



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto anti-*Helicobacter-pylori in vitro* de nanopartículas
de magnetita cargadas con ácido 6-pentadecil salicílico**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

ITZEL TREJO ZENDEJAS



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

Ciudad Universitaria, CDMX, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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. Libia Vega Loyo

VOCAL: Dra. Norma Espinosa Sánchez

SECRETARIO: Dra. Irma Romero Álvarez

1er SUPLENTE: Dr. Gerardo Mata Torres Valle

2° SUPLENTE: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 2, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE
MEDICINA, UNAM.**

ASESORA DE TESIS:

DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

SUSTENTANTE:

ITZEL TREJO ZENDEJAS

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT. FORDECYT-PRONACES/21067/2020. Ciencia de Frontera

Agradezco al proyecto PAPIIT IN217019 por la beca recibida.

A la Dra. Erika Gómez Chang del Depto. de Bioquímica de la Fac. de Medicina, por su asistencia académica y técnica y su invaluable colaboración en la realización de esta tesis.

Al Dr. Jaime Santoyo Salazar del Depto. de Física del CINVESTAV, IPN, así como a sus colaboradoras, las Dras. Margarita Lizeth Alvarado Noguez y Eunice Matías Reyes por la síntesis y caracterización de las nanopartículas de magnetita.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia que me ha brindado su apoyo económico y moral que me ha sido de gran ayuda para poder llegar hasta aquí. Extendiendo un agradecimiento especial para mi hermana que ha sido mi mejor amiga también, siendo una parte muy importante de mi red de apoyo personal, es una persona con la que puedo contar sin dudar.

Otro agradecimiento a los demás miembros de mi red de apoyo: Germán y Andrea, quienes me dieron su amor y cariño durante los momentos más oscuros y que gracias a ellos he podido continuar viviendo y finalizar esta tesis.

A la doctora Irma Romero y a la doctora Erika Gómez quienes, además de apoyarme académicamente, me han apoyado en el ámbito personal y siempre han estado atentas a mi salud física y mental. Muchas gracias, doctoras.

Y un último agradecimiento a mí misma, por no haberme rendido ni con la tesis (proceso largo y difícil) ni con la vida, que, si no hubiera sido por no desistir con los tratamientos antidepressivos (de más de un año) ni con la terapia psicológica, tal vez no habría podido acabar este trabajo por falta de energía o por mi ausencia en el mundo. Gracias a la UNAM, que tengo seguro médico y me han podido brindar la ayuda que he requerido. *Si alguien lee esto y también siente que ya no puede más: busca ayuda y ayúdate a ti mismo yendo a terapia psicológica y psiquiátrica, si es necesario. No estás sol@.*

Índice

Lista de abreviaturas.....	VI
Lista de tablas.....	VII
Lista de figuras.....	VII
Resumen.....	IX
Abstract.....	X
1. Introducción	1
1.1 Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.1.1. Hábitat y condiciones de crecimiento.....	2
1.1.2. Factores de patogenicidad	3
1.2 Infección por <i>Helicobacter pylori</i> y tratamiento.....	5
1.2.1. Vías de transmisión y Epidemiología	5
1.2.2. Patogénesis	6
1.2.3. Tratamiento y problemática	7
1.2.4. Alternativas al tratamiento.....	8
1.3 Nanopartículas (NPs) en la Biomedicina	9
1.4 Nanopartículas de óxido de hierro	10
2. Antecedentes directos.....	12
2.1 Nanopartículas contra <i>Helicobacter pylori</i>.....	12
2.2 Nanopartículas de óxido de hierro contra <i>Helicobacter pylori</i>.	14
2.3 Ácido anacárdico y <i>Helicobacter pylori</i>.....	15
3. Hipótesis	17
4. Objetivos.....	17
4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos específicos	18
5. Materiales y métodos	18
5.1 Cepa y Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> en medio sólido.....	18
5.2 Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>.....	19
5.2.1 Prueba ureasa	19
5.2.2 Prueba catalasa	20
5.2.3 Prueba oxidasa	20
5.2.4 Tinción de Gram	21
5.3 Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> en medio líquido	22

5.4	Determinación de la Susceptibilidad de <i>Helicobacter pylori</i> a compuestos por el método de dilución en medio líquido para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	23
5.5	Nanopartículas (NPs) utilizadas	24
5.6	Estandarización de las condiciones óptimas para suspender NPs para utilizarlas en los experimentos de la determinación de susceptibilidad	26
5.7	Muestras de cultivos de <i>Helicobacter pylori</i> analizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido (STEM)	26
5.8	Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido (STEM)	27
6.	Análisis estadístico	28
7.	Resultados y Discusión	29
7.1	Lote de <i>Helicobacter pylori</i> en medio sólido para los ensayos	29
7.2	Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	29
7.3	Estandarización de las condiciones óptimas para suspender NPs para determinar la susceptibilidad	31
7.4	Determinación de la Susceptibilidad de <i>Helicobacter pylori</i> a compuestos por el método de dilución en medio líquido para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	32
7.4.1	Antibióticos de referencia: Amoxicilina y Metronidazol	32
7.4.2	Ácido 6-pentadecil salicílico 6SA	34
7.4.3	NPs vacías	37
7.4.4	NP-6SA	38
7.4.5	NPs vacías vs NP-6SA	41
7.4.6	Comparación del efecto del 6SA libre y las NP-6SA sobre el crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i>	43
7.5	Microscopía Electrónica de Transmisión de barrido (STEM) de <i>Helicobacter pylori</i> en presencia y ausencia de NP sin cargar y cargadas (NP-6SA)	45
8.	Conclusiones	49
9.	Perspectivas	49
10.	Referencias	50
	Anexo 1. Cuentas viables	i
	Anexo 2 Análisis estadístico	ii

