



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**Análisis electroforético de los cambios en la
expresión proteica de *Helicobacter pylori*
en presencia de ácido anacárdico
6 pentadecil salicílico**

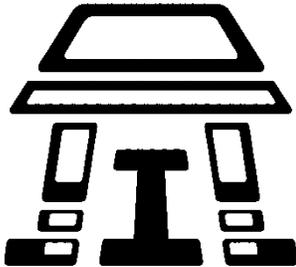
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JUAN ALBERTO RUIZ MIRANDA



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

LICENCIATURA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras

VOCAL: Dr. Eric Monroy Pérez

SECRETARIO: Dra. Irma Romero Álvarez

1er. SUPLENTE: Dra. Erika Gómez Chang

2do. SUPLENTE: Dra. Alina Uribe García

LUGAR DONDE SE ELABORÓ EL PROYECTO:

LABORATORIO 2, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, EDIFICO D, PRIMER PISO. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESORA DE TESIS:

DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

SUSTENTANTE:

JUAN ALBERTO RUIZ MIRANDA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca recibida.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA de la UNAM, **IN214317** e **IN217019**.

De manera muy especial a la Dra. Erika Gómez Chang, mi agradecimiento más sincero por su gran ayuda y asistencia técnica en la realización del análisis proteico y en el manejo de *H. pylori*.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mis padres, Juana Miranda García y Alberto Ruiz Ruiz, aunque muchas veces no expreso lo que siento, quiero darles las gracias por todo lo que me han brindado, porque sin ustedes, simplemente, no estaría aquí, gracias por todo su amor y apoyo incondicional. Gracias por guiarme y educarme personal y académicamente. Este logro no es para mí, sino de ustedes. Los amo infinitamente.

A mis hermano Eloísa, Rogelio, Maricruz, aunque no estemos juntos, gracias por sus consejos, por su apoyo moral, anímico y económico.

Igualmente a Ita y Heriberto aunque en la mayoría de las veces parece que estuviéramos en una batalla, siempre estaremos juntos. Gracias por todos los bonitos momentos que hemos pasado. Además a mis niñas Abril, Nicté, Valeria y Victoria siempre me hacen feliz, espero que algún día comprendan todo el sacrificio que hacen mis hermanos día a día para brindarles la oportunidad de ser alguien en la vida. Siempre estaré para ustedes.

Académicamente a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por todo lo que me brindo durante mi formación académica profesional y sobre todo a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de tan grandiosa institución.

También a Deporte UNAM por las becas otorgadas durante mi estancia deportiva. Por supuesto al equipo de Lucha Olímpica, principalmente al Prof. Javier Vázquez Fernández, Prof. Francisco Monter y a la Biol. Alejandra Popoca por su amistad y todo su apoyo incondicional, me ayudaron a formarme personal, física y mentalmente, muchas gracias.

A mis amigos que he conocido a lo largo de esta etapa, gracias por tantos momentos inolvidables y tantas aventuras. Es imposible nombrar a cada uno; pero a Mario Lejarazo, Zaid Villaseñor, Francisco Sánchez y en especial al L.C. Ricardo Sánchez, gracias por formar parte de mi vida y “por enseñarme las cosas que no debo de hacer”.

Con mucho cariño y respeto, a la Dra. Irma Romero Álvarez, por abrirme las puertas de su laboratorio, por instruirme al realizar éste trabajo, por su gran ayuda y sus acertados consejos, infinitas gracias. Igualmente a la Dra. Erika Gómez Chang, gracias por enseñarme con tanta paciencia y profesionalidad. Jamás encontraré las palabras exactas para expresarles toda mi gratitud por todo su tiempo y conocimiento que me brindaron. Las quiero mucho.

Por último a cada uno de mis asesores por tomarse un tiempo para la revisión del presente trabajo: Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras, Dr. Eric Monroy Pérez y Dra. Alina Uribe García. Gracias por todas sus observaciones.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

“Si es que estoy equivocado y la teología tiene razón, espero que al fin puedas ver que he cumplido con la promesa que teníamos pendiente; pero si no lo estoy, no hay por que lamentarse, me queda tu eterno recuerdo”

-H.M.C.

Con cariño a Francisca Ruiz Ruiz†

1.	Introducción	1
1.1.	Historia y descubrimiento de <i>Helicobacter pylori</i>	2
1.2.	Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i>	3
1.2.1.	Clasificación taxonómica	3
1.2.2.	Morfología	4
1.2.3.	Crecimiento y características bioquímicas para identificación	5
1.2.4.	Factores de patogenicidad y virulencia.....	5
1.3.	Epidemiología de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	9
1.4.	Patologías.....	11
1.5.	Tratamiento.....	13
1.5.1.	Tratamiento personalizado	16
1.5.2.	Problemas de las terapias actuales	16
1.6.	Plantas medicinales. Tratamiento y uso	17
1.7.	Descripción de <i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltdl). Standl.....	18
1.7.1.	Usos tradicionales.....	19
1.7.2.	Fitoquímica y farmacología.....	19
1.8.	Antecedentes directos	20
1.9.	Ácido anacárdico	22
1.10.	Justificación del trabajo.....	23
2.	Objetivo.....	23
2.1.	Objetivo particular	23
3.	Materiales y métodos.....	24
3.1.	Cepa y cultivo de <i>H. pylori</i>	24
3.1.1.	Prueba de oxidasa	24
3.1.2.	Prueba de catalasa.....	24
3.1.3.	Prueba rápida de ureasa.	24
3.2.	Preparación de los cultivos para el análisis	25
3.3.	Determinación de proteína de las muestras	28
3.4.	Electroforesis en gel de poliacrilamida/bis-acrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS)	28
3.5.	GelAnalyzer	30

3.6.	Prueba de inmunoelectrotransferencia o Western Blot.....	34
3.6.1.	Detección con anticuerpos.....	36
4.	Resultados y Discusión.....	38
4.1.	Crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i> en ausencia y presencia de Ana 15:0	38
4.2.	Muestras obtenidas	40
4.3.	Cuantificación de proteína de las muestras de estudio	40
4.4.	Electroforesis en geles de PAGE-SDS	43
4.5.	Perfiles electroforéticos.....	45
4.5.1.	Análisis de los Perfiles electroforéticos de la fracción Citoplásmica de <i>H. pylori</i> (Cp).....	47
4.5.2.	Análisis de los Perfiles electroforéticos de la fracción Sobrenadante del cultivo de <i>H. pylori</i> (Sn).	56
4.5.3.	Análisis de los Perfiles electroforéticos de la fracción del precipitado de la ultracentrifugación de <i>H. pylori</i> (Pp).	62
4.6.	Inmunoelectrotransferencia o Western Blot.....	66
5.	Conclusiones	75
6.	Perspectivas.	76
7.	Bibliografía.....	77

Lista de abreviaturas

A

- A: Absorbancia
AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos
ANA 15:0: Ácido anacárdico 6 pentadecil salicílico
ATCC: American Type Culture Collection

B

- BSA: Albumina de suero bovino

C

- CMI: Concentración mínima inhibitoria de crecimiento
CMB: Concentración mínima bactericida
Cp: Fracción citoplásmica de *Helicobacter pylori*

D

- DMSO: Dimetilsulfóxido

E

- ELC: Sustrato quimioluminiscente

F

- F.C: Frente de corrida de la electroforesis

H

- HRP: Peroxidasa de rábano

I

- I.B.P: inhibidor de la bomba de protones

K

- kDa: kilo Dalton

L

- LPS: Lipopolisacárido

M

- MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas

M.P.M: Marcador de peso molecular

P

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

PBS: Tampón fosfato salino

Pp: Fracción precipitado celular de *Helicobacter pylori*

PAGE-SDS: Electroforesis en gel de poliacrilamida/bis-acrilamida con dodecilsulfato sódico

PM: Peso molecular

PSA: Persulfato de amonio

R

Rf: Relación de frente de corrida

rpm: revoluciones por minuto

S

Sn: Fracción sobrenadante del cultivo de *Helicobacter pylori*

SDS: Dodecilsulfato sódico

T

T: Tiempo del muestreo

TEMED: Tetrametiletilendiamina

TMDF: N'N'N'N' tetrametil-p-fenilendiamina

TRIS HCl: Trisaminometano-ácido clorhídrico

TBS: Tris buffer salino

TBS-T: Tris buffer salino-polisorbato 20 (Tween)

W

WGO: Organización Mundial de Gastroenterología

WHO: Organización Mundial de la Salud

1. Introducción

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, polimórfica y microaerófila. Es la única bacteria que logra colonizar y sobrevivir en epitelio gástrico humano, se sabe que infecta a más del 50% de la población a nivel mundial. Está relacionada directamente con enfermedades gástricas como: la inflamación gástrica, úlcera gástrica o duodenal, cáncer gástrico y linfoma tipo MALT y actualmente es considerada como un carcinógeno tipo I por la Organización Mundial de la Salud.

Para la erradicación de *H. pylori* en pacientes infectados se administran diferentes tratamientos como la terapia triple, en caso de no lograrlo, se recurre a la terapia cuádruple, sin embargo, la resistencia a los antibióticos, la falta de apego al tratamiento y el alto costo de los medicamentos hacen difícil la erradicación total.

La herbolaria y medicina tradicional en México, ha sido un punto de partida para la creación de más y mejores tratamientos para curar diferentes enfermedades.

En este trabajo nos referiremos en particular a la corteza del árbol *Amphipterygium adstringens*, mejor conocido como el cuachalalate, la cual ha sido utilizada para diferentes afecciones, sobre todo, para el tratamiento de enfermedades gástricas.

Estudios recientes han demostrado el efecto bactericida de la mezcla de ácidos anacárdicos del cuachalalate sobre *H. pylori* con una CMI de 10 µg/mL, donde el ácido anacárdico 15:0 es el mayoritario (Castillo-Juárez *et al.*, 2007). Sin embargo, no se ha determinado el mecanismo por el cual estos ácidos anacárdicos logran la inhibición de *H. pylori*.

Por ello el presente trabajo se dio a la tarea de tratar de dilucidar el posible mecanismo por el cual el ácido anacárdico 15:0 logra inhibir a *Helicobacter pylori* mediante el estudio de los cambios en la expresión proteica en presencia del compuesto a través de un análisis electroforético en condiciones desnaturizantes.

1.1. Historia y descubrimiento de *Helicobacter pylori*

En 1892 Bizzozero observó, por primera vez, la presencia de microorganismos espirales en biopsias de estómagos de perros y humanos (Figura & Bianciardi, 2002). Posteriormente, en 1899 se relacionó su presencia con desórdenes del tracto gastrointestinal inferior, sin embargo, se consideraron a estos microorganismos como contaminantes de alimentos digeridos en lugar de verdaderos colonizadores (Van Amsterdam *et al.*, 2006).

No fue hasta finales del siglo pasado, en 1982, cuando Barry J. Marshall y J. Robin Warren hicieron un descubrimiento que cimbró el ambiente científico de la Medicina, la Bacteriología y sobre todo de la Gastroenterología. Estos médicos demostraron que en la mucosa del estómago humano viven bacterias que colonizan y lesionan al epitelio. Un año después lograron aislar y cultivar a este microorganismo a partir de biopsias de pacientes con gastritis crónica activa, demostrando su carácter patológico mediante experimentos de auto ingestión de cultivos (Marshall & Warren, 1984).

En un inicio el microorganismo cultivado fue incluido en el género *Campylobacter*, recibiendo el nombre de *Campylobacter pylori* por algunas características que asemejan a este género, como la morfología curveada, crecimiento en condiciones microaerófilas, su incapacidad de fermentar glucosa, sensibilidad al metronidazol y el contenido de G-C de su ADN (34%) (Marshall & Goodwin, 1987).

Unos años más tarde, en 1989, gracias a los estudios de microscopía electrónica se encontraron diferencias en los acomodos unipolares de los flagelos. Así mismo, estudios bioquímicos detectaron diferencias en el tipo de proteínas y ácidos grasos; por otro lado, el análisis de la secuencia del ARN ribosomal en la subunidad 16S, justificó la exclusión de esta bacteria del género *Campylobacter* y permitió la creación de uno nuevo género llamado *Helicobacter*, donde *H. pylori* fue el primer miembro y especie tipo (Goodwin *et al.*, 1989). A la fecha, además de ella se encuentran otras 23 especies validadas por el Comité Internacional de Sistemática Bacteriológica, 2 especies candidatas y al menos otras 10

potenciales nuevas especies. De las especies oficiales que han sido aisladas de mamíferos; 7 son de la mucosa gástrica y 16 de origen intestinal (On *et al.*, 2015).

Actualmente, se reconoce que *H. pylori* es la responsable de la infección bacteriana crónica gastrointestinal más común en el mundo, y a pesar de esto, no se le ha podido considerar como parte de la microbiota habitual por el hecho de que su presencia siempre produce en los infectados una respuesta inflamatoria en grado variable (Marshall, 2002).

En el 2005, Marshall y Warren recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por el descubrimiento de *Helicobacter pylori* y su relación clínica con la gastritis y la úlcera péptica.

1.2. Generalidades de *Helicobacter pylori*

1.2.1. Clasificación taxonómica

Actualmente la bacteria se clasifica de la siguiente manera de acuerdo a la clasificación taxonómica del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2015).

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: ϵ -proteobacteria

Orden: Campylobacteriales

Familia: Helicobacteraceae

Género: *Helicobacter*

Especie: *H. pylori* (Marshall *et al.*, 1986) Goodwin *et al.*, 1989.

<*Campilobacter pylori*>

1.2.2. Morfología

H. pylori es una bacteria polimórfica (puede ser curvada, fusiforme, o espiral), no forma esporas y es multiflagelada, (Goodwin *et al.*, 1989). Cuando crece en medios artificiales es menos espiral y adopta la forma de coco en los cultivos más viejos o que son sometidos a situaciones no favorables para su crecimiento (Figura 1), siendo un indicador de su viabilidad (Boyanova, 2011).

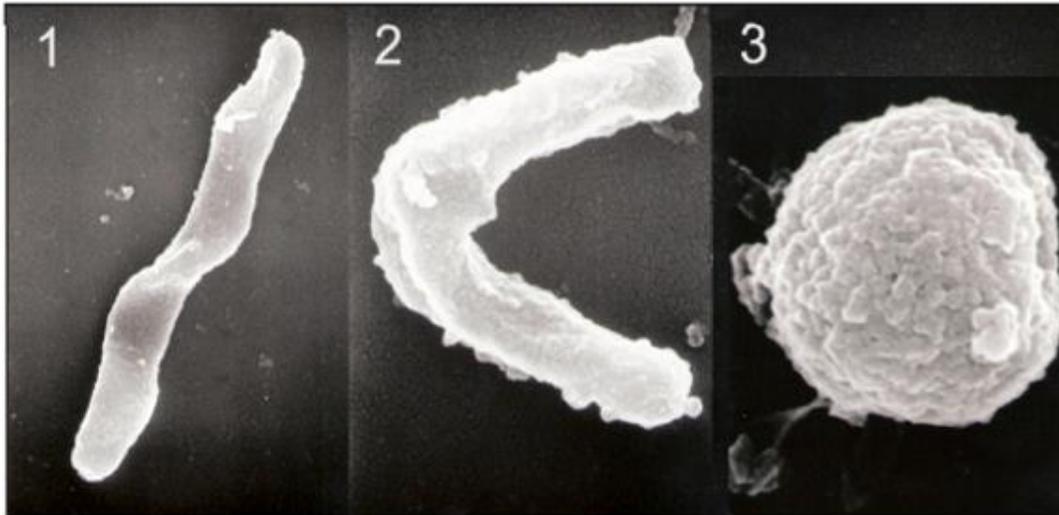


Figura 1. Microscopia electrónica de barrido. Diferentes morfologías de *Helicobacter pylori*. 1) forma espiral. 2) forma curvada o forma de “U”. 3) forma de coco. (Tomado de Duš *et al.*, 2013).

Presenta un tamaño de 0.5 a 1.0 μm de ancho y de 2-4 μm de largo. Tiene de 2 a 6 flagelos unipolares (3 μm de longitud) con un bulbo en la punta, los cuales son fundamentales para su movilidad, están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, igual que la membrana externa, que parece tener la misión de proteger a los flagelos de su degradación del medio ácido (Amieva & El-Omar, 2008).

Al igual que algunas bacterias Gram negativas, *H. pylori* produce vesículas de membrana externa que transportan proteínas de membrana, porinas, adhesinas y a algunos factores de virulencia (Boyanova, 2011).

1.2.3. Crecimiento y características bioquímicas para identificación

H. pylori es microaerofílica y neutrófila (con aclimatación al ácido), crece en concentraciones de oxígeno del 2 al 8% y de dióxido de carbono de 7 a 10%, a una temperatura de 37°C y a un pH de 6.0 a 7.0 *in vitro*, sin embargo, puede sobrevivir en un ambiente ácido de pH 2 a 2.4 como lo es el del estómago humano (Windsor *et al.*, 2000).

Es una bacteria Gram negativa y para su identificación bioquímica, se hace uso de la actividad de sus enzimas oxidasa, catalasa, ureasa y fosfatasa alcalina. No hidroliza gelatina, almidón, caseína y tirosina (Solnick & Vandamme, 2001).

1.2.4. Factores de patogenicidad y virulencia

A diferencia de *H. pylori*, otras bacterias que entran al estómago humano no son capaces de multiplicarse, mucho menos de sobrevivir. *H. pylori* utiliza diferentes mecanismos para lograr la colonización de la mucosa gástrica, al grado que ha coevolucionado con el humano y se ha especializado para vivir y persistir en ese ambiente hostil.

Estos factores se pueden clasificar en tres tipos: a) *factores de colonización gástrica*, b) *factores involucrados en la inflamación y de daño a tejido* y c) *factores de supervivencia* (Ogura *et al.*, 2000). (Figura 2).

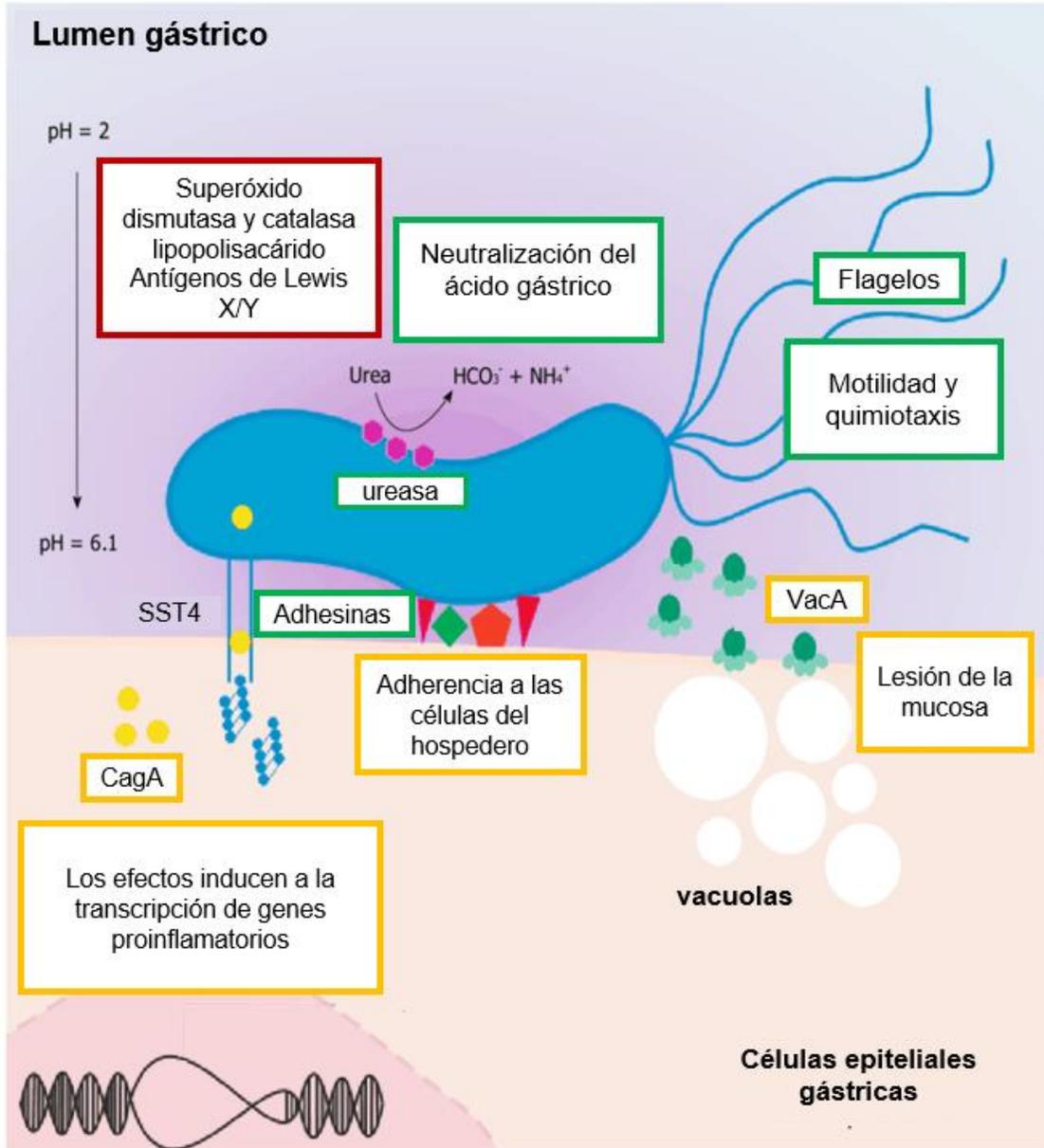


Figura 2. Esquema general de los factores de virulencia y colonización del epitelio gástrico de *Helicobacter pylori*. Recuadros Verde: factores de colonización; flagelos ureasa, motilidad, adhesinas. Recuadros Amarillos: factores de virulencia CagA y VacA. Recuadros Rojo: factores de supervivencia; lipopolisacáridos, antígenos de Lewis X/Y superóxido dismutasa (Tomado y modificado de Molina-Castro *et al.*, 2018)

a) Factores de colonización gástrica

Estos factores hacen referencia a:

- i) la movilidad conferida gracias a los flagelos unipolares que posee, que aparentemente funcionan como receptor que responde a estímulos quimiotácticos del medio, permitiendo la migración y el desplazamiento a través de la barrera de moco hasta las células del epitelio gástrico (Eaton *et al.*, 1992).
- ii) la enzima Ureasa, encargada de hidrolizar a la urea convirtiéndola en amoníaco (NH₃) y dióxido de carbono (CO₂), ayudando a neutralizar el microambiente ácido alrededor de la bacteria permitiendo la colonización. Está formada por dos subunidades, Ure α de 26-31 kDa y Ure β de 61-66 kDa, donde se localiza el sitio activo (Dunn *et al.*, 1990; Hu *et al.*, 1990; Krajewska, 2009; Turbett *et al.*, 1992; UniProt). La enzima adopta una estructura cuaternaria donde participan seis monómeros de Ure α y seis de Ure β (Sachs *et al.*, 2005).

La ureasa de *H. pylori* está codificada por un *cluster* constituido por 7 genes, los genes *ureA* (o *ure α*) y *ureB* (o *ure β*) que codifican a las subunidades estructurales de la enzima, y los genes *ureE*, *ureF*, *ureG* y *ureH*, que codifican para las proteínas accesorias encargadas de la toma e inserción de dos moléculas de níquel (Ni²⁺) en cada subunidad. El gen *ureI* codifica para un canal que permite el paso de la urea y su apertura es dependiente del pH ácido (Sachs *et al.*, 2005).

La ureasa representa del 10 al 15% de la proteína total sintetizada por *H. pylori* (Bauerfeind *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 1990; Sachs *et al.*, 2005).

- iii) las adhesinas, cuya función es la unión íntima entre las bacterias y la membrana plasmática de las células epiteliales gástricas, siendo el primer paso para ejercer su virulencia (Eaton *et al.*, 1991). Esta unión se lleva a cabo a través de glicoproteínas o glicolípidos bacterianos de membrana que interactúan con receptores específicos del hospedero. Se han reportado numerosas proteínas de membrana externa asociadas a la adherencia de *H. pylori*, sin embargo, se tienen identificadas cinco familias principales de

adhesinas: como BabA (*blood antigen binding adhesión*), SabA (*sialic acid binding adhesion*), AlpA y AlpB (*Adhesion lipoprotein*), HpaA (*Helicobacter pylori adhesin*) y OipA (*outer inflammatory protein A*). BabA es la adhesina más estudiada y caracterizada, interactúa con las células epiteliales a través de los antígenos de Lewis b (Cervantes, 2016). SabA (segunda adhesina mejor caracterizada) interactúa con diversos receptores a través de ácido siálico (Aspholm *et al.*, 2006) y se asocia con el desarrollo de metaplasia intestinal, atrofia gástrica y cáncer gástrico.

b) Factores involucrados en la inflamación y daño al tejido

Dentro de los factores que producen el daño al tejido epitelial, sobresalen ciertas proteínas que incrementa la capacidad de virulencia, como la citotoxina vacuolizante (VacA) con un peso molecular de 87 - 90 kDa, es la responsable de la vacuolización intracelular de las células del epitelio gástrico, induce a la célula a cambios en su metabolismo y eventualmente a la muerte celular (Cover & Blaser, 1992; Covacci *et al.*, 1999; Testerman *et al.*, 2014). La variación genética de esta proteína está directamente asociada con la capacidad de virulencia, así como a la distribución geográfica de las diferentes cepas de este microorganismo (Isomoto *et al.*, 2010).

El gen *vacA* posee una estructura en la cual se han identificado cuatro alelos diferentes en la secuencia señal (s1a, s1b, s1c y 2s), responsable del grado de inflamación de la mucosa gástrica y demostrándose una asociación significativa entre la presencia de s1 con el grado de infiltración celular. En la región media de *vacA* se presentan dos alelos, m1 o m2, de los cuales m1 se asocia a mayor daño de tejido gástrico. Siendo entonces la combinación más virulenta la s1m1 (Atherton, 2006).

Por otro lado, la Isla de patogenicidad Cag-PAI es un conjunto de alrededor de 30 genes, de los cuales destaca el gen que codifica para la proteína CagA, la cual posee un peso molecular de 128 a 145 kDa. Se ha demostrado que esta proteína es translocada al interior de las células gástricas por un sistema de secreción tipo IV (también secretado por la isla), una vez dentro de las células,

es activada por fosforilación mediada por enzimas celulares, lo que induce a múltiples cambios en el citoesqueleto, en la motilidad y finalmente induciendo a la apoptosis celular (Blaser & Berg, 2001).

También, la ureasa junto con altas concentraciones de amoníaco, ejerce un efecto tóxico, sobre las uniones intracelulares del epitelio gástrico, alterando la permeabilidad de la mucosa gástrica (Hazell & Lee, 1986; Wroblewski *et al.*, 2009).

a) Factores de supervivencia

H. pylori posee enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa que previenen la fagocitosis de *H. pylori* producto de la respuesta inmunitaria del hospedero. Estas enzimas son utilizadas como mecanismo de defensa contra el ataque de los neutrófilos en el tejido inflamado, actúan como antioxidantes al catabolizar a los metabolitos reactivos de oxígeno producto de los neutrófilos, los cuales tienen como función dañar a la bacteria (Götz *et al.*, 1996; Piñol & Paniagua, 1999).

