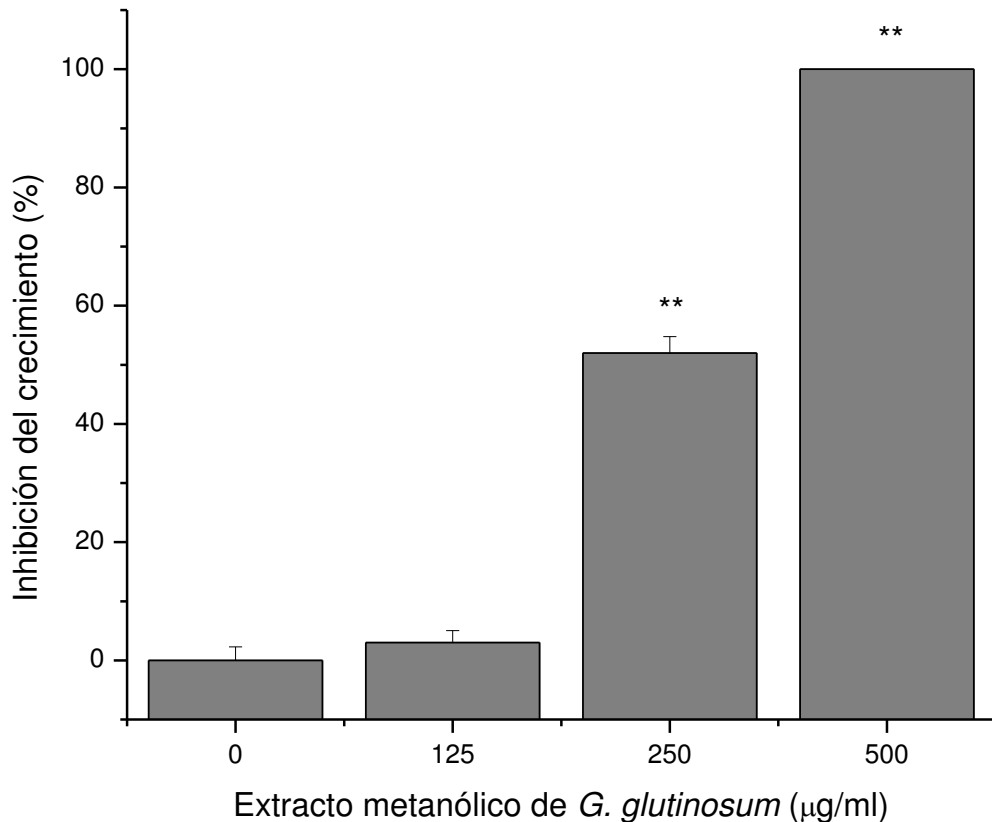
Concentración (µg/ml)	<i>Persea americana</i>		<i>Gymnosperma glutinosum</i>		<i>Pachycereus marginatus</i>		<i>Ibervillea sonorae</i>		<i>Phaenix dactylifera</i>	
	Media	Error	Media	Error	Media	Error	Media	Error	Media	Error
0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
7.81	0.950	0.068	0.348	0.025	1.101	0.034	1.140	0.032	0.954	0.041
15.62	0.992	0.052	0.380	0.045	1.200	0.072	1.185	0.065	1.026	0.037
31.25	0.943	0.088	0.361	0.036	1.355	0.094	1.188	0.047	1.332	0.147
62.5	0.911	0.054	0.396	0.038	1.291	0.073	1.324	0.088	1.011	0.085
125	1.010	0.092	0.485	0.033	1.291	0.073	1.218	0.031	0.947	0.048
250	0.975	0.133	0.615	0.024	1.570	0.113	1.049	0.074	1.074	0.052
500	1.267	0.130	0.584	0.038	1.330	0.076	0.985	0.120	1.321	0.118

El índice de proliferación expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al observado en el grupo control (no tratado con opioides) cuyo índice de crecimiento = 1. Los datos se presentan como la media ± error estándar de tres experimentos representativo con 6 repeticiones.

Mientras que el extracto acuoso de *G. glutinosum* no afectó el crecimiento de *H. pylori* (Tabla 4), el extracto metanólico mostró una concentración mínima inhibitoria (CMI) en el rango de concentraciones de 31.25µg/ml a 500 µg/ml e indujo

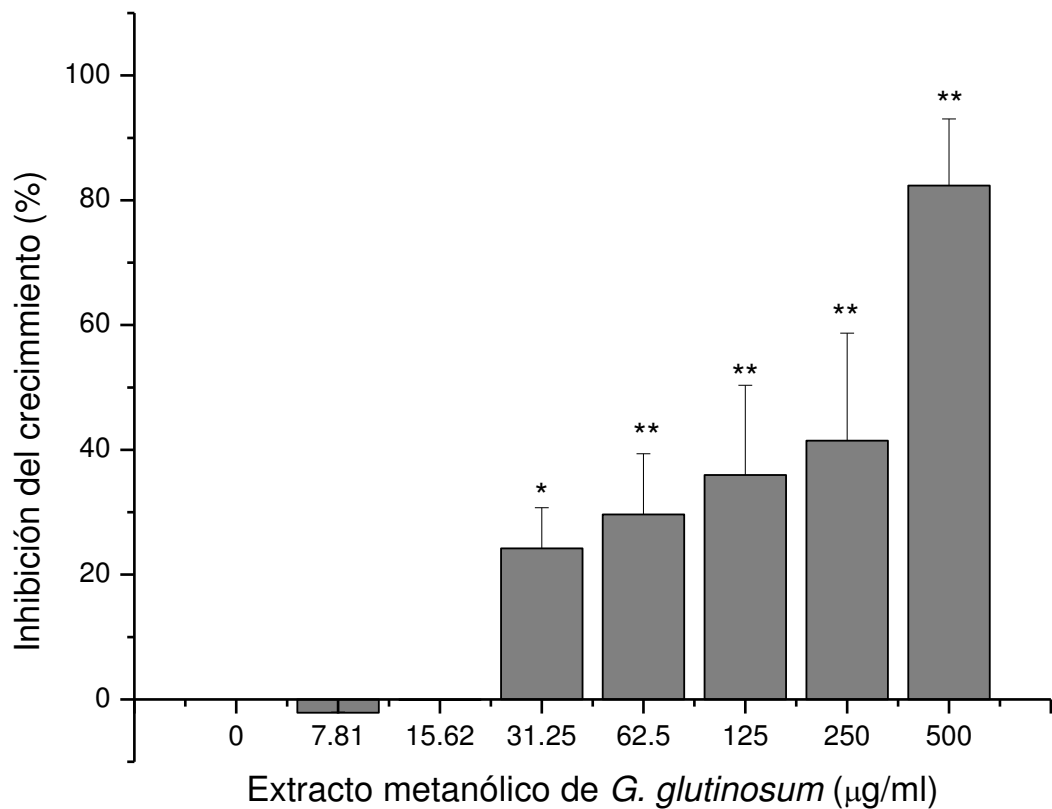
un máximo de inhibición del crecimiento contra *H. pylori* de 82 y 100%, respectivamente, de acuerdo a las determinaciones mediante el método de las UFC y el ensayo de reducción del MTT (Figuras 10 y 11).

El extracto metanólico inhibió significativamente el crecimiento de *H. pylori* en el rango de concentraciones de 31.25  $\mu\text{g/ml}$  a 500  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, de acuerdo al ensayo de reducción del MTT, mientras que causó una inhibición significativa ( $p < 0.05$ ) del crecimiento del 52% y 100% a las concentraciones de 250  $\mu\text{g/ml}$  y 500  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, de acuerdo al método de las UFC (Figura 10). El control del vehículo, metanol, o el medio solo no alteraron el crecimiento bacteriano (datos no mostrados).



**Figura 14.** Efecto antimicrobiano del extracto metanólico de *G. glutinosum* sobre el crecimiento de *H. pylori*. Se incubaron cultivos en suspensión de *H. pylori* en presencia o ausencia de varias concentraciones del extracto metanólico de *G. glutinosum*, después de lo cual se determinó el crecimiento mediante el método de

UFC. Los datos representan la media  $\pm$  de determinaciones por triplicado de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  en comparación con el control no tratado con el extracto de *G. glutinosum*. Las densidades ópticas a 570nm para las células no tratadas fueron de  $3.5 \times 10^8 \pm 8 \times 10^6$  UFC/ml.



**Figura 15.** Efecto antimicrobial del extracto metanólico de *G. glutinosum* sobre el crecimiento de *H. pylori*. Se incubaron cultivos en suspensión de *H. pylori* en presencia o ausencia de varias concentraciones del extracto metanólico de *G. glutinosum*, después de lo cual se determinó el crecimiento mediante el método de reducción del MTT. Los datos representan la media  $\pm$  de determinaciones por triplicado de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  en comparación con el control no tratado con el extracto de *G. glutinosum*. Las densidades ópticas a 570nm para las células no tratadas fueron de  $0.85 \pm 0.03$ .

## 8 DISCUSION

Se estima que el 50% de la población mundial ha sido infectada por la bacteria *Helicobacter pylori*, una enfermedad que si bien en etapas tempranas no es considerada mortal, a largo plazo puede conducir a enfermedades de mayor gravedad, como el cáncer. Por ello es importante encontrar nuevas opciones ya sea para su tratamiento, o bien para prevenir la infección y desarrollo. En este trabajo se emplearon dos estrategias comunes en la lucha contra *H. pylori*; primero un modelo *in vivo* en el ratón BALB/c para determinar el potencial preventivo del péptido MVTLINNE, que forma parte de la porción terminal de una proteína de 52-55 kDa identificada como un homólogo de la citrato sintasa y que previamente se ha descrito y patentado por su utilidad como herramienta de diagnóstico de la infección por *H. pylori* (Dunkey, 1999) y por otro lado el uso de un modelo *in vitro* para la búsqueda de nuevos compuestos fitoquímicos que coadyuven en el tratamiento de la infección. Es por ello que la discusión la dividiremos en dos partes, según el modelo empleado.

### ***Modelo de inmunización e infección***

El uso de modelos *in vivo* de infección en roedores es ampliamente utilizado para determinar el potencial tanto de compuestos químicos como de vacunas, dichos modelos implican la administración por diferentes rutas de compuestos químicos o preparaciones biológicas a animales vivos, entre los más empleados ratones y ratas, y el éxito de dichas intervenciones se determina de acuerdo a una serie de parámetros que reflejan o representan los síntomas de la enfermedad a prevenir o tratar. En el caso de la infección por *H. pylori* la mortalidad en humanos es baja y es el producto de infecciones crónicas, esto es una desventaja cuando se le compara con los modelos pre-clínicos de cáncer u otras infecciones donde la mortalidad es alta, y donde el aumento en la supervivencia es el indicador más directo del éxito de una intervención. Otro aspecto divergente es el de la duración de la infección, mientras que en humanos la infección asintomática puede estar presente por años antes de que se presenten morbilidad y mortalidad, en los modelos pre-clínicos la duración de la

infección es significativamente más corta, lo que dificulta evaluar parámetros de progresión de la enfermedad y extrapolarlos a la situación en humanos.

En los modelos pre-clínicos de *H. pylori* la evaluación se centra en la proliferación de lesiones en la mucosa del estómago a consecuencia de la infección, otros métodos como el diagnóstico molecular son también útiles en la evaluación del éxito de una terapia de intervención (Horemans et al, 2011), sin embargo su uso requiere equipo costoso y no siempre disponible. Tanto la baja mortalidad, como la naturaleza crónica de la enfermedad significan que los modelos pre-clínicos son limitados tanto en el estudio de la enfermedad como en la evaluación de estrategias de intervención terapéutica. Otro aspecto importante en el modelo pre-clínico es la selección del animal a emplear, lo más frecuente es el ratón y en algunos estudios, la rata. Sin embargo, la cepa de animales empleada es también importante a la hora de interpretar los estudios, ya que existen importantes variaciones fisiológicas e inmunológicas intrínsecas que pueden determinar los resultados que se obtengan. Los resultados de este trabajo reflejan las limitaciones y retos de los modelos pre-clínicos de la infección por *H. pylori*.