Lista de abreviaturas

6SA	Ácido 6-pentadecil salicílico
A	Absorbancia
AGS	Células de adenocarcinoma gástrico
AMX	Amoxicilina
CagA	Citotoxina asociada al gen A
CLR	Claritromicina
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetil sulfóxido
IBP	Inhibidor de la bomba de protones
NPs	Nanopartículas
NP-6SA	Nanopartículas cargadas con ácido 6-pentadecil salicílico
OMP	Proteínas de membrana externa
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PEG	Polietilenglicol
PLGA	Ácido poli (láctico co-glicólico)
SOD	Superóxido dismutasa
SPIO	Nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas
STEM	Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TMPD	Dihidrocloreuro de N,N,N',N' tetrametil-p-fenilendiamina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VacA	Citotoxina vacuolizante

Lista de tablas

[Tabla 1.](#) Inhibición neta del crecimiento de *Helicobacter pylori* por NP-6SA.

[Tabla 2.](#) Concentración de ácido anacárdico 6SA ($\mu\text{g/mL}$) en las NP-6SA utilizadas para los experimentos de Determinación de Susceptibilidad.

[Tabla 3.](#) Conteo y porcentaje de células de *Helicobacter pylori* íntegras vs lisadas visualizadas en las fotografías STEM capturadas.

Lista de figuras

[Fig. 1.](#) Morfología de *Helicobacter pylori*

[Fig. 2.](#) Esquema del estómago humano y principal zona de colonización de *Helicobacter pylori*

[Fig. 3.](#) Prevalencia mundial de *Helicobacter pylori*

[Fig. 4.](#) Representación de una NP polimérica

[Fig. 5.](#) Estructura de las NPs metálicas

[Fig. 6.](#) Método de síntesis biológica de NPs.

[Fig. 7.](#) Estructura química del ácido 6-pentadecil salicílico C15:0

[Fig. 8.](#) Cultivo de *Helicobacter pylori* en caldo Mueller Hinton

[Fig. 9.](#) Determinación de la susceptibilidad de compuestos de *Helicobacter pylori* en medio líquido para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria

[Fig. 10.](#) Nanopartículas (NPs) sintetizadas

[Fig. 11.](#) Botones de las muestras de *Helicobacter pylori* para preparación STEM

[Fig. 12.](#) Muestras para análisis por STEM

[Fig. 13.](#) Cultivo de *Helicobacter pylori* en cajas de agar sangre

[Fig. 14.](#) Pruebas de identificación bioquímica

[Fig. 15.](#) Identificación morfológica de *Helicobacter pylori*

[Fig. 16.](#) Condiciones óptimas para la suspensión de las nanopartículas (NPs)

[Fig. 17.](#) Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por amoxicilina

[Fig. 18.](#) Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por metronidazol

[Fig. 19.](#) Determinación de la Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* al ácido 6-pentadecil salicílico (6SA)

[Fig. 20.](#) Determinación de la Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a nanopartículas (NPs) vacías

[Fig. 21.](#) Determinación de la Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a nanopartículas cargadas con ácido 6-pentadecil salicílico (NP-6SA)

[Fig. 22.](#) Ejemplo de placa utilizada para la Determinación de la Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a NP-6SA

[Fig. 23.](#) Comparación de la inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* entre nanopartículas sin cargar (NPs vacías) y nanopartículas cargadas con 6SA (NP-6SA)

[Fig. 24.](#) Inhibición neta del crecimiento de *Helicobacter pylori* dada por nanopartículas cargadas con 6SA (NP-6SA)

[Fig. 25.](#) Comparación de la inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* entre las nanopartículas cargadas con 6SA (NP-6SA) y el ácido anacárdico 6SA de forma libre

[Fig. 26.](#) Microfotografías en STEM de *Helicobacter pylori* a bajo aumento (5.59 KX).

[Fig. 27.](#) Imágenes de STEM de *Helicobacter pylori* sin tratamiento y tratadas con NPs vacías y NP-6SA

Resumen

Helicobacter pylori es una bacteria que infecta alrededor del 50% de la población mundial y ocasiona enfermedades gastroduodenales como gastritis, úlcera péptica e incluso cáncer gástrico. Existen terapias para erradicar a la bacteria basadas en antibióticos e inhibidores de la bomba de protones, pero la resistencia a los antibióticos utilizados va en aumento, disminuyendo su efectividad. Una de las alternativas en desarrollo para erradicar a *H. pylori* son compuestos aislados de plantas medicinales con actividad antibiótica. Sin embargo, algunos presentan desventajas como su solubilidad, potencia y biodisponibilidad. A partir de esto, surge la idea de usar nanopartículas (NPs) como vehículo para estos compuestos y así optimizar su efecto.

El ácido anacárdico 6-pentadecil salicílico (6SA) se ha aislado de varias especies vegetales de la familia Anacardiaceae y, entre otras propiedades biológicas, se ha demostrado su actividad anti-*H. pylori*. Sin embargo, es un compuesto poco soluble en agua, lo que podría complicar su empleo en alguna terapia. En este trabajo se propuso utilizar NPs de magnetita como vehículo para mejorar el efecto del 6SA sobre la inhibición del crecimiento de *H. pylori*.