Otro factor importante para la supervivencia de *H. pylori* es su lipopolisacárido (LPS), que es una molécula heterogénea con baja actividad biológica y que posee en su antígeno O los carbohidratos de Lewis x (Le x), Lewis y (Le y), o ambos. Su papel fundamental es la evasión de la respuesta inmune durante y después de la colonización del epitelio gástrico, los antígenos de Lewis muestran mimetismo molecular con el huésped, ya que las células epiteliales gástricas humanas también expresan a estos mismos antígenos. El lipopolisacárido induce a la liberación de citoquinas, ecosanoides, y metabolitos reactivos de oxígeno (Appelmelk & Vandenbrounke-Grauls, 2001).

1.3. Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*

La infección por *H. pylori* es una de las más importantes a nivel mundial. Se calcula que esta bacteria se encuentra en el 50% de la población mundial (Hunt *et al.*, 2011), esto se debe a su elevada capacidad de colonización y a su extraordinaria adaptación al huésped. Sin embargo, la prevalencia de la infección

no es uniforme, existen variaciones en función del área geográfica, del nivel socioeconómico e incluso entre diferentes grupos poblacionales de un mismo país (Figura 3). La mayor prevalencia se presenta en países subdesarrollados ya que en los países desarrollados la infección por *H. pylori* parece haber disminuido durante las últimas décadas. Se ha reportado que la infección es adquirida con mayor frecuencia durante la infancia, la transmisión de la bacteria ocurre de persona a persona, por las vías oral-oral, oral-fecal y gastro-oral (a través de saliva, heces y vómito, respectivamente) (Suerbaum *et al.*, 2002). Mientras que en los países en vías de desarrollo, el agua para consumo podría constituir una ruta importante de diseminación (Santiago *et al.*, 2015).

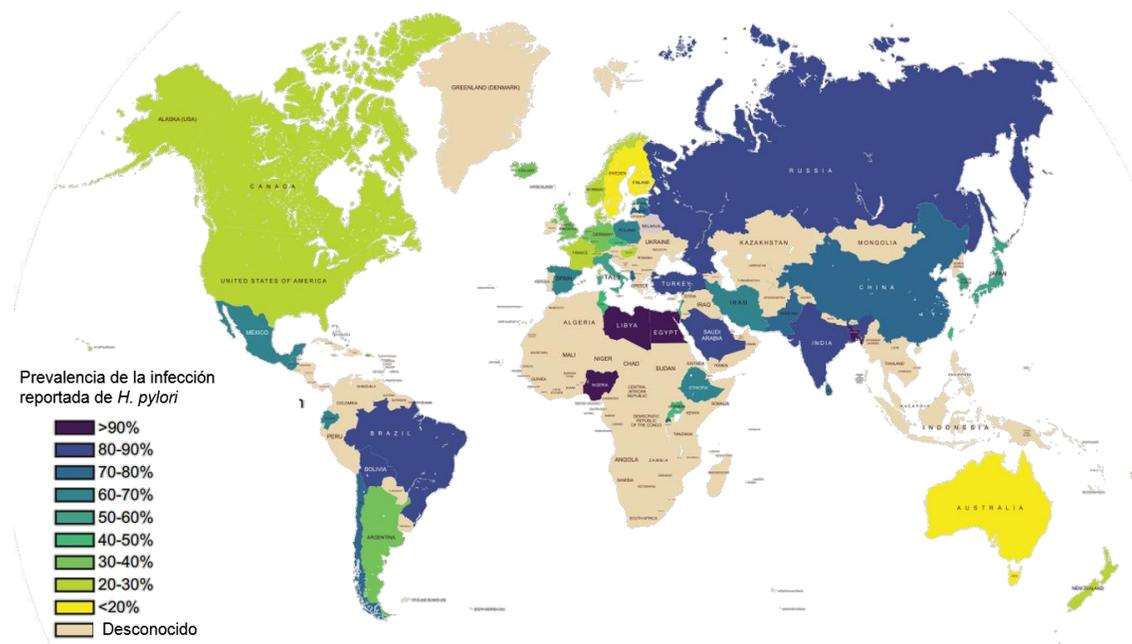


Figura 3. Prevalencia a nivel mundial de la infección por *Helicobacter pylori*. (Tomado de Burkitt *et al.*, 2017)

En México un estudio serológico con 11,605 sueros de personas entre 1-90 años de edad, provenientes de todas las regiones del país, mostró una seroprevalencia global del 66%; así también, se encontró que *H. pylori* se adquiere a edades tempranas, alcanzando un 80% de prevalencia en adultos jóvenes entre 30 y 40 años de edad, con una tasa de incremento del 5% anual durante los primeros 10 años de vida (Torres *et al.*, 1998).

Según datos de la Organización Mundial de Gastroenterología (WGO, por sus siglas en inglés: *World Gastroenterology Organization*), la prevalencia en México es del 43% en niños de 5 a 9 años y en adultos es del 70 al 90% (WGO¹, 2010).

1.4. Patologías

En 1994 la Organización Mundial de la Salud reconoció a *H. pylori* como un carcinógeno tipo I. Actualmente se reconoce como el principal agente etiológico de la gastritis, úlcera péptica, del adenocarcinoma gástrico y del linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés: *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*) (Trespacios *et al.*, 2010).

De las personas infectadas con *H. pylori*, se estima que alrededor del 80% permanecen asintomáticos, mientras que, del 10 al 20% desarrollan úlcera péptica, del 1 al 2% cáncer gástrico y menos del 1% linfoma tipo MALT (Kusters *et al.*, 2006).

Las enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori* son consecuencia de una continua inflamación de la mucosa gástrica. Sin embargo, el curso clínico de la infección por *H. pylori* es altamente variable y depende de factores bacterianos (factores de virulencia), del huésped y ambientales.

Después de la infección inicial, la inflamación gástrica aguda puede evolucionar a una gastritis crónica activa. A partir de este punto, la localización anatómica de esta inflamación (ya sea en el cuerpo o antro del estómago) se relaciona fuertemente con el riesgo a desarrollar algún tipo de ulceración gástrica o duodenal. Cabe mencionar que *H. pylori* es responsable del 70 al 85% de las úlceras gástricas y del 90 al 95% de las úlceras duodenales (De Falco *et al.*, 2015). Cuando la gastritis predomina en la región del antro, aunando a una hipersecreción de ácido clorhídrico, la progresión clínica puede ser hacia el desarrollo de una úlcera duodenal (y en menor frecuencia evolucionar a linfoma MALT); mientras que, la gastritis atrófica que afecta primordialmente al cuerpo del estómago puede conllevar al desarrollo de úlceras gástricas y cáncer gástrico (Egan *et al.*, 2007; Tan & Wong, 2011). Figura 4.

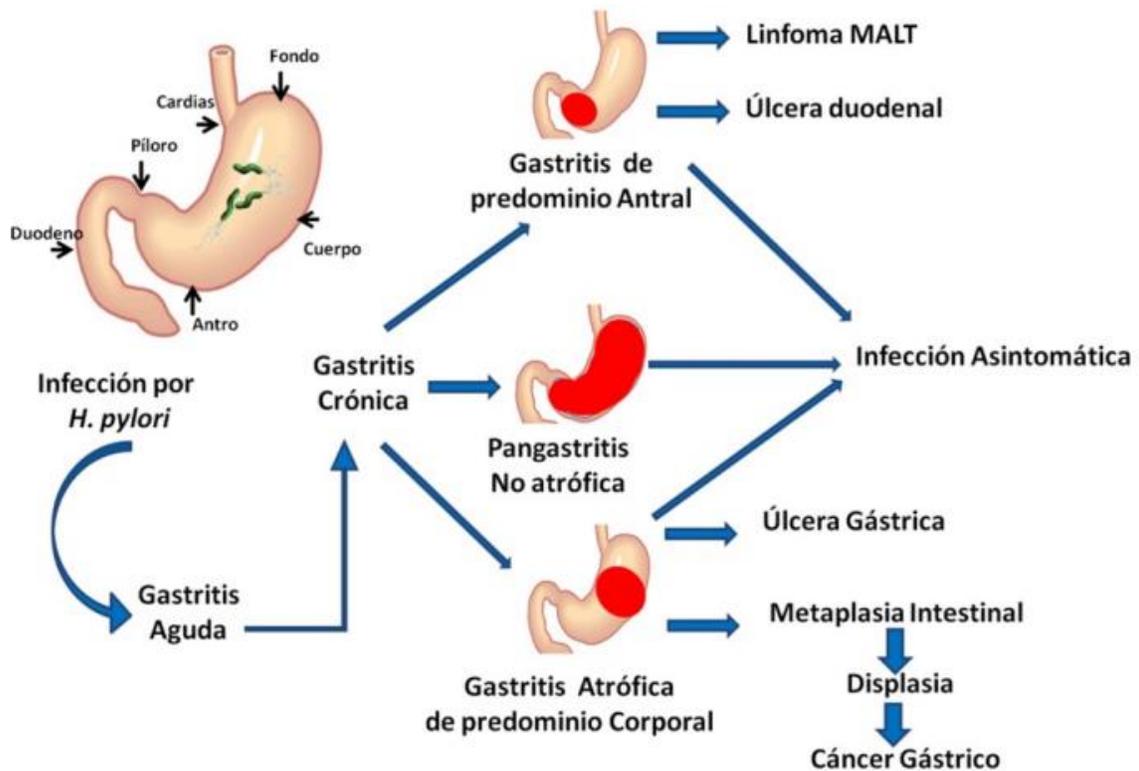


Figura 4. Historia natural de *H. pylori*. El curso clínico de la infección por *H. pylori* es variable respecto a la zona de colonización. En rojo se muestra la localización anatómica de la inflamación. (Tomado de Gómez Chang *et al.*, 2017).

La úlcera duodenal es más frecuente en hombres, presenta ritmo y periodicidad (con dolor por la madrugada y calma con la ingestión de alimentos o soluciones alcalinas, reaparece antes de la comida denominándose “hambre dolorosa”) también presenta vómito y náuseas (Arozamena *et al.*, 2008).

La úlcera gástrica se caracteriza por dolor epigástrico que tiene periodicidad y horario (aparece después de las comidas), suele ceder espontáneamente antes de una nueva ingestión de alimentos (Arozamena *et al.*, 2008).

El cáncer gástrico temprano prácticamente es asintomático, mientras que en el cáncer gástrico avanzado, predominan la pérdida de peso y el dolor abdominal, también existen la disfagia, saciedad temprana, vómitos persistentes y anemia por los eventuales sangrados (Testerman, 2014).

El linfoma MALT es una forma rara del linfoma maligno que afecta a los linfocitos tipo B y que se desarrolla a expensas del tejido linfoide asociado a las membranas mucosas tras la infección con la bacteria (Floch *et al.*, 2017).

1.5. Tratamiento

De acuerdo con las guías internacionales y el IV Congreso Mexicano sobre *H. pylori* 2018, existen situaciones clínicas donde es absolutamente indicada la erradicación de la bacteria como en: 1) úlcera péptica (gástrica o duodenal), activa o no, con o sin complicaciones asociadas, 2) gastritis atrófica y metaplasia intestinal, 3) linfoma gástrico tipo B (MALT), 4) después de una resección gástrica parcial por cáncer, 5) pacientes infectados con *H. pylori* que tengan familiares en primer grado que han tenido cáncer gástrico, 6) uso crónico de inhibidores de la bomba de protones y 7) uso crónico de analgésicos no esteroideos (AINEs) en pacientes con antecedentes de úlcera péptica, con o sin complicaciones y factores de riesgo asociados (Abdo-Francis *et al.*, 2007; Malfertheiner *et al.*, 2012; Bosques-Padilla *et al.*, 2018).

Existen diferentes tratamientos conforme a las pautas internacionales para la erradicación de *H. pylori* y el único tratamiento que se considera efectivo para el manejo de las úlceras gastroduodenales causadas por esta bacteria es con antibióticos (Graham & Fischbach, 2010).

Las tasas de éxito en los tratamientos varían a nivel mundial. Hasta la fecha, no existe ninguna terapia que asegure una erradicación del 100% por diversas razones. La estabilidad y la actividad de algunos antibióticos utilizados puede afectarse en el medio ácido del lumen gástrico, por lo que, dentro de las terapias de erradicación recomendadas, se utilizan también los fármacos anti-secretorios de ácido, los cuales al disminuir la producción ácida, permiten por una parte, alcanzar el pH necesario para que actúen ciertos fármacos y por otro lado ayudan a controlar la sintomatología y favorecen la resolución de las úlceras (Suerbaum *et al.*, 2002).

Los antibióticos con efecto sistémico principalmente utilizados para la erradicación de *H. pylori* son: claritromicina, amoxicilina, metronidazol,

tetraciclina, levofloxacino y rifabutina. La furazolidona y las sales de bismuto son medicamentos que actúan a nivel del lumen gástrico y también forman parte de los esquemas de tratamiento debido a su efecto reportado contra la bacteria (Gómez-Chang *et al.*, 2017).

Dentro de los medicamentos que suprimen la secreción ácida, están los inhibidores de la bomba de protones (IBP) como el omeprazol, lansoprazol, esomeprazol y rabeprazol, los cuales son preferidos con respecto a los bloqueadores de los receptores de histamina, debido a la velocidad y a la eficacia con la cual mejoran la sintomatología y contribuyen a la resolución de las úlceras (Gómez-Chang *et al.*, 2017).

En la Tabla 1 se presentan los tratamientos más comunes empleados para eliminar a la bacteria.

Tabla 1. Resumen de los tratamientos para la erradicación de *H. pylori*.

Terapia	Fármaco		Posología (Dosis)	Duración en días
Triple estándar	IBP Claritromicina Amoxicilina o metronidazol		Dosis estándar b.i.d 500 mg b.i.d 1000 mg b.i.d o 500 mg b.i.d	14
Cuádruple con bismuto**	IBP Bismuto Tetraciclina Metronidazol		Dosis estándar b.i.d Dosis estándar b.i.d 500 mg b.i.d 500 mg b.i.d	10-14
Secuencial	IBP Amoxicilina	Día 1-5	Dosis estándar b.i.d 1000 mg b.i.d	10
	IBP Claritromicina o Levofloxacino Metronidazol	Día 6-10	Dosis estándar b.i.d 500 mg b.i.d o 250 mg b.i.d 500 mg b.i.d	
Concomitante	IBP Claritromicina Amoxicilina Metronidazol		Dosis estándar b.i.d 500 mg b.i.d 1000 mg b.i.d 500 mg b.i.d	10
Híbrida	IBP Amoxicilina	Día 1-7	Dosis estándar b.i.d 1000 mg b.i.d	14
	IBP Amoxicilina Claritromicina Metronidazol	Día 8-14	Dosis estándar b.i.d 1000 mg b.i.d 500 mg b.i.d 500 mg b.i.d	
Rescatante	IBP Levofloxacino Amoxicilina		Dosis estándar b.i.d 500 mg b.i.d 1000 mg b.i.d	10
Triple terapia basada en Rifabutina	IBP Rifabutina Amoxicilina		Dosis estándar b.i.d 150 mg b.i.d 1000 mg b.i.d	14
<p>**Otras terapias con bismuto incluyen IBP, tetraciclina y furazolidona o levofloxacino. IBP: Inhibidor de la bomba de protones; b.i.d.: 2 veces al día; q.i.d.: cuatro veces al día. (Tomada de Gómez-Chang <i>et al.</i>, 2017).</p>				

1.5.1. Tratamiento personalizado

Este tratamiento, consiste en la identificación del patógeno causante de la infección, por medio de la extracción de tejidos de órganos mediante biopsias.

Para identificar la variedad de *H. pylori* (patogenicidad) presente en el hospedero, se hace una gastroscopia, en la que se extraen muestras de la mucosa gástrica para realizar cultivos *in vitro*. Se prueba la susceptibilidad de la bacteria a diferentes antibióticos para ajustar un nuevo tratamiento para su erradicación. Los antibióticos para el tratamiento son seleccionados de acuerdo a su eficacia ante la cepa. Esta terapia es la más eficaz, pero a su vez, la menos utilizada, ya que muy pocos casos recurren a la obtención de una biopsia y a las pruebas de susceptibilidad bacteriana (Gisbert, 2011).

1.5.2. Problemas de las terapias actuales

Como se ha explicado en la sección anterior, existe una gran variedad de esquemas de erradicación disponibles para la infección por *H. pylori*, no obstante, se siguen produciendo fallas terapéuticas a consecuencia de úlceras refractarias a los medicamentos convencionales y principalmente a la falta de apego del paciente, ya sea por los altos costos y/o los efectos adversos de las terapias prolongadas; sumándose a esto la recurrencia de la infección. De tal manera que cerca del 20% de los pacientes no logran la erradicación (Graham & Fischbach, 2010).

Otro problema muy grave es la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos de uso común dentro de las terapias de erradicación, la cual está aumentando en todo el mundo. En general, en México y Sudamérica la resistencia de *H. pylori* al metronidazol es alta (más del 50%), mientras que la resistencia a la amoxicilina y tetraciclina son bajas, sin embargo, el porcentaje de resistencia a un antibiótico en particular varía de acuerdo a la región geográfica que se trate, siendo más alta en los países en desarrollo (WGO², 2010).

Con base en lo anterior y tomando en cuenta que la gama de antibióticos con la que actualmente se dispone para los tratamientos es limitada, es indispensable

buscar nuevas y mejores terapias que tengan mayores beneficios para la erradicación y menores efectos secundarios para el hospedero (Testerman & Morris, 2014).

1.6. Plantas medicinales. Tratamiento y uso

A lo largo de la historia, las plantas medicinales han formado parte importante del conocimiento, desarrollo y bienestar de las civilizaciones a nivel mundial; se consideran plantas medicinales a todas aquellas que contienen en alguno de sus órganos compuestos activos, los cuales al ser administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades (Barragán-Solís, 2006; WHO, 2013). En la actualidad las plantas medicinales cuentan con el reconocimiento de la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés: *World Health Organization*) (WHO, 2000).

En México la herbolaria ha formado parte importante de los pueblos indígenas, incluso antes de la conquista, el uso y aplicaciones constituyen un conocimiento que se trasmite de forma oral de generación en generación (Argueta, 1994), se estima que en México existen alrededor de 26,000 especies vegetales (Llorente-Bousquets & Ocegueda, 2008) y cerca de 4,000 contiene algún atributo medicinal y son empleadas por la población (Bellucci, 2003).

Castillo-Juárez y colaboradores (2009), llevaron a cabo una búsqueda exhaustiva de plantas medicinales mexicanas utilizadas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, en particular para la gastritis y úlceras gástricas, con el objetivo de determinar su efecto contra *H. pylori*. Los autores evaluaron contra *H. pylori* extractos de 53 de estas plantas y encontraron que el 77% de estas especies son activas contra el crecimiento de la bacteria. Una de las muestras evaluadas en este trabajo fue la corteza del árbol llamado *Amphipterygium adstringens* (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

1.7. Descripción de *Amphipterygium adstringens* (Schltdl). Standl.

Amphipterygium adstringens (Schltdl), Standl., es un árbol perteneciente a la familia Anacardiaceae. En México se le conoce comúnmente con el nombre de "cuachalalate", "cuachalala", "matixeran", "volador" o en náhuatl "cuachalalatl" y su corteza se usa comúnmente para el tratamiento de numerosas enfermedades gastrointestinales, así como diversas afecciones inflamatorias (Argueta *et al.*, 1994).

El cuachalalate tiene una altura aproximada de 10 m, con el tronco y ramas torcidas, con una corteza grisácea y con grandes escamas. Sus hojas están agrupadas en las puntas de las ramas (de tres a cinco), en el anverso son verde opaco y en el reverso verde grisáceo. Las flores pueden encontrarse solitarias o en ramilletes. Los frutos son nueces abultadas y alargadas que están en ramas de color verde pálido (CONABIO, 2009).

Esta especie habita en clima cálido, semicálido y templado desde los 100 hasta los 3000 msnm. Se distribuye a lo largo del centro de México (Figura 5), crece en zonas perturbadas de bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, de matorral xerófilo, bosque espinoso, mesófilo de montaña. Los árboles de cuachalalate, florecen en abril y mayo, presenta fructificación de junio a marzo; su madurez se presenta entre noviembre y enero. (Argueta *et al.*, 1994).



Figura 5. Mapa de distribución de *A. adstringens*. Ubicación geográfica de la distribución del cuachalalate en la República Mexicana. En verde se muestra los estados con registros de esta especie (Tomado y modificado de Argueta *et al.*, 1994; CONABIO, 2009).

1.7.1. Usos tradicionales

En varios estados de la República Mexicana, se emplea la corteza del cuachalalate en cocimiento para tratar malestares digestivos, dolor de estómago, infección estomacal o intestinal. En particular se emplea para el tratamiento de úlceras (bucales y peptídicas), gastritis y actualmente es usado para tratar el cáncer de estómago (Martínez, 1959; Argueta *et al.*, 1994).

1.7.2. Fitoquímica y farmacología

La mayor parte de la investigación fitoquímica sobre esta planta se ha hecho en México. De la corteza de *Amphipterygium adstringens* se han aislado e identificado varios triterpenoides (Soriano-García *et al.*, 1987; Watson *et al.*, 1987; Navarrete *et al.*, 1989; Makino *et al.*, 2004), fenoles de cadena larga, en donde se han identificado tanto ácidos anacárdicos como aldehídos (Navarrete *et al.*, 1989; Mata *et al.*, 1991); al igual que el ácido 3-dodecil-1,8-dihidroxi-2-naftoico (Rivero-Cruz *et al.*, 2005).

Los estudios farmacológicos de la corteza revelaron un efecto gastroprotector de un extracto metanólico (Navarrete *et al.*, 1998), identificando como los principios activos a los triterpenos aislados: ácido 3- α -hidroximasticadienónico, ácido 3-epi-oleanólico y al esteroles, β -sitosterol (Arrieta *et al.*, 2003).

Los extractos acuosos y de hexano de la corteza mostraron actividad antiinflamatoria teniendo como compuestos activos a los ácidos masticadienónico y 3- α -hidroximasticadienónico (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004).

Por otra parte, los ácidos masticadienónico y 3- α -hidroximasticadienónico, aislados de un extracto hexánico de la corteza, ejercieron un efecto hipocolesterolémico en ratas (Mata *et al.*, 1991).

El ácido anacárdico 6-nonadecil salicílico demostró un efecto citotóxico y genotóxico mediante ensayos de micronúcleos en muestras de sangre de ratones, deteniendo la frecuencia de los eritrocitos policromáticos micronucleados, por lo que no conduce al daño cromosómico (Acevedo *et al.*, 2006).

Respecto a la actividad antimicrobiana de *Amphipterygium adstringens* se ha reportado que el extracto metanólico inhibe especies bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter aerogenes* y *E. agglomerans*) a una CMI de 125 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (Canales *et al.*, 2005). Además, los ácidos masticadienónico y al 3 α -hidroximasticadienónico tienen efecto contra *Mycobacterium tuberculosis* a una CMI de 64 y 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Rivero-Cruz *et al.*, 2005).

1.8. Antecedentes directos

En el estudio realizado por Castillo-Juárez y colaboradores en el 2007, se analizó el contenido fitoquímico de la corteza de *A. adstringens* y su efecto sobre *H. pylori* *in vitro*. Los autores identificaron, en un extracto de éter de petróleo, la presencia de una mezcla de ácidos anacárdicos (6 pentadecil-, 6 hexadecil-, 6 heptadecil- y 6 nonadecil-salicílico), los triterpenos, ácidos 3-alfa hidróxi-masticadienónico, y 3-epi oleanólico; y el esteroles, β -sitosterol. Reportaron que la mezcla de ácidos

anacárdicos (en su mayoría compuesta por el ácido 6 pentadecil salicílico [46.8%]), exhibe una potente actividad antibacteriana dependiendo de la dosis.

En este trabajo se determinó, para la mezcla de ácidos anacárdicos, una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 10 µg/mL y una concentración mínima bactericida (CMB) de 16 µg/mL. La comparación de la CMI con respecto a la presentada por los antibióticos de referencia, metronidazol y amoxicilina, indicaron un buen potencial antibiótico para estos compuestos. Así pues, los ácidos anacárdicos se presentan como una posible alternativa farmacológica a los antimicrobianos ya utilizados para *H. pylori*.

Posteriormente, se determinó para el ácido anacárdico 6 pentadecil salicílico, una CMI de 5 µg/mL lo que indica que, el componente mayoritario de la mezcla de ácidos anacárdicos, contribuye de manera importante a la actividad anti-*H. pylori*.

1.9. Ácido anacárdico

Químicamente el término ácido anacárdico se refiere a una mezcla de compuestos orgánicos relacionados con un ácido siálico substituido con una cadena de alquilo de 15 a 19 carbonos (Hemshekhar, 2011). (Figura 6).

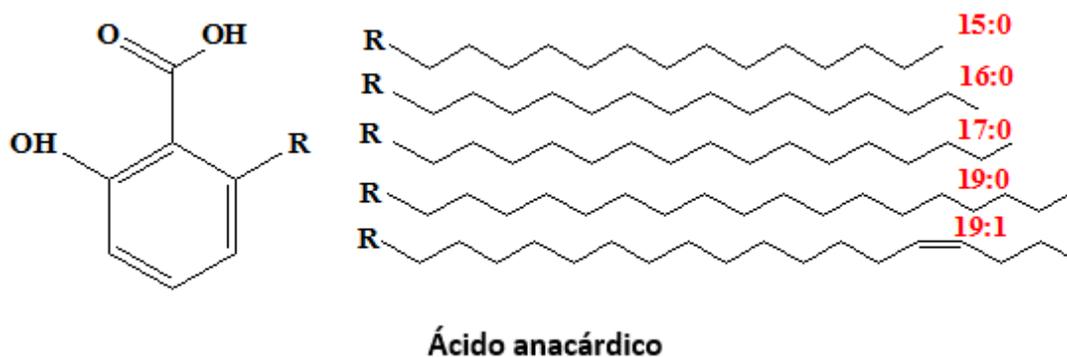


Figura 6. Estructura química del ácido anacárdico. Se presentan los diferentes tipos de ácidos anacárdicos presentes en *A. adstringens*. En rojo el número de carbonos y de insaturaciones de la cadena de alquilo sustituyente (R).

En investigaciones recientes se ha evidenciado a los ácidos anacárdicos como potentes moléculas con propiedades bactericidas, fungicida y como agentes terapéutico en el tratamiento de trastornos patológicos más graves como el cáncer y el daño oxidativo, además, se descubrió que la mezcla de ácidos anacárdicos actúan como un inhibidor común de varias enzimas, como la quinasa NFkB, la histona acetiltransferasa (HAT), lipoxigenasa (LOX-1), xantina oxidasa, tirosinasa y ureasas (Hemshekhar, 2011).