En este trabajo, se estableció un modelo *in vivo* de *Helicobacter pylori* en el ratón BALB/c, empleamos un método de infección no invasivo, administrando la bacteria en el agua de beber (Boehnke, 2015). Este modelo, se empleó para evaluar la eficacia preventiva de la administración de un péptido sintético proveniente de una proteína de *H. pylori*. Dicho péptido inmunogéno MVTLINE fue administrado en dos ocasiones, primero por vía intraperitoneal en la semana 1 y después por vía subcutánea como refuerzo, en la semana 4, con el propósito de potenciar la respuesta inmune del animal contra la infección por la bacteria.

Los resultados mostraron, por una parte la estimulación de la respuesta inmune celular, primero reflejada en el mayor tamaño del bazo de ratones inmunizados, y también determinada por la respuesta proliferativa de los linfocitos de timo de los animales en diferentes condiciones tanto al mitógeno concanavalina A

como al mismo péptido MVTLINE. La respuesta inmune celular tiene un papel importante en la defensa contra infecciones, en el caso particular de *H. pylori* se ha demostrado en modelos de infección con ratones inmunodeficientes que la respuesta inmune celular, pero no la humoral, es capaz de resolver la gastritis y eliminar la infección (Eaton, 2001).

El análisis de los perfiles de citocinas TH1/TH2 y TH17 no permite llegar a una conclusión sobre el éxito de la estrategia de vacunación ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. Si bien se observaron algunas tendencias que indican una respuesta inflamatoria durante la infección, la cual parece menor en animales inmunizados e infectados. Que no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas puede deberse al limitado número de animales, 5 por grupo, también al limitado número de réplicas del análisis, tan solo una, sin embargo la tecnología empleada es de alta sensibilidad, por lo que es confiable, aunque costosa. Otro factor a tomar en cuenta es la variabilidad intrínseca de la respuesta inmunológica de cada animal, que se puede presentar a pesar de tener fondo genético idéntico.

Otros factores a tomar en cuenta son la cepa de ratón y el tejido analizado, por ejemplo, Ulett et al (2000) analizaron la expresión a nivel genético de citocinas pro y anti-inflamatorias en un modelo de infección por *Burkholderia pseudomallei* y encontraron diferencias significativas tanto por cepa como por tejido analizado, sus resultados muestran que en el caso del ratón BALB/c la expresión de citocinas como el IFN- $\gamma$  y TNF muestran una mayor expresión en hígado, mientras que la IL-6 y la IL-10 muestran mayor expresión en el bazo. Otro factor que influye y en ocasiones no es posible determinar a partir de la información disponible en la metodología de los artículos consultados, es el sexo de los animales. Se ha visto que para la citocina IL-6 se presentan diferencias importantes entre machos y hembras de la cepa BALB/c, donde los machos expresan significativamente más IL-6 en respuesta a un reto por LPS (Queen et al, 2016). Lo que sugiere que al establecer un modelo de infección es más conveniente el uso de ratones machos que hembras.

En este trabajo se emplearon ratones hembras, y aunque detectable los niveles de IL-6 fueron bajos, y esto pudo afectar el resultado del análisis estadístico. Sería importante en el futuro, tomar esto en cuenta durante el diseño experimental.

Otro aspecto a analizar es el método que se empleó para la infección, el método más utilizado, según la literatura, es la administración oral con cánula de una cantidad conocida de la bacteria (Czinn y Nedrud, 1991). Sin embargo, este método requiere considerable destreza, y conlleva riesgos para el bienestar de los animales experimentales, por lo que se buscó un método alternativo que disminuyera dichos riesgos, se seleccionó un método en el cual se administra la bacteria en el bebedero de su jaula (Boehnke, 2015). Existe controversia respecto al tiempo que se mantiene la viabilidad de la bacteria en agua, sin embargo varios reportes indican que es lo suficiente para la infección vía oral (Beneduce et al, 2003; Aziz et al, 2015). En nuestro trabajo, los datos indican que los ratones infectados si presentan parámetros de respuesta inmunológica consistentes con infección, sin embargo es indispensable el análisis histológico de los estómagos para confirmarlo, y esto es la gran limitación para obtener conclusiones sólidas de este trabajo.

Finalmente, los resultados del modelo *in vivo* reflejan las dificultades que se presentan al diseñar un experimento, desde la selección de los animales y los parámetros a medir, así como los tiempos para llevar a cabo las determinaciones, que en este caso, fueron finales, esto en consideración del principio de las 3 Rs, reducir al máximo el número de animales de experimentación (Parker y Browne, 2014). Es importante, por lo mismo, ensayar metodologías no invasivas que permitan el monitoreo de los animales sin necesidad de sacrificarlos, opciones como el diagnóstico molecular de *H. pylori* en heces de los animales (Nyan et al, 2004), son una forma de resolver este dilema.

## **Modelo *in vitro*: Evaluación de extractos acuosos y metanólicos**

Las plantas medicinales se han vuelto populares a nivel mundial debido a sus potenciales beneficios para la salud; estas plantas pueden consumirse o aplicarse directamente para tratar infecciones (Rojas et al., 2006). Los compuestos sintetizados por las plantas tienen gran potencial terapéutico debido a sus constituyentes químicos, cuya evaluación de actividad antimicrobiana es importante para desarrollar productos farmacológicos alternativos (Rodríguez-Fragoso et al., 2008).

Se han hecho estudios con extractos de plantas del género *Asteraceae* como agentes antibacterianos, pero ningún estudio enfocado a sus efectos contra *H. pylori*; la elección de *G. glutinosum* para el presente estudio se fundamentó en su uso en la medicina tradicional de México. El uso de extractos acuosos y metanólicos de plantas es común para este tipo de estudios (Akihisa et al., 2005; Jiménez-Arellanes et al., 2003; Rai and Acharya, 1999).

Se han reportado diversas actividades biológicas de las plantas de la familia *Asteraceae* incluyendo *Baccharis gaudichaudiana* (Guo et al., 2006), *Anthemis aciphyla* (Baser et al., 2006), *Echinops ritro* (Fokialakis et al., 2006), y *Pterocaulon spp* (Stein et al., 2006). Los extractos hexánicos de *G. glutinosum* han mostrado actividad antibacterial y antifúngica (Canales et al., 2007). En el presente estudio se encontró que la CMI de los extractos de *G. glutinosum* contra *H. pylori* se encuentra en un rango de 31.25 µg/ml to 250 µg/ml. Es aceptado que los agentes antimicrobianos de plantas tienen potencial clínico si sus CMI se encuentran en el rango de 100 to 1000 µg/ml (Drusano, 2004), por lo que los resultados del presente estudio indican una importante actividad antibiótica de los extractos de *G. glutinosum* contra *H. pylori*.

Las plantas medicinales han demostrado ser una fuente importante de agentes antimicrobianos, muchos de los cuales han sido base para el desarrollo de nuevas drogas farmacéuticas, que pueden superar la creciente resistencia de muchos patógenos a los antibióticos comunes (Chinedium, 2005; Moreillon, 2000; Rusell, 2000).

## 9 CONCLUSIONES

1. La inmunización con el péptido MVTLINE estimuló la respuesta proliferativa de linfocitos tímicos de ratón BALB/c.
2. La infección con *Helicobacter pylori* por el método de bebedero suprime la respuesta proliferativa de timocito de ratón BALB/c
3. La inmunización con el péptido MVTLINE no altera las respuestas TH1/TH2/TH17 de ratones hembra BALB/c
4. La infección con *Helicobacter pylori* por el método de bebedero no altera las respuestas TH1/TH2/TH17 de ratones hembra BALB/c
5. Tanto la inmunización con el péptido MVTLINE como la inmunización e infección produjeron perfiles de inmunoglobulinas plasmáticas característicos de respuesta inmunitaria de mucosas y claramente distintos de los controles sin tratamiento e infectados.
6. Los resultados obtenidos no nos permiten hacer una evaluación completa del éxito del protocolo de inmunización
7. Los extractos acuosos o metanólicos de las plantas *Persea americana*, *Pachycereus marginatus*, *Ibervillea sonora* y *Phaenix dactylifera* no tuvieron efecto sobre el crecimiento *in vitro* de *Helicobacter pylori*
8. Los extractos metanólicos de *G. glutinosum* inhiben el crecimiento *in vitro* de *H. pylori*.

## 11 PERSPECTIVAS

En lo referente al péptido utilizado, faltaría hacer otros estudios con un mayor número de muestra probablemente, otras concentraciones del péptido y otros esquemas de inmunización, así como también incluir otros grupos donde se pueda corroborar la acción específica de este péptido.

En cuanto al modelo de infección es importante hacer más estudios para saber si el grado de infección está realmente relacionado con el grado de inflamación y observarlo histológicamente así como también si la cantidad de péptido está relacionado con el grado de respuesta inmunológica celular y/o específica.

Con base en los resultados obtenidos con respecto a la inhibición del crecimiento de *H. pylori* por *Gymnosperma glutinosum* sería importante aislar los compuestos fitoquímicos de esta planta para ver en realidad cual compuesto es el que está inhibiendo el crecimiento de esta bacteria y agregar el compuesto o sintetizarlo para que sea fácilmente consumido en los pacientes infectados por esta bacteria y erradicarla como método alternativo en los pacientes infectados que presentan adversos a los antibióticos utilizados o en pacientes alérgicos a dichos antibióticos.

## 12 LITERATURA CITADA

Akihisa T, Franzblau SG, Ukiya M, Okuda H, Zhang F, Yasukawa K, Suzuki T, Kimura Y. 2005. Antitubercular activity of triterpenoids from Asteraceae flowers. *Boil. Pharm. Bull.* 28(1):158-160.

Annuk H, Hirno S, Tuëri E, Mikelsaar M, Arak E, Wadstroëm T. 1999. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts *Microbiology Letters*. 172(1); 41-45

Arema A, Saafia EB, Ben Slamab R, Zayena N, Hammamic M, Achoura L. 2013. Phytochemical composition, antibacterial and antioxidant activities of common date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit during three maturation stages. *Tunis. J. Med. Plants Nat. Prod* 10(2): 33-48.

Arana JC, Corona A. 2009. Cancer Gástrico. *Revista de la Facultad de Medicina*. 47(5); 204-209

Arukwe U, Amadi BA, Duru MKC, Agomuo EN, Adindu EA, Odika PC, Lele KC, Egejuru L, Anudike J. 2012. Chemical composition of *Persea americana* leaf, fruit and seed. *Int. J of Res. And Rev. Applied. Sci.* 11 (2):346-349.

Atherton JC. 1998. *H. pylori* virulence factors. *British Medical Bulletin*. 54 (No. 1):105-120

Avilés-Jiménez F, Reyes-Leon A, Nieto-Patlán E, M. Hansen L, Burgueño J, Ramos I, Camorlinga-Ponce M, Bermúdez H, Blancas JM, Cabrera L, Ribas-Aparicio RM, V. Solnick J, Torres-López J. 2012. In Vivo Expression of *Helicobacter pylori* Virulence Genes in Patients with Gastritis, Ulcer, and Gastric Cancer. 80(2) :594- 601

Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *Journal of advanced research*. 2015 Jul 31;6(4):539-47.

Baser, K.H.C., Demirci, B., Iscan, G., Hashimoto, T., Demirci, F., Noma, Y. and Asakawa, Y. (2006). The essential oil constituents and antimicrobial activity of *Anthemis aciphylla* BOISS. var. *discoidea* BOISS. *Chem. Pharm. Bull.* 54,222-225.

Beneduce L, Tarantino D, Spano G, Libergoli M, Labonia M, Massa S. Survival of *Helicobacter pylori* in well water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2003 Jul 1;19(5):505-8.

Betoni JE, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, Fernandes Junior A.2006. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 101: 387-390.

Boehnke, K.F., Eaton, K.A., Valdivieso, M., Baker, L.H. and Xi, C., 2015. Animal model reveals potential waterborne transmission of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 20(5), pp.326-333.

Borchers AT, Keen CL, Stern JS, Gershwin ME. 2000. Inflammation and native American medicine: the role of botanicals. *The American journal of clinical nutrition* 72:339-47.