Para determinar la susceptibilidad antimicrobiana se utilizó el método de dilución en caldo para obtener la concentración mínima para inhibir el crecimiento de la bacteria al 100% (CMI). Los resultados mostraron que la CMI del 6SA libre fue de 5 µg/mL, mientras que el valor de las NPs con 6SA (NP-6SA) fue de 1.1 µg/mL.

Estos datos indican que las NP-6SA son 3.8 veces más potentes que el 6SA en forma libre, es decir, se requiere menor cantidad del compuesto para ejercer el mismo efecto sobre el crecimiento de *H. pylori*. En conclusión, la presentación del 6SA en nanopartículas parece hacer más disponible al compuesto o potenciar su efecto antibiótico, por lo que es importante seguir estudiando este tipo de preparación como una posible alternativa a futuro como tratamiento de erradicación de *H. pylori*.

Abstract

Helicobacter pylori is a bacterium that infects around 50% worldwide population and causes gastroduodenal diseases such as gastritis, peptic ulcer, and even gastric cancer. There are therapies for bacterium eradication based on antibiotics and proton pump inhibitors, but antibiotic resistance is increasing, decreasing their effectiveness. In the search for treatment alternatives to eradicate *H. pylori*, compounds isolated from medicinal plants with antibiotic activity are used. However, some of these have disadvantages like their solubility, potency, and bioavailability. From this point, the idea of using nanoparticles (NPs) as a vehicle for these compounds and thus optimize their effect arises.

The 6-pentadecyl salicylic acid anacardic acid (6SA) has been isolated from multiple species of Anacardiaceae family, among other biological properties, it has been demonstrated its anti-*H. pylori* activity. Nonetheless, it is a compound with poor water solubility, which could complicate its use in a therapy. In this work it was proposed to use magnetite NPs as a vehicle to improve the 6SA effectiveness on the growth inhibition of *H. pylori*.

In order to determine the antimicrobial susceptibility, it was used the broth dilution method to obtain the 100% minimum inhibition concentration of the bacteria (CMI). The results show that the free 6SA CMI was 5 µg/mL, while the 6SA NPs (NP-6SA) value was 1.1 µg/mL.

These data show that NP-6SA are 3.8 times more potent than 6SA in free form, that is, a less amount of the compound is required to exert the same effect on *H. pylori* growth. In conclusion, 6SA presentation in nanoparticles seems to make the compound more available, or enhance its antibiotic affect, so it is important to continue studying this type of preparation as a possible future alternative for *H. pylori* eradication treatment.

1. Introducción

1.1 Generalidades de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa que presenta de 5 a 7 flagelos unipolares, su forma característica es de bacilo curvado, aunque se ha reportado que, dependiendo de su fase de crecimiento, su forma puede ser de bacilo helicoidal o en forma de “v” o “u” (Fig. 1) (Worku *et al.*, 1999). La bacteria mide aprox. 0.2 - 1.2 μm de diámetro y 0.5 – 5.0 μm de largo. Cuando las condiciones de crecimiento no son las más adecuadas puede presentarse en forma cocoide (O'Rourke & Bode, 2001; Solnick & Vandamme, 2001).

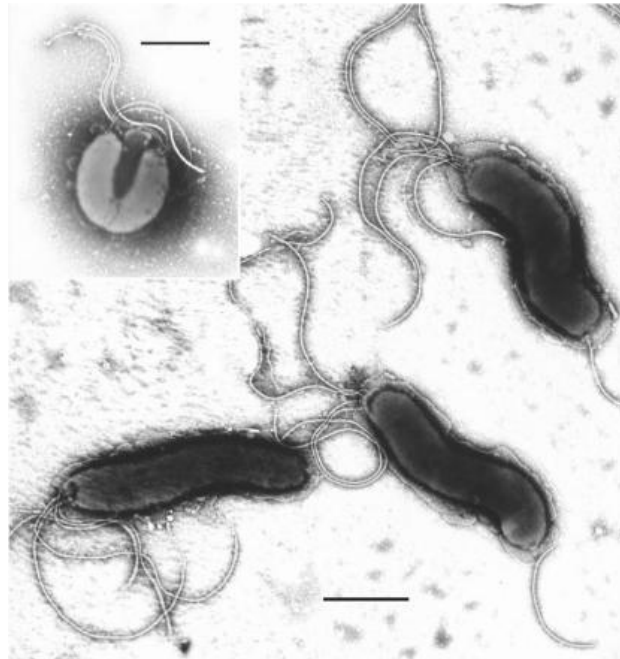


Fig. 1. Morfología de *Helicobacter pylori*. Micrografías electrónicas de preparaciones de *H. pylori* teñidas negativamente de *H. pylori*, mostrando su forma espiral y múltiples flagelos polares. En el inserto superior se muestra una bacteria en división observándose claramente el septum y grupos de filamentos flagelares en cada polo. Barras de 500 nm. (Tomado de Worku *et al.*, 1999).

Cuando *H. pylori* crece en medios sólidos, se forman colonias redondas de tamaño de 0.5 – 2 mm con una apariencia blanca o grisácea pálida translúcida, dependiendo del medio en el que sea incubada (Andersen & Wadström, 2001).

1.1.1. Hábitat y condiciones de crecimiento

Helicobacter pylori coloniza únicamente al ser humano y principalmente la zona antral de la mucosa gástrica (Sachs *et al.*, 2003) (Fig. 2).