1.10. Justificación del trabajo

Considerando los problemas en las terapias para la erradicación de *H. pylori* y la necesidad de encontrar nuevos fármacos que mejoren la terapia, la búsqueda de compuestos de origen natural es una opción viable.

Así mismo, con base en los antecedentes respecto al efecto bactericida del ácido anacárdico 6 pentadecil salicílico (Ana 15:0) sobre *H. pylori*, y con el objeto de entender el posible mecanismo por el cual este compuesto ejerce su acción inhibitoria, es necesario conocer el efecto que este ácido anacárdico tiene sobre el metabolismo de la bacteria; por ello, en el presente estudio se pretende analizar el cambio en la expresión de proteínas de *H. pylori* en respuesta a la presencia del Ana 15:0 y así determinar cambios diferenciales que permitan proponer su posible mecanismo de acción.

2. Objetivo

Determinar el cambio diferencial en la expresión de proteínas de *Helicobacter pylori* en presencia del ácido anacárdico 6 pentadecil salicílico mediante análisis electroforético en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS).

2.1. Objetivo particular

Comparar la expresión de proteínas de *H. pylori* en ausencia y en presencia del ácido anacárdico 6 pentadecil salicílico a 3, 6, 9 y 24 horas de cultivo en las siguientes fracciones:

- a) Fracción citoplásmica.
- b) Sobrenadante del cultivo de *H. pylori*.
- c) Fracción del precipitado de la ultracentrifugación de las bacterias.

3. Materiales y métodos

3.1. Cepa y cultivo de *H. pylori*.

Se empleó la cepa de colección de *H. pylori* ATCC 43504. *H. pylori* es un patógeno humano y está considerado como un microorganismo de Nivel de riesgo 2 de acuerdo al “Biosafety in microbiological and biomedical laboratories” de la CDC/NIH-USA (Chosewood, 2007) por lo que se siguieron las prácticas de bioseguridad correspondientes.

Para la obtención de biomasa, la bacteria se cultivó en cajas Agar Mueller Hinton con 5% de sangre desfibrinada de carnero y 10 µg/mL de vancomicina en condiciones microaerófilas con 10% CO₂ a 37°C durante 24 h. Las bacterias fueron recolectadas y almacenadas en caldo Brucella suplementado con suero fetal bovino al 10% y glicerol al 10% a -70°C hasta su uso. A cada lote de *H. pylori* se le realizaron las pruebas de identificación correspondientes, morfología y coloración por tinción de Gram y pruebas bioquímicas (ureasa, catalasa y oxidasa) (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

3.1.1. Prueba de oxidasa.

La placa de dihidrocloruro de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMDF) (Dry Slide Oxidase, DIFCO®), se torna morada al contacto con las bacterias. Esta reacción depende de la actividad de la enzima citocromo oxidasa bacteriana, la cual oxida al citocromo C, que a su vez oxida al TMDF dando el color morado que se observa.

3.1.2. Prueba de catalasa.

El peróxido de hidrogeno es descompuesto por la catalasa de *H. pylori* por lo que se observa un burbujeo provocado por la liberación de oxígeno.

3.1.3. Prueba rápida de ureasa.

Se utiliza una solución de urea 6 M a un pH de 7.0 y se le agrega 0.05% de rojo de fenol hasta obtener un color amarillo durazno. Esta prueba se basa en el rojo fenol como indicador de pH. Al contacto con las bacterias, la ureasa hidroliza la

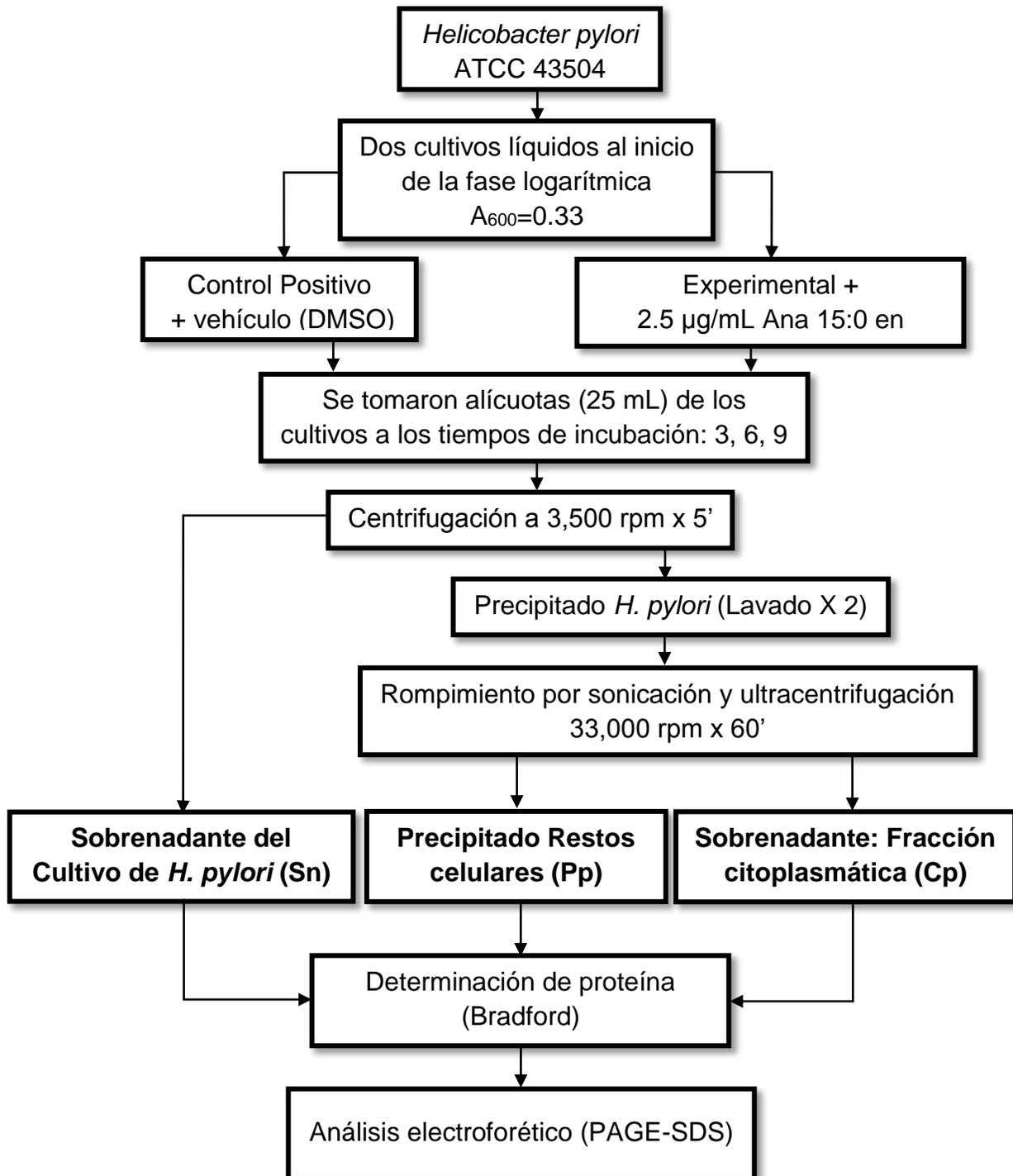
urea y libera amoníaco que eleva el pH provocando que el rojo de fenol cambie a un color rosa-rojo.

Los cultivos líquidos de *H. pylori* se llevaron a cabo en Caldo Mueller Hinton con 0.2% β -ciclodextrina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de vancomicina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trimetoprima, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anfotericina y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polimixina B con agitación constante (150 rpm) en condiciones microaerofílicas (10% CO_2) a 37°C (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

3.2. Preparación de los cultivos para el análisis

Para determinar el cambio en la expresión de proteínas de *H. pylori* en presencia del ácido anacárdico 6 pentadecil salicílico (Ana 15:0), Calbiochem®, se siguió la estrategia que se ilustra a continuación:

Estrategia metodológica



Notas y abreviaturas. A: absorbancia, DMSO: dimetilsulfóxido, PAGE-SDS: electroforesis en gel de poliacrilamida/bis-acrilamida con dodecilsulfato sódico.

Se crecieron dos cultivos (100 mL) de bacterias simultáneamente hasta llegar al inicio de la fase logarítmica ($A_{600nm} = 0.33$), uno considerado control y el otro, el experimental. Para iniciar el experimento ($T = 0$), al cultivo experimental se le agregó una concentración sub-letal del ácido anacárdico 6 pentadecil salicílico (Ana 15:0) (concentración final de 2.5 $\mu\text{g/mL}$, equivalente a 0.5 CMI) y al control se le adicionó el vehículo en el que se disolvió la sustancia (DMSO, concentración final de 0.5%).

Con el objeto de monitorear el cambio comparativo en la expresión de proteínas de los dos cultivos, se tomaron alícuotas del cultivo de 25 mL a los tiempos: $T = 3, 6, 9$ y 24 horas.

El procesamiento de las alícuotas se efectuó a 4°C, para evitar la desnaturalización de las proteínas. Cada alícuota se centrifugó a 5,000 rpm durante 3 min, el sobrenadante del cultivo (medio caldo Mueller Hinton) se recuperó y almacenó a 4°C hasta su procesamiento posterior.

El precipitado (*H. pylori*) se resuspendió y lavó dos veces con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) pH 7.4 frío. Las bacterias se resuspendieron con 500 μL de PBS y se conservaron a 4°C hasta su uso.

Para la extracción de proteínas se indujo a una ruptura celular por sonicación a las bacterias lavadas, añadiendo un coctel de inhibidores de proteasas (cOplete: protease inhibitor cocktail, Roche®). La sonicación se llevó a cabo a 4°C en un Sonicador Branson 250, a 40 W, por 3 veces durante 30 seg intercalando con 2 min de descanso.

Una vez realizada la sonicación, las muestras se centrifugaron a alta velocidad en ultracentrífuga Beckman XL-90 a 33,000 rpm (rotor 65Ti), equivalente a 60,000 $\times g$, durante 60 min a 4°C para separar la fracción citoplásmica del resto de los materiales celulares. Se recuperó el sobrenadante (citosol) y el precipitado (membranas y pedazos de pared celular) se resuspendió en PBS.

Posteriormente se concentraron el citosol y el sobrenadante del cultivo por ultrafiltración, utilizando membranas Amicon Ultra® con un corte de peso molecular de 100 kDa para el sobrenadante del cultivo (caldo Mueller Hinton) y de 30 kDa para la fracción citoplásmica, en una centrifuga refrigerada Sorvall™ ST-40 ThermoFisher® a 4,000 rpm durante 1 hora a 4°C.

Los filtrados y los precipitados resuspendidos, se alicuotaron y almacenaron en congelación a -20°C para posteriormente ser utilizados.

El experimento completo se repitió por duplicado, utilizando lotes de bacterias diferentes y además para cada experimento se corrieron los geles también por duplicados

3.3. Determinación de proteína de las muestras

La cuantificación de la concentración de proteína de todas las muestras se determinó con el método colorimétrico descrito por Bradford (Bradford, 1976). A las muestras del precipitado celular se les añadió SDS ajustando una concentración final de 0.1% conforme al fabricante (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate #500000).

3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida/bis-acrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS)

Esta técnica permite la separación de una mezcla de proteínas según su peso molecular. La electroforesis se realizó en una cámara Mini-protean III (Bio-Rad) a un voltaje constante de 120 volts y 50 amperios por gel, utilizando una fuente de poder Amersham Pharmacia Biotech modelo Electrophoresis Power Supply–EPS 301.

En todos los experimentos en este estudio, se hicieron geles de 10% de poliacrilamida con una proporción de acrilamida/bis-acrilamida 30%:0.8% de 6.0 x 8.6 x 0.15 cm (gel separador) y una sección concentradora de 4.0% de acrilamida bis-acrilamida 1.2 x 8.6 x 0.15 cm (gel concentrador).

Para los geles separadores al 10% se mezcló: 9.9 mL de acrilamida bis-acrilamida (30%/0.8%), 3.74 mL de Tris HCl 1.5 M pH 8.8, 14.44 mL de H₂O_d,

750 μ L SDS 10%, 0.2 mL de persulfato de amonio (PSA) y 10 μ L de Tetrametiletilendiamina (TEMED). Para la preparación de los geles concentradores se mezcló: 1.6 mL de acrilamida bis-acrilamida (30%/0.8%), 3.0 mL Tris HCl 0.5 M pH 6.8, 7.0 mL de H₂O_d, 300 μ L de SDS 10%. 0.15 mL de PSA y 10 μ L de TEMED.

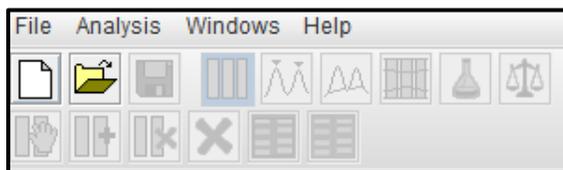
Una vez conocida la concentración de proteína de las muestras, se calculó el volumen necesario para cargar por pozo 25 μ g de proteína de cada muestra y se añadió en concentración 1:1 el buffer de muestra (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, glicerol 20%, SDS 2%, β -Mercaptoetanol 5%). En cada gel se utilizó un carril para cargar el marcador de peso molecular en este caso Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad).

Terminada la separación por electroforesis, los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie, durante 2 h con agitación constante, pasado el tiempo de teñido, se retiró el colorante y se lavaron con solución desteñidora (ácido acético 7% y metanol 40% v/v). La solución desteñidora se cambió periódicamente hasta eliminar el exceso del colorante, una vez realizado esto, se escanearon y la imagen obtenida se analizó mediante el programa de libre acceso GelAnalyzer 2010. Este software transforma las bandas de proteína de la electroforesis en picos y permite calcular sus áreas, medir la distancia de migración de los picos para calcular su movilidad electroforética relativa (Rf) y para estimar el peso molecular de las proteínas. De tal manera que es posible comparar los cambios que se presentaron a través del tiempo en ausencia y en presencia de Ana 15:0.

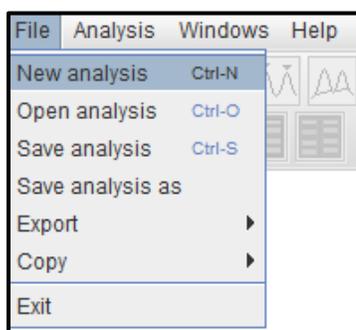
3.5. GelAnalyzer

Una vez obtenida la imagen, se procedió a su análisis mediante el software libre conforme al siguiente procedimiento:

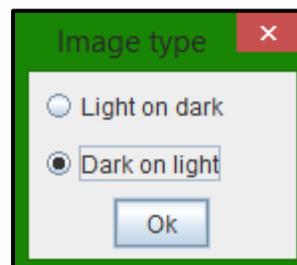
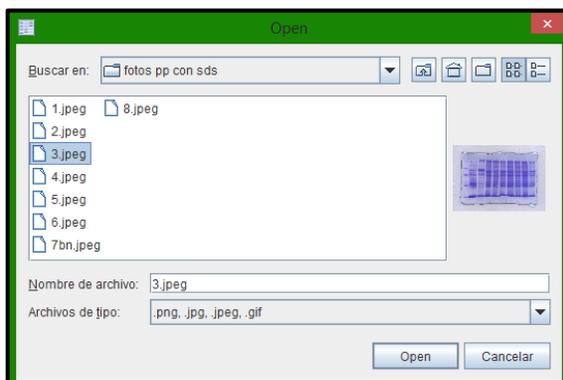
Se inicia el programa y se muestra el menú como a continuación.



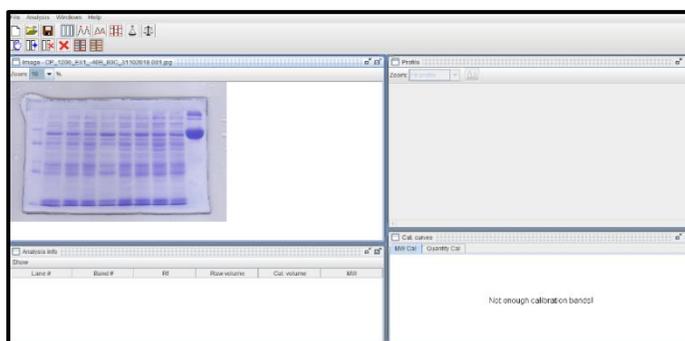
1. Para seleccionar la imagen nos dirigimos a la pestaña "File" e inmediatamente a "New analysis"



2. A continuación el programa abre los documentos del equipo para poder localizar la ubicación de la imagen previamente escaneada (formato .png, .jpg, o .jpeg). Se selecciona el archivo, clic en "Open", inmediatamente abre otro dialogo en el cual seleccionamos la opción "Dark on light", que elige imágenes o líneas sobre fondo claro.



- Una vez realizado esto, la imagen aparece en uno de los 4 espacios de la pantalla como se muestra a continuación.



Dentro del recuadro donde se encuentra la imagen, nos da la opción “Zoom” la cual nos sirve para ajustar el tamaño.

- Para generar los perfiles electroforéticos se tiene que seleccionar cada una de las bandas a analizar mediante el siguiente procedimiento: clic en

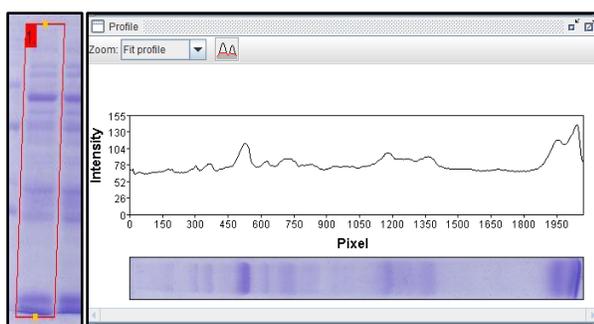


“Lanes mode” y



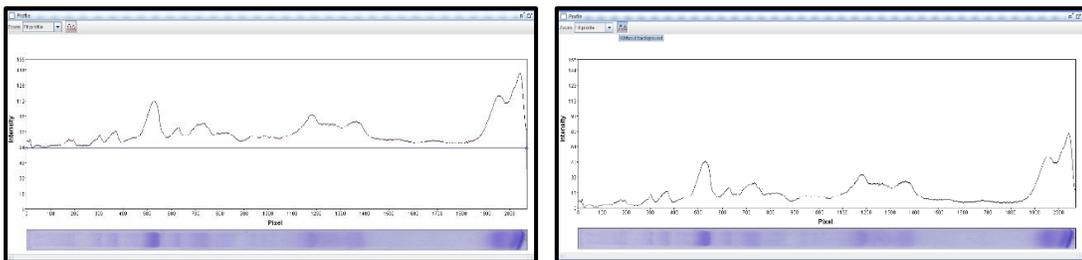
“Add new lane”.

- Colocamos el puntero en el inicio del gel separador y lo deslizamos hasta el frente de corrida (final del gel) y se separa ajustando para que quede seleccionado todo el carril. En la sección de “Profile” (recuadro superior derecho) nos aparece automáticamente el perfil electroforético.

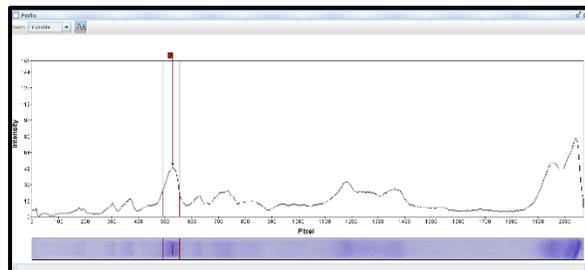


El software se encarga de ajustar la escala automáticamente y da al eje [Y] como “intensity” referente a la intensidad de color presentado y el eje [X] como “pixel” como numero arbitrario, referente a la distancia recorrida por la muestra.

6. Para eliminar el ruido (fondo blanco) y tener un ajuste más certero, se selecciona la opción  “Background subtract mode” ubicada en el menú principal y se selecciona la opción de  “Baseline mode”, ahora en la parte de “Profile” buscamos nivel el mínimo de intensidad y le damos un clic, en automático generará una línea base, eliminando el fondo, seleccionamos la opción  “Without background” generando un nuevo perfil.



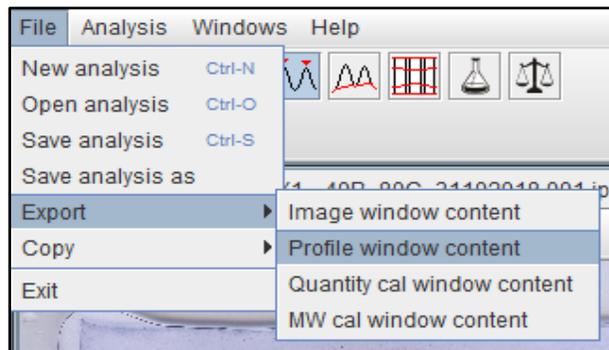
7. Para seleccionar las bandas y poder comparar ahora damos clic en  “Bands mode” y luego a  “Add new band”, ahora nos dirigimos a “Profile” y colocamos las barras limitantes al pico de interés como se muestra en la siguiente.



En la parte inferior izquierda la sección de “Analysis info” nos muestra datos como el “Rf” y “Raw volumen” el cual es un numero arbitrario para referir al área entre las líneas y el pico seleccionado.

Analysis info					
Show					
Lane #	Band #	Rf	Raw volume	Cal. volume	MW
1.	1.	0.255	2542	-	-

8. Para obtener perfil electroforético deseado es posible exportarlo y guardarlo como una imagen de la siguiente manera: “File”, “Export” y “Profile window content”, como requisito nos pide seleccionar la ubicación en donde se guardará el perfil electroforético.



Para obtener el perfil electroforético de cada muestra cargada en el gel, se tiene que hacer cada carril de forma independiente.

3.6. Prueba de inmunoelectrotransferencia o Western Blot

Esta técnica se llevó a cabo para la identificación de la ureasa en los geles. La técnica permite la identificación de la proteína utilizando anticuerpos específicos, en este caso, contra las subunidades α y β de la enzima de *Helicobacter pylori* y su presencia se detecta por quimioluminiscencia (Figura 7).

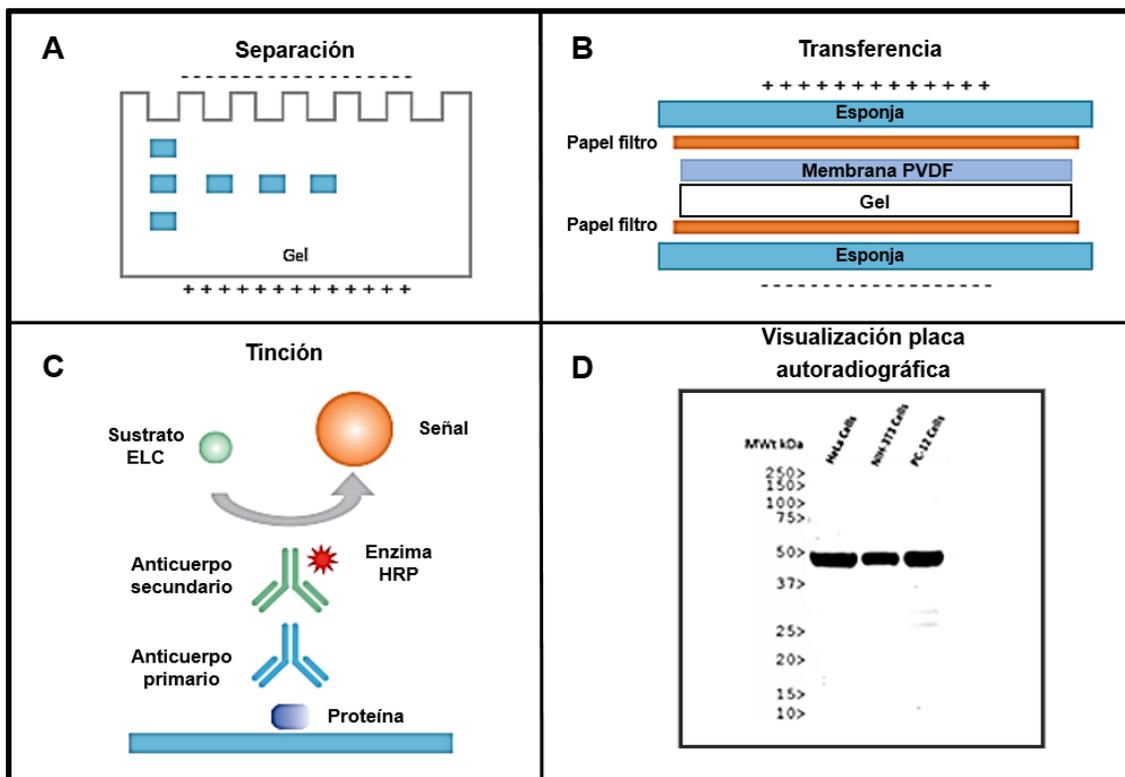


Figura 7. Técnica de Western Blot. (A) Las proteínas son separadas por PAGE-SDS, posteriormente (B) son transferidas a la membrana de polifluoruro de vinidileno (PVDF) para su detección. (C) La membrana ahora es incubada con un anticuerpo primario específico para una proteína y posteriormente con un anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Esta enzima actúa sobre un sustrato (electroquimioluminisciente, ECL) que produce luz, (D) emitiendo una señal que es capturada en una placa autoradiográfica Tomado y modificado de (Novus Biologicals, 2020).

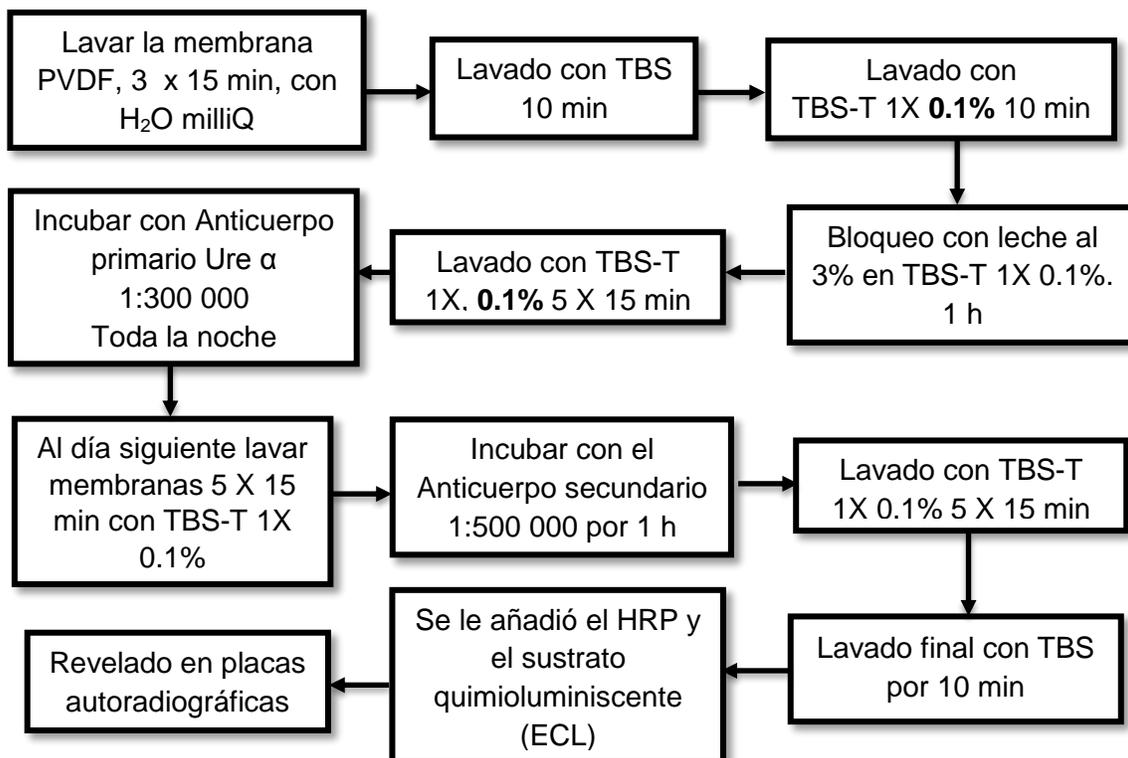
Una vez realizada la separación de las muestras correspondientes a Cp, Sn y Pp por PAGE-SDS, como se describió previamente, las proteínas del gel son transferidas a una membrana de Polifluoruro de vinidileno (PVDF, por sus siglas en inglés: *polyvinylidene difluoride*). (Figura 7-B).