Canales, M., Hernández, T., Serrano, R., Hernández, L.B., Duran, A., Ríos, V., Sigrist, S., Hernández, H.L., Garcia, A.M., Angeles-López, O., Fernández-Araiza, M.A. and Avila, G. (2007). Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: a comparative study. *J. Ethnopharmacol.* 110,343-347.

Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I. 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. J. Ethnopharmacol. 122( 2); 402 -405

Chinedum, I.E. (2005). Microbial resistance to antibiotics. Afr. J. Biotechnol. 4,1606-1611.

Covacci A, Telford JL, Giudice GD, Parsonnet J, Rappuoli R. 1999. *Helicobacter pylori* Virulence and Genetic Geography. Science. 284(5418);1328-33.

Cover TL, Glupczynski Y, Lage AP, Burette A, Tummuru MKR, Perez-Perez GI, Blaser MJ. June 1995. Serologic Detection of Infection with cagA *Helicobacter pylori* Strains. J. Clin. Microbiol. 33( 6 );1496-1500

Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12(4); 564-582.

Czinn SJ. and Nedrud JG. 1991. Oral Immunization against *Helicobacter pylori*. Infect. Immun. 59 (7): 2359-2363

Drusano, G.L. (2004). Antimicrobial pharmacodynamics: Critical interactions of “bug and drug”. Nature Rev. 2,289-300.

Dunkley ML, Harris SJ, McCoy RJ, Musicka MJ, Eysers FM, Beagley LG, Lumley PJ, Beagley KW, Clancy RL. 1999. Protection against *Helicobacter pylori* infection by intestinal immunisation with a 50/52-kDa subunit protein. Immunol. Med. Microbiol. 24(2); 221-225

Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. 1997. *Helicobacter pylori*. Clin. Microbiol. Rev. 10( 4); 720–741.

Dye BA, Kruszon-Moran , McQuillan G. 2002. The Relationship Between Periodontal Disease Attributes and *Helicobacter pylori* Infection Among Adults in the United States. Am J Public Health. 92(11);1809-1815.

Eaton KA, Mefford ME. Cure of *Helicobacter pylori* infection and resolution of gastritis by adoptive transfer of splenocytes in mice. Infection and immunity. 2001 Feb 1;69(2):1025-31.

Elson, C. O., W. Ealding, and J. Lefkowitz. 1984. A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions. J. Immunol. Methods 67(1);101-108.

Fabricant DS y Farnsworth NR. 2001. The Value of Plants Used in Traditional Environ Health Perspect.109(1): 69–75.

Fokialakis, N., Cantrell, C.L., Duke, S.O., Skaltsounis, A.L. and Wedge, D.E. (2006). Antifungal activity of thioterpens from *Echinops ritro*. J. Agric. Food Chem. 54,1651-1655.

Funatogawa K ,Hayashi S,Shimomura H,Yoshida T,Hatano T, HideyukiIto I, Hirai Y. 2004.Antibacterial Activity of Hydrolyzable Tannins Derived from Medicinal Plants against *Helicobacter pylori*. Microbiol,Immunol.48(4);251-261.

Glusker JP, Lewis M, Rossi M. 1994. Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists. J. Chem. Educ.1995, 72 (3); 73-9

Gómez-Flores R, Gupta S, Tamez-Guerra R, Mehta RT. 1995. Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. J. Clin. Microbiol. 33(7):1842-1846.

Gómez-Flores R, Arzate-Quintana C, Quintanilla-Licea R, Tamez-Guerra P, Tamez-Guerra R, Monreal-Cuevas E, Rodríguez-Padilla C.2008. Antimicrobial Activity of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) Leaf Extracts and Active Fractions Against *Mycobacterium tuberculosis*. Am-Euras. J. Sci. Res., 3 (2): 188-194.

Guo, Y., Li, Y., Xu, J., Watanabe, R., Oshima, Y., Yamakuni, T. and Ohizumi, Y. (2006). Bioactive ent-clerodane diterpenoids from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. J. Nat. Prod. 69,274-276.

Hernandez-Martínez HC, Gómez-Flores R, Tamez-Guerra P, Quintanilla-Licea R, Samaniego Escamilla MA, Monreal-Cuevas E, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C.2016. Antitumor activity of *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose extracts against murine lymphoma L5178Y-R and skin melanoma B16F10 cells. J. Med. Plants Res. 10(36):635-639

Hoffman JS, Katz LM, Cave DR.1999. Efficacy of a 1 –week regimen of ranitidine bismuth citrate in combination with metronidazole and clarithromycin for *Helicobacter pylori* eradication. Aliment Pharmacol Ther. 13(4); 503-506

Holezt FB, Pessini GL, Sanches NR, García-Cortez DA, Vataru-Nakamura C, Dias-Filho BP. 2002. Screening of some plants used in brazilian Folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97(7):1027-1031.

Horemans T, Deschacht M, Clais S, Van Camp J, de Rijk P, Holvoet J, Van Assche T, Maes L, Cos P. An alternative, sensitive method to detect *Helicobacter pylori* DNA in feces. Helicobacter. 2011 Apr 1;16(2):113-8.

Hosein Farzaei M, Shams-Ardekani MR, Abbasabadi Z, Rahimi R. 2013. Scientific Evaluation of Edible Fruits and Spices Used for the Treatment of Peptic Ulcer in Traditional Iranian Medicine. Gastroenterology. 1-12.

Hostettmann K, Terreaux C. 2000. Search for new Lead Compounds from higher Plants. *Chimia*, 2000, vol. 54(11):652-657.

Jimenez-Arellanes A, Meckes M, Ramirez R, Torres J, Luna-Herrera J. 2003. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytother Res.* 17(8):903-8.

Kabir A.M.A, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T, Koga Y.1997. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* 41(1);49-55

Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Stachura J, Karczewska E, Pajdo R, Ghiara P Hahn EG.1999. Mouse model of *Helicobacter pylori* infection: studies of gastric function and ulcer healing. *Aliment Pharmacol Ther.* 13(3):333-46.

Khuroo MS, Khuroo NS, Khuroo MS. Diffuse duodenal nodular lymphoid hyperplasia: a large cohort of patients etiologically related to *Helicobacter pylori* infection. *BMC Gastroenterol.* 2011; 11: 36.

Li S, Lu AP, Zhang L, Li YD. 2003. Anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of *H. pylori* infection in patients with precancerous lesions. *World J Gastroenterol.* 9(4): 755-758

Lin YT, Kwon YI, Labbe RG, Shetty K. 2005. Inhibition of *Helicobacter pylori* and Associated Urease by Oregano and Cranberry Phytochemical Synergies. *Appl Environ Microbiol* 71(12); 8558-8564.

Lu D-Y, Chen H-C, Yang M-S , Hsu Y-M , Lin H-J, Tang C-H, Lee C-H, Lai C-K, Lin C-J, Shyu W-C, Lin F-Y and Lai C-H. 2012. Ceramide and Toll-Like

Receptor 4 Are Mobilized into Membrane Rafts in Response to *Helicobacter pylori* Infection in Gastric Epithelial Cells. *Infect Immun.* 80(5):1823-1833

Mattsson, A., M. Quiding-Jarbrink, H. Lonroth, A. Hamlet, I. Ahlstedt, and A. Svennerholm. 1998. Antibody-secreting cells in the stomachs of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect. Immun.* 66(6):2705-2712

Mégraud F. 2012. The challenge of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: the comeback of bismuth-based quadruple therapy. *Therap Adv Gastroenterol.* 5(2):103-109

Mitchell PJ, Afzali B, Fazekasova H, Chen D, Ali N, Powell N, Lord G M, Lechler R Lombardi G. 2012. *Helicobacter pylori* induces *in vivo* expansion of human regulatory T cells through stimulating IL-1 $\beta$ -production by dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.*. Articulo aceptado. No formateado

Montecucco C, Rappuoli R..2001. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Nature Rev Mol Cell Biol* 2 (6):457-66.

Moreillon, P. (2000). Means of bacterial resistance. *Rev. Med. Suisse Romande* 120,641-50.

Moy TI, Ball AR, Anklesaria Z, Casadei G, Lewis K, Ausubel FM. Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 103(27):10414-10419.

Nyan DC, Welch AR, Dubois A, Coleman WG. Development of a noninvasive method for detecting and monitoring the time course of *Helicobacter pylori* infection. *Infection and immunity.* 2004 Sep 1;72(9):5358-64.

Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. World Health Organization, 2005.

Parker RM, Browne WJ. The place of experimental design and statistics in the 3Rs. *ILAR journal*. 2014 Dec 20;55(3):477-85.

Pellon A, Ramirez-Garcia A, Antoran A, Fernandez-Molina JV, Abad-Diaz-de-Cerio A, Montañez D, Sevilla MJ, Rementeria A, Hernando FL. *Scedosporium prolificans* immunomes against human salivary immunoglobulin A. *Fungal biology*. 2014 Jan 31;118(1):94-105.

Queen AE, Moerdyk-Schauwecker M, McKee LM, Leamy LJ, Huet YM. Differential expression of inflammatory cytokines and stress genes in male and female mice in response to a lipopolysaccharide challenge. *PloS one*. 2016 Apr 27;11(4):e0152289.

Rai MK and Acharya D. 1999. Screening of some Asteraceous plants for antimycotic activity. *Compositae newsletter* 34:37-43.

Rahmani AH, Aly SM, Ali H, Babiker AY, Srikar S, Khan AA. 2014. Review Article. Therapeutic effects of date fruits (*Phoenix dactylifera*) in the prevention of diseases via modulation of anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-tumour activity. *Int J. Clin Exp Med*. 7(3):483-491.

Ramakrishnan K, Salinas RC. 2007. Peptic Ulcer Disease. *Am Fam Physician*. 76, (7); 1005-1012

Reynolds WF, Enríquez R. G. 2002. Choosing the best pulse sequences, acquisition parameters, postacquisition processing strategies, and probes for natural product structure elucidation by NMR spectroscopy. *J. Nat. Prod*. 65(2):221-244

Robles-Zepeda RE, Velázquez-Contreras CA, Garibay-Escobar A, Gálvez-Ruiz JC, Ruiz Bustos E. 2011. Antimicrobial activity of Northwestern Mexican plants against *Helicobacter pylori*. *J. Med Food*. 14(10):1280-3.

Rodriguez-Fragoso, L., Reyes-Esparza, J., Burchielb, S., Herrera-Ruiza, D., Torres, E. (2008). Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227,125-35.

Rojas JJ, Ochoa VJ, Ocampo SA, Muñoz JF. 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complement Altern Med.* 6:2.

Russell, A.D. (2000). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 92,121S-135S.

Shahid S. 2012. *Helicobacter Pylori* Infection in Children. *Webmed Central Pediatrics.* 3(8) 1-12.

Shinoy M, Dennehy R, Coleman L, Carberry S, Schaffer K, Callaghan M, Doyle S, McClean S. Immunoproteomic analysis of proteins expressed by two related pathogens, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*, during human infection. *PLOS one.* 2013 Nov 15;8(11):e80796.

Sinagawa-Garcia SR, Gutierrez-Diez A, Mora-Olivo A, Juarez-Aragon MC, Torres-Castillo JA.2015. Características descriptivas de la raíz de wereke (*Ibervillea sonorae* Greene) y generalidades bioquímicas de su extracto acuoso. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 84: 358-367.

Smith CJ, Cripps A y Llewellyn Clancy R. Application Number CA 2212952. 22-08-1996.

Stein, A.C., Alvarez, S., Avancini, C., Zacchino, S. and von-Poser, G. (2006). Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 107,95-98.

Torrado-Truiti MC, Sarragiotto MH, Abreu Filho BA, Vataru-Nakamura C, Dias Filho BP. 2003. In Vitro antibacterial activity of a 7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-nutanocoumarin from *Chaptalia nutans* (Asteraceae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98(2):283-286.

Ulett GC, Ketheesan N, Hirst RG. Cytokine gene expression in innately susceptible BALB/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei*. Infection and immunity. 2000 Apr 1;68(4):2034-42.

Villegas, Humberto H. Lara, Nilda Vanesa Ayala Núñez, and Cristina Rodríguez Padilla. "Laboratorios de bioseguridad nivel 3 y 4." Rev Mex Patol Clin 54.4 (2007): 177-186.