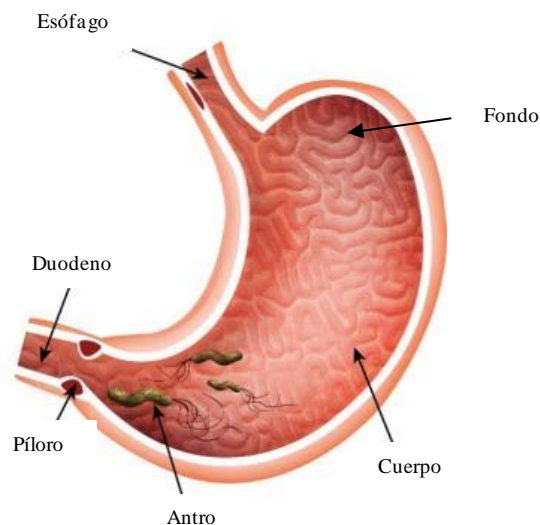


Fig. 2. Esquema del estómago humano y principal zona de colonización de *Helicobacter pylori*. (Modificado de Brock, 2012).

Helicobacter pylori es neutrófila y microaerófila. Se le considera como una bacteria fastidiosa que requiere para poder crecer de un medio no selectivo rico en nutrientes, suplementado con sangre o suero, una atmósfera con concentraciones de 5 a 10% de CO₂ y de 2 a 5% de O₂ (Kusters *et al.*, 2006), temperatura de 34 a 40 °C, siendo la óptima de 37 °C (similar a la temperatura corporal humana) y con mucha humedad (Walker, 2012).

Para que *H. pylori* crezca en medios sólidos, generalmente se utiliza agar Brucella, Columbia, agar infusión cerebro corazón o agar de triptona soya; cualquier agar que se utilice, se suplementa con sangre lisada de oveja o caballo, o suero fetal bovino (5 a 10%), o β -ciclodextrina, carbón activado o, alternativamente, medio de emulsión yema de huevo (Kusters *et al.*, 2006; Walker, 2012). Debido a que no se utilizan medios selectivos, se les pueden añadir antibióticos para favorecer el crecimiento de *H. pylori* por sobre otros microorganismos. Existen dos formulaciones muy comunes para suplementar con antibióticos, la llamada Dent, que consiste en vancomicina, trimetoprima, anfotericina B y

cefsoludina, y la llamada Skirrow, que consiste en los mismos antibióticos que el anterior, pero cambiando la cefsoludina por polimixina B (Kusters *et al.*, 2006).

Para crecer la bacteria en medio líquido se puede utilizar caldo Brucella, Mueller-Hinton o infusión cerebro corazón y se suplementa de igual manera que los medios sólidos. Este medio también se suplementa con la formulación de Dent o Skirrow (Kusters *et al.*, 2006; Walker, 2012).

1.1.2. Factores de patogenicidad

Helicobacter pylori es una bacteria que tiene una alta tasa de éxito para colonizar la mucosa gástrica humana y ser la especie dominante. Este éxito se debe a que ha coevolucionado con el ser humano desde hace miles de años y ha desarrollado estrategias para superar los retos que hay en el ambiente gástrico, como la acidez, la peristalsis, la disponibilidad de nutrientes y la respuesta inmune innata y adaptativa (Cover & Blaser, 2009). Estas estrategias se pueden clasificar en factores de colonización, de supervivencia y de virulencia.

Entre los factores de colonización encontramos a los flagelos, que le permiten desplazarse y llegar a su nicho (mucosa gástrica) por medio de quimiotaxis hacia zonas con urea y pH neutro (Baj *et al.*, 2021).

Además, en esta clasificación se encuentran las adhesinas, las cuales le permiten a *H. pylori* anclarse a las células de la mucosa gástrica y así evitar el barrido gástrico dado por la peristalsis (Baj *et al.*, 2021). Entre el grupo de las adhesinas están presentes las proteínas de membrana externa (OMP) Oip A, Sab A, Sab B, Bab A, Bab C y Hop Z (Nejati *et al.*, 2018), así como las lipoproteínas A y B asociadas a la adherencia y las adhesinas de unión a los antígenos de los grupos sanguíneos (Baj *et al.*, 2021). Los genes que codifican las OMPs pueden variar dependiendo de las condiciones en las que se encuentre la bacteria (Cover & Blaser, 2009).

Otro factor de colonización es la ureasa, la cual es una enzima que hidroliza urea en amoníaco y ácido carbónico. Los productos de la ureasa elevan el pH en torno a la bacteria formando un microambiente neutro alrededor de ella. De esta manera, *H. pylori* puede pasar por el estómago, hasta llegar a la mucosa gástrica en donde el pH es neutro y colonizar esta región (Baj *et al.*, 2021).

Los factores de supervivencia, como bien dice su nombre, ayudan a *H. pylori* a sobrevivir en el estómago. Uno de los principales retos es el ambiente ácido, por lo cual, la ureasa también es considerada como un factor de supervivencia (Sachs *et al.*, 2003). Adicionalmente, cuenta con las proteínas de choque térmico que ayudan a mantener la integridad estructural y funcional de las proteínas celulares y los antígenos de Lewis que evitan la detección de *H. pylori* por parte de los mecanismos de defensa del sistema inmune del hospedero. Por otra parte, los neutrófilos y macrófagos que se desplazan a la mucosa durante la inflamación producida por la bacteria generan una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno, las cuales son procesadas por sistemas enzimáticos de la bacteria como son la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa que la ayudan a sobrevivir al estrés oxidativo (Baj *et al.*, 2021). Esto último se da mediante la conversión del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a $H_2O_2 + O_2$ por la SOD, para después convertir el H_2O_2 en agua y O_2 por medio de la catalasa.