Para la transferencia de proteínas, se colocaron los papeles filtros (3-4 piezas) y las esponjas dentro del buffer de transferencia (Tris buffer glicina 10x, metanol y H₂O_d) durante 20 min; mientras que la membranas de PVDF se activaron en metanol 15 seg, inmediatamente se lavaron en agua desionizada miliQ por 2 min y se colocaron 5 min en el buffer de transferencia.

Para realizar la transferencia se montó el material como se muestra en la Figura 7-B. En este caso, se utilizó como marcador de peso molecular el kit Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad). La transferencia se llevó a cabo con una corriente a 120 V por 60 min en una cámara Semi-Dry Transfer Unit TE70/77 GE Healthcare Life Science (Amersham).

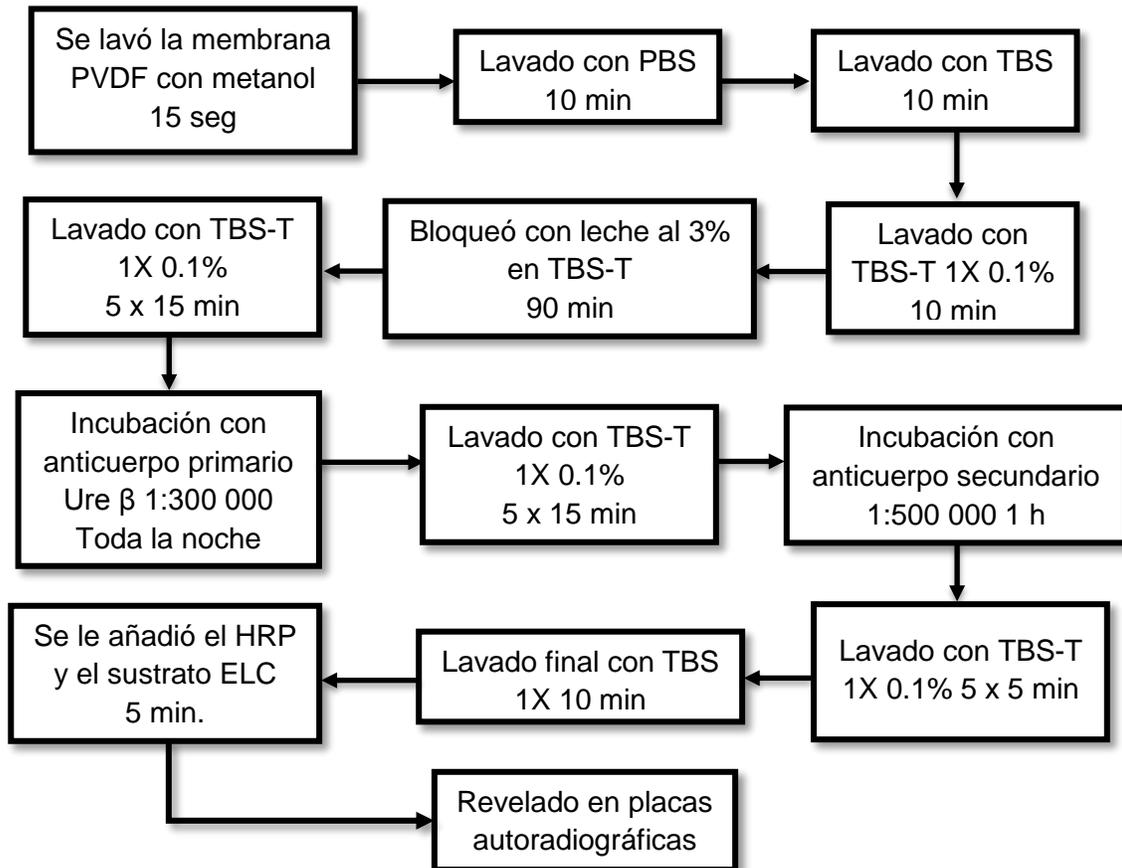
3.6.1. Detección con anticuerpos.

Una vez terminada la electrotransferencia, se realizó el siguiente procedimiento para la detección de la subunidad Ure α de la enzima ureasa con el anticuerpo: Urease α (B-234): SC-21016. Santa Cruz Biotechnology.Inc.



Notas y abreviaturas: todos los lavados e incubaciones se realizaron con agitación constante. PVDF: polifluoruro de vinilideno, TBS: (por sus siglas en inglés: *Tris. buffered saline*) solución salina tamponada con tris, TBS-T: (por sus siglas en inglés: *Tris buffered saline and polysorbate 20*) 1X 0.1%: solución salina tamponada con tris 1X y Tween 20 0.1%, Anticuerpo primario: policlonal de conejo (Rabbit Urease α (B-234): SC-21016. Santa Cruz Biotechnology.Inc.), Anticuerpo secundario: cabra anti-conejo (Goat anti-rabbit IgG. SC-2004 Santa Cruz Biotechnology.Inc), HRP: Peroxidasa de rábano (Horseradish Peroxidase), ECL: quimioluminiscente.

Para la detección de la subunidad β de la enzima ureasa se utilizó la misma membrana de PVDF en la que ya se había detectado la subunidad α , pero ahora incubándola con el anticuerpo policlonal para Ure β (Urease β (B-300): SC-22742. Santa Cruz Biotechnology.Inc.). Como se describe en el siguiente diagrama



Notas y abreviaturas: todos los lavados e incubaciones se realizaron con agitación constante. PVDF: polifluoruro de vinilideno, PBS: Tampón fosfato salino, TBS: solución salina tamponada con tris, TBS-T: 1X 0.1%: solución salina tamponada con tris 1X Tween 20 0.1%, Anticuerpo primario: policlonal de conejo (Rabbit Urease β (B-300): SC-22742. Santa Cruz Biotechnology.Inc.), Anticuerpo secundario: cabra anti-conejo (Goat anti-rabbit IgG. SC-2004 Santa Cruz Biotechnology.Inc), HRP: Peroxidasa de rabano (Horseradish Peroxidase), ECL: quimioluminiscente.

4. Resultados y Discusión

4.1. Crecimiento de *Helicobacter pylori* en ausencia y presencia de Ana 15:0

En la Figura 8 se muestra el crecimiento de los cultivos líquidos de *H. pylori* ATTC 43504, en presencia de 2.5 µg/mL del ácido anacárdico 15:0 (Ana 15:0) o con vehículo (DMSO), determinado por su absorción a 600 nm. Al tiempo determinado (3, 6, 9 y 24 h) se tomaron las alícuotas de los cultivos para llevar a cabo el análisis electroforético

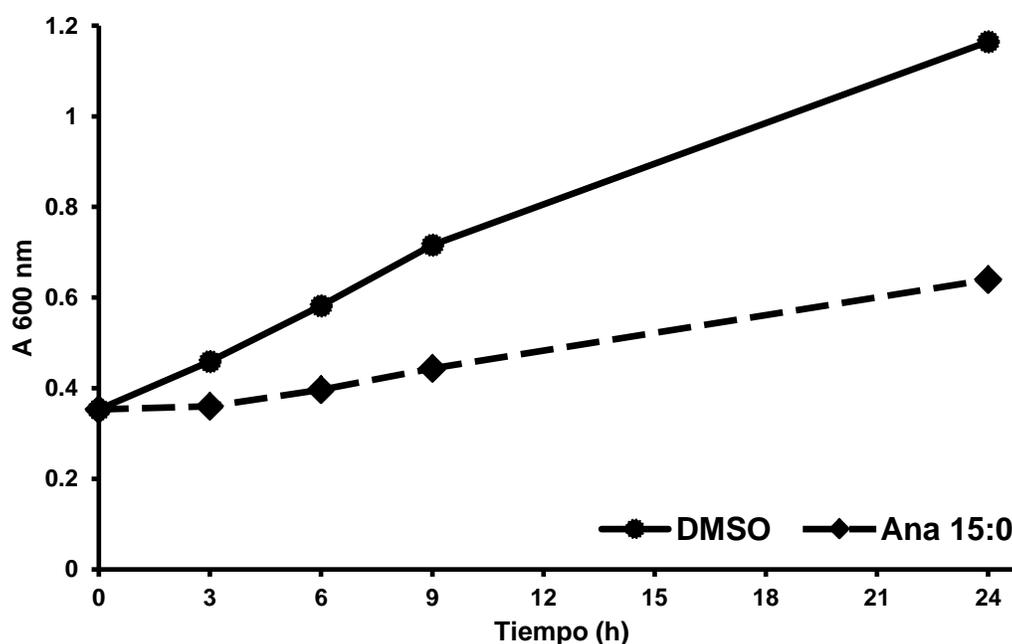


Figura 8. Crecimiento de *H. pylori* en ausencia y presencia del Ana 15:0. Línea continua representa el crecimiento del cultivo control con DMSO, mientras que la línea discontinua representa el crecimiento con Ana 15:0. Los datos representan el promedio de los 2 experimentos realizados.

Como puede observarse, en presencia de la concentración de Ana 15:0, equivalente a 0.5 de la CMI, el cultivo alcanza aproximadamente la mitad del crecimiento en comparación con el control ($A_{600\text{ nm}}=0.63$ vs 1.16). Esto está en concordancia con los datos previamente obtenidos en el laboratorio para el efecto de éste ácido anacárdico (Guadarrama-Cruz, 2015).

Rutinariamente en cada cultivo de *H. pylori* realizado, se llevaron a cabo las pruebas de identificación correspondientes. En la Figura 9 se muestran las pruebas bioquímicas para un cultivo representativo positivo para oxidasa, catalasa y ureasa; así como la tinción de Gram negativa

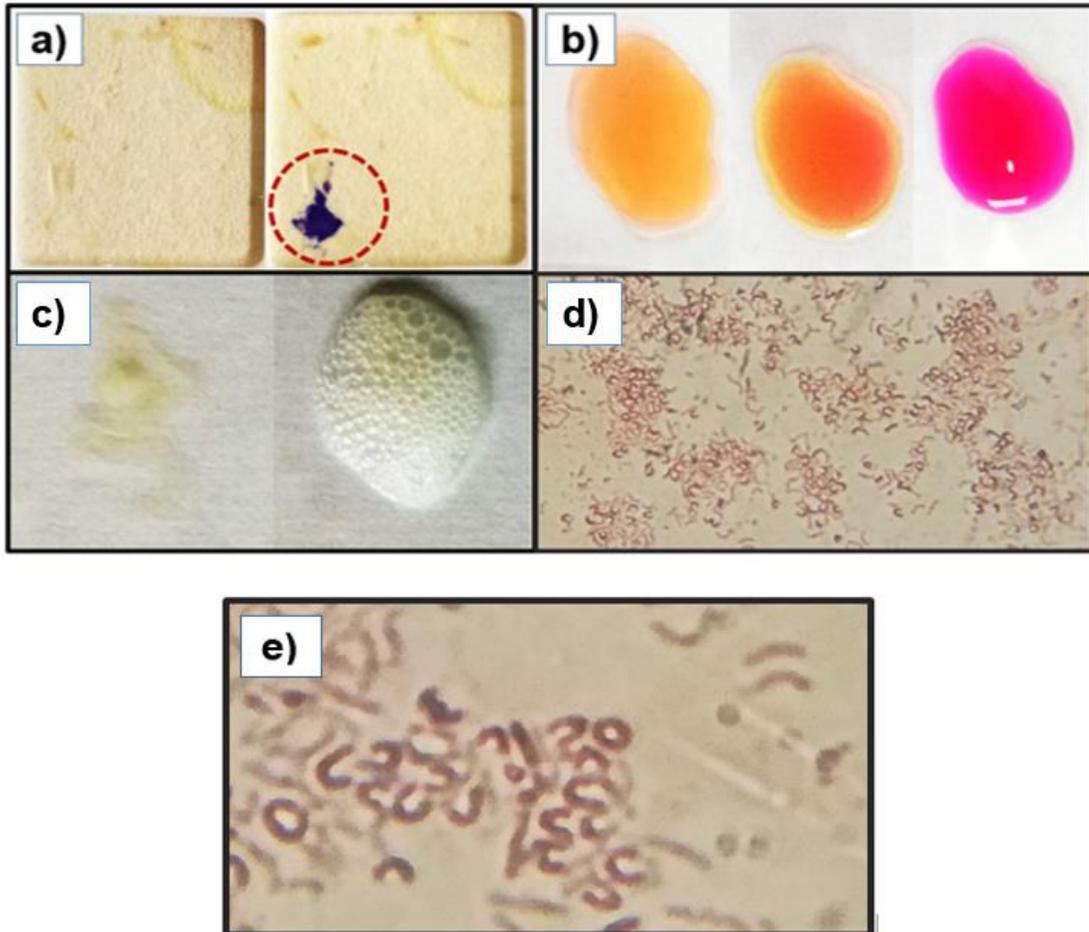


Figura 9. Pruebas de identificación rutinarias para *H. pylori*. En los recuadros se muestra las imágenes correspondientes a los resultados de las pruebas bioquímicas y tinción de Gram. a) Prueba de Oxidasa positiva. b) Prueba de ureasa positiva. c) Prueba de catalasa positiva y d) tinción positiva para bacterias Gram negativas. En la ampliación de la imagen e) se observan formas características de la bacteria: algunos bacilos, formas de U y otras en forma de espiral. Microscopía óptica de luz de un frotis fijo para un cultivo con tinción de Gram a 100x.

4.2. Muestras obtenidas

Se obtuvieron muestras de los cultivos de *H. pylori* (con y sin Ana 15:0) de las 3 fracciones de estudio:

- A. Fracción citoplásmica (Cp)
- B. Sobrenadante del cultivo de *H. pylori* (Sn)
- C. Fracción del precipitado de la ultracentrifugación de las bacterias (Pp)

a los tiempos: 3, 6, 9 y 24 horas, lográndose un total de 24 muestras.

4.3. Cuantificación de proteína de las muestras de estudio

Para la cuantificación de proteína de cada una de las muestras de la fracción Sn y Cp se utilizó la determinación colorimétrica de Bradford y se realizó una Curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) [1 mg/mL] (Figura 10).

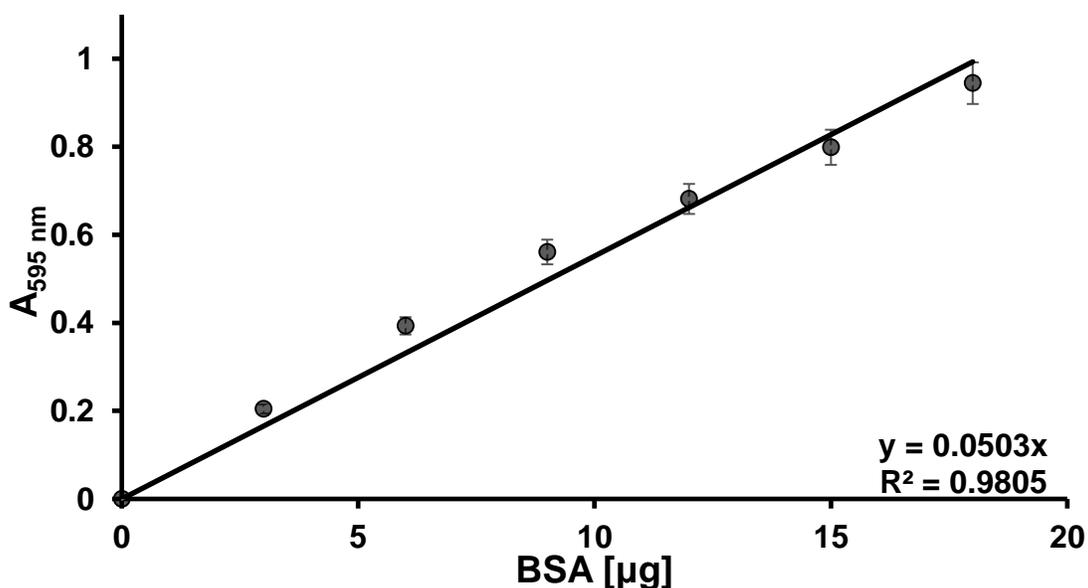


Figura 10. Curva de calibración de BSA para la determinación de proteína por el método de Bradford. El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 mL de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (#500000)).

Para la cuantificación de proteína de la fracción Pp, y con el objetivo de disolver los residuos precipitados y determinar correctamente la proteína, se le agregó el detergente SDS, para ajustar cada muestra a una concentración final de 0.1% (recomendada por el fabricante: Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate #500000). A continuación se presenta la curva de calibración de BSA con SDS. (Figura 11).

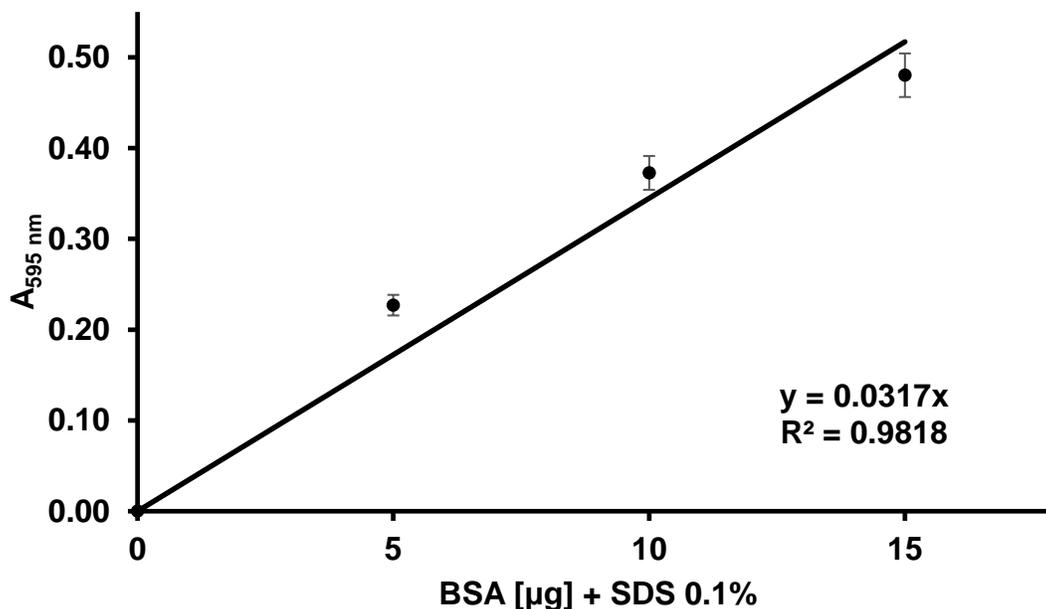


Figura 11. Curva de calibración de BSA + SDS 0.1% para la determinación de proteína de la fracción Pp por el método de Bradford. El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 mL de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (#500000)).

Los resultados de las cuantificaciones de proteína determinadas por el método de Bradford de las tres fracciones se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 2. Fracción citoplásmica Cp			
Muestra	$\bar{X} = A_{600nm}$	Ecuación de la recta $y=0.0503x$	mg/mL
T= 3 h Control	0.736	14.63	1.46
T= 3 h Ana 15:0	0.531	11.54	1.15
T= 6 h Control	0.531	10.56	2.11
T= 6 h Ana 15:0	0.607	12.06	1.21
T= 9 h Control	0.730	14.51	2.90
T= 9 h Ana 15:0	0.565	11.23	2.24
T= 24 h Control	0.574	11.41	1.141
T= 24 h Ana15:0	0.643	12.78	1.270

T= 3 h: muestra al tiempo 3 h; T= 6: muestra al tiempo 6 h; T= 9 h: muestra al tiempo 9 h;

T= 24 h: muestra al tiempo 24 h.

Tabla 3. Fracción sobrenadante (Sn)			
Muestra	$\bar{X} = A_{600nm}$	Ecuación de la recta $y=0.0503x$	[mg/mL]
T= 3 h Control	0.29	5.74	1.15
T= 3 h Ana 15:0	0.26	5.16	1.03
T= 6 h Control	0.43	8.45	0.84
T= 6 h Ana 15:0	0.52	10.42	1.04
T= 9 h Control	0.40	7.98	1.60
T= 9 h Ana 15:0	0.39	7.76	1.55
T= 24 h Control	0.43	8.54	0.85
T= 24 h Ana15:0	0.46	9.17	0.92

T= 3 h: muestra al tiempo 3 h; T= 6: muestra al tiempo 6 h; T= 9 h: muestra al tiempo 9 h;

T= 24 h: muestra al tiempo 24 h.

Tabla 4. Fracción precipitado celular Pp			
Muestra	$\bar{X} = A_{600nm}$	Ecuación de la recta $y=0.0317x$	[mg/mL]
T= 3 h Control	0.392	12.98	1.30
T= 3 h Ana 15:0	0.395	13.09	1.31
T= 6 h Control	0.413	13.68	1.37
T= 6 h Ana 15:0	0.478	15.82	1.58
T= 9 h Control	0.471	15.60	1.56
T= 9 h Ana 15:0	0.513	16.99	1.70
T= 24 h Control	0.522	17.30	1.73
T= 24 h Ana 15:0	0.582	19.27	1.92

T= 3 h: muestra al tiempo 3 h; T= 6: muestra al tiempo 6 h; T= 9 h: muestra al tiempo 9 h;

T= 24 h: muestra al tiempo 24 h.

4.4. Electroforesis en geles de PAGE-SDS

Una vez conocida la concentración de proteína, se procedió a realizar los cálculos necesarios para cargar en cada pozo del gel 25 μ g de proteína de cada muestra. Como se explicó en la metodología, se realizó el experimento por duplicado y dado que se obtuvieron resultados semejantes, a continuación se presentan geles y perfiles electroforéticos que muestran de mejor manera los resultados obtenidos. En las Figuras 12, 13 y 14 se muestran los geles correspondientes a las Fracciones Cp, Sn y Pp, respectivamente.

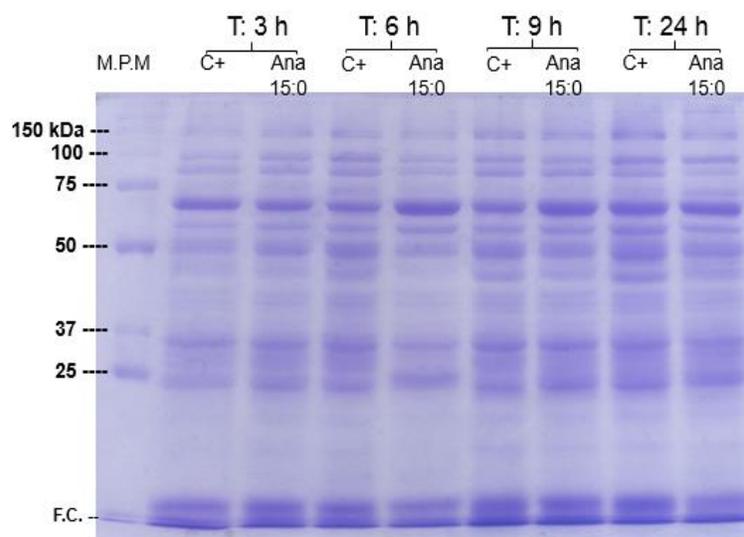


Figura 12. Gel de poliacrilamida al 10% con SDS de la fracción citoplasmática (Cp) teñido con azul de Coomassie. En la parte de arriba se indica el tiempo de muestreo y las muestras que fueron corridas en el gel (C+: control o Ana 15:0, con el ácido anacárdico 15:0). En el primer carril se cargó el marcador de peso molecular (M.P.M), las líneas negras de la izquierda indican el peso molecular en kDa. El frente de corrida (F.C) está marcado con una línea en la parte inferior izquierda del gel.

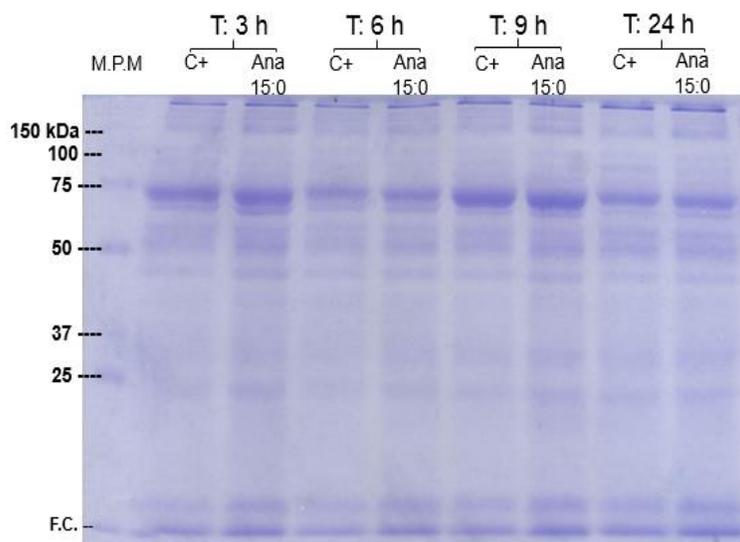


Figura 13. Gel de poliacrilamida al 10% con SDS de la fracción Sobrenadante (Sn) teñido con azul de Coomassie. En la parte de arriba se indica el tiempo de muestreo y las muestras que fueron corridas en el gel (C+: control o Ana 15:0, con el ácido anacárdico 15:0). En el primer carril se cargó el marcador de peso molecular (M.P.M), las líneas negras de la izquierda indican el peso molecular en kDa. El frente de corrida (F.C) está marcado con una línea en la parte inferior izquierda del gel.