**ANEXO 1**  
**PUBLICACION DE ARTÍCULO**

Ricardo Gomez-Flores\*<sup>1</sup>, David Espinosa-Ramos<sup>1</sup>, Ramiro Quintanilla-Licea<sup>2</sup>, María Porfiria Barrón-Gonzalez<sup>3</sup>, Patricia Tamez-Guerra<sup>1</sup>, Reyes Tamez-Guerra<sup>1</sup>, Cristina Rodriguez-Padilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología e Inmunología, <sup>1</sup> Departamento de Química, <sup>2</sup> Departamento de Biología Celular y Genética, <sup>3</sup> San Nicolás de los Garza, NL. México.

\*Corresponding author: Ricardo Gomez-Flores, E-mail: [rgomez60@hotmail.com](mailto:rgomez60@hotmail.com)

## Abstract

**Background:** Prolonged use of antibiotics may lead to the selection of drug-resistant bacteria; as a result, efforts are being made to identify new and effective antimicrobial agents, particularly, from medicinal plants, against bacterial infections. Antimicrobial activity of *Gymnosperma glutinosum* against *Helicobacter pylori* has not yet been reported.

**Materials and methods:** The antibacterial *in vitro* effect of *Gymnosperma glutinosum* methanol leaf extracts against *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) was evaluated in liquid medium by the colorimetric 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay and in solid medium by the colony forming units (CFU) method.

**Results:** Methanol extracts significantly ( $p<0.05$ ) inhibited *in vitro* *H. pylori* growth in liquid medium from 24% to 82% at concentrations ranging from 31.25 mg/ml to 500 mg/ml, respectively, and in solid medium the extracts caused significant ( $p<0.05$ ) 52% and 100% bacterial growth inhibition at concentrations of 250 µg/mL and 500 µg/mL, respectively, as compared with untreated control. Methanol vehicle did not affect *H. pylori* growth.

**Conclusion:** The observed antibacterial effect of *G. glutinosum* extracts may be of benefit as an adjuvant treatment of diseases caused by *H. pylori*.

**Key words:** *Gymnosperma glutinosum*, *Helicobacter pylori*, methanol extract, minimal inhibitory concentration (MIC).

## Introduction

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a Gram-negative spiral-shaped bacteria, which is the main factor for the development of duodenal ulcer disease and has been involved in the development of gastric ulcer, which increases the risk of stomach cancer, the most common digestive tract neoplasia worldwide (Arana y Corona, 2009). In developed countries, 70 to 90% of the population becomes infected before 10 years of age and the modes of transmission include oral-oral or fecal-oral, and iatrogenic when performing endoscopy with a contaminated tube from person to person (Dunn et al., 1997). In addition to surgery, including partial gastrectomy, a variety of antibiotics approved by the United States Food and Drug Administration to treat gastric ulcer have been suggested, among which it is common the use of bismuth subsalicylate, metronidazole, and tetracycline, in addition to an antacid agent; however, this can cause systemic damage such as pseudo-membranous colitis (11%) and vaginal candidiasis (above 10%) in women under treatment (Dunn et al., 1997).

*H. pylori* infections are currently treated with antibiotics, plant extracts, and various types of immunization with the aim of preventing the colonization of the bacterium, as well as eradicate it when it is established in gastric epithelial cells. Different antibiotics have been suggested to treat *H. pylori*; among these, the use of 10 to 14 days of 20 mg omeprazole twice daily or using plus amoxicillin 1g, 2 times per day, can remove 80 to 90% of these bacteria (Ramakrishnan et al., 2007). An antibiotic scheme 7 days in patients infected with *H. pylori* on the basis of 400 mg of ranitidine, metronidazole 500 mg, and 500 mg of clarithromycin was used before meals in another study, in which they found elimination of the bacteria in 91% of 47 patients (Hoffman et al., 1999).

There is a general warning about the potential benefits of medicinal plants for health, as part of complementary medicine in the world (Gomez-Flores et al., 2010, 2009). Plants play a vital role in the medicinal practices of many Native Americans who use them not only for diagnosis and treatment, such as Ginseng (*Panax quinquefolius*, *Panax ginseng*, *Eleutherococcus senticosus*), *Echinacea* (*Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea pallida*), and Goldenseal (*Hydrastis canadensis*), but also to enhance immune responses against many diseases (Borchers et al., 2000). Interest in botanical medicine has increased over the years, not only by physicians, but also by public in general who seem to prefer natural products than synthetic ones (Borchers et al., 2000; Torrado-Truiti et al., 2003). Although there are a great number of plants in Mexico, the percent of species studied for their antimicrobial activity is low, and their effectiveness must be scientifically validated to increase the credibility of their use (Garcia-Alvarado et al., 2001). Some plant

## Gomez et al., Afr J Tradit Complement Altern Med. (2016) 13(4):55-59

doi: 10.21010/ajtcam.v13i4.9

families have been demonstrated to produce antimicrobial substances against a wide variety of bacteria (Akihisa et al., 2005) and fungus (Stein et al., 2006).

*Gymnosperma glutinosum* is a gummy shrub, 1-1.5 m high, distributed from Guatemala and Mexico to the southeastern United States. In traditional medicine in Mexico, this plant (known as tatalencho, ladybug, motita, jarilla, fox tail, xonequitl, sticky grass, among other names) is used for the treatment of diarrhea, ulcers, pain, and rheumatism (Martinez, 1989). The few phytochemical studies to date have resulted in the discovery of more than 20 flavonoids (Dominguez and Torre, 1974) from the alcoholic extracts and 4 diterpenes (Maldonado et al., 1994; Calderon et al., 2001) of the hexane extracts. Serrano et al. (2009) reported antifungal activity of an ent-labdane type diterpene from *G. glutinosum*, whereas Quintanilla-Licea et al. (2012) found antitumor activity of compounds hentriacontane (1) and (+)-13S,14R,15-trihydroxy-ent-labd-7-ene, as well as the ent-labdane diterpene (-)-13S,14R,15-trihydroxy-7-oxo-ent-labd-8(9)-ene from this plant. Furthermore, *G. glutinosum* has been reported to possess antibiotic activity against *Sarcina lutea*, *Aspergillus niger*, and *Trichophyton mentagrophytes* (Canales et al., 2007), *Mycobacterium tuberculosis* (Gomez-Flores et al., 2008). Canales et al. (2004) reported that *G. glutinosum* extracts possessed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholera* and *Shigella boydii*.

The present study was designed to evaluate the effects of the *Gymnosperma glutinosum* leaf extracts on *H. pylori* growth. The plant belongs to the family Asteraceae, but has not been previously reported to have antimicrobial activity against this bacterium. We found significant *in vitro* growth inhibition activity of *G. glutinosum* extracts against *H. pylori*.

## Material and Methods

Reagents, culture medium, and bacterial strain

Brucella broth was obtained from Difco (Detroit MI), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from Amresco (Solon, OH). *H. pylori* ATCC 43504 was donated by the Laboratorio de Odontología from Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud at Universidad Autónoma de Nuevo León, México, and maintained in Brucella broth (Difco, Detroit, MI).

## Plant extract preparation

*Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. was collected in Escobedo, NL, México and identified by Biol. Ma. del Consuelo González from Facultad de Ciencias Biológicas Herbarium at Universidad Autónoma de Nuevo León, México, with the specimen voucher number 024784. Leaves were washed, dried, and macerated. To prepare aqueous extracts, 5 grams of leaves powder were allowed to stand in boiling water (80ml) for 10 minutes, freeze dried (Freeze Dry Systems, Labconco Corporation, KC) and stored at -20°C, until use. To produce methanol extracts, 5 grams of leaves powder were allowed to stand in 100% methanol (80ml) for 24 hours at room temperature, solution was then dried in a Speed Vac (Milford, MA) and stored at 6°C, until use. Aqueous and methanol extracts were then diluted to 1mg/ml in sterile media. Under aseptic conditions, the products were then filtrated through 0.22µ-pore size diameter filters (Whatman filters, Whatman International Ltd., Maidstone, England) and one milliliter aliquots were stored in 1.5ml Eppendorf tubes at -20°.

## Plant extracts susceptibility testing

In brief, 50 µl of *H. pylori* suspensions at  $2.5 \times 10^5$  bacteria/mL were plated in Brucella broth (Difco), in flat-bottomed 96-well plates (Corning Incorporated, Corning, NY), in the presence or absence of serial dilutions (1:2) of the *G. glutinosum* aqueous or methanol extract (50 µl) at 1mg/ml, and 50µl antibiotic control (tetracycline), methanol vehicle control or culture medium. The methanol vehicle control was similarly processed as with plant methanol extractions, but without plant material. Plates were then incubated for 6 h at 37°C, after which the tetrazolium salt MTT was added to all wells at a final concentration of 0.5 mg/ml, and plates were incubated for 15 additional minutes. At the end of the incubation period, 80 µl of DMSO were added to all wells and plates were incubated for 15 minutes. Optical densities resulting from dissolved formazan crystals were then read in a microplate reader (DTX 880 Multimode detector, Becton Dickinson, Austria) at 570 nm (Gomez-Flores et al., 2009, 2010; Caballero-Hernandez et al., 2009). In regard to CFUs determination, 50 µl of the microbial suspensions were plated in Brucella broth, in flat-bottomed 96-well plates (Corning Incorporated), in the presence or absence of serial dilutions (1:2) of the *G. glutinosum* aqueous or methanol extract (50 µl), antibiotic control (5 µg/ml tetracycline), and vehicle controls (methanol and culture medium). Then, 1:10,000 dilutions were prepared from the wells and 100 µl were plated on Brucella agar plates (Difco). Agar plates were then incubated at 37°C for 24h and colonies were counted in a colony counter (ULB-100, Lightbox 37864-2000, Scienceware BEL-ART products, Pequannock, NJ). Percent growth inhibition was calculated as follows:

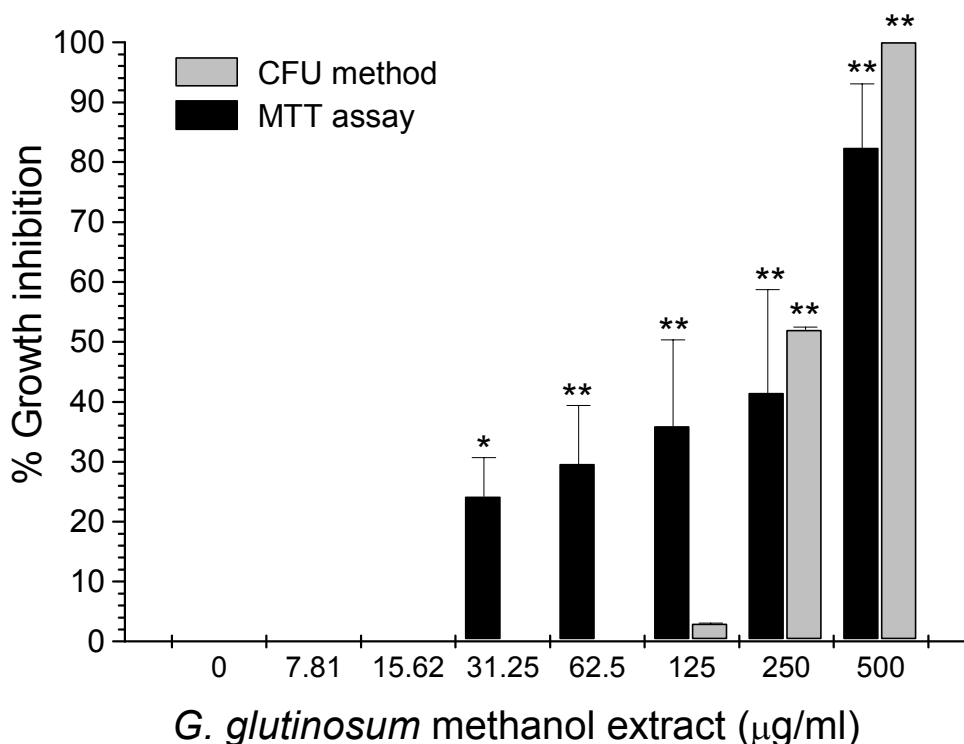
$$\% \text{ Growth inhibition} = 100 - \frac{A_{570} \text{ or CFU/ml of cells treated with extract}}{A_{570} \text{ or CFU/ml untreated cells}} \times 100$$

### Statistical analysis

Data represent means  $\pm$  SEM of triplicate determinations from three independent experiments. Level of significance was assessed by the Student *t* test and one-way ANOVA.