Por último, *H. pylori* cuenta con factores de virulencia que tienen como función causar daño al hospedero. Dos de los factores de virulencia de mayor importancia son la isla de patogenicidad cagPAI que codifica la citotoxina asociada al gen A (CagA) y la citotoxina vacuolizante VacA. CagA no se expresa en todas las cepas de *H. pylori*, mientras que VacA sí; sin embargo, ambas presentan diversidad en sus loci, lo que produce que la virulencia sea diferente entre las distintas cepas (Cover & Blaser, 2009).

CagA es una proteína que se transloca al interior de las células epiteliales por medio del sistema de secreción tipo IV (también codificado por cagPAI), donde puede o no ser fosforilada por la familia de cinasas Abl o Src. Cuando CagA se encuentra fosforilada induce múltiples cambios en el citoesqueleto que alteran la morfología celular. En su estado desfosforilado desregula vías de señalización asociadas a la proliferación, diferenciación, respuestas inflamatorias, afecta la polaridad y las uniones estrechas y, finalmente, puede conducir a la apoptosis (Cover & Blaser, 2009; Nejati *et al.*, 2018).

VacA, por su parte, se secreta por el sistema de secreción tipo V de *H. pylori* y entra a las células del hospedero por medio de endocitosis. Esta toxina altera la integridad epitelial al inducir vacuolización, altera las uniones estrechas de la célula, genera una respuesta inflamatoria, disipa el potencial mitocondrial, propicia la liberación de citocromo c y activa el factor pro-apoptótico Bcl2, resultando en apoptosis (Nejati *et al.*, 2018).

Finalmente, hay que mencionar que la ureasa también es un factor de virulencia. Por un mecanismo aún desconocido, la ureasa está involucrada en la desregulación de las uniones estrechas del epitelio gástrico (Wroblewski *et al.*, 2009); por otra parte, se ha demostrado que promueve la liberación de citocinas pro-inflamatorias y dispara procesos que inician la angiogénesis, lo cual puede derivar en cáncer gástrico (Baj *et al.*, 2021).

1.2 Infección por *Helicobacter pylori* y tratamiento

1.2.1. Vías de transmisión y Epidemiología

La infección por *H. pylori* se adquiere generalmente en la infancia y el mecanismo de transmisión se plantea que puede ser por vía oral-oral, por vía fecal-oral o por vía gastro-oral, aunque también se sugiere que puede darse por agua o comida contaminada (Kayali *et al.*, 2018).

Se ha reportado que *H. pylori* es una bacteria distribuida a lo largo de todo el mundo e infecta a más del 50% de la población mundial. La prevalencia de *H. pylori* varía dependiendo de la zona geográfica, la edad, etnia y sexo (WGO, 2010); presentando una mayor prevalencia en los países en vías de desarrollo debido, principalmente, a las pocas medidas de higiene pública (Sonnenberg, 2022), a un bajo nivel socioeconómico y a condiciones de hacinamiento. Existen otros factores relacionados con el estilo de vida (consumir sal, fumar, estrés, etc.) que pueden estar relacionados con la prevalencia de ciertas regiones geográficas, como se ha reportado en muchos países asiáticos (WGO, 2010).

En países desarrollados como Estados Unidos, Canadá y Australia, entre otros, se reporta una prevalencia menor al 40%. Mientras que, en países en vías de desarrollo como Kazajistán o República Democrática del Congo, se ha registrado una prevalencia mayor al 70%. Estos y más países con su prevalencia se muestran en la Fig. 3. En el caso de México, el porcentaje de prevalencia en promedio es del 52.5% (Fig. 3) (Hooi *et al.*, 2017).