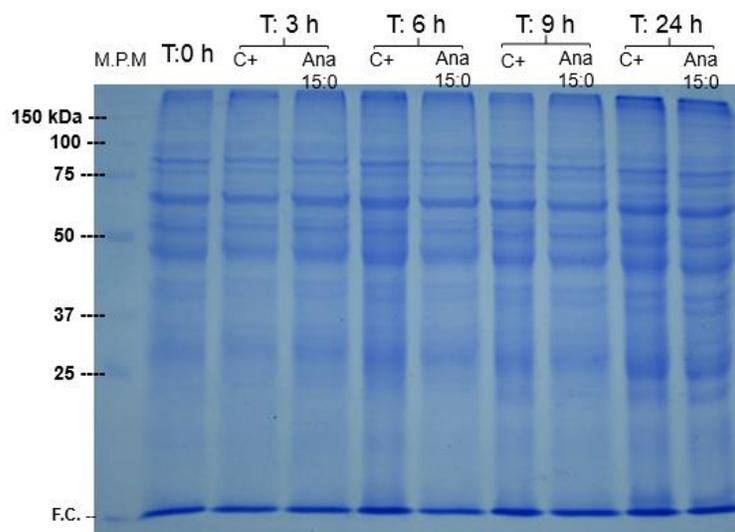


Figura 14. Gel de poliacrilamida al 10% con SDS de la fracción Precipitado celular (Pp) teñido con azul de Coomassie. En la parte de arriba se indica el tiempo de muestreo y las muestras que fueron corridas en el gel (C+: control o Ana 15:0, con el ácido anacárdico 15:0). En el primer carril se cargó el marcador de peso molecular (M.P.M), las líneas negras de la izquierda indican el peso molecular en kDa. El frente de corrida (F.C) está marcado con una línea en la parte inferior izquierda del gel.

4.5. Perfiles electroforéticos.

A continuación, se obtuvieron los perfiles electroforéticos de las fracciones Cp, Sn, y Pp a los tiempos 3, 6, 9 y 24 horas utilizando el programa GelAnalyzer 2010. Para determinar los posibles cambios en la expresión de las proteínas, en cada condición experimental, los perfiles en presencia de Ana 15:0 fueron comparados con su respectivo control (vehículo DMSO).

Para cada gel se calculó el peso molecular (PM) de los picos de interés, utilizando los estándares de peso molecular que fueron corridos en el propio gel. En la Figura 15 se muestra la curva de calibración representativa de un gel y a continuación un ejemplo de cómo se realizó el cálculo del PM de un pico (banda).

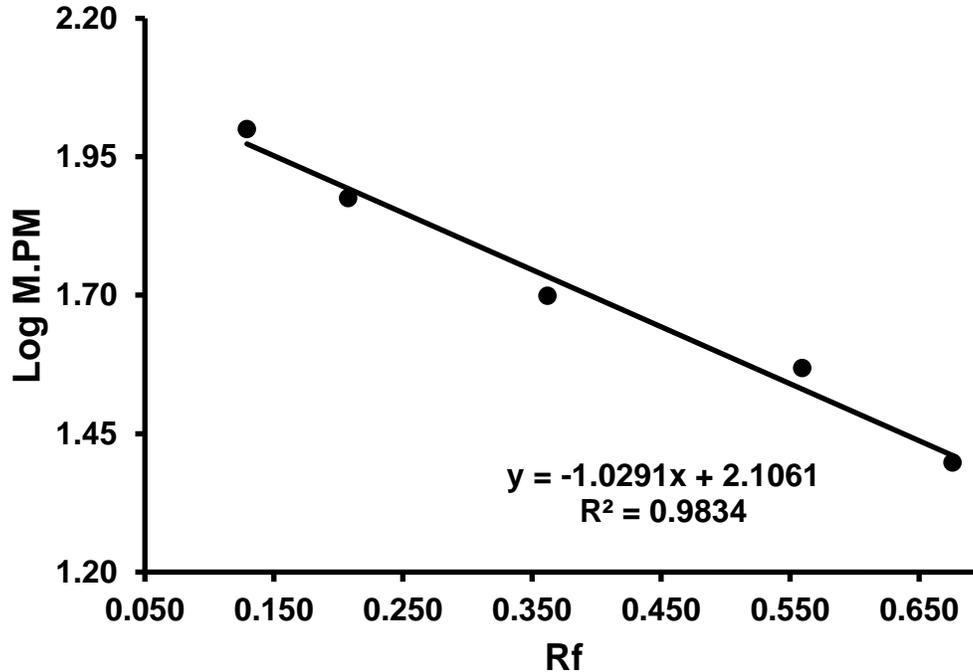


Figura 15. Curva de calibración para determinación de Pesos Para la realización de esta curva se utilizaron los datos obtenidos del carril No. 1 de cada gel que contenía las proteínas de la Mezcla comercial de estándares de peso molecular. Rf: la movilidad electroforética relativa, Log M.P.M: logaritmo del marcador de peso molecular.

El cálculo de Rf o movilidad relativa es un parámetro experimental asociado a esta técnica electroforética y se define

$$Rf = \frac{\text{distancia que migra una determinada proteína}}{\text{distancia que migra el frente de corrida}}$$

El frente de corrida determina de movilidad máxima, en este caso la posición del compuesto de referencia azul de Coomassie

Para calcular el PM de un pico (banda) en particular, se utiliza la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración:

$$Y = \text{Log}(\text{PM}) = -1.0291X + 2.1061$$

Suponiendo un Rf=0.693 de la banda de interés, simplemente se sustituye éste valor en X:

$$\text{Log}(\text{PM}) = -1.0291(0.693) + 2.1061$$

Se resuelve la ecuación: $\text{PM} = 10^{(-1.0291(0.693) + 2.1061)}$ y $\text{PM} = 24.71 \text{ kDa}$

Al obtener con el programa GelAnalyzer el perfil electroforético de una muestra en particular podemos hacer una estimación muy precisa de la cantidad total de proteína cargada, esto es gracias al valor llamado “Raw volume” (RV) que equivale al Área Total de perfil electroforético y que está dado en pixeles.

Con base en esta información, nuestra primera observación fue que, a pesar de haber cargado la misma cantidad de proteína en cada pozo, 25 µg (de acuerdo a la determinación de proteína por Bradford), el programa revela diferencias considerables, que probablemente se deban a varios factores, entre ellos la precisión de la determinación de proteína, errores de carga, solubilidad de las proteínas, precisión de micropipetas, etc. Estas diferencias ya han sido reportadas por otros autores (Mathé-Hubert *et al.*, 2015). Con el objeto de tratar de que nuestro análisis entre las muestras Control y Ana 15:0 fuera más comparativo se normalizó (ajustó) la cantidad de proteína cargada con base en el valor de “raw volume” que arrojaba el programa y se corrieron nuevamente los geles. Sin embargo, aunque si logramos equiparar mejor el contenido de proteína entre las muestras, nunca logramos que los valores fueran exactamente iguales. Considerando lo anterior, al realizar los análisis comparativos de las bandas en ausencia (controles) y en presencia de Ana 15:0, deben de tomarse en cuenta estas diferencias en la carga de proteína (en el raw volume). Éste valor se mostrará en la parte de arriba a la izquierda de cada perfil que se presentará más adelante.

4.5.1. Análisis de los Perfiles electroforéticos de la fracción Citoplásmica de *H. pylori* (Cp).

En las figuras 16 a 20 se presentan los perfiles electroforéticos del control (DMSO) en comparación con el perfil de Ana 15:0, para la fracción Citoplásmica (Cp) a cada uno de los tiempos ensayados.

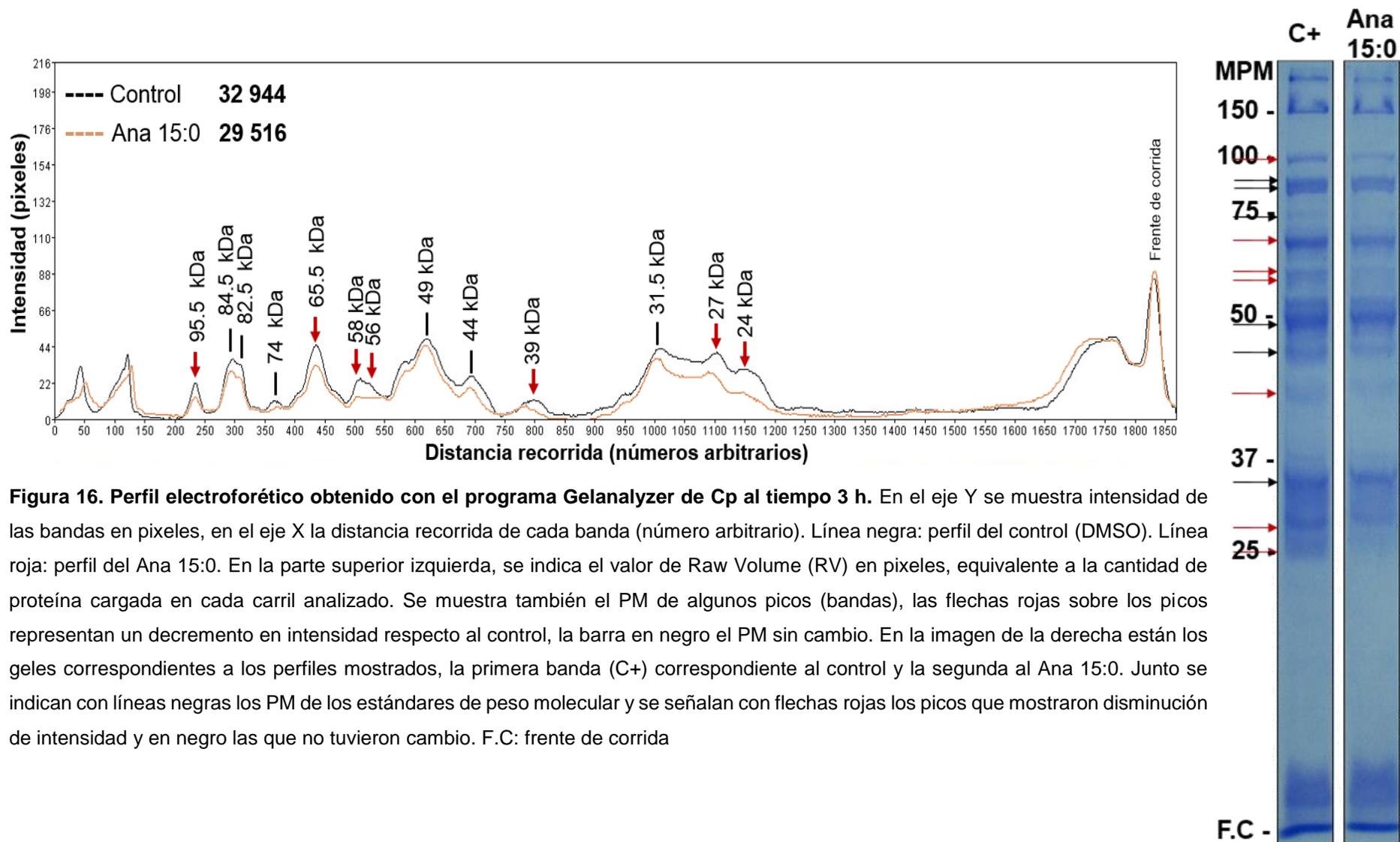


Figura 16. Perfil electroforético obtenido con el programa Gelanalyzer de Cp al tiempo 3 h. En el eje Y se muestra intensidad de las bandas en pixeles, en el eje X la distancia recorrida de cada banda (número arbitrario). Línea negra: perfil del control (DMSO). Línea roja: perfil del Ana 15:0. En la parte superior izquierda, se indica el valor de Raw Volume (RV) en pixeles, equivalente a la cantidad de proteína cargada en cada carril analizado. Se muestra también el PM de algunos picos (bandas), las flechas rojas sobre los picos representan un decremento en intensidad respecto al control, la barra en negro el PM sin cambio. En la imagen de la derecha están los gels correspondientes a los perfiles mostrados, la primera banda (C+) correspondiente al control y la segunda al Ana 15:0. Junto se indican con líneas negras los PM de los estándares de peso molecular y se señalan con flechas rojas los picos que mostraron disminución de intensidad y en negro las que no tuvieron cambio. F.C: frente de corrida

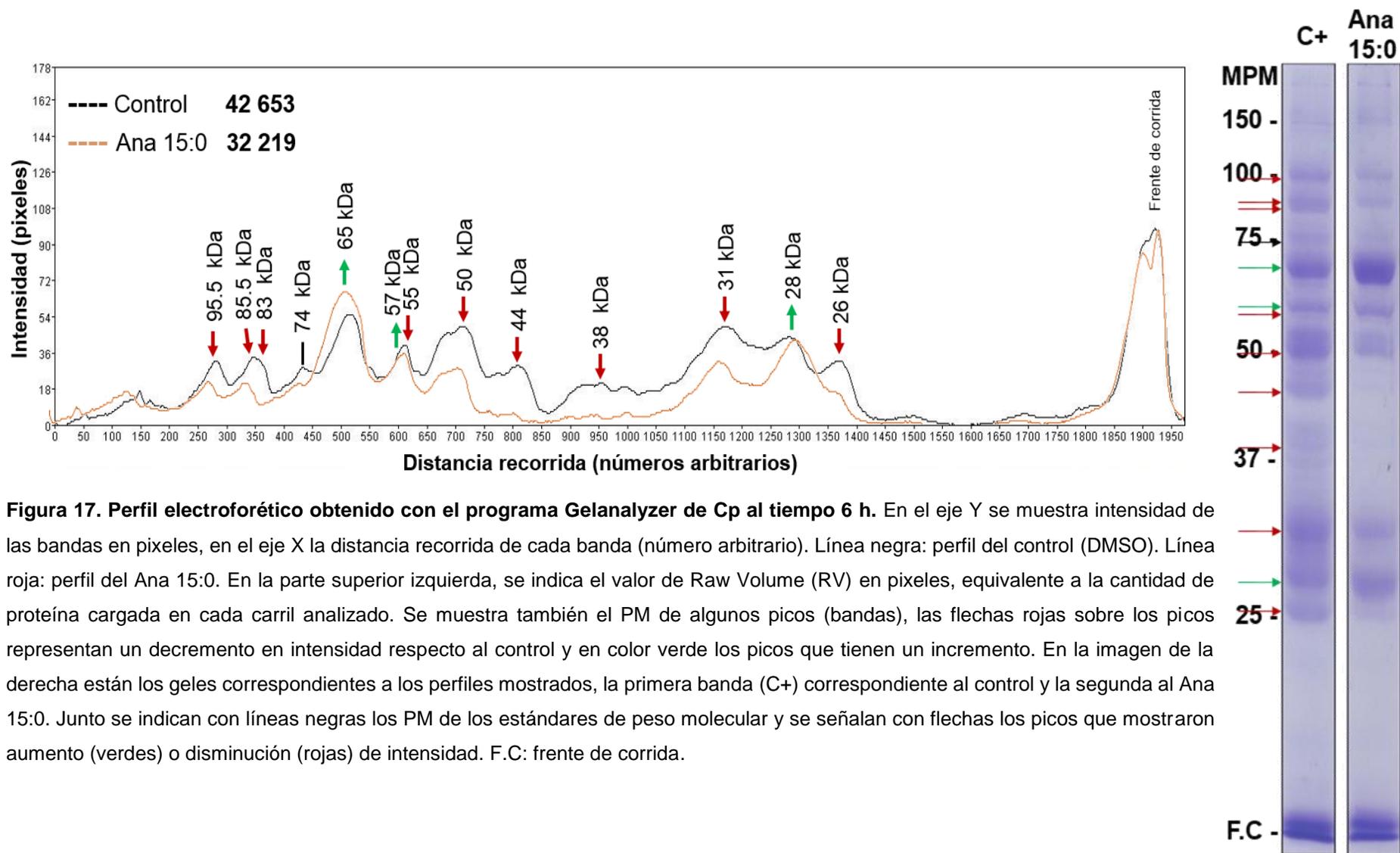


Figura 17. Perfil electroforético obtenido con el programa Gelanalyzer de Cp al tiempo 6 h. En el eje Y se muestra intensidad de las bandas en pixeles, en el eje X la distancia recorrida de cada banda (número arbitrario). Línea negra: perfil del control (DMSO). Línea roja: perfil del Ana 15:0. En la parte superior izquierda, se indica el valor de Raw Volume (RV) en pixeles, equivalente a la cantidad de proteína cargada en cada carril analizado. Se muestra también el PM de algunos picos (bandas), las flechas rojas sobre los picos representan un decremento en intensidad respecto al control y en color verde los picos que tienen un incremento. En la imagen de la derecha están los geles correspondientes a los perfiles mostrados, la primera banda (C+) correspondiente al control y la segunda al Ana 15:0. Junto se indican con líneas negras los PM de los estándares de peso molecular y se señalan con flechas los picos que mostraron aumento (verdes) o disminución (rojas) de intensidad. F.C: frente de corrida.

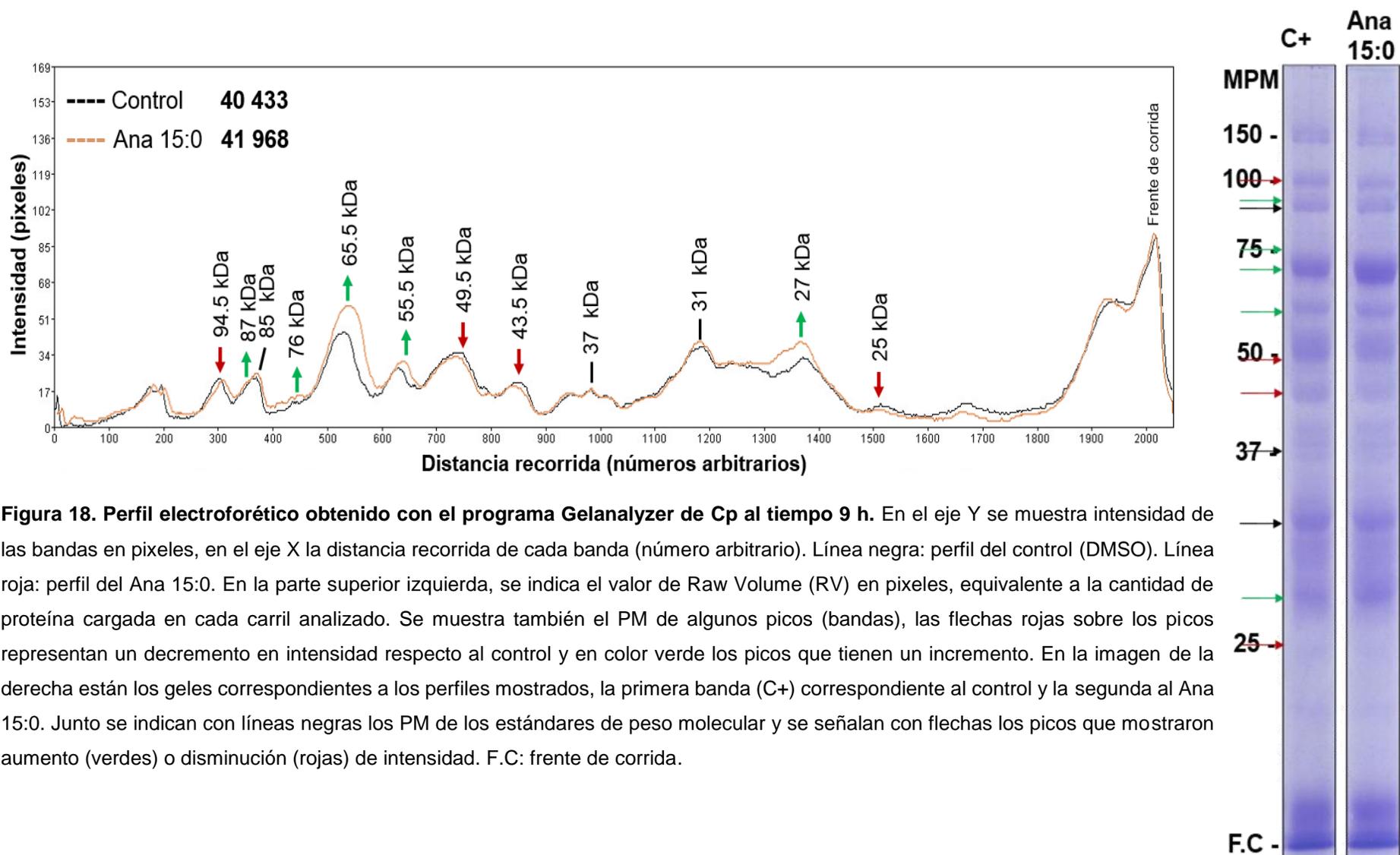


Figura 18. Perfil electroforético obtenido con el programa Gelanalyzer de Cp al tiempo 9 h. En el eje Y se muestra intensidad de las bandas en pixeles, en el eje X la distancia recorrida de cada banda (número arbitrario). Línea negra: perfil del control (DMSO). Línea roja: perfil del Ana 15:0. En la parte superior izquierda, se indica el valor de Raw Volume (RV) en pixeles, equivalente a la cantidad de proteína cargada en cada carril analizado. Se muestra también el PM de algunos picos (bandas), las flechas rojas sobre los picos representan un decremento en intensidad respecto al control y en color verde los picos que tienen un incremento. En la imagen de la derecha están los geles correspondientes a los perfiles mostrados, la primera banda (C+) correspondiente al control y la segunda al Ana 15:0. Junto se indican con líneas negras los PM de los estándares de peso molecular y se señalan con flechas los picos que mostraron aumento (verdes) o disminución (rojas) de intensidad. F.C: frente de corrida.

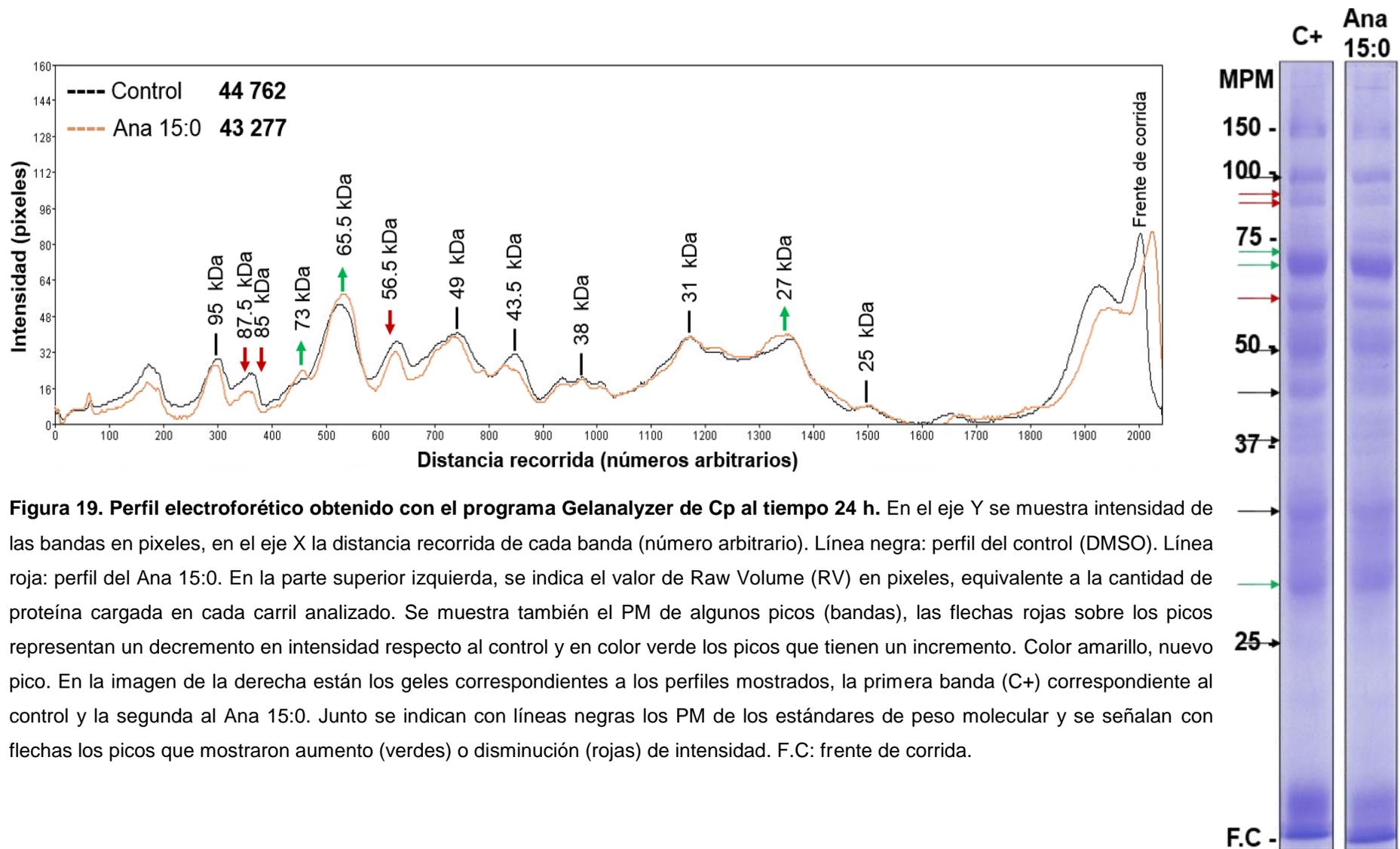


Figura 19. Perfil electroforético obtenido con el programa Gelanalyzer de Cp al tiempo 24 h. En el eje Y se muestra intensidad de las bandas en pixeles, en el eje X la distancia recorrida de cada banda (número arbitrario). Línea negra: perfil del control (DMSO). Línea roja: perfil del Ana 15:0. En la parte superior izquierda, se indica el valor de Raw Volume (RV) en pixeles, equivalente a la cantidad de proteína cargada en cada carril analizado. Se muestra también el PM de algunos picos (bandas), las flechas rojas sobre los picos representan un decremento en intensidad respecto al control y en color verde los picos que tienen un incremento. Color amarillo, nuevo pico. En la imagen de la derecha están los geles correspondientes a los perfiles mostrados, la primera banda (C+) correspondiente al control y la segunda al Ana 15:0. Junto se indican con líneas negras los PM de los estándares de peso molecular y se señalan con flechas los picos que mostraron aumento (verdes) o disminución (rojas) de intensidad. F.C: frente de corrida.

En la Tabla 5, se resumen las bandas de la fracción Citoplásmica (Cp) que tuvieron cambios a los diferentes tiempos muestreados y se les dio seguimiento a lo largo del tiempo. Se seleccionaron solamente las bandas entre un PM de 100 kDa y 20 kDa dado que es el rango en el que el sistema electroforético utilizado nos permite determinar su peso molecular con más precisión. Cada una de las bandas se identifica por su peso molecular.

4.5.1.1. Cálculo de la diferencia (en porcentaje) entre cada pico obtenido en presencia de Ana 15:0 y su respectivo control.