### Results

*G. glutinosum* aqueous extract did not alter *H. pylori* growth (data not shown), however, methanol extract showed minimal inhibitory concentration (MIC) of 31.25  $\mu\text{g/ml}$  and 250  $\mu\text{g/ml}$  and induced a maximum of 82% and 100% growth inhibition against *H. pylori*, as measured by the MTT reduction assay and CFU method, respectively (Fig. 1). Methanol extract caused from 24% to 82% significant ( $p < 0.05$ ) *H. pylori* growth inhibition at concentrations from 31.25  $\mu\text{g/ml}$  to 500  $\mu\text{g/ml}$ , respectively, as measured by the MTT reduction assay, and significant ( $p < 0.05$ ) 52% and 100% growth inhibition at concentrations of 250  $\mu\text{g/ml}$  and 500  $\mu\text{g/ml}$ , respectively, as measured by the CFU method (Fig. 1). Methanol vehicle control or medium alone did not alter bacterial growth (data not shown).



**Figure 1:** Antimicrobial effect of *G. glutinosum* methanol extract on *H. pylori* growth. *H. pylori* culture suspensions were incubated in the presence or absence of various concentrations of *G. glutinosum* methanol extract, after which growth was measured by the MTT reduction assay and CFU method, as explained in the text. Data represent means  $\pm$  SEM of triplicate determinations from three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , compared with *G. glutinosum* extract-untreated control. Optical density at 570 nm for untreated cells was  $0.85 \pm 0.03$  for the MTT reduction technique, whereas CFU control value for untreated cells was  $3.5 \times 10^8 \pm 8 \times 10^6$  CFU/ml.

## Discussion

Medicinal plants have become popular worldwide because of their potential health benefits; these plants can be consumed or directly applied to treat infections (Rojas et al., 2006). Compounds synthesized by plants have great therapeutic potential due to their chemical constituents, for which the evaluation of their antimicrobial activity is important to develop alternative pharmacological products (Rodríguez-Fragoso et al., 2008).

There are studies with *Asteraceae* plant extracts as antibacterial agents, but none is related to their effects against *H. pylori*; the selection of *G. glutinosum* for the present study was based on its medicinal traditional use in Mexico. The use of aqueous and methanol plant extracts is common for this type of studies (Akihisa et al., 2005; Jiménez-Arellanes et al., 2003; Rai and Acharya, 1999).

Various biological activities of plants of the *Asteraceae* family including *Baccharis gaudichaudiana* (Guo et al., 2006), *Anthemis aciphylla* (Baser et al., 2006), *Echinops ritro* (Fokialakis et al., 2006), and *Pterocaulon spp* (Stein et al., 2006) have been reported. *G. glutinosum* hexane extracts were shown to possess antibacterial and antifungal activities (Canales et al., 2007). In the present study, *G. glutinosum* extract MICs against *H. pylori* ranged from 31.25 µg/ml to 250 µg/ml. It is accepted that antimicrobial agents from plants have clinical potential if their MICs are in the range from 100 to 1000 µg/ml (Drusano, 2004); thus, the results of the present study may be an indication of an important antibiotic activity of *G. glutinosum* extracts against *H. pylori*.

Medicinal plants have proven to be important sources of antimicrobial agents, many of which have been the basis for the development of new pharmaceuticals drugs, which may overcome the increasing resistance of many pathogens to common antibiotics (Chinedum, 2005; Moreillon, 2000; Rusell, 2000).

## Conclusion

To our knowledge, this is the first report showing that *G. glutinosum* methanol extracts inhibit *H. pylori* growth in-vitro. There are still a number of plant compounds that remain to be evaluated at the molecular, cellular, and physiological levels for their potential to treat human diseases.

## Acknowledgement

This work was supported by the Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICyT) from Universidad Autónoma de Nuevo León to RGF.

## References

1. Akihisa, T., Franzblau, S.G., Ukiya, M., Okuda, H., Zhang, F., Yasukawa, K., Suzuki, T. and Kimura, Y. (2005). Antitubercular activity of triterpenoids from *Asteraceae* flowers. *Boil. Pharm. Bull.* 28,158-160.
2. Arana, J.C. and Corona, A. (2009). Cancer Gástrico. *Rev. Fac. Med.* 47,204-209.
3. Baser, K.H.C., Demirci, B., Iscan, G., Hashimoto, T., Demirci, F., Noma, Y. and Asakawa, Y. (2006). The essential oil constituents and antimicrobial activity of *Anthemis aciphylla* BOISS. var. *discoidea* BOISS. *Chem. Pharm. Bull.* 54,222-225.
4. Borchers, A.T., Keen, C.L., Stern, J.S. and Gershwin, M.E. (2000). Inflammation and Native American medicine: the role of botanicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 72,339-347.
5. Caballero-Hernández, D., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R. and Rodríguez-Padilla, C. (2009). Role of immunogenic fetuin A on L5178Y-R lymphoma tumorigenesis. *Cancer Invest.* 27,257-263.
6. Calderon, J.S., Segura-Correa, R., Cespedes, C.L. and Toscano, R.A. (2001). Crystal and molecular structure of (-)-17-hydroxy-neoclerod-3-en-15-oic acid from *Gymnosperma glutinosum*. *Anal. Sci.* 17,1467-1468.
7. Canales, M., Hernández, T., Serrano, R., Hernández, L.B., Duran, A., Ríos, V., Sigrist, S., Hernández, H.L., Garcia, A.M., Angeles-López, O., Fernández-Araiza, M.A. and Avila, G. (2007). Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: a comparative study. *J. Ethnopharmacol.* 110,343-347.
8. Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A. and Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *J. Ethnopharmacol.* 97,429-439.
9. Chinedum, I.E. (2005). Microbial resistance to antibiotics. *Afr. J. Biotechnol.* 4,1606-1611.
10. Domínguez, X.A. and Torre, B. (1974). Two pentamethoxylated flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 13,1624-1625.
11. Drusano, G.L. (2004). Antimicrobial pharmacodynamics: Critical interactions of “bug and drug”. *Nature Rev.* 2,289-300.
12. Dunn, B.E., Cohen, H. and Blaser, M.J. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10,720-741.
13. Fokialakis, N., Cantrell, C.L., Duke, S.O., Skaltsounis, A.L. and Wedge, D.E. (2006). Antifungal activity of thioterpens from *Echinops ritro*. *J. Agric. Food Chem.* 54,1651-1655.

**Gomez et al., Afr J Tradit Complement Altern Med. (2016) 13(4):55-59**

doi: 10.21010/ajtcam.v13i4.9

14. Garcia-Alvarado, J.S., Verde-Star, M.J. and Heredia-Rojas, N.L. (2001). Traditional uses and scientific knowledge of medicinal plants from Mexico and Central America. *J. Herbs Spices Med. Plants* 8,37-90.
15. Gomez-Flores, R., Hernández-Martínez, H., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R., Quintanilla-Licea, R., Monreal-Cuevas, E. and Rodríguez-Padilla, C. (2010). Antitumor and immunomodulating potential of *Coriandrum sativum*, *Piper nigrum* and *Cinnamomum zeylanicum*. *J. Nat. Prod. (India)* 3,54-63.
16. Gomez-Flores, R., Verastegui-Rodríguez, L., Quintanilla-Licea, R., Tamez-Guerra, P., Monreal-Cuevas, E., Tamez-Guerra, R. and Rodríguez-Padilla, C. (2009). Antitumor properties of *Gymnosperma glutinosum* leaf extracts. *Cancer Invest.* 27,149 – 155.
17. Gomez-Flores, R., Arzate-Quintana, C., R. Quintanilla-Licea, P. Tamez-Guerra, R. Tamez-Guerra, E. Monreal-Cuevas and C. Rodríguez-Padilla. 2008. Antimicrobial Activity of *Persea Americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) Leaf Extracts and Active Fractions Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Am.-Eur. J. Sci. Res.* 3,188-194.
18. Guo, Y., Li, Y., Xu, J., Watanabe, R., Oshima, Y., Yamakuni, T. and Ohizumi, Y. (2006). Bioactive ent-clerodane diterpenoids from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. *J. Nat. Prod.* 69,274-276.
19. Hoffman, J.S., Katz, L.M. and Cave, D.R. (1999). Efficacy of a 1 –week regimen of ranitidine bismuth citrate in combination with metronidazole and clarithromycin for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol. Ther.* 13,503-506.
20. Jimenez-Arellanes, A., Meckes, M., Ramirez, R., Torres, J. and Luna-Herrera, J. (2003). Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytother. Res.* 17,903-908.
21. Maldonado, M., Segura-Carrera, R., Ortega, A., Calderón, J.S. and Fronczek, F.R. (1994). Ent-Labdane y Neo-Clerodore diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 35,721-724.
22. Martínez, M. (1989). *Las Plantas Medicinales de México*. Ediciones Botas, (México), p. 1-656.
23. Moreillon, P. (2000). Means of bacterial resistance. *Rev. Med. Suisse Romande* 120,641-50.
24. Quintanilla-Licea, R., Morado-Castillo, R., Gomez-Flores, R., Laatsch, H., Verde-Star, M.J., Hernández-Martínez, H., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R. and Rodríguez-Padilla, C. (2012). Bioassay-guided isolation and identification of cytotoxic compounds from *Gymnosperma glutinosum* leaves. *Molecules* 17,11229-11241.
25. Rai, M.K. and Acharya, D. (1999). Screening of some Asteraceous plants for antimycotic activity. *Comp. Newsl.* 34,37-43.
26. Ramakrishnan, K. and Salinas, R.C. (2007). Peptic Ulcer Disease. *Am. Fam. Physician.* 76,1005-1012.
27. Rodríguez-Fragoso, L., Reyes-Esparza, J., Burchielb, S., Herrera-Ruiza, D., Torres, E. (2008). Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227,125-35.
28. Rojas, J.J., Ochoa, V.J., Ocampo, S.A. and Muñoz, J.F. (2006). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complement Altern. Med.* 6,2.
29. Russell, A.D. (2000). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 92,121S-135S.
30. Serrano, R., Hernández, T., Canales, M., García-Bores, A.M., Romo De Vivar, A., Céspedes, C.L. and Ávila, J.G. (2009). Ent-labdane type diterpene with antifungal activity from *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. (Asteraceae). *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas* 8,412-418.
31. Stein, A.C., Alvarez, S., Avancini, C., Zacchino, S. and von-Poser, G. (2006). Antifungal activity of some coumarins obtained from species of Pterocaulon (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 107,95-98.
32. Torrado-Truiti, M.C., Sarragiotto, M.H., Abreu Filho, B.A., Vataru-Nakamura, C. and Dias Filho, B.P. (2003). *In Vitro* antibacterial activity of a 7-O-β-D-glucopyranosyl-nutanocoumarin from *Chaptalia nutans* (Asteraceae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98,283-286.

## **ANEXO 2**

### **PARTICIPACION EN CONGRESOS**



## Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by an Asteraceae family plant methanol extract

David Espinosa-Ramos<sup>1</sup>, Ricardo Gomez-Flores<sup>1</sup>, Patricia Tamez-Guerra<sup>1</sup>, Ramiro Quintanilla-Licea<sup>1</sup>, Myriam de la Garza-Ramos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Ave. Universidad s/n. San Nicolás de los Garza, N. L. México. 66450. <sup>2</sup>Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, 64460, México. E-mail: alonsoespinosa81@hotmail.com

**Abstract:** *Helicobacter pylori* is a spiral Gram-negative bacterium associated with inflammation of the gastric mucosa, peptic ulcer, and gastric adenocarcinoma; it is one of the leading causes of cancer death worldwide. Treatment prescribed to patients with gastric ulcer has failed in many cases mainly due to antibiotic resistance and important side effects such as taste disturbances, vaginal candidiasis, and pseudomembranous colitis. Interest in botanical medicine is increasing as a viable alternative to the traditional one. Plant leaves of the Asteraceae family are used to treat diarrhea, ulcers and rheumatism. The aim of this study was to evaluate the activity of aqueous and methanolic extracts from plants of the Asteraceae family against *H. pylori* growth *in vitro*, using the colorimetric tetrazolium bromide (MTT) reduction assay. We observed that methanolic extracts from plants of the Asteraceae family showed up to 82% *H. pylori* growth inhibition (MIC at 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The results of the present study contribute to the body of knowledge of medicinal plants with antimicrobial potential, particularly against *H. pylori*.