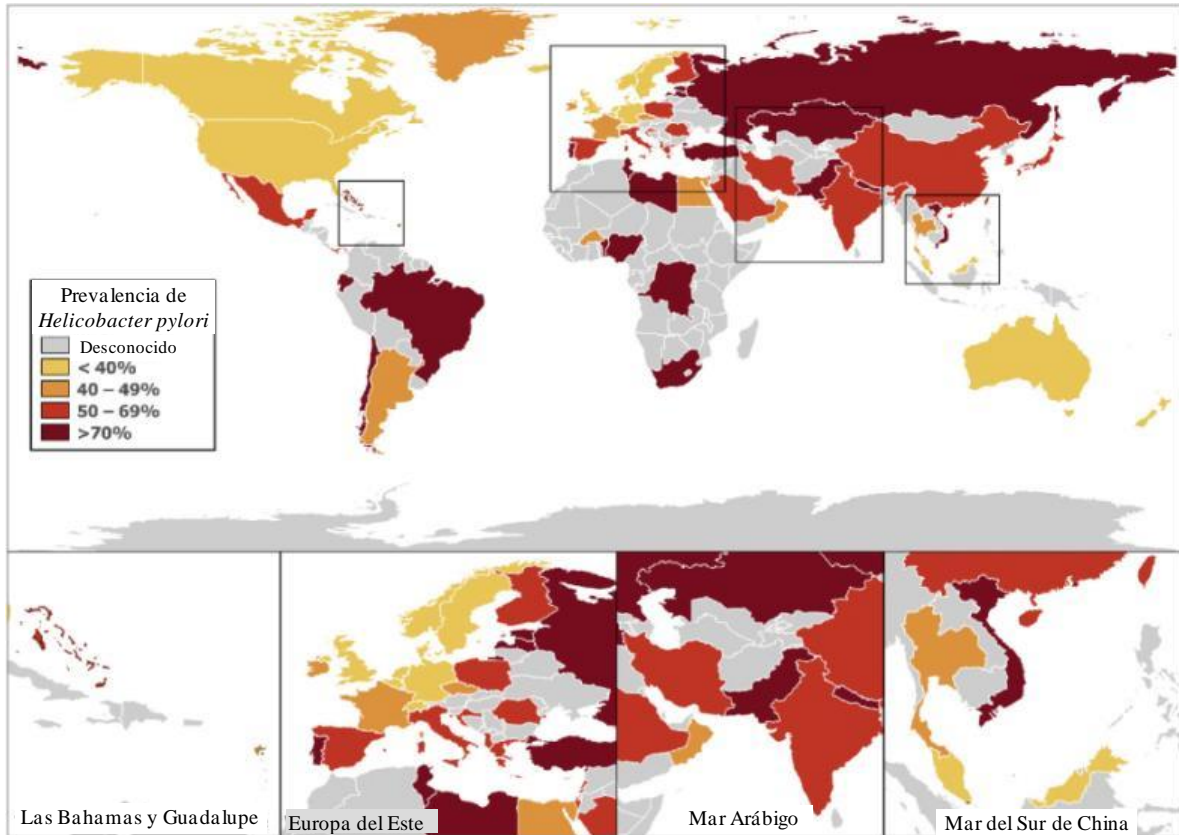


Fig. 3. Prevalencia mundial de *Helicobacter pylori* (Tomado y modificado de Hooi *et al.*, 2017).

1.2.2. Patogénesis

Helicobacter pylori es el principal factor etiológico de enfermedades gastroduodenales como gastritis, úlcera péptica, linfoma tipo MALT y puede contribuir a la proliferación celular descontrolada, llegando al grado de desarrollar adenocarcinoma gástrico (Cover & Blaser, 2009). Además, es reconocida por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer, como un carcinógeno clase I (IARC, 1994). El desarrollo de estas enfermedades está determinado por variaciones en los factores de virulencia de ciertas cepas de *H. pylori* como, por ejemplo, las cepas CagA, VacA, BabA y OipA positivo, por factores genéticos del hospedero como polimorfismos en genes pro-inflamatorios, así como por factores ambientales (nivel socioeconómico, dieta, higiene) (Cover & Blaser, 2009; Gravina *et al.*, 2018).

Además de las enfermedades gástricas, hay algunos estudios que señalan que *H. pylori* puede estar involucrada en el aumento de riesgo de padecer enfermedades neurológicas, dermatológicas, hematológicas, cardiovasculares, oculares, metabólicas y hepatobiliares. Algunas de estas enfermedades son Alzheimer, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré, rosácea, urticaria crónica, enfermedades ampollas autoinmunes, anemia por deficiencia de hierro, glaucoma de ángulo abierto, blefaritis, alteraciones en el metabolismo de los glicolípidos, accidentes cerebrovasculares e infartos (Gravina *et al.*, 2018).

1.2.3. Tratamiento y problemática

Considerando las enfermedades que puede desencadenar *H. pylori*, se han propuesto varias terapias para erradicarla. Desde mediados de los años 90 se utilizó la primera terapia estandarizada o “terapia de primera línea”, que fue publicada en las guías de tratamiento de Europa, Norteamérica y la región de Asia-Pacífico (O’Connor *et al.*, 2010).

La terapia de primera línea consiste en un inhibidor de la bomba de protones (IBP), claritromicina y amoxicilina o metronidazol. Inicialmente, esta terapia obtenía un 90% de tasa de éxito (O’Connor *et al.*, 2010), sin embargo, la resistencia a antibióticos ha ido en aumento, por lo que no se recomienda una terapia basada en claritromicina en aquellas regiones geográficas que presenten una resistencia mayor al 15% a la claritromicina y se sugiere usar la terapia cuádruple o concomitante. En México, estamos cerca de alcanzar este porcentaje, se ha reportado una resistencia a la claritromicina del 13%, al metronidazol del 60%, a la amoxicilina del 4%, a tetraciclinas del 2% y a metronidazol en combinación con claritromicina del 13% (Bosques-Padilla *et al.*, 2018). La alta resistencia al metronidazol en México se ha observado desde 1995 y se ha asociado a que este es un antibiótico que se prescribe para tratar otros padecimientos como diarrea e infecciones vaginales. En México no se ha observado que la resistencia a los antibióticos sea distinta en diferentes edades ni entre sexos (Torres *et al.*, 2001).

La terapia cuádruple consiste en un IBP, metronidazol, tetraciclina y subcitrate de bismuto y la terapia cuádruple concomitante conlleva el uso de un IBP, amoxicilina, claritromicina y

metronidazol. En México, cualquiera de estas dos opciones es recomendada como terapia de primera línea (Bosques-Padilla *et al.*, 2018).