En primer lugar, se tomó en cuenta el valor de la cantidad total de proteína cargada (RV) en cada uno de los perfiles (en ausencia y en presencia de Ana 15:0) y se obtuvo el porcentaje de diferencia entre ellos; esto se muestra en la 3^{era} y 4^a fila de la Tabla 5. Para hacer la cuantificación de la diferencia de una banda en particular C+ vs Ana 15:0, se determinaron sus RV seleccionando 20 pixeles de cada lado del pico máximo y al valor obtenido se le añadió o restó el porcentaje de diferencia obtenido para el perfil completo, es decir, se trató de igualar la cantidad de proteína bajo las dos condiciones y sobre ese valor se calculó la diferencia entre ellos en porcentaje (este valor se indica en la tabla como ≠%).

Por ejemplo:

Tenemos al tiempo: 3 h; RV total de C+ = 32 944; Ana 15:0 = 29 516

$$C+ = 32\ 944 - 100\%$$

$$Ana\ 15:0 = 29\ 516 - 89.59\%$$

La diferencia de porcentaje [≠(%)] es = 10.4%

Para la banda con PM de 95.5 kDa tenemos que:

$$RV\ banda\ C+ = 296$$

$$RV\ banda\ Ana\ 15:0 = 205$$

Dado que el perfil completo de Ana 15:0 es 10.4% menor que C+, entonces, se calculó el 10.4% del valor de RV de la banda con Ana 15:0 y se sumó a la misma quedando:

$$(205 \times 10.4\%) \div 100 = 21.3$$

$$\text{RV Ana 15:0} = 205 + 21.3 = 226.3$$

Por lo tanto:

$$\text{RV C+} = 296 - 100\%$$

$$\text{RV Ana 15:0} = 226.3 - 76.45\%$$

$$\text{Por lo que: la } \neq(\%) = -23.55\%$$

Es decir, se redujo la expresión de esta banda.

Para fines del presente trabajo, se consideró como un cambio, aquellos porcentajes (positivos o negativos) que fueran mayores al 10%. Este método, a pesar de poder parecer un poco arbitrario, fue la única manera en que se pudo cuantificar las diferencias obtenidas en presencia de Ana 15:0 y el control.

Tiempo de muestreo	3 h			6 h			9 h			24 h		
Condición	C+	Ana 15:0	≠(%)	C+	Ana 15:0	≠(%)	C+	Ana 15:0	≠(%)	C+	Ana 15:0	≠(%)
RV total	32944	29516	10.406	42653	32219	24.463	40433	41968	3.796	44762	43277	3.318

PM (kDa)	3 h			6 h			9 h			24 h		
	RV		≠%	RV		≠%	RV		≠%	RV		≠%
	C+	Ana 15:0		C+	Ana 15:0		C+	Ana 15:0		C+	Ana 15:0	
95	296	205	-23.54	412	276	-16.62	351	301	-17.50	430	403	-3.17
86.12	392	324	-8.75	371	209	-29.88	174	209	15.55	247	189	-20.94
83.87	287	252	-3.06	206	119	-28.10	295	307	0.12	283	236	-13.84
74.25	157	128	-9.99	368	268	-9.36	166	207	19.96	298	367	27.24
65.37	840	664	-12.73	2186	2649	50.82	1784	2310	24.57	2133	2355	14.07
57.5	309	192	-31.40	802	718	11.43	664	643	-6.84	823	574	-27.94
55.75	283	182	-29.00	350	246	-12.52	246	268	4.81	446	406	-5.95
49.37	994	928	3.07	1017	585	-28.41	1262	1146	-12.64	1456	1403	-0.44
43.75	974	827	-6.26	613	124	-74.82	722	619	-17.52	1088	960	-8.84
38	330	253	-15.36	464	123	-67.01	588	552	-9.69	708	718	4.78
31.12	885	775	-3.32	1070	679	-21.02	1510	1585	0.98	1563	1591	5.17
27.25	823	603	-19.11	1648	1557	17.59	970	1172	16.24	1152	1243	11.48
25	625	353	-37.64	692	359	-35.43	163	125	-26.22	243	259	10.12

Notas: C+: control, Ana15:0: Ác. Anacárdico 15:0, RV: Raw Volume determinados por el programa, indicativo de la cantidad de proteína, ≠(%): Diferencia calculada (en porcentaje) de la Condición con Ana 15:0 con respecto a C+, PM: Peso molecular promedio de los picos. Recuadros rosa: decremento de la intensidad de la banda, Recuadros verdes: incremento de la intensidad de la banda. Se consideró presencia de cambio en las bandas, solo cuando se obtuvieron porcentajes superiores o inferiores a 10%.

Como podemos observar en los perfiles electroforéticos (Figs. 16 a 19) y en la Tabla 5, los cambios que se presentaron en las bandas en la fracción Cp son variables a lo largo del tiempo,

Sin embargo, hay dos bandas que presentan cambios constantes a través de los 4 tiempos muestreados, una de ellas corresponde a un peso molecular (PM) de alrededor de ~65 kDa y la otra banda con un PM de ~27 kDa. Al tiempo 3 h, estas bandas en presencia del Ana 15:0 tuvieron una menor expresión comparado con el control (-12.7% y -19.1% respectivamente). Mientras que a los tiempos 6, 9 y 24 h se presenta una mayor expresión en estas proteínas (ver Tabla 5).

Otras dos bandas que muestran un cambio consistente, al menos hasta las 9 h, son las correspondientes a los pesos moleculares de ~95 kDa y de ~25 kDa, las cuales muestran, en este caso, menor expresión en presencia de Ana 15:0 en los 3 primeros tiempos.

Hay que hacer notar que, de manera general, la tendencia a las 3 h es una menor expresión de proteínas, como puede apreciarse en los valores negativos en los porcentajes de cambio en la Tabla 5. Esta tendencia continúa a las 6 h, aunque ya algunas proteínas muestran aumento en su expresión. Finalmente a las 9 y 24 esta tendencia es menor y ya los cambios son muy pocos.

Sabemos que el Ana 15:0 funciona como un antibiótico contra *H. pylori*, de tal manera que la inhibición en la expresión de proteínas que se observa en las primeras horas de exposición podría ser una respuesta al estrés que produce este compuesto. Sin embargo, conforme pasa el tiempo, observamos un aumento en su expresión lo que podría indicar inducción o síntesis de ciertas proteínas lo cual permitiría el ajuste de las proteínas reprimidas o la respuesta de la bacteria al antibiótico para sobrevivir o para generar algún mecanismo de resistencia para alcanzar un estado de susceptibilidad antibiótica disminuida.

Con respecto a las bandas con PM ~65 kDa y ~27 kDa, se realizó una búsqueda en la literatura de las posibles proteínas que tuvieran un peso molecular

semejante. Encontramos que la enzima Ureasa está conformada por dos subunidades estructurales, la subunidad β y la subunidad α , con PM β = 61-66 y α = 26-31 kDa (Dunn *et al.*, 1990; Hu *et al.*, 1990; Krajewska, 2009; Turbett *et al.*, 1992; UniProt), semejantes a los de las bandas con cambios a lo largo de los 4 tiempos.

La enzima ureasa es una proteína que, como mencionamos en la Introducción, es uno de los factores de patogenicidad de suma importancia para los mecanismos de colonización, virulencia y supervivencia. Esta enzima es una de las proteínas mayoritarias de *H. pylori*, llega a representar hasta el 10% de la proteína total de la bacteria (Bauerfeind *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1990; Sachs *et al.*, 2005). La ureasa se encuentra localizada principalmente en el citoplasma y solo en una pequeña cantidad se ha reportado fuera de ella o adherida en la superficie de la bacteria quizás debido a lisis de otras *H. pylori* (Hong *et al.*, 2003). De tal manera que es natural que la encontremos en la fracción citoplásmica Cp.

El comportamiento consistente de expresión de las dos bandas de ~65 y ~25 kDa a lo largo del tiempo en presencia del Ana 15:0 (primero menor expresión a las 3 h y posteriormente mayor expresión) coincide con que podría tratarse de las subunidades α y β de la enzima ureasa.

Para comprobar si estas dos bandas corresponden a la enzima ureasa se planificó un ensayo de identificación de las mismas mediante inmunoelectrotransferencia tipo Western Blot que se mostrará más adelante.

4.5.2. Análisis de los Perfiles electroforéticos de la fracción Sobrenadante del cultivo de *H. pylori* (Sn).

En las figuras 20 a 23 se muestran los perfiles electroforéticos del control en comparación con el perfil de Ana 15:0, para la muestra del Sobrenadante a los tiempos muestreados (3, 6, 9 y 24 h)

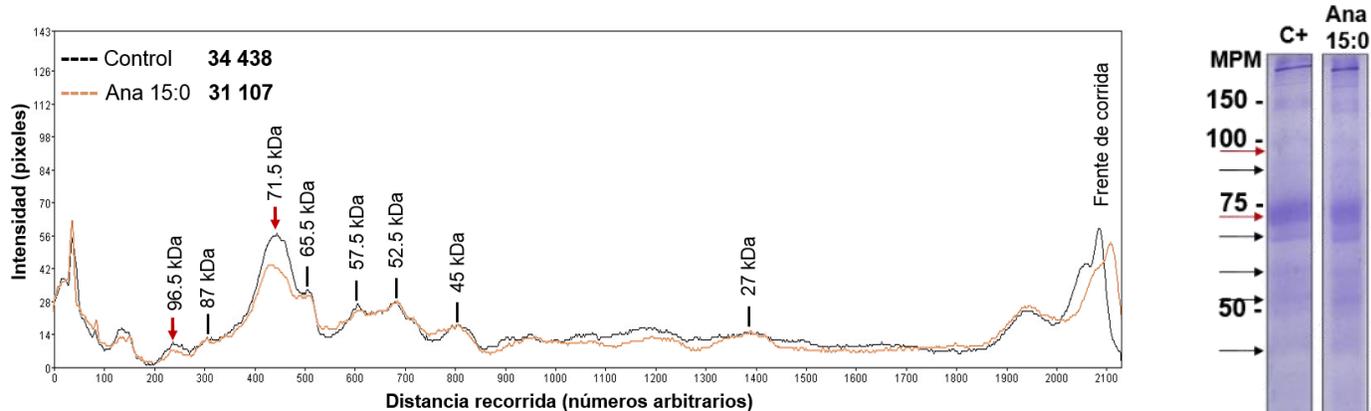


Figura 20. Perfil electroforético obtenido con el programa Gelanalyzer del Sn tiempo 3 h. El eje Y muestra la intensidad de las bandas en pixeles, el eje X la distancia recorrida de cada banda (número arbitrario). Línea negra: perfil del control (DMSO). Línea roja: perfil del Ana 15:0. En la parte superior izquierda, se indica el valor de Raw Volume (RV) en pixeles, equivalente a la cantidad de proteína cargada en cada carril analizado. Se muestra el PM de algunos picos (bandas) barra negra, las flechas rojas sobre los picos representan un decremento en intensidad respecto al control. En la imagen de la derecha están los geles correspondientes a los perfiles mostrados, la 1ª banda (C+) correspondiente al control y la 2ª al Ana 15:0. Junto se indican con líneas negras los PM de los estándares de peso molecular y se señalan con flechas rojas los picos que mostraron disminución de intensidad. F.C: frente de corrida.

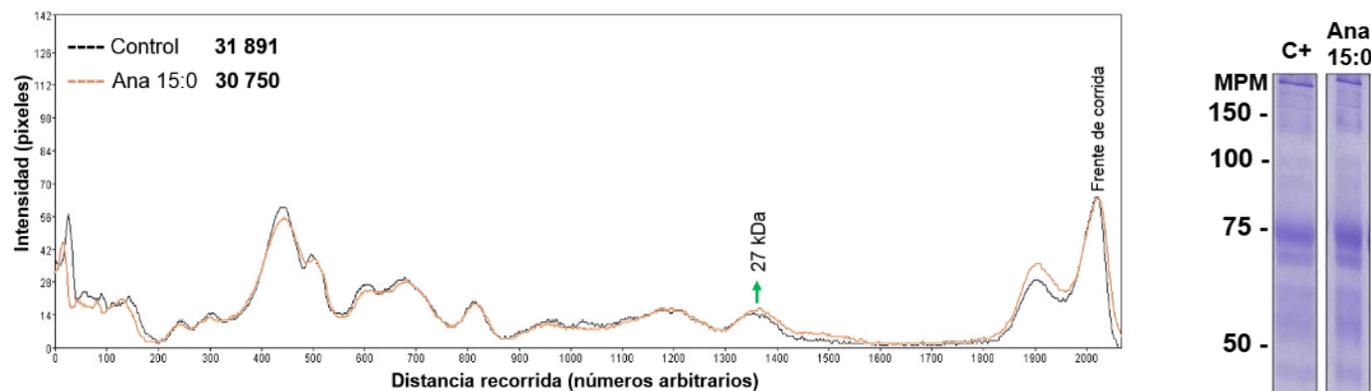


Figura 21. Perfil electroforético obtenido con el programa Gelanalyzer del Sn tiempo 6 h. El eje Y muestra la intensidad de las bandas en pixeles, el eje X la distancia recorrida de cada banda (número arbitrario). Línea negra: perfil del control (DMSO). Línea roja: perfil del Ana 15:0. En la parte superior izquierda, se indica el valor de Raw Volume (RV) en pixeles, equivalente a la cantidad de proteína cargada en cada carril analizado. Se muestra el PM de algunos picos (bandas), en color verde los picos que tienen un incremento con respecto al control. En la imagen de la derecha están los geles correspondientes a los perfiles mostrados, la 1ª banda (C+) correspondiente al control y la 2ª al Ana 15:0. Junto se indican con líneas negras los PM de los estándares de peso molecular y se señalan con flechas verdes los picos que mostraron aumento de intensidad. F.C: frente de corrida.

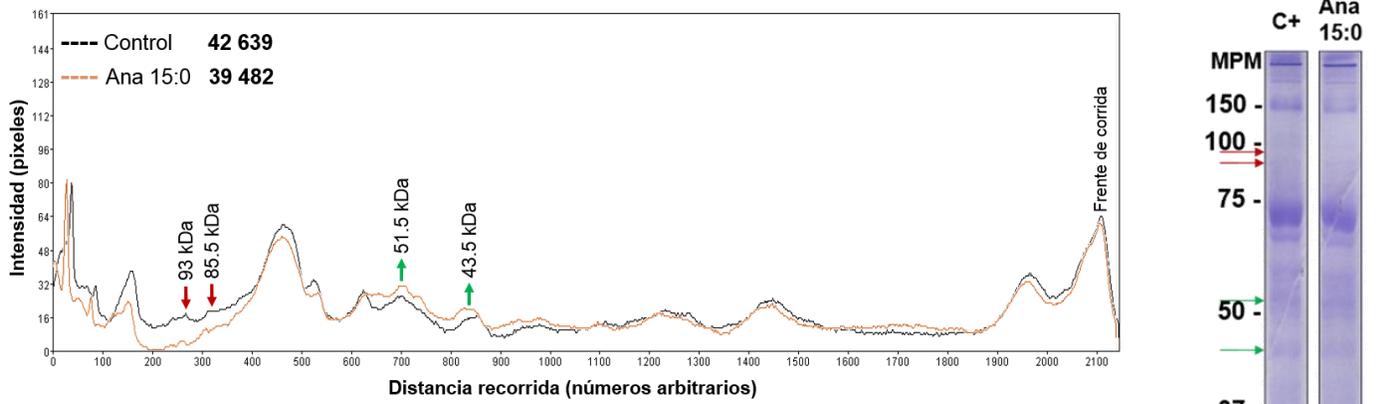


Figura 22. Perfil electroforético obtenido con el programa Gelanalyzer del Sn tiempo 9 h. El eje Y muestra la intensidad de las bandas en pixeles, el eje X la distancia recorrida de cada banda (número arbitrario). Línea negra: perfil del control (DMSO). Línea roja: perfil del Ana 15:0. En la parte superior izquierda, se indica el valor de Raw Volume (RV) en pixeles, equivalente a la cantidad de proteína cargada en cada carril analizado. Se muestra el PM de algunos picos (bandas), las flechas rojas sobre los picos representan un decremento en intensidad respecto al control y en color verde los picos que tienen un incremento. En la imagen de la derecha están los geles correspondientes a los perfiles mostrados, la 1ª banda (C+) correspondiente al control y la 2ª al Ana 15:0. Junto se indican con líneas negras los PM de los estándares de peso molecular y se señalan con flechas los picos que mostraron aumento (verdes) o disminución (rojas) de intensidad. F.C: frente de corrida.

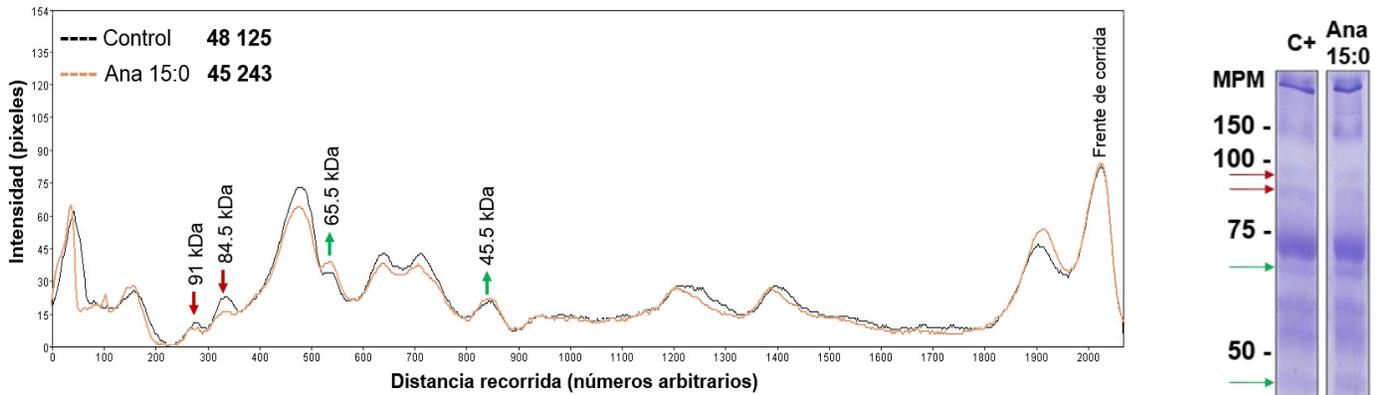


Figura 23. Perfil electroforético obtenido con el programa Gelanalyzer de Sn tiempo 24 h. El eje Y muestra la intensidad de las bandas en pixeles, el eje X la distancia recorrida de cada banda (número arbitrario). Línea negra: perfil del control (DMSO). Línea roja: perfil del Ana 15:0. En la parte superior izquierda, se indica el valor de Raw Volume (RV) en pixeles, equivalente a la cantidad de proteína cargada en cada carril analizado. Se muestra el PM de algunos picos (bandas), las flechas rojas sobre los picos representan un decremento en intensidad respecto al control y en color verde los picos que tienen un incremento. En la imagen de la derecha están los geles correspondientes a los perfiles mostrados, la 1ª banda (C+) correspondiente al control y la 2ª al Ana 15:0. Junto se indican con líneas negras los PM de los estándares de peso molecular y se señalan con flechas los picos que mostraron aumento (verdes) o disminución (rojas) de intensidad. F.C: frente de corrida.

En la Tabla 6, se resumen las bandas de la fracción del Sobrenadante del cultivo (Sn) que tuvieron cambios a los diferentes tiempos muestreados. Nuevamente se seleccionaron solamente las bandas entre un PM de 100 kDa y 20 kDa. Realizando los mismos ajustes que se mencionaron para la muestra de Citoplasma (Cp) se calculó el porcentaje de diferencia entre cada pico obtenido en presencia de Ana 15:0 y su respectivo control.

Tabla 6. Resumen de los cambios presentados en las bandas de la Fracción Sobrenadante												
Tiempo de muestreo	3 h			6 h			9 h			24 h		
Condición	C+	Ana 15:0	≠(%)	C+	Ana 15:0	≠(%)	C+	Ana 15:0	≠(%)	C+	Ana 15:0	≠(%)
RV total	34438	31107	9.67	31891	30750	3.57	42639	39482	-7.40	48125	45243	5.98

PM (kDa)	3 h			6 h			9 h			24 h		
	RV		≠%	RV		≠%	RV		≠%	RV		≠%
	C+	Ana 15:0		C+	Ana 15:0		C+	Ana 15:0		C+	Ana 15:0	
94.14	147	97	-27.63	160	142	-8.07	262	70	-71.30	171	131	-18.80
86.5	205	191	2.18	275	252	-5.09	399	200	-46.16	359	256	-24.42
71.71	1678	1272	-16.86	1769	1637	-4.15	1814	1641	-2.84	2216	1937	-7.36
66.14	650	597	0.73	781	794	5.30	677	573	-9.10	711	828	23.43
58.14	737	684	1.79	378	347	-4.92	435	405	0.00	678	599	-6.36
53.21	784	777	8.69	423	434	6.27	410	496	29.93	674	588	-7.54
45.5	689	647	2.99	527	526	3.38	482	569	26.79	610	639	11.03
26.71	419	408	6.79	408	447	13.48	733	658	-3.59	829	788	0.75

Notas: C+: control, Ana15:0: Ác. Anacárdico 15:0, RV: Raw Volume determinados por el programa, indicativo de la cantidad de proteína, ≠(%): Diferencia calculada (en porcentaje) de la Condición con Ana 15:0 con respecto a C+, PM: Peso molecular promedio de los picos. Recuadros rosa: decremento de la intensidad de la banda, Recuadros verdes: incremento de la intensidad de la banda. Se consideró presencia de cambio en las bandas, solo cuando se obtuvieron porcentajes superiores o inferiores a 10%.

En esta fracción, que corresponde al sobrenadante del cultivo, se esperaba encontrar solamente proteínas que fueran secretadas por *H. pylori*. En los perfiles no se observaron cambios consistentes a lo largo del tiempo en alguna de las bandas en particular. Sin embargo, podemos hacer algunas observaciones:

Se encontró una banda de un PM ~94 kDa, que mostró al tiempo 3, 9 y 24 h, una disminución en su expresión en presencia de Ana 15:0. Cabe recordar que, también en la fracción Cp se presentó una banda de PM semejante (~95 kDa) y tuvo un comportamiento similar de baja en su expresión en los 4 tiempos muestreados. Es posible que sea la misma proteína, pero por el momento, no tenemos ninguna evidencia de ello.

Así mismo, una proteína de PM ~87 kDa también baja su expresión a los tiempos 9 y 24 h en presencia de Ana 15:0, pero no muestra cambio en los primeros dos tiempos. De acuerdo a la literatura, la Citotoxina vacuolizante VacA tiene un PM de 87-90 kDa (Cover & Blaser 1992; Covacci *et al.*, 1999; Testerman *et al.*, 2014). La cepa ATTC 43504, usada en este trabajo, es *vacA+* por lo que es posible encontrarla en esta fracción. Esta toxina se exporta de la bacteria y es importante para los procesos de virulencia de tal manera que sería lógico encontrar una baja en su expresión debido a que el Ana 15:0, al tener una función antibiótica estaría provocando un estrés metabólico en la bacteria de manera que, aquellas proteínas que no tengan una función de sobrevivencia, dejarían de estarse produciendo.

Por otra parte, al igual que en la fracción Cp, encontramos aquí los picos correspondientes a las bandas con PM ~65 kDa y ~27 kDa, que suponemos podrían relacionarse con las subunidades β y α de la enzima ureasa, por su movilidad electroforética (Rf). Como ya se explicó, la enzima también puede encontrarse fuera de la bacteria como resultado de la lisis de otras bacterias, de manera que estas bandas podrían ser de la ureasa. Sin embargo, en esta fracción del Sn no encontramos cambios en su expresión, solamente observamos un

aumento en la expresión de la banda de ~65 kDa (subunidad β) a las 24 h y de la banda de ~27 kDa (subunidad α) al tiempo 6 h y estos cambios no van vinculados para las dos bandas. Más adelante, se mostrará el análisis de inmunoelectrotransferencia para demostrar su identidad.

4.5.3. Análisis de los Perfiles electroforéticos de la fracción del precipitado de la ultracentrifugación de *H. pylori* (Pp).

Las figuras 24 a 27 muestran los perfiles electroforéticos de la muestra control comparada con el perfil en presencia del Ana 15:0. Esta fracción corresponde al precipitado de la ultracentrifugación de las bacterias y que fue lavado dos veces para evitar traer alguna proteína citoplásmica, por lo que se espera obtener proteínas membranales o adosadas a las mismas.

Como puede observarse en los perfiles, prácticamente no hay diferencias entre la muestra control y en presencia de Ana 15:0; solamente al tiempo 3 h se encuentran diferencias en dos picos, el correspondiente a un PM de ~64 kDa y otro en un pico de ~29 kDa, en ambos picos se muestra un aumento considerable en la expresión de esas proteínas. Sin embargo, a lo largo del tiempo, ya solo se logra ver una ligera sobreexpresión de la banda de ~29 kDa. Estas dos bandas corresponden al peso molecular de las subunidades de la enzima ureasa (Ure β y α) que encontramos también en la fracción Cp y Sn. Como se comentó previamente es posible encontrar a la enzima adosada a membranas. Se ha referido que la fuente de esta enzima es la lisis de otras bacterias (Phadnis *et al.*, 1996).

Si se confirma por la técnica de inmunoelectroforesis tipo Western Blot que es la enzima ureasa, esto querría decir que la enzima se adhiere fuertemente a las membranas y que los lavados simples como los que realizamos no son suficientes para despegarla.

En la Tabla 7 se resumen estos cambios.

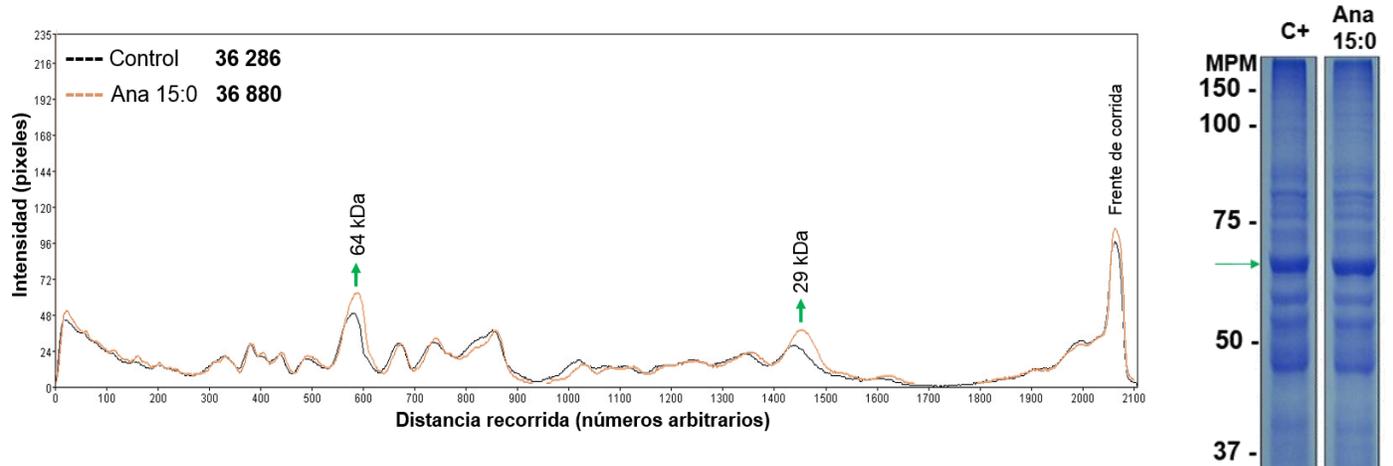


Figura 24. Perfil electroforético obtenido con el programa Gelanalyzer del Pp tiempo 3 h. El eje Y muestra la intensidad de las bandas en pixeles, el eje X la distancia recorrida de cada banda (número arbitrario). Línea negra: perfil del control (DMSO). Línea roja: perfil del Ana 15:0. En la parte superior izquierda, se indica el valor de Raw Volume (RV) en pixeles, equivalente a la cantidad de proteína cargada en cada carril analizado. Se muestra el PM de algunos picos (bandas), las flechas en color verde indican picos que tienen un incremento. En la imagen de la derecha están los geles correspondientes a los perfiles mostrados, la 1ª banda (C+) correspondiente al control y la 2ª al Ana 15:0. Junto se indican con líneas negras los PM de los estándares de peso molecular y se señalan con flechas los picos que mostraron aumento (verdes) de intensidad. F.C: frente de corrida.