**Keywords:** *Helicobacter pylori* • Asteraceae family plant • Methanolic extracts • Aqueous extracts

**Introduction:** *H. pylori* infects and colonizes the human stomach in 50% of the world's population (Hongying *et al.*, 2014). Chronic infection in the human stomach is characterized by chronic inflammation. The development of gastric adenocarcinoma, particularly of the intestinal type, is preceded by the development of chronic gastritis, atrophic gastritis, intestinal metaplasia, and dysplasia. In developing countries, 70 to 90% of the population becomes infected before 10 years of age and more than 80% of adults and 50% of children are colonized by *H. pylori* compared with 30% of adults and 10% of children in developed countries (Dunn *et al.*, 1997, Dye *et al.*, 2002). In México, seroprevalence of *H. pylori* is higher than 50% (Alvarado-Esquivel *et al.*, 2013). The first-line treatment option for *H. pylori* consists of a 7 to 10 days regimen with proton-pump inhibitor (PPI), plus amoxicillin, and clarithromycin (Alahdab *et al.*, 2014). The use of clarithromycin increases resistance to *H. pylori* (Wu *et al.*, 2014). Treatment prescribed to patients with gastric ulcer fail in many cases mainly due to antibiotic resistance, in addition to induced side effects. Interest in botanical medicine has increased in recent years, physicians and people seem to show preference for products that contain "natural extracts" instead of products based on "synthetic" substances (Borchers *et al.*, 2000, Torrado-Truitt *et al.*, 2003) The first report of plants against *H. pylori* was made in 1991 (Cassel-Beraud *et al.*, 1991). There are reports of methanol and aqueous extracts of Mexican plants that have inhibitory effect against *H. pylori* (Castillo-Juárez *et al.*, 2009). The plant compounds including polyphenols, flavonoids, quinones, coumarins, terpenoids and alkaloids. The anti-*H. pylori* action mechanism, including inhibition of enzymatic (urease, DNA



gyrase, dihydrofolate reductase, N-acetyltransferase, and myeloperoxidase) and anti-adhesion activities, high redox potential and hydrophilic/hydrophobic natures of compounds (Wang, 2014). The aim of this study was to evaluate aqueous and methanol plants extracts using the MTT tetrazolium reduction assay as a viability test to assess direct effects of these plant extracts against *H. pylori* growth *in vitro*.

### Materials and Methods:

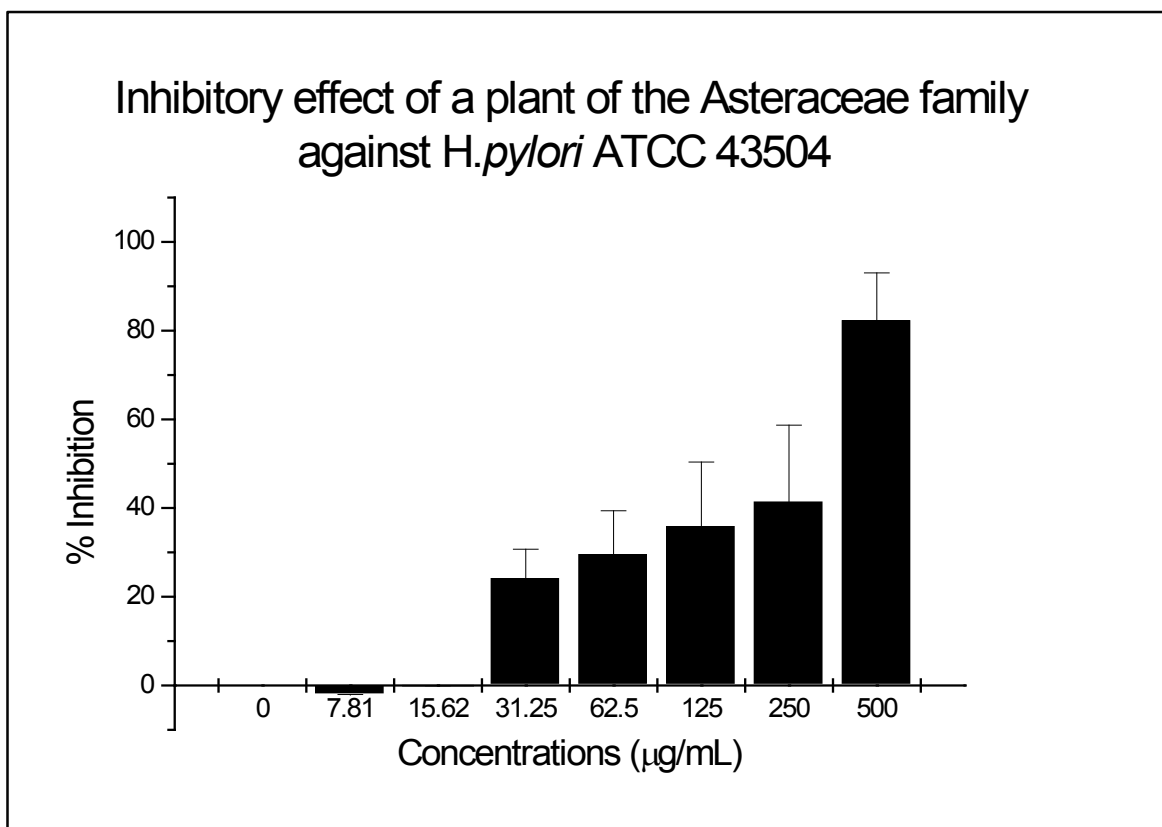
Five grams of each sample were used to prepare the extracts. For aqueous extracts, the plants were boiled for 10 min with 80 mL of purified water filtered and then lyophilized in freeze dry system (LABCONCO Corp., Kansas City, MI) for about four hours. Once the sample was obtained the amount of extracts was calculated. In the case of methanol extracts the material was extracted for 72 hours in 80 mL of methanol. After filtration the extracts were evaporated in a Speed Vac (Milford, MA). The plants screened in the present study were *Persea americana* Mill (Lauraceae), *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose, a plant of the Asteraceae family (its use is in the process of patenting), *Ibervillea sonorae* Green, and *Phoenix dactylifera* Linn.

**Bacterial strain and culture conditions.** *H. pylori* standard strain ATCC 43504 was grown on *Brucella* broth for a day at 37 °C. The strain was identified by Gram staining morphology and biochemical positive tests for catalase and urease.

**Minimum inhibitory concentration (MIC) determinations.** The aqueous and methanol extracts were tested by MTT tetrazolium reduction assay in 96-flat well microplates. The extracts were dissolved in *Brucella* broth to obtain a final concentration 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, and 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A volume of 50  $\mu\text{L}$  of *H. pylori* ( $2.5 \times 10^5$  bacteria  $\text{mL}^{-1}$ ) was placed in the plate wells and incubated. The MIC was determined using the MTT reduction assay, being the lowest concentration of the extracts in the plate with no bacterial growth. Before extracts were incubated, we added 15  $\mu\text{L}$  of MTT and incubated for 15 min, then 80  $\mu\text{L}$  of DMSO were added to dissolve the formazan crystals. The absorbances were measured in a microplate reader at 570 nm (DTX 800/880 Multimode Detectors, Fullerton, CA). All the experiments were performed in triplicate and repeated at least three times. Tetracyclin was used as a positive control.

### Results and Discussion:

Methanolic and aqueous extracts of 5 different plants were tested *in vitro* for their anti *H. pylori* activity. No aqueous extract of the 5 plants showed *in vitro* effect against *H. pylori* ATCC 43504. Only methanolic extracts from plants of the Asteraceae family showed inhibitory effect against *H. pylori*. Such results are shown in Figure 1. The vehicle control did not affect *H. pylori* viability.



**Figure 1.** Inhibitory effect of methanol plant leaves extract of a plant of the Asteraceae family.

As seen in Figure 1, the Asteraceae plant methanolic extracts showed up to 82.3% growth inhibition of *H. pylori* ATCC 43504 at a concentration of  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0.05$ ), and the growth inhibition activity was in a concentration-dependent manner.

The beneficial medicinal effects of plant materials typically result from the combinations of secondary products present in the plant. In plants, these compounds are mostly secondary metabolites such as alkaloids, steroids, tannins, and phenol compounds, which are synthesized and deposited in specific parts or in all parts of the plant (Parekh *et al.*, 2005).

Although our aqueous extracts of *Persea americana* Mill (Lauraceae), *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton and Rose, a plant of the Asteraceae family, *Ibervillea sonora* Green, and *Phoenix dactylifera* Linn did not affect *H. pylori* viability, authors such as Castillo *et al.* (2013), reported anti-*Helicobacter pylori* activity from aqueous extracts of *Persea americana* Mill with a minimum inhibitory concentration (MIC)  $> 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  tested with the agar dilution method.

Methanolic extracts of plants used in this work have previously been tested against *H. pylori*. The MIC of *Ibervillea sonora* Green against *H. pylori* is reported of 200 to  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Robles-Zepeda *et al.*, 2011). Also, methanol extract of *Persea americana* Mill has been reported as active with a MIC  $< 7.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  tested with the broth dilution method (Castillo *et al.*, 2013).



Asteraceae plants have been reported to contain essential oils, flavonoids (Wollenweber *et al.*, 1981), among other substances, and possess antimicrobial and antitumor activities.

Our Asteraceae plant methanolic extracts showed a growth inhibition of *H. pylori* ATCC 43504 at a concentration of 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and the activity was in a concentration-dependent manner. However the results obtained in this research can not be compared with others due to the bioassay employed. The active concentrations used in the present study can be considered high, nevertheless there are active components which can inhibit the growth of the bacteria.

The MTT reduction assay was standardized in order to test the activity anti-*Helicobacter pylori* of plants. It is possible that during the extraction method or when the plants were boiled some trace amounts of compounds evaporated.

**Conclusions:** The methanolic extracts from a plant of the Asteraceae family showed up to 82.3% *H. pylori* growth inhibition at a concentration of 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , which warrants further studies on diverse *in vitro* and *in vivo* parameters.

#### References:

- Alahdab YO, Kalayci C 2014. *Helicobacter pylori*: Management in 2013. World J Gastroenterol, 20(18):5302-5307.
- Alvarado-Esquivel C, Hernandez-Tinoco J, Sanchez-Anguiano L, Ramos-Nevarez A, Cerrillo-Soto S, Saenz-Soto L 2013. High Seroprevalence of *Helicobacter Pylori* Infection in Inmates: A Case Control Study in a Northern Mexican City. Gastroenterology Research 6(6):227-232.
- Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Analyst. 125:989-1009.
- Berridge M, Herst P, Tan A 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. Biotechnology Annual Review 11:127-152.
- Borchers AT, Keen CL, Stern JS, Gershwin ME 2000. Inflammation and native American medicine: the role of botanicals. Am. J. Clin. Nutr., 72(2):339-47.
- Cassel - Beraud AM., Le Jan J, Mouden JC, Andriantsoa M., Andriantsiferana R 1991. Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive,
- Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. J. Ethnopharmacol., 122( 2):402 -405.
- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. 1997. *Helicobacter pylori*. Clin. Microbiol. Rev., 10( 4); 720–741.
- Dye BA, Kruszon-Moran D, McQuillan G. 2002. The relationship between periodontal disease attributes and *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. Am J Public Health., 92(11):1809-1815.
- Mégraud F. 2012. The challenge of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: the comeback of bismuth-based quadruple therapy. Therap. Adv Gastroenterol., 5(2):103-109.
- Parekh J, Jadeja D, Chanda S 2005. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. Turk J Biol. 29:203-210
- Peschel W, Sanchez-Rabaneda F, Dn, W. Plescher A, Gartzia I, Jimenez D, Lamuela- Raventos R, Buxaderas S, Condina C 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. Food Chem. 97:137-150.