Todas estas terapias contra *H. pylori* tienen algunas desventajas, siendo la principal la ya mencionada resistencia de esta bacteria a los antibióticos empleados. La resistencia antibiótica es debida a varias razones, por un lado, los pacientes dejan los tratamientos inconclusos, lo que puede ser a causa de los altos costos del tratamiento y/o a los efectos secundarios generados por los medicamentos, así como al uso indiscriminado de antibióticos en enfermedades que no son causadas por bacterias (Graham & Fischbach, 2010). La resistencia a los antibióticos puede darse por diversos mecanismos desarrollados por *H. pylori*, como mutaciones, sistemas de eflujo, cambios en la permeabilidad de la membrana y formación de biofilms, entre otros (Boyanova *et al.*, 2023).

1.2.4. Alternativas al tratamiento

Debido a los problemas presentados con las terapias convencionales para erradicar a *H. pylori*, se está en la búsqueda de nuevos tratamientos. Algunas alternativas se han buscado entre las plantas utilizadas en la Medicina Tradicional de distintos países, la cual cuenta con el reconocimiento de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2000). Múltiples plantas han sido estudiadas para comprobar su eficacia contra *H. pylori*, por ejemplo, *Allium sativum*, *Aloe vera*, *Brassica oleracea*, *Camellia sinensis*, *Cinnamomun verum*, *Curcuma longa*, *Amphipterygium adstringens*, *Cyrtocarpa procera*, *Impatiens balsamina*, *Mentha* sp., entre muchas otras y se han identificado compuestos y extractos activos contra la bacteria (Baker, 2020).

Además de las plantas, también se han utilizado como fuentes en el descubrimiento de nuevos tratamientos, extractos de algunos hongos, los probióticos, el propóleo, la miel, péptidos obtenidos de las glándulas de la piel de *Xenopus laevis* o de *Odorrana graham* y algunos polisacáridos obtenidos de plantas o algas (Ayala *et al.*, 2014).

Por otro lado, recientemente se ha aplicado la nanotecnología como una forma de administración de fármacos y el tratamiento para erradicar *H. pylori* no ha sido la excepción (Safarov *et al.*, 2019).

1.3 Nanopartículas (NPs) en la Biomedicina

Las nanopartículas (NPs) son materiales de tamaño de entre 1-100 nm (Samrot *et al.*, 2021) que, entre otras propiedades, son capaces de unir diferentes biomoléculas y fármacos. Al incorporarse algún fármaco a las NPs, éstas pueden adquirir propiedades biológicas o funcionales adicionales, como la de controlar la cinética de liberación de los fármacos que transportan y/o aumentar el efecto terapéutico (Safarov *et al.*, 2019).

Las NPs se pueden elaborar a partir de polímeros, NPs poliméricas (Fig. 4) como el polietilenglicol (PEG), ácido poli (láctico co-glicólico) (PLGA), gliadina o celulosa, o de metales, NPs metálicas (Fig. 5) como el oro, plata, hierro, zinc o bismuto (Safarov *et al.*, 2019). Dependiendo del material de las NPs, éstas tendrán distintas funciones, ventajas y desventajas.

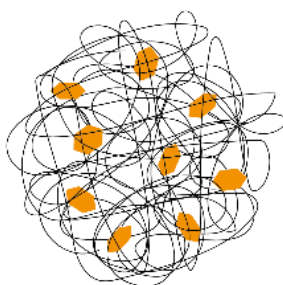


Fig. 4. Representación de una NP polimérica. En color negro se ilustra el polímero y en naranja la carga (compuesto activo o fármaco) (Tomado y modificado de Olaizola & Lin, 2020).



Fig. 5. Estructura de las NPs metálicas. Las esferas representan el conjunto de átomos de uno o más elementos metálicos (Tomado y modificado de Johnston, 2012).

Las NPs poliméricas poseen la ventaja de acarrear fármacos o biomoléculas, confiriéndoles protección a la degradación antes de llegar al sitio de acción, son biodegradables, no tóxicas en el ser humano, son altamente estables y aumentan la biocompatibilidad de los agentes encapsulados en ellas (Zielinska *et al.*, 2020).

Las NPs metálicas pueden, por sí mismas, contar con cierta actividad antibacteriana por parte de los metales con los que están elaboradas, pero también pueden funcionar como acarreadoras de biomoléculas, al igual que las NPs poliméricas.

Actualmente se está estudiando más extensivamente la aplicación de ambos tipos de NPs al recubrir y funcionalizar su superficie con agentes que puedan dirigir las al sitio de acción, como proteínas para dirigir las hacia las regiones donde se encuentren sus receptores o moléculas que las hagan sensibles al pH de manera que puedan llegar con mayor efectividad a ciertos sitios como al estómago, por ejemplo (Luo *et al.*, 2018). Las NPs recubiertas en su superficie presentan mayores ventajas en comparación con las no cubiertas, ya que evitan la aglomeración de estas consigo mismas, disminuyen los efectos secundarios, se puede controlar la liberación de los fármacos y aumentan la biocompatibilidad (Chandrakala *et al.*, 2022).

1.4 Nanopartículas de óxido de hierro

Dentro del grupo de las NPs metálicas se encuentran las NPs de óxido de hierro con un tamaño de 10 a 100 nm, tienen la propiedad de ser superparamagnéticas (Wahajuddin & Arora, 2012), es decir, presentan un alto grado de magnetismo bajo un campo magnético externo en el que las NPs individuales expresarán el momento magnético como un dominio único y se desmagnetizan en su ausencia. Esta característica les ha dado ventajas únicas en aplicaciones biomédicas (como separación y selección de células, el direccionamiento en el transporte de medicamentos o de radioisótopos y la terapia de hipertermia magnética (Samrot *et al.*, 2021).