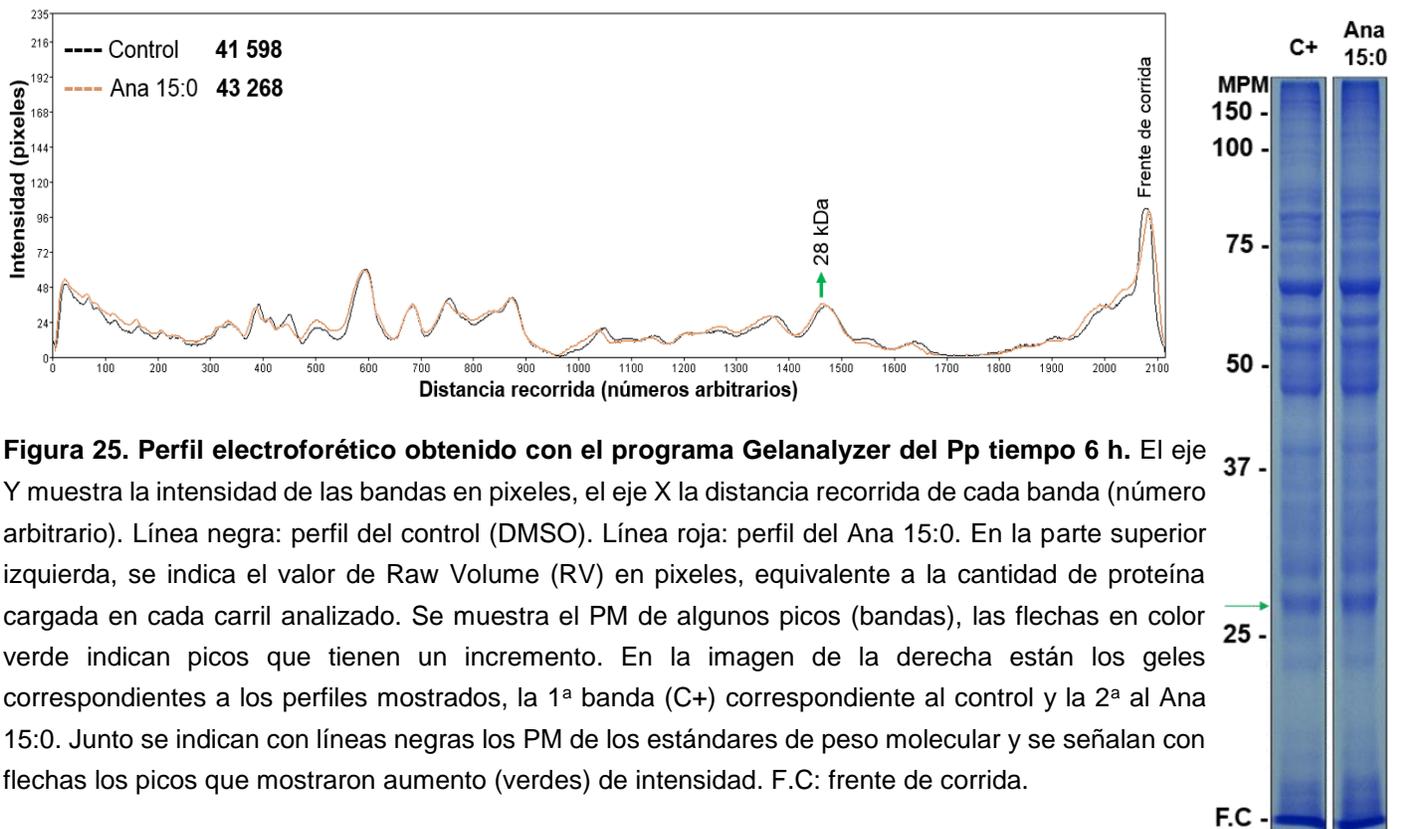


Figura 25. Perfil electroforético obtenido con el programa Gelanalyzer del Pp tiempo 6 h. El eje Y muestra la intensidad de las bandas en pixeles, el eje X la distancia recorrida de cada banda (número arbitrario). Línea negra: perfil del control (DMSO). Línea roja: perfil del Ana 15:0. En la parte superior izquierda, se indica el valor de Raw Volume (RV) en pixeles, equivalente a la cantidad de proteína cargada en cada carril analizado. Se muestra el PM de algunos picos (bandas), las flechas en color verde indican picos que tienen un incremento. En la imagen de la derecha están los geles correspondientes a los perfiles mostrados, la 1ª banda (C+) correspondiente al control y la 2ª al Ana 15:0. Junto se indican con líneas negras los PM de los estándares de peso molecular y se señalan con flechas los picos que mostraron aumento (verdes) de intensidad. F.C: frente de corrida.

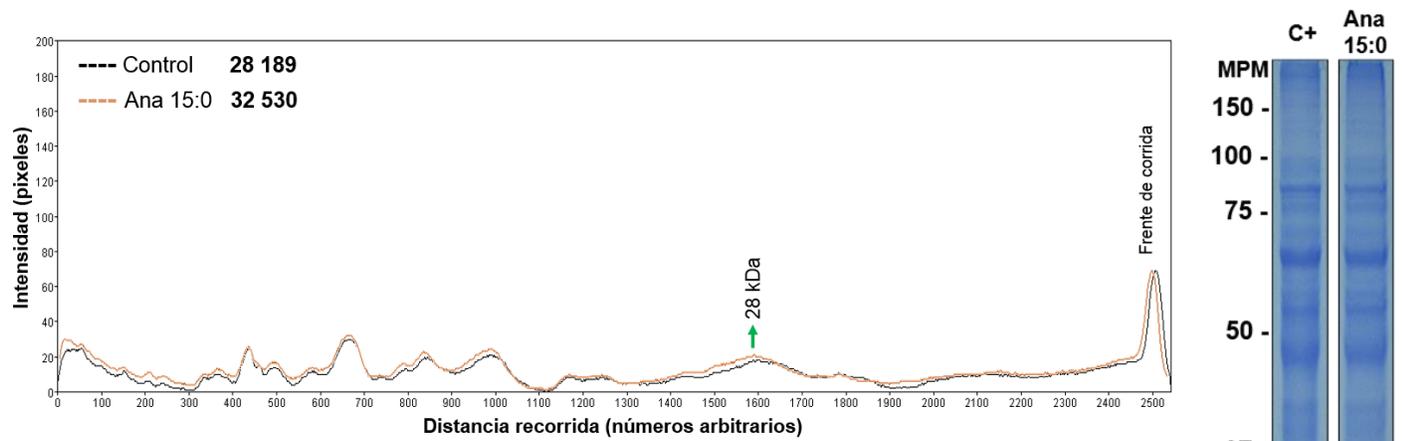


Figura 26. Perfil electroforético obtenido con el programa Gelanalyzer del Pp tiempo 9 h. El eje Y muestra la intensidad de las bandas en pixeles, el eje X la distancia recorrida de cada banda (número arbitrario). Línea negra: perfil del control (DMSO). Línea roja: perfil del Ana 15:0. En la parte superior izquierda, se indica el valor de Raw Volume (RV) en pixeles, equivalente a la cantidad de proteína cargada en cada carril analizado. Se muestra el PM de algunos picos (bandas), las flechas en color verde indican picos que tienen un incremento. En la imagen de la derecha están los geles correspondientes a los perfiles mostrados, la 1ª banda (C+) correspondiente al control y la 2ª al Ana 15:0. Junto se indican con líneas negras los PM de los estándares de peso molecular y se señalan con flechas los picos que mostraron aumento (verdes) de intensidad. F.C: frente de corrida

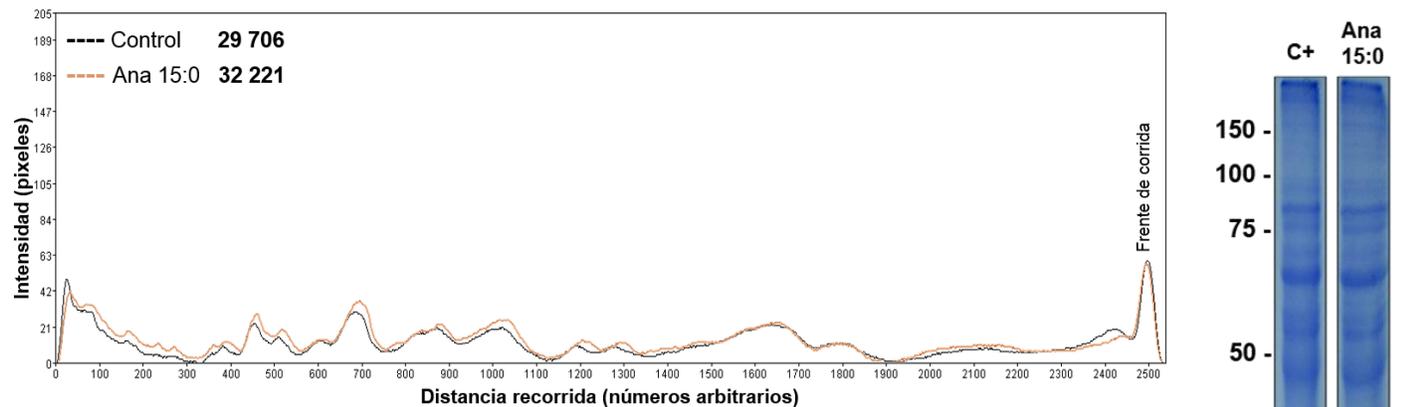


Figura 27. Perfil electroforético obtenido con el programa Gelanalyzer del Pp tiempo 9 h. El eje Y muestra la intensidad de las bandas en pixeles, el eje X la distancia recorrida de cada banda (número arbitrario). Línea negra: perfil del control (DMSO). Línea roja: perfil del Ana 15:0. En la parte superior izquierda, se indica el valor de Raw Volume (RV) en pixeles, equivalente a la cantidad de proteína cargada en cada carril analizado. En la imagen de la derecha están los geles correspondientes a los perfiles mostrados, la 1ª banda (C+) correspondiente al control y la 2ª al Ana 15:0. Junto se indican con líneas negras los PM de los estándares de peso molecular. F.C: frente de corrida.

Tabla 7. Resumen de los cambios presentados en las bandas de la Fracción Precipitado Pp												
Tiempo de muestreo	3 h			6 h			9 h			24 h		
Condición	C+	Ana 15:0	≠(%)	C+	Ana 15:0	≠(%)	C+	Ana 15:0	≠(%)	C+	Ana 15:0	≠(%)
RV total	36286	36880	1.63	41598	43268	4.01	28189	32530	15.40	29706	32221	8.46

PM (kDa)	3 h			6 h			9 h			24 h		
	RV		≠%	RV		≠%	RV		≠%	RV		≠%
	C+	Ana 15:0		C+	Ana 15:0		C+	Ana 15:0		C+	Ana 15:0	
62.75	1391	1697	23.99	1716	1726	-3.45	873	962	-3.45	898	1023	4.27
28.25	572	798	41.79	754	874	11.26	435	508	11.262	530	558	-3.63

Notas: C+: control, Ana15:0: Ác. Anacárdico 15:0, RV: Raw Volume determinados por el programa, indicativo de la cantidad de proteína, ≠(%): Diferencia calculada (en porcentaje) de la Condición con Ana 15:0 con respecto a C+, PM: Peso molecular promedio de los picos. Recuadros verdes: incremento de la intensidad de la banda. Se consideró presencia de cambio en las bandas, solo cuando se obtuvieron porcentajes superiores o inferiores a 10%.

4.6. Inmunoelectrotransferencia o Western Blot.

Retomando los resultados de la fracción Cp, se continuó con la identificación, a través de inmunodetección (Western Blot), de las bandas de PM ~65 kDa y ~27 kDa que presentaban cambios conjuntos en su expresión, y que se proponen corresponden a las subunidades α y β de la ureasa. Hay que hacer notar, que estas dos bandas también fueron detectadas en las fracciones Sn y Pp, por lo que el análisis se llevó a cabo para las 3 fracciones.

En las Figuras 28, 29 y 30 se presentan los resultados para las fracciones Cp, Sn y Pp, respectivamente. Se analizaron solamente los tiempos 3, 6 y 9 h. En todos los casos se logró detectar a las dos subunidades de la enzima ureasa (Ure β y Ure α) con los anticuerpos correspondientes.

En el caso de la fracción Cp (Figura 28), al tiempo de 3 h se detectan las subunidades casi idénticas para las muestras C+ y el Ana 15:0. Sin embargo, es claro que a los T= 6 y 9 h, se aprecia una mayor cantidad de proteína en presencia del Ana 15:0, corroborando lo obtenido en los perfiles electroforéticos.

Analizando la fracción del Sn, al comparar las bandas del C+ y el Ana 15:0 a simple vista no se ven diferencias en la cantidad de proteína para los tiempos 3, 6 y 9 h, tal como se observó en los perfiles electroforéticos, aunque para el T= 9 h la subunidad α no tiene mucha intensidad, quizá debido a algún problema en la inmunodetección.

Para el caso de la fracción Pp, aparentemente las bandas en presencia del Ana 15:0 son de menos intensidad con respecto al C+, lo cual no concuerda con lo obtenido en los perfiles electroforéticos. Con este análisis se puede inferir que la enzima disminuye en presencia del Ana 15:0 y que la banda que observamos en el perfil con PAGE-SDS está constituida de otras proteínas además de la ureasa.

La parte importante de este análisis es que podemos corroborar que las bandas de PM ~65 kDa y ~27 kDa que se encontraron en todas la fracciones

efectivamente corresponden a las subunidades β y α de la ureasa. También se corrobora que a los tiempos 6 y 9 h en la fracción Cp se presenta un aumento en la cantidad de la ureasa en presencia del Ana 15:0. Y finalmente, como está reportado en la literatura, es posible localizar a la enzima principalmente en el citoplasma, pero también fuera de ella o adherida en la superficie de la bacteria (Hong *et al.*, 2003).

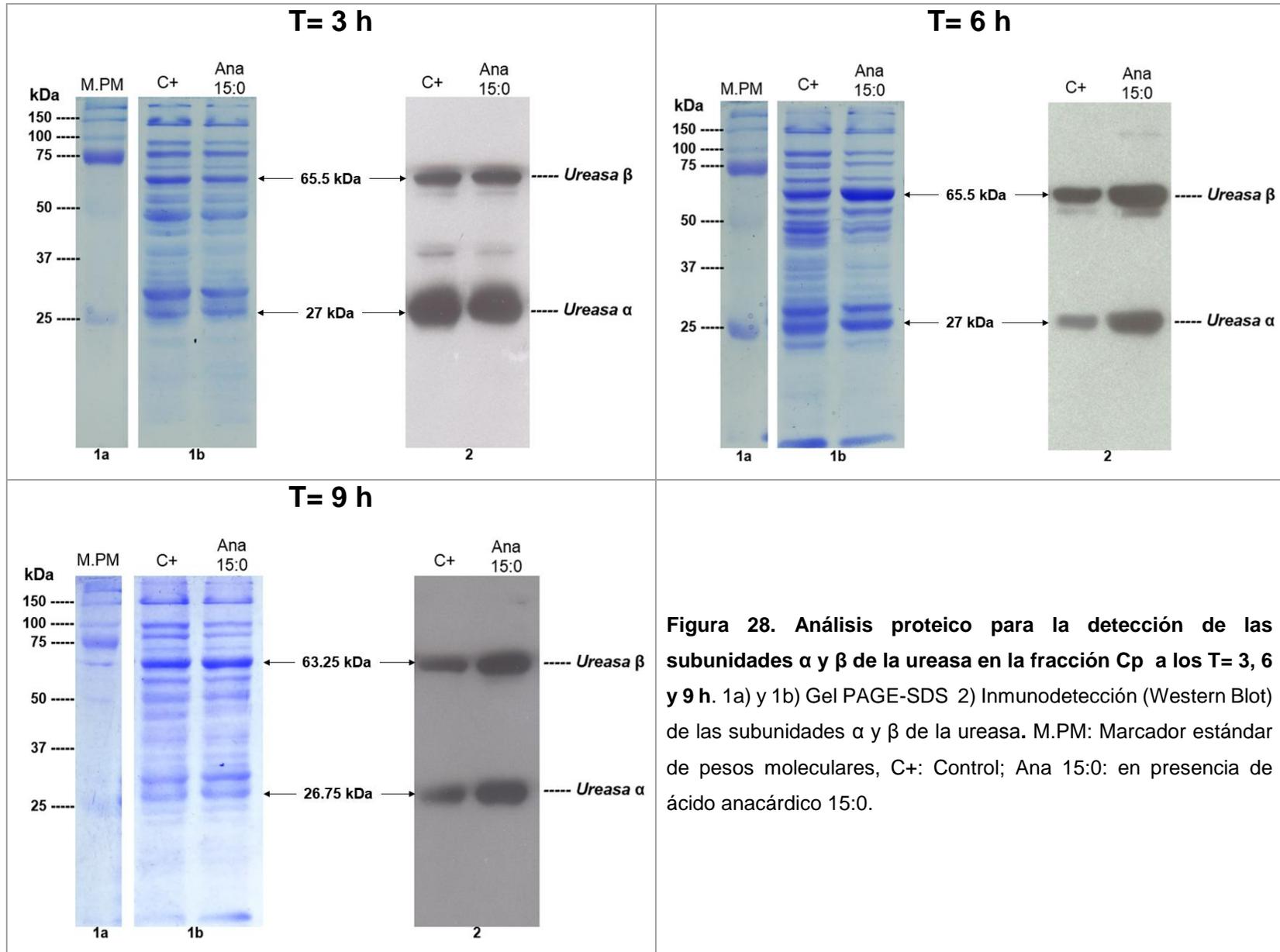


Figura 28. Análisis proteico para la detección de las subunidades α y β de la ureasa en la fracción Cp a los T= 3, 6 y 9 h. 1a) y 1b) Gel PAGE-SDS 2) Inmunodetección (Western Blot) de las subunidades α y β de la ureasa. M.PM: Marcador estándar de pesos moleculares, C+: Control; Ana 15:0: en presencia de ácido anacárdico 15:0.

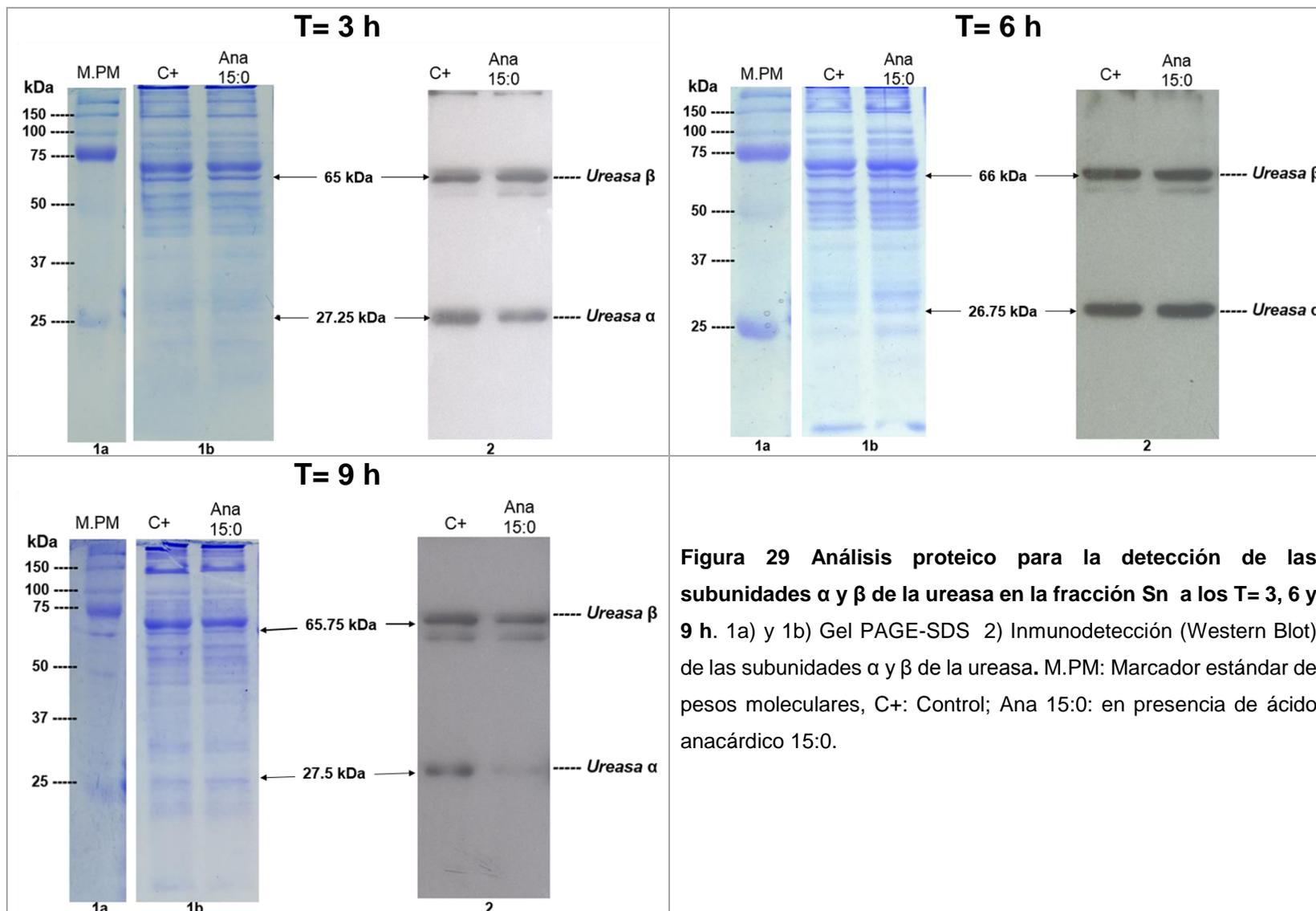


Figura 29 Análisis proteico para la detección de las subunidades α y β de la ureasa en la fracción Sn a los T= 3, 6 y 9 h. 1a) y 1b) Gel PAGE-SDS 2) Inmunodetección (Western Blot) de las subunidades α y β de la ureasa. M.PM: Marcador estándar de pesos moleculares, C+: Control; Ana 15:0: en presencia de ácido anacárdico 15:0.

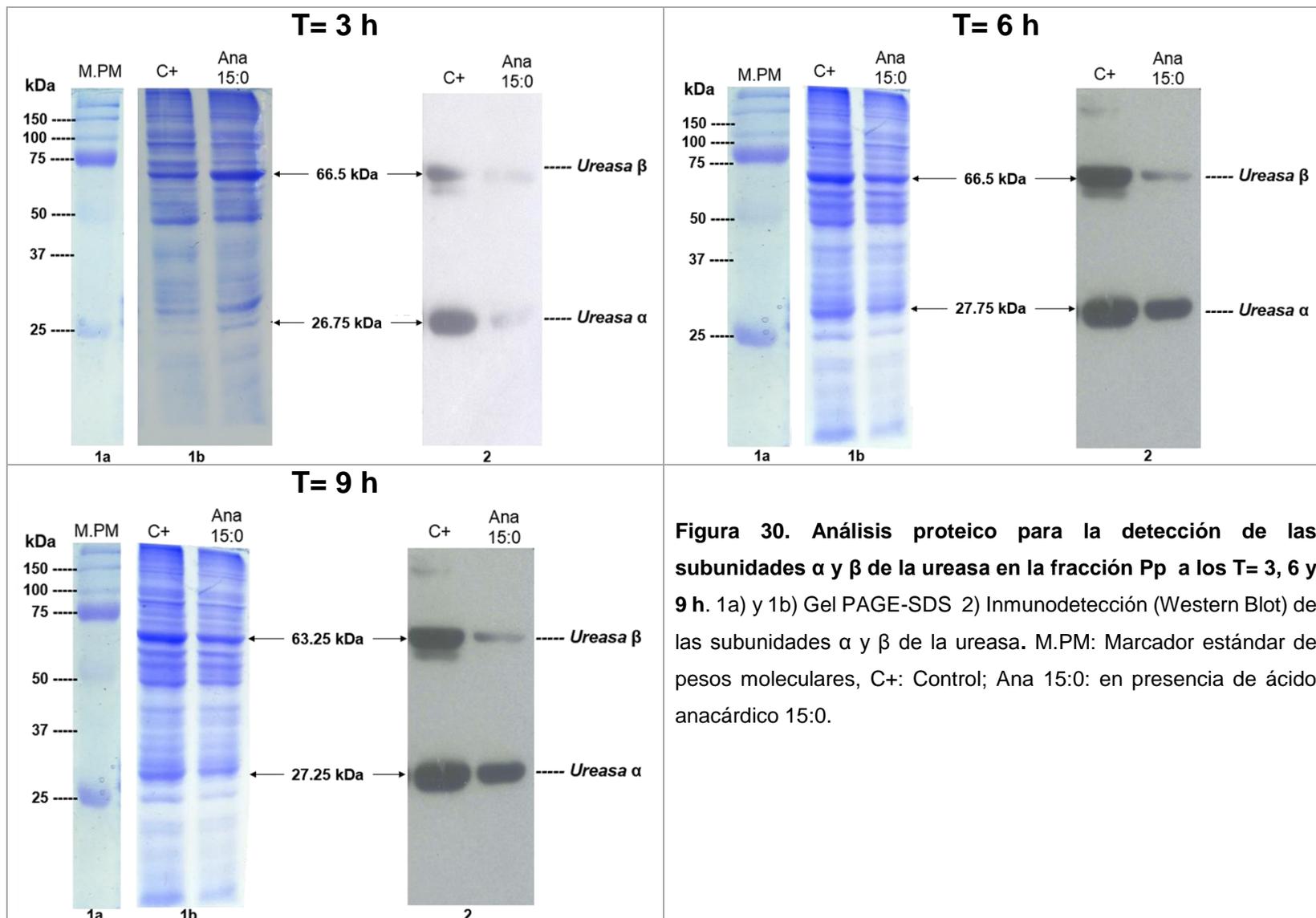


Figura 30. Análisis proteico para la detección de las subunidades α y β de la ureasa en la fracción Pp a los T= 3, 6 y 9 h. 1a) y 1b) Gel PAGE-SDS 2) Inmunodetección (Western Blot) de las subunidades α y β de la ureasa. M.PM: Marcador estándar de pesos moleculares, C+: Control; Ana 15:0: en presencia de ácido anacárdico 15:0.