- Torrado-Truiti MC, Sarragiotto MH, Abreu Filho BA, Vataru-Nakamura C, Dias Filho BP 2003. In Vitro antibacterial activity of a 7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-nutanocoumarin from *Chaptalia nutans* (Asteraceae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98(2):283-286.
- Wollenweber E, Dietz, V. 1981. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry.* 20:869–932.

## Inhibition of *Helicobacter pylori* growth by an Asteraceae family plant methanol extract

### “Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por un extracto de metanol de una planta de la familia Asteraceae”

David Espinosa-Ramos<sup>1</sup>, Ricardo Gomez-Flores<sup>1</sup>, Patricia Tamez-Guerra<sup>1</sup>,  
Ramiro Quintanilla-Licea<sup>1</sup>, Myriam de la Garza-Ramos<sup>2</sup>

1 Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Ave. Universidad s/n. San Nicolás de los Garza, N. L. México. 66450.

2 Facultad de Odontología / Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León. Calle Dr. Carlos Canseco y Ave. Gonzalitos s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, 64460, México.

#### Abstract:

*Helicobacter pylori* is a spiral Gram-negative bacterium associated with inflammation of the gastric mucosa, peptic ulcer, and gastric adenocarcinoma; it is one of the leading causes of cancer death worldwide. Treatment prescribed to patients with gastric ulcer has failed in many cases mainly due to antibiotic resistance and important side effects such as taste disturbances, vaginal candidiasis, and pseudomembranous colitis. Interest in botanical medicine is increasing as a viable alternative to the traditional one. Plant leaves of the Asteraceae family are used to treat diarrhea, ulcers and rheumatism. The aim of this study was to evaluate the activity of aqueous and methanolic extracts from plants of the Asteraceae family against *H. pylori* growth *in vitro*, using the colorimetric tetrazolium bromide (MTT) reduction assay. We observed that methanolic extracts from plants of the Asteraceae family showed up to 82% *H. pylori* growth inhibition (MIC at 500 µg/mL). The results of the present study contribute to the body of knowledge of medicinal plants with antimicrobial potential, particularly against *H. pylori*.

**Keywords:** *Helicobacter pylori* • Asteraceae family plant • Methanolic extracts • Aqueous extracts

## INTRODUCTION

*H. pylori* infects and colonizes the human stomach in 50% of the world's population (Hongying et al., 2014). Chronic infection in the human stomach is characterized by chronic inflammation. The development of gastric adenocarcinoma, particularly of the intestinal type, is preceded by the development of chronic gastritis, atrophic gastritis, intestinal metaplasia, and dysplasia. In developing countries, 70 to 90% of the population becomes infected before 10 years of age and more than 80% of adults and 50% of children are colonized by *H. pylori* compared with 30% of adults and 10% of children in developed countries (Dunn et al., 1997, Dye et al., 2002). Researchers have mentioned the oral cavity as the main reservoir of intragastric *H. pylori* and it is likely that oral health is directly related to infection or reinfection with *H. pylori* (Cover et al., 1995). *H. pylori* has been detected in saliva, plaque and periodontal disease patients by PCR, culture, urease test; this organism can promote the development of lesions of the oral mucosa, particularly recurring ulcer disease and lesions of the oral mucosa (Rigglo and Lennon, 1999; Nguyen et al., 1993). In México, seroprevalence of *H. pylori* is higher than 50% (Alvarado-Esquivel et al., 2013). The first-line treatment option for *H. pylori* consists of a 7 to 10 days regimen with proton-pump inhibitor (PPI), plus amoxicillin, and clarithromycin (Alahdab et al., 2014). The use of clarithromycin increases resistance to *H. pylori* (Wu et al., 2014). Treatment prescribed to patients with gastric ulcer fail in many cases mainly due to antibiotic resistance, in addition to induced side effects. Interest in botanical medicine has increased in recent years, physicians and people seem to show preference for products that contain "natural extracts" instead of products based on "synthetic" substances (Borchers et al., 2000, Torrado-Truiti et al., 2003) The first report of plants against *H. pylori* was made in 1991 (Cassel-Beraud et al., 1991). There are reports of methanol and aqueous extracts of Mexican plants that have inhibitory effect against *H. pylori* (Castillo-Juárez et al., 2009). The plant compounds including polyphenols, flavonoids, quinones, coumarins, terpenoids and alkaloids. The anti-*H. pylori* action mechanism, including inhibition of enzymatic (urease, DNA gyrase, dihydrofolate reductase, N-acetyltransferase, and myeloperoxidase) and anti-adhesion activities, high redox potential and hydrophilic/hydrophobic natures of compounds (Wang, 2014). The aim of this study was to evaluate aqueous and methanol plants extracts using the MTT tetrazolium reduction assay as a viability test to assess direct effects of these plant extracts against *H. pylori* growth in vitro.

## Materials and Methods

Five grams of each sample were used to prepare the extracts. For aqueous extracts, the plants were boiled for 10 min with 80 mL of purified water filtered and then lyophilized in freeze dry system (LAB-CONCO Corp., Kansas City, MI) for about four hours. Once the sample was obtained the amount of extracts was calculated. In the case of methanol extracts the material was extracted for 72 hours in 80 mL of methanol. After filtration the extracts were evaporated in a Speed Vac (Milford, MA). The plants screened in the present study were *Persea americana* Mill (Lauraceae), *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose, a plant of the Asteraceae family (its use is in the process of patenting), *Ibervillea sonorae* Green, and *Phoenix dactylifera* Linn.

### Bacterial strain and culture conditions

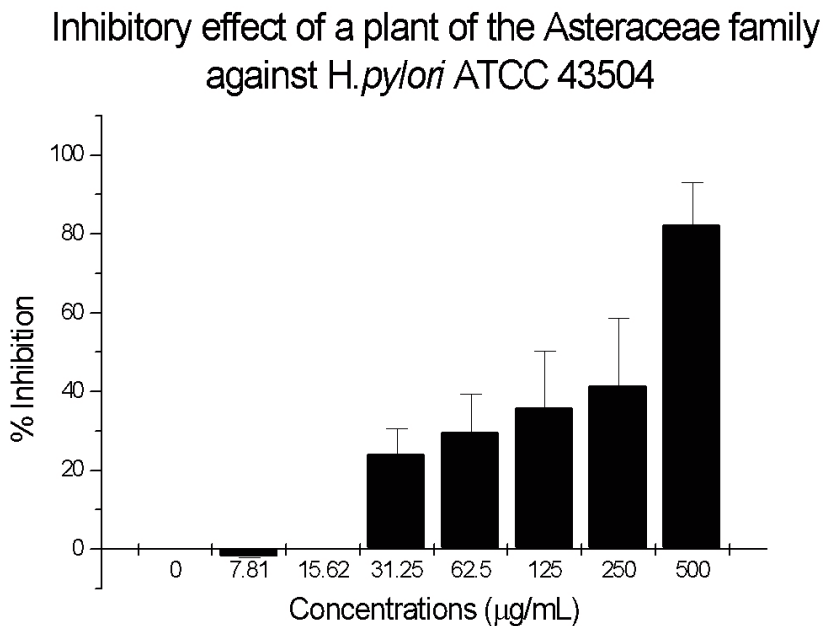
*H. pylori* standard strain ATCC 43504 was grown on *Brucella* broth for a day at 37°C. The strain was identified by Gram staining morphology and biochemical positive tests for catalase and urease.

### Minimum inhibitory concentration (MIC) determinations

The aqueous and methanol extracts were tested by MTT tetrazolium reduction assay in 96-flat well microplates. The extracts were dissolved in *Brucella* broth to obtain a final concentration 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, and 500 µg/mL. A volume of 50 µL of *H. pylori* ( $2.5 \times 10^5$  bacteria/mL) was placed in the plate wells and incubated. The MIC was determined using the MTT reduction assay, being the lowest concentration of the extracts in the plate with no bacterial growth. Before extracts were incubated, we added 15 µL of MTT and incubated for 15 min, then 80 µL of DMSO were added to dissolve the formazan crystals. The absorbances were measured in a microplate reader at 570 nm (DTX 800/880 Multimode Detectors, Fullerton, CA). All the experiments were performed in triplicate and repeated at least three times. Tetracyclin was used as a positive control.

### Results

Methanolic and aqueous extracts of 5 different plants were tested *in vitro* for their anti *H. pylori* activity. No aqueous extract of the 5 plants showed *in vitro* effect against *H. pylori* ATCC 43504. Only methanolic extracts from plants of the Asteraceae family showed inhibitory effect against *H. pylori*. Such results are shown in Figure 1. The vehicle control did not affect *H. pylori* viability.



**Figure 1.** Inhibitory effect of methanol plant leaves extract of a plant of the Asteraceae family.

As seen in Figure 1, the Asteraceae plant methanolic extracts showed up to 82.3% growth inhibition of *H. pylori* ATCC 43504 at a concentration of 500 µg/mL ( $p < 0.05$ ), and the growth inhibition activity was in a concentration-dependent manner.

## Discussion

The beneficial medicinal effects of plant materials typically result from the combinations of secondary products present in the plant. In plants, these compounds are mostly secondary metabolites such as alkaloids, steroids, tannins, and phenol compounds, which are synthesized and deposited in specific parts or in all parts of the plant (Parekh et al., 2005).

Although our aqueous extracts of *Persea americana* Mill (Lauraceae), *Pachycereus marginatus* (DC.) Britton & Rose, a plant of the Asteraceae family, *Ibervillea sonora* Green, and *Phoenix dactylifera* Linn did not affect *H. pylori* viability, authors such as Castillo et al., 2013, reported anti-*Helicobacter pylori* activity from aqueous extracts of *Persea americana* Mill with a minimum inhibitory concentration (MIC) > 1000 µg/mL tested with the agar dilution method.

Methanolic extracts of plants used in this work have previously been tested against *H. pylori*. The MIC of *Ibervillea sonora* Green against *H. pylori* is reported of 200 to 400 µg/mL (Robles-Zepeda et al., 2011). Also, methanol extract of *Persea americana* Mill has been reported as active with a MIC < 7.5 µg/mL tested with the broth dilution method (Castillo et al., 2013).

Asteraceae plants have been reported to contain essential oils, flavonoids (Wollenweber et al., 1981), among other substances, and possess antimicrobial and antitumor activities.

Our Asteraceae plant methanolic extracts showed a growth inhibition of *H. pylori* ATCC 43504 at a concentration of 500 µg/mL, and the activity was in a concentration-dependent manner. However the results obtained in this research can not be compared with others due to the bioassay employed. The active concentrations used in the present study can be considered high, nevertheless there are active components which can inhibit the growth of the bacteria.

The MTT reduction assay was standardized in order to test the activity anti-*Helicobacter pylori* of plants. It is possible that during the extraction method or when the plants were boiled some trace amounts of compounds evaporated.

## Conclusions:

The methanolic extracts from a plant of the Asteraceae family showed up to 82.3% *H. pylori* growth inhibition at a concentration of 500 µg/mL, which warrants further studies on diverse *in vitro* and *in vivo* parameters.