Por otra parte, poseen la ventaja de que el hierro puede ser absorbido y excretado del cuerpo humano (Hunt *et al.*, 2009).

Dentro de este tipo de NPs, se encuentran las de magnetita (Fe_3O_4), de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y de goethita [$\text{FeO}(\text{OH})$] (Sangaiya & Jayaprakash, 2018), las cuales son sintetizadas por métodos físicos, químicos o biológicos y dependiendo de cada método se pueden obtener NPs con propiedades diferentes (forma, tamaño, estabilidad y aplicaciones) (Samrot *et al.*, 2021).

El método biológico utiliza entidades biológicas como bacterias, hongos, extractos de plantas o proteínas (Samrot *et al.*, 2021). El proceso de síntesis con este método consiste en una disolución de precursores de hierro a la que se le agrega el agente biológico seleccionado que provoca una reducción del hierro, formando las NPs (Fig. 6).

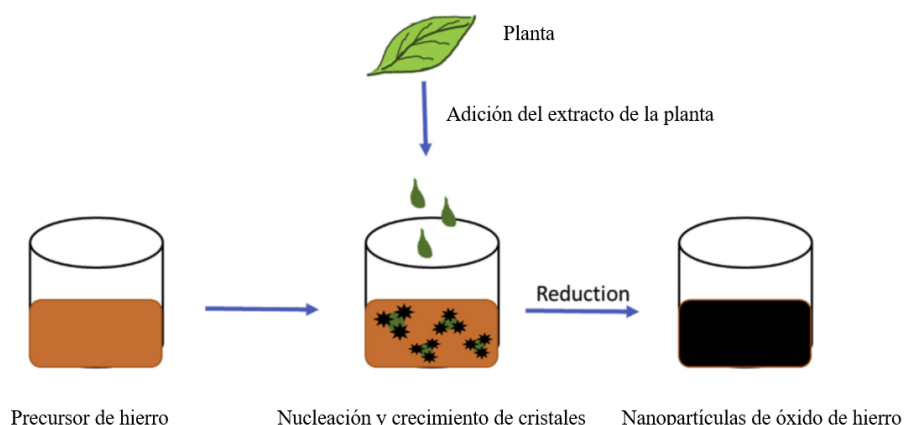


Fig. 6. Método de síntesis biológica de NPs. (Tomado y modificado de Samrot *et al.*, 2021).

Este método cuenta con las ventajas de ser fácil de escalar, barato y el producto es respetuoso con el ambiente, “eco-friendly”, además que da como resultado NPs de óxido de hierro recubiertas con metabolitos secundarios propios de la especie con la que se elija realizar el proceso de síntesis (Ramirez-Núñez *et al.*, 2018).

2. Antecedentes directos

2.1 Nanopartículas contra *Helicobacter pylori*

Pan-In *et al.*, (2014), Lotfipour *et al.*, (2015) y Angsantikul *et al.*, (2018) probaron el efecto anti-*H. pylori* de distintos tipos de NPs a las que cargaron con claritromicina (NP-CLR) y compararon estos efectos contra la claritromicina de forma libre. Pan *et al.* elaboraron NPs de etilcelulosa, Lotfipour *et al.* de ácido poli láctico co-glicólico (PLGA) y Angsantikul *et al.* de PLGA cubiertas con membranas de células de adenocarcinoma gástrico, AGS [AGS-NP(CLR)] y de polietilenglicol, PEG (PEG-NP(CLR)).

En los primeros dos trabajos mencionados se evaluó la susceptibilidad de *H. pylori in vitro* y se determinó la concentración mínima con la que se inhibe el 100% del crecimiento de *H. pylori* (CMI). En el caso de las NPs de etilcelulosa, la CMI no fue mejor que la del antibiótico libre (CMI de claritromicina libre: 0.03 µg/mL contra CMI de NP-CLR: 0.09-0.18 µg/mL) (Pan-In *et al.*, 2014), y con las NPs de PLGA se obtuvieron resultados semejantes (CMI claritromicina libre: 0.003-0.1 µg/mL contra CMI de NP-CLR: 0.003-0.05 µg/mL) (Lotfipour *et al.*, 2015).

En el tercer trabajo se evaluó la actividad anti-*H. pylori in vitro*, encontrando una CMI de 4 µg/mL con las AGS-NP (CLR), mientras que tanto la claritromicina libre y las PEG-NP (CLR) no lograron inhibir el crecimiento de *H. pylori*. También fue evaluada la actividad anti-*H. pylori* en ratones C57BL/6 inoculados con la bacteria, cuantificando las Unidades Formadoras de Colonias de *H. pylori* por gramo de tejido de estómago (UFC/g). Comparado con el estómago de los animales controles tratados solo con PBS (1.58×10^5 UFC/g), el tratamiento con la claritromicina reducía la cantidad de colonias a 5.01×10^4 UFC/g, pero fue más efectiva al administrarla en las nanopartículas PEG-NP(CLR) y AGS-NP(CLR) disminuyendo a 6.45×10^3 UFC/g y 1.46×10^2 UFC/g, respectivamente, mostrando que las NPs aumentan el efecto terapéutico de la claritromicina *in vivo*. Las NPs probaron ser inocuas en el estómago, puesto que no se presentaron cambios en el peso ni en la morfología