El análisis realizado por electroforesis PAGE-SDS y electroinmunotransferencia (Western Blot) indica que la enzima ureasa aumenta su expresión en presencia del ácido anacárdico 15:0 al menos a partir de las 6 h de haber expuesto a un cultivo de *H. pylori* a una concentración de 2.5 µg/mL (½ CMI).

Previamente en el laboratorio donde se realizó esta tesis, se abordó el mismo problema de entender el posible mecanismo por el cual el Ana 15:0 ejerce su acción inhibitoria, pero tratando de identificar los cambios producidos en la expresión génica de *H. pylori* en presencia del compuesto mediante la técnica de microarreglos (Guadarrama-Cruz, 2015). Las condiciones utilizadas fueron exactamente las mismas que se utilizaron en esta tesis, es decir, se incubó un cultivo de *H. pylori* en presencia de 2.5 µg/mL de Ana 15:0 y se determinó su efecto en la expresión génica a las 3, 6 y 9 h de incubación. Así pues, correlacionando algunos los resultados de los experimentos con microarreglos y los hallados en esta tesis respecto a la ureasa, encontramos que, dentro de los genes que se sobreexpresaron significativamente (transcripción >2X respecto al C+) a los T = 6 y 9 h, se encuentran varios de los genes del clúster que codifica a la enzima ureasa. De tal manera que mediante las dos técnicas utilizadas (proteómica y genómica) podemos concluir que, una de las respuestas de *H. pylori* al Ana 15:0 es una sobreexpresión de la enzima por lo menos a partir de las 6 h.

Kubo y colaboradores (1999) reportaron un efecto inhibitorio del ácido anacárdico 15:3 (Ana 15:3) sobre la actividad de la ureasa del frijol mungo y encontraron una $IC_{50} = 125 \mu\text{g/mL}$. Así mismo, Uribe, 2017, probó el efecto del Ana 15:0, sobre la ureasa parcialmente pura de *H. pylori*, encontrando una inhibición de la enzima, dependiente de la concentración, pero con un máximo de inhibición de 65.7% con 250 µg/mL, extrapolando un valor de una IC_{50} de 85 µg/mL. Con una concentración como la utilizada en los experimentos realizados en esta tesis, 2.5 µg/mL (½CMI), la enzima prácticamente no se inhibe. Con base en lo anterior, podemos decir que el mecanismo antibiótico del Ana 15:0 no es a través de inhibir

a la ureasa, sin embargo, el papel que tiene la ureasa para *H. pylori* es tan importante que al exponer a los cultivos a concentraciones subletales del Ana 15:0, 2.5 µg/mL, la bacteria reacciona sobreexpresando a la enzima.

Como lo hemos comentado, la ureasa de *H. pylori* hidroliza la urea a amoníaco y bióxido de carbono, con lo que aumenta el pH citoplasmático y amortigua el periplasma bacteriano. Este incremento local del pH permite a la bacteria sobrevivir temporalmente a la exposición del ácido gástrico y crea una capa neutra alrededor de la superficie de la bacteria (Sachs *et al.*, 2005).

El mecanismo de aclimatación al ácido desarrollado por *H. pylori* es único, ésta habilidad le es conferida por la enzima ureasa, pero además incluye otras proteínas como un canal para la urea (Ure I) y la anhidrasa carbónica. La membrana externa de *H. pylori* posee porinas permeables a la urea y a los protones. Sin embargo, con la acidificación del medio, el canal Ure I se abre y la urea entra al citoplasma, en dónde es hidrolizada por la ureasa, produciendo 2NH_3 y CO_2 , que al ser volátiles salen al periplasma. El NH_3 que fluye al periplasma puede neutralizar la acidez entrante (H^+) formando amonio (NH_4^+), mientras que el CO_2 se convierte por acción de la anhidrasa carbónica, a H^+ y bicarbonato (HCO_3^-), que también es un amortiguador (Marcus *et al.*, 2005; Sachs *et al.*, 2005).

En resumen, éste sistema permite a la bacteria mantener su pH periplásmico a niveles en los que tanto el pH del citoplasma como el potencial de membrana sean adecuados para el crecimiento.

Dicho control local de la acidez gástrica se considera esencial para la colonización y sobrevivencia de la bacteria; sin embargo, el hecho de que cepas de *H. pylori* mutantes ureasa-negativas no son capaces de colonizar en modelos animales, en los que su secreción ácida ha sido suprimida (Eaton & Krakowka, 1994), sugiere un papel adicional para la ureasa.

Si bien la aclimatación al ácido es una de las funciones más relevantes de la ureasa, esta enzima tiene otras funciones adicionales. La ureasa juega un papel central en el metabolismo del nitrógeno, ya que puede utilizar el nitrógeno del amoníaco como fuente para la síntesis de componentes clave como aminoácidos (que finalmente se incorporan a proteínas), amino azúcares, pirimidinas y purinas (De Rouse & Skouloubris, 2001).

La ureasa contribuye a la lesión tisular y formación de úlceras a través de la producción de amoníaco, un agente que se sabe que es tóxico por sí mismo y/o en combinación con los metabolitos de los neutrófilos. Se ha reportado que la ruptura y desregulación de las uniones estrechas entre las células epiteliales gástricas requieren de la producción de amoníaco por la ureasa (Wroblewski *et al.*, 2009). Todo esto, afecta la permeabilidad epitelial y facilita el daño inducido por otros factores de patogenicidad de la bacteria.

Por otro lado, Schoep *et al.*, 2010 demostraron que en sí, las propiedades superficiales del complejo de la ureasa juegan un papel importante para la persistencia durante la colonización gástrica, interactuando directamente con los componentes del huésped.

La ureasa es un potente agente proinflamatorio, capaz de desencadenar la formación de edema y la acumulación de leucocitos *in vivo*. Tanahashi *et al.*, 2000 reportaron en células de epitelio gástrico que la ureasa participa en la producción de citosinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- α . En este sentido, también se ha demostrado que induce agregación plaquetaria, quimiotaxis de neutrófilos y producción de especies reactivas de oxígeno *in vitro* (de Jesus Souza *et al.*, 2019; Uberti *et al.*, 2013; Wassermann *et al.*, 2010)

Recapitulando, la ureasa de *H. pylori* es multifuncional y resulta esencial para su colonización, virulencia y sobrevivencia.

Nuestros resultados indican un aumento en la expresión de la ureasa en el citoplasma desde las 6 h de exposición al ácido áncardico 15:0. Considerando

que en las condiciones de cultivo, la bacteria no tiene la necesidad de reaccionar a la respuesta de un huésped, podríamos sugerir que la respuesta que se está presentando es en función de que la ureasa esté tratando de recuperar o mantener su pH periplásmico, citoplásmico y sobre todo su potencial de membrana en niveles adecuados, no para su crecimiento, sino para su sobrevivencia. De ahí, que sea entendible que la bacteria, tienda a sobreexpresar a la ureasa ante un ataque como el de éste antibiótico.

5. Conclusiones

De todas las fracciones estudiadas (Cp, Sn y Pp), en el citoplasma (Cp) es en donde se observa el mayor cambio en proteínas en presencia del Ana 15:0.

Con los resultados de la inmunoelectrotransferencia (Western Blot), podemos concluir que las bandas con peso molecular de ~65 y ~27 kDa que sufren cambios considerables en presencia de Ana 15:0 en la fracción Cp, corresponden a las subunidades β y α , respectivamente, de la ureasa.

Se confirma la presencia de la ureasa, en las 3 fracciones estudiadas Cp, Sn y Pp, concordando que la mayor cantidad de esta proteína se encuentra en el citoplasma y es ahí donde la ureasa presenta cambios muy claros en presencia de Ana 15:0.

Considerando que la ureasa representa del 10-15% de la proteína total de *H. pylori*, podemos considerar que los cambios observados en los experimentos mediante la técnica de PAGE-SDS, son confiables.

En la fracción Cp podemos concluir que, el tiempo de 6 horas es el punto crítico, donde la ureasa de *H. pylori* presenta las mayores diferencias en presencia de Ana 15:0 al comparar la intensidad de las bandas de los perfiles electroforéticos y por el análisis inmunoelectroforetico.

Se propone que el aumento en la expresión de la ureasa en presencia del Ácido anacárdico 15:0, sea debido a que esté desempeñando un papel de supervivencia estabilizando su pH citoplásmico y periplásmico, y sobre todo, su potencial de membrana a niveles adecuados, no para su crecimiento, sino para su sobrevivencia.

De las otras proteínas (bandas) que muestran cambio es necesario seguir estudiándolas para poder ser identificadas y determinar su respuesta al Ana 15:0. Este trabajo finaliza con la identificación de la ureasa y su modificación en presencia del Ana 15:0.

6. Perspectivas.

Este trabajo da pie para continuar por muchas vertientes por ejemplo:

Continuar con el estudio proteómico, pero ahora mediante electroforesis en gel bidimensional para separar mejor a las proteínas que mostraron cambios y poderlas identificar por diferentes métodos como espectrometría de masas, complementado con inmunodetección en el caso de algunas proteínas.

Al lograr identificar las proteínas y su afectación por el Ana 15:0, se podrá plantear un mecanismo de cómo responde la bacteria al compuesto, con la intención de proponerlo como un antibiótico para el control de *H. pylori*.

7. Bibliografía

- Acevedo, H. R., Rojas, M. D., Arceo, S. D. B., Hernández, M. S., Vázquez, M. M., Terrazas, T., & del Toro, G. V. 2006. Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 609(1): 43-46.
- Abdo-Francis, J. M. 2007. Mesa 3 Tratamiento. *Revista de Gastroenterología de México*. 72(3): 332-338.
- Amieva, M. R., & El-Omar, E. M. 2008. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 134(1), 306-323.
- Appelmek, B. J. & Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. 2001. Lipopolysaccharide Lewis Antigens. En: Mobley H. L. T., Mendez G. L., Hazell S. L., editores. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press. Capítulo 35.
- Argueta, A., Cono, L. M., & Rodarte, M. E. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Distrito Federal: Instituto Nacional Indigenista. 1: 542-543. Citado en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castillo, C., & Navarrete, A. 2003. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Médica*. 69(10): 905-909.
- Arozamena, C. J., Gutierrez, L. V., Corbelle, J. L., Cimino, C. R., Paladino, A. M., Beveraggi, E. M., Cavadas, D., Telenta, M. I. & Casalnuovo, C. A. 2008. Estómago y Duodeno. En: Cirugía de Michans. Eds. Ferráina, P. y Oría, A. 5a ed. Buenos Aires, Argentina: El Ateneo. pp.705-759.
- Aspholm, M., Olfat, F. O., Nordén, J., Sondén, B., Lundberg, C., Sjö, R., Sjöström, Altraja, S., Odenbreit, S., Haas, R., Wadström, T., Engstrand, L., Semino-Mora, C., Liu, H. Dubois, A., Susann Teneberg, S., Arnqvist, A., & Bore´n, T. 2006. SabA is the *Helicobacter pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS pathogens*. 2(10): 989-1001.
- Atherton, J. C. 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*. 1(1): 63-96.
- Barragán-Solís, A. 2006. La práctica de la autoatención por fitoterapia en un grupo de familias mexicanas. *Archivos en Medicina Familiar*. 8(3): 155-162.
- Bauerfeind, P., Garner, R., Dunn, B. E., & Mobley, H. L. 1997. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*. 40(1): 25-30.
- Bellucci, A. P. 2003. La herbolaria en los mercados tradicionales. *Revista del Centro de Investigación de la Universidad la Salle*. 5(20): 63-63.
- Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Online ©. 2015 Bergey's Manual Trust. Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. Citado el 25 de enero 2020 en:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm01073>

- Blaser, M. J., & Berg, D. E. 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *The Journal of clinical investigation*. 107(7): 767-773.
- Bosques-Padilla, F. J., Remes-Troche, J. M., González-Huezo, M. S., Pérez-Pérez, G., Torres-López, J., Abdo-Francis, Bielsa-Fernandez, M. V., Constanza-Camargo, M. Esquivel-Avaneguii, F., Garza-González, E., Hernández-Guerrero, A. I., Herrera-Goepfertk, R., Huertalgal, F. M., Leal-Herrera, Y., López-Colombon, A., Ortiz-Oliverao, N. X., Riquelme-Pérez, A., Sampiering, C. L., Uscanga-Domínguez, L. F. & Velarde-Ruiz Velasco, J. A. 2018. IV consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México*. 83:3 325–41.
- Boyanova, L. 2011. Microbiology and characteristics of *Helicobacter pylori*. En: *Helicobacter pylori*. Gran Bretaña, Caister Academic Press. Capítulo 3.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1-2): 248-254.
- Burkitt, M. D., Duckworth, C. A., Williams, J. M., & Pritchard, D. M. 2017. *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Disease models & mechanisms*. 10(2): 89-104.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., De Vivar, A. R., Avila, G., Duran, A., & Lira, R. 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 97(3): 429-439.
- Castillo-Juárez I, Rivero F., Celis H. y Romero I. 2007. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*. 114(1):72-77.
- 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. *Journal of Ethnopharmacology*. 122(2): 402-405.
- Cervantes-García, E. 2016. *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y medicina de laboratorio*. 63(2): 100-109.
- Chosewood, L. C. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Diane Publishing.
- CONABIO. 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, Mexico City. Consultado el 20 de agosto de 2019.
- Citado en: <https://www.naturalista.mx/taxa/209860-Amphipterygium-adstringens>
- Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., & Rappuoli, R. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*. 284(5418): 1328-1333.
- Cover, T. L. & Blaser, M. J. 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 10570–10575.

- De Falco, M., Lucariello, A., Laquinto, S., Esposito, V., Guerra, G., De Luca, A. (2015). Molecular mechanism of *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Journal of cellular physiology*. 230: 1702-1707.
- De Jesus Souza M, de Moraes JA, Da Silva VN, Helal-Neto E, Uberti AF, Scopel- Guerra A, Olivera-Severo D, Carlini CR, Barja-Fidalgo C. 2019. *Helicobacter pylori* urease induces pro-inflammatory effects and differentiation of human endotelial cells: Cellular and molecular mechanism. *Helicobacter*. 24(3):e12573.
- De Reuse, H. & Skpouloubris, S. 2001. Nitrogen Metabolism. En: Mobley H. L. T., Mendez G. L., Hazell S. L., editores. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press. Capítulo 11.
- Dunn, B. E., Campbell, G. P., Perez-Perez, G. I., & Blaser, M. J. 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry*. 265(16): 9464-9469.
- Duś, I., Dobosz, T., Manzin, A., Loi, G., Serra, C., & Radwan-Oczko, M. 2013. Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research--new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej*. 67(9): 261-218.
- Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D.R. & Krakowka, S. 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infection and immunity*. 59(7): 2470-2475.
- Eaton, K. A., Morgan, D. R., & Krakowka, S. 1992. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 37(2): 123-127.
- Eaton K. A. & Krakowka S. 1994. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. 62: 3604–3607.
- Egan, B. J., Holmes, K., O'Connor, H. J., & O'Morain, C. A. 2007. *Helicobacter pylori* Gastritis, the Unifying Concept for Gastric Diseases. *Helicobacter*. 12(2): 39–44.
- Figura, N., & Bianciardi, L. 2002. *Helicobacters* were discovered in Italy in 1892: An episode in the scientific life of an eclectic pathologist, Giulio Bizzozero. *Helicobacter* Pioneers. Singapore: Blackwell Science Asia. 1-14.
- Floch, P., Francis Mégraud, F., and Lehours, P. 2017. *Helicobacter pylori* Strains and Gastric MALT Lymphoma. *Toxins (Basel)*. 9(4):132.
- Gisbert, J. P. 2011. Enfermedades relacionadas con *Helicobacter pylori*: dispepsia, úlcera y cáncer gástrico. *Gastroenterología y Hepatología*. 34: 15-26.
- Gómez-Chang, E., Escobedo Hinojosa, W., & Romero Álvarez, I. 2017. Tratamiento de la úlcera péptica asociada a *Helicobacter pylori*. Una perspectiva desde los productos naturales. Memoria del 44º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM. Mensaje Bioquímico. 41:9-20.
- Goodwin, C. S., J. A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters., M. D. Collins, L. Sly, W. Mc Connel, & W. E. S. Harper. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb.

- nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 39(4): 397-405.
- Götz, J. M., Van Kan, C. I., Verspaget, H. W., Biemond, I., Lamers, C. B., & Veenendaal, R. A. 1996. Gastric mucosal superoxide dismutases in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 38(4): 502-506.
- Graham, D. Y., & Fischbach, L. 2010. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut* 59(8): 1143-1153.
- Guadarrama-Cruz, G. V. 2015. Estudio de la respuesta fisiológica de *Helicobacter pylori* frente a la acción inhibitoria del ácido anacárdico 6-petadecil salicílico. Informe final del proyecto de investigación posdoctoral. DGAPA-UNAM. Investigadora responsable: Dra. Irma Romero Álvarez.
- Hazell, S., & Lee, A. 1986. *Campylobacter pyloridis*, urease, hydrogen ion back diffusion, and gastric ulcers. *The Lancet*. 328(8497): 15-17.
- Hemshekhkar, M., Sebastin Santhosh, M., Kemparaju, K., & Girish, K. S. 2011. Emerging Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: A Pharmacological Overview. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 110(2): 122–132.
- Hong, W., Sano, K., Morimatsu, S., Scott, D. R., Weeks, D. L., Sachs, G., Goto, T., Mohan, S., Harada, F., Nkajima, N & Nakano, T. 2003. Medium pH-dependent redistribution of the urease of *Helicobacter pylori*. *Journal of medical microbiology*. 52(3): 211-216.
- Hu, L. T., & Mobley, H. L. T. 1990. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity*. 58(4): 992-998.
- Hunt, C. R. H., Xiao, S. D., Megraud, F., Leon-Barua, R., Bazzoli, F., Van der Merwe, S., Vaz Coelho, L. G., Fock, M., Fedail, S., Cohen, H., Malfetheriner, P., Vakil, N., Hamid, S., Goh, K. L., Wong, B. C. Y., Kranshuis, J. & Le Mair, A. 2011. *Helicobacter pylori* in developing countries. World gastroenterology organisation global guideline. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 20(3): 299-304.
- Isomoto, H., Moss, J., & Hirayama, T. 2010. Pleiotropic actions of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 220(1): 3-14.
- Krajewska B. 2009. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 54(1-3): 9-21.
- Kubo, J., Lee, J. R., & Kubo, I. 1999. Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(2), 533-53.
- Kusters, J.G., van Vliet, A.H., Kuipers, E.J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Review*. 19: 449–490.
- Llorente-Bousquets, J., & Ocegueda, S. 2008. Estado del conocimiento de la biota. Capital natural de México. 1: 283-322.

- Malfetheriner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Atherton, J., Axon, A. T. R & Bazzoli, F. 2012. Management of *Helicobacter pylori* infection, the Maastricht IV/ Florence Consensus Report Gut. 61(5): 646–664.
- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Rio, F., & Delgado, G. 1991. Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. Journal of Ethnopharmacology. 34(2-3): 147-154
- Marcus, E.A., Moshfegh A.P., Sachs G., & Scott D.R. 2005. The periplasmic α -carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. Journal of Bacteriology. 187: 729–738.
- Makino, M., Motegi, T. & Fujimoto, Y. 2004. Tirucallane-type triterpenes from *juliana adstringens*. Phytochemistry. 65(7): 891-896.
- Martínez, M. 1959. Las plantas medicinales de México. Ediciones botas. pp 404.
- Marshall, B. J. & Goodwin, C. 1987. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 37(1):68.
- Marshall, B. J. & Warren, J. R. 1984. Unidentified curved bacilli in stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. The Lancet. 323(8390): 1311-1315.
- Marshall, B. J. 2002. *Helicobacter pylori* 20 years. On Clinical Medicine. 2(2):147-52.
- Mathé-Hubert, H.; Gatti, J.-L.; Colinet, D.; Poirié, M.; Malausa, T. 2015. Statistical analysis of the individual variability of 1D protein profiles as a tool in ecology: An application to parasitoid venom. Molecular Ecology Resources. 15(5):1120-32.
- Molina-Castro, S., Ramírez-Mayorga, V., & Alpízar-Alpízar, W. (2018). Priming the seed: *Helicobacter pylori* alters epithelial cell invasiveness in early gastric carcinogenesis. World Journal of Gastrointestinal Oncology. 10(9):231-243.
- Ogura, K., Maeda, S., Nakao, M., Watanabe, T., Tada, M., Kyutoku, T., Yoshida, H., Shiratori, Y. & Omata, M. 2000. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. Journal of Experimental Medicine. 192(11):1601-1610.
- Navarrete, A., Mata, R., & Delgado, G. 1989. Alkylanacardic Acids from *Amphipterygium adstringens*1. Planta médica. 55(06): 579-579.
- Novus Biologicals. 2020. Western Blotting. Consultado el 22 de diciembre 2019. Recuperado de: <https://www.novusbio.com/application/western-blotting>
- On, S. L. W., Lee, A., O'Rourke, J. L., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Fox, J. G., & Vandamme, P. 2015. *Helicobacter*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Bergey's Manual Trust. 1:1.
- Oviedo-Chávez, I., Ramirez-Apan, T., Soto-Hernández, M., & Martínez-Vázquez, M. 2004. Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology. 11(5): 436-445.

- Phadnis, S. H., Parlow, M. H., Levy, M., Ilver, D. A. G., Caulkins, C. M., Connors, J. B., & Dunn, B. E. 1996. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infection and immunity*. 64(3): 905-912.
- Piñol-Jiménez, F. N., & Paniagua-Estévez, M. 1999. Mediadores bacterianos de la inflamación en la gastritis crónica por *Helicobacter pylori*. *Revista Cubana de Medicina*. 38(4): 276-283.
- Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Guerrero, J. A., Martínez, S., Pereda-Miranda, R., Mata, R. & Timmermann, B. N. 2005. Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *Journal of pharmacy and Pharmacology*. 57(9): 1117-1126.
- Santiago, P., Moreno, Y., & Ferrús, M. A. 2015. Identification of viable *Helicobacter pylori* in drinking water supplies by cultural and molecular techniques. *Helicobacter*. 20(4): 252-259.
- Sachs, G., Weeks, D. L., Wen, Y., Marcus, E. A., Scott, D. R., & Melchers, K. 2005. Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. *American Physiological Society*. 20(6): 429-438.
- Schoep, T. D., Fulurija, A., Good, F., Lu, W., Himbeck, R. P., Schwan, C., Choi, S. S., Berg, D. E., Mittl, P. R., Benghezal, M. & Marshall, B. J. 2010. Surface properties of *Helicobacter pylori* urease complex are essential for persistence. *PLoS One*. 5(11):e15042.
- Solnick, J. V. & Vandamme, P. 2001. Taxonomy of the *Helicobacter* genus En: Mobley H. L. T., Mendez G. L., Hazell S. L., editores. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press. Capítulo 5.
- Soriano-García, M., Toscano, R. A., Ortiz, B., Navarrete, A., Sanchez-Obregon, R., Barrios, H., & Yuste, F. 1987. Structure and stereochemistry of the methyl ester of (5 α , 13 α , 14 β , 17 α , 20S, 24Z)-3-oxolanosta-7, 24-dien-26-oic acid (masticadienonic acid). *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*. 43(5): 990-992.
- Suerbaum, S., & Michetti, P. 2002. *Helicobacter pylori* infection. *New England Journal of Medicine*. 347(15): 1175-1186.
- Tan, V. P., & Wong, B. C. 2011. *Helicobacter pylori* and gastritis: Untangling a complex relationship 27 years on. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 26: 42-45.
- Tanahashi, T., Kita, M., Kodama, T., Yamaoka, Y., Sawai, N., Ohno, T., Mitsufuji, S., Wei, Y. P., Kashima, K. & Imanishi, J. 2000. Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells. *Infection and Immunity*. 68: 664-671.
- Testerman, T. L., & Morris, J. 2014. Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 20(36): 12781-12808.
- Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gomez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R. & Munoz, O. 1998. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *The Journal of infectious diseases*. 178(4): 1089-1094.
- Trespalacios, A. A., Otero Regino, W., & Mercado Reyes, M. 2010. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Revista Colombiana de gastroenterología*. 25(1): 31-38.

- Turbett, G. R., Høj, P. B., Horne, R., & Mee, B. J. 1992. Purification and characterization of the urease enzymes of *Helicobacter* species from humans and animals. *Infection and immunity*. 60(12): 5259-5266.
- UniProt Consortium. 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research*. 43(D1), D204-D212. Consultado el: 08 de enero de 2020 en: <https://www.uniprot.org/uniprot/P14916> y <https://www.uniprot.org/uniprot/P69996>
- Uberti, A. F., Olivera-Severo, D., Wassermann, G. E., Scopel-Guerra, A., Moraes, J. A., Barcellos-de-Sauza, C., Barja-Fidalgo, C. & Carlini, R. C. 2013. Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. *Toxicon*. 69:240-249.
- Uribe, E, G, V. 2017. Efecto de extractos de tres especies de quelites sobre la actividad de la enzima ureasa de *Helicobacter pylori*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. CDMX, México.
- Van Amsterdam, K., Van Vliet, A. H., Kusters, J. G. & Van der Ende, A. 2006. Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*-related diseases. *FEMS Microbiology Reviews*. 30: 131- 156.
- Wassermann, G. E., Olivera-Severo, D., Uberti, A. F. & Carlini, C. R. 2010. *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14(7):2025-2034.
- Watson, W. H., Dominguez, X. A., Vázquez, G., & García, S. 1987. Cuachalalic acid, a new triterpene from *Amphipterygium adstringens*. *Revista Latinoamericana de Química*. 18: 89-90.
- WGO¹. 2010. *Helicobacter pylori* in developing countries. Global Guidelines.
- WGO². 2010. Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología: *Helicobacter pylori* en los países en desarrollo. *Gastroenterología Latinoamericana*. 21(2): 165-181.
- WHO. 2000. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine (No. WHO/EDM/TRM/2000.1). World Health Organization.
- WHO. 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. 2014-2023. Pp 76.
Citado en: <https://apps.who.int/medicinedocs/es/m/abstract/Js21201es/>
- Windsor, H. M., & O'Rourke, J. 2000. Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*. 29(3): 633-648.
- Wroblewski, L. E., Shen, L., Ogden, S., Romero-Gallo, J., Lapierre, L. A., Dawn, A. I., Turner, R., & Peek Jr R. M. 2009. *Helicobacter pylori* dysregulation of gastric epithelial tight junctions by ureasemediated myosin II activation. *Gastroenterology*. 136: 236–246.