---

## References

- Hongying F, Xianbo W, Fang Y, Yang B, Beiguo L. 2014. Oral Immunization with Recombinant *Lactobacillus acidophilus* Expressing the Adhesin Hp0410 of *Helicobacter pylori* Induces Mucosal and Systemic Immune Responses Clin. Vaccine Immunol. 21(2):126-132.
- Dunn B, Cohen H, Blaser M. 1997. *Helicobacter pylori*. Clin. Microbiol. Rev., 10(4); 720-741.
- Dye B, Kruszon-Moran D, McQuillan G. 2002. The relationship between periodontal disease attributes and *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. Am. J. Public Health., 92(11); 1809-1815.
- Cover T, Glupczynskil Y, Lage A, Burette A, Tummuru M, Perez-Perez G, Blaser M. 1995. Serologic Detection of Infection with cagA1 *Helicobacter pylori* Strains. Journal of Clinical Microbiology., 33(6); 1496–1500.
- Riggio M, Lennon A. 1999. Identification by PCR of *Helicobacter pylori* in subgingival plaque of adult periodontitis patients. J. Med. Microbiol. 48 (1 999), 3 17-322.
- Nguyen A, Engstrand L, Genta R, Graham D, El-Zaatari F. 1993. Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 31 (1993); 783–787.
- Alvarado-Esquivel C, Hernandez-Tinoco J, Sanchez-Anguiano L, Ramos-Nevarez A, Cerrillo-Soto S, Saenz-Soto L. 2013. High Seroprevalence of *Helicobacter Pylori* Infection in Inmates: A Case Control Study in a Northern Mexican City. Gastroenterology Research, 6(6); 227-232.
- Alahdab Y, Kalayci C. 2014. *Helicobacter pylori*: Management in 2013. World J Gastroenterol, 20(18); 5302-5307.
- Wu J, Wang S, Lee Y, Yamaoka Y, Graham D, Jan C, Wu D. 2014. Detection of genotypic clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* by string tests. World J Gastroenterol., 20(12): 3343-3349.
- Borchers A, Keen C, Stern J, Gershwin M. 2000. Inflammation and native American medicine: the role of botanicals. Am. J. Clin. Nutr., 72(2); 339-47.
- Torrado-Truiti M, Sarragiotto M, Abreu Filho B, Vataru-Nakamura C, Dias Filho B. 2003. *In Vitro* antibacterial activity of a 7-O-β-D-glucopyranosyl-nutanocoumarin from *Chaptalia nutans* (Asteraceae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 98 (2); 283-286.
- Cassel-Beraud A, Le Jan J, Mouden J, Andriantsoa M. Andriantsiferana R 1991. Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive, Madagascar and the antibacterial activity in vitro of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar 59: 9-23.
- Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I. 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. J. Ethnopharmacol., 122(2); 402 -405.
- Wang Y. 2014. Medicinal plants and *H. pylori*-induced diseases. World J. Gastroenterol., 20(30): 10368-10382 Potential Antibacterial Activity. Turk J. Biol. 29; 203-210.

Parekh J, Jadeja D, Chanda S 2005. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. Turk J. Biol. 29; 203-210.

Robles-Zepeda R, Velázquez-Contreras C, Garibay-Escobar A, Gálvez-Ruiz J, Ruiz-Bustos E. 2011. Antimicrobial activity of Northwestern Mexican plants against *Helicobacter pylori*. J Med Food. 14:1280–1283.

Wollenweber E, Dietz V 1981. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. Phytochemistry 20; 869–932.

Autor de correspondencia:

David Espinosa Ramos.

alonsoespinosa81@hotmail.com

Artículo recibido:

12 de Mayo 2015.

Artículo aprobado para publicación:

26 de Junio de 2015.

### ANEXO 3

#### PROLIFERACIÓN

##### Datos de absorbancia del grupo control (570nm).

	RATÓN <sup>1</sup>						
	R1	R2	R3	R4	Media	D.E	Error
Control	0.421	0.403	0.405	0.398	0.407	0.01	0.005
ConA	0.559	0.558	0.56	0.56	0.559	1E-03	5E-04
Péptido <sup>2</sup>	0.38	0.393	0.367	0.333	0.368	0.026	0.013
	RATÓN <sup>2</sup>						
	R1	R2	R3	R4	Media	D.E	Error
Control	0.384	0.386	0.371	0.382	0.381	0.007	0.003
ConA	0.658	0.631	0.639	0.605	0.633	0.022	0.011
Péptido <sup>2</sup>	0.424	0.31	0.31	0.304	0.337	0.058	0.029
	RATÓN <sup>3</sup>						
	R1	R2	R3	R4	Media	D.E	Error
Control	0.414	0.413	0.416	0.431	0.419	0.008	0.004
ConA	0.73	0.66	0.663	0.721	0.694	0.037	0.019
Péptido <sup>2</sup>	0.343	0.313	0.387	0.378	0.355	0.034	0.017
	RATÓN <sup>4</sup>						
	R1	R2	R3	R4	Media	D.E	Error
Control	0.445	0.427	0.421	0.402	0.424	0.018	0.009
ConA	0.849	0.716	0.804	0.729	0.775	0.063	0.032
Péptido <sup>2</sup>	0.392	0.383	0.442	0.391	0.402	0.027	0.013
	RATÓN <sup>5</sup>						
	R1	R2	R3	R4	Media	D.E	Error
Control	0.388	0.372	0.382	0.38	0.381	0.007	0.003
ConA	0.571	0.603	0.609	0.574	0.589	0.02	0.01
Péptido <sup>2</sup>	0.391	0.378	0.383	0.385	0.384	0.005	0.003

**Datos de absorbancia del grupo de animales inmunizados (570nm).**

RATÓN <sup>1</sup>							
	R1	R2	R3	R4	Media	D.E	Error
Control	0.38	0.362	0.351	0.348	0.3603	0.0145	0.0072
ConA	0.478	0.506	0.523	0.561	0.517	0.0347	0.0174
Péptido <sup>1</sup>	0.354	0.357	0.354	0.359	0.356	0.0024	0.0012
RATÓN <sup>2</sup>							
	R1	R2	R3	R4	Media	D.E	Error
Control	0.259	0.256	0.261	0.263	0.2598	0.003	0.0015
ConA	0.352	0.33	0.346	0.346	0.3435	0.0094	0.0047
Péptido <sup>2</sup>	0.244	0.247	0.243	0.243	0.2443	0.0019	0.0009
RATÓN <sup>3</sup>							
	R1	R2	R3	R4	Media	D.E	Error
Control	0.465	0.489	0.481	0.481	0.479	0.0101	0.005
ConA	1.051	1.141	1.204	0.913	1.0773	0.1262	0.0631
Péptido <sup>3</sup>	0.523	0.514	0.517	0.445	0.4998	0.0367	0.0183
RATÓN <sup>4</sup>							
	R1	R2	R3	R4	Media	D.E	Error
Control	0.446	0.519	0.502	0.506	0.4933	0.0323	0.0162
ConA	0.812	1.283	1.287	1.322	1.176	0.2433	0.1216
Péptido <sup>4</sup>	0.452	0.482	0.471	0.501	0.4765	0.0205	0.0103
RATÓN <sup>5</sup>							
	R1	R2	R3	R4	Media	D.E	Error
Control	0.473	0.468	0.467	0.474	0.4705	0.0035	0.0018
ConA	1.084	1.091	1.097	0.995	1.0668	0.0481	0.0241
Péptido <sup>5</sup>	0.43	0.447	0.451	0.438	0.4415	0.0094	0.0047

**Datos de absorbancia del grupo de animales infectados (570nm)**

RATÓN <sup>1</sup>							
	R1	R2	R3	R4	Media <sup>2</sup>	D.E	Error <sup>2</sup>
Control	0.388	0.382	0.388	0.375	0.3833	0.0062	0.0031
ConA	0.426	0.434	0.41	0.416	0.4215	0.0106	0.0053
Péptido	0.385	0.368	0.355	0.352	0.365	0.015	0.0053
RATÓN <sup>2</sup>							
	R1	R2	R3	R4	Media <sup>2</sup>	D.E	Error <sup>2</sup>
Control	0.294	0.296	0.291	0.298	0.2948	0.003	0.0015
ConA	0.381	0.376	0.385	0.397	0.3848	0.009	0.0045
Péptido	0.288	0.286	0.286	0.285	0.2863	0.0013	0.0006
RATÓN <sup>3</sup>							
	R1	R2	R3	R4	Media <sup>2</sup>	D.E	Error <sup>2</sup>
Control	0.382	0.404	0.401	0.392	0.3948	0.0099	0.005
ConA	0.392	0.254	0.358	0.361	0.3413	0.0602	0.0301
Péptido	0.379	0.402	0.409	0.403	0.3983	0.0132	0.0066
RATÓN <sup>4</sup>							
	R1	R2	R3	R4	Media <sup>2</sup>	D.E	Error <sup>2</sup>
Control	0.435	0.436	0.449	0.423	0.4358	0.0064	0.0032
ConA	0.59	0.637	0.716	0.464	0.6018	0.1055	0.0528
Péptido	0.452	0.436	0.453	0.435	0.444	0.0098	0.0049
RATÓN <sup>5</sup>							
	R1	R2	R3	R4	Media <sup>2</sup>	D.E	Error <sup>2</sup>
Control	0.414	0.385	0.403	0.413	0.4038	0.0135	0.0067
ConA	0.414	0.387	0.378	0.402	0.3953	0.0159	0.008
Péptido	0.368	0.39	0.45	0.435	0.4108	0.0382	0.0191

**Datos de absorbancia del grupo de animales inmunizados e infectados (570nm)**

RATÓN <sup>1</sup>							
	R1	R2	R3	R4	MEDIA	D.E. <sup>2</sup>	ERROR
Control	0.445	0.424	0.405	0.404	0.4195	0.0193	0.0097
ConA	0.634	0.586	0.746	0.607	0.6433	0.0713	0.0356
Péptido	0.405	0.381	0.396	0.39	0.393	0.0101	0.005
RATÓN <sup>2</sup>							
	R1	R2	R3	R4	MEDIA	D.E. <sup>2</sup>	ERROR
Control	0.526	0.501	0.499	0.505	0.5078	0.0124	0.0062
ConA	0.719	0.701	0.693	0.798	0.7278	0.0481	0.024
Péptido	0.472	0.497	0.495	0.486	0.4875	0.0114	0.0057
RATÓN <sup>3</sup>							
	R1	R2	R3	R4	MEDIA	D.E. <sup>2</sup>	ERROR
Control	0.507	0.501	0.486	0.522	0.504	0.0149	0.0074
ConA	0.77	0.727	0.684	0.701	0.7205	0.0374	0.0187
Péptido	0.472	0.461	0.496	0.499	0.482	0.0185	0.0092
RATÓN <sup>4</sup>							
	R1	R2	R3	R4	MEDIA	D.E. <sup>2</sup>	ERROR
Control	0.523	0.486	0.447	0.476	0.483	0.0314	0.0157
ConA	0.749	0.621	0.691	0.646	0.6768	0.0562	0.0281
Péptido	0.498	0.481	0.475	0.442	0.474	0.0235	0.0117
RATÓN <sup>5</sup>							
	R1	R2	R3	R4	MEDIA	D.E. <sup>2</sup>	ERROR
Control	0.471	0.434	0.477	0.459	0.4603	0.019	0.0095
ConA	0.67	0.641	0.636	0.683	0.6575	0.0227	0.0113
Péptido	0.442	0.462	0.435	0.458	0.4493	0.0128	0.0064

## 12 Resumen Autobiográfico

Candidato para el grado de:

**Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología**

**“EVALUACION DEL POTENCIAL INMUNOGÉNICO DEL PÉPTIDO  
MVTLINE DE HELICOBACTER PYLORI, SOLO O EN COMBINACIÓN  
CON EXTRACTOS DE PLANTAS CONTRA LA INFECCIÓN EN UN  
MODELO MURINO”**

**Campo de Estudio:** Inmunobiología

**Biografía:**

**Datos personales:** Nacido en Monterrey, Nuevo León el 21 de Mayo de 1981, hijo de Humberto Espinosa Córdova y María del Socorro Ramos Herrera.

**Educación:** Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grados obtenidos; Cirujano Dentista en 2003, Maestro en Endodoncia en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí 2008.

Publicaciones: Gomez-Flores, R., Espinosa-Ramos, D., Quintanilla-Licea, R., Barrón Gonzalez, MP., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R., Rodriguez-Padilla, C. 2016. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF GYMNOSPERMA GLUTINOSUM (SPRENG.) LESS. (ASTERACEAE) METHANOL EXTRACTS AGAINST HELICOBACTER PYLORI. The African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines. 13(4):55-59. DOI: 10.21010/ajtcam.v13i4.9.

**“Evaluación del potencial inmunogénico del péptido MVTLINE de *Helicibacter pylori*, sólo o en combinación con extractos de plantas contra la infección, en un modelo murino”**

Comité de Tesis



Director Interno: Dr. Ricardo Gómez Flores

---

Asesor Externo: Dra. Myriam de la Garza Ramos

---

Secretaria: Dra. Patricia Tamez Guerra

---

Vocal: Dr. Edgar Mendoza Gamboa

---

Vocal: Dra. Diana Caballero-Hernández

---

Vocal: Dra. Lydia Rivera Morales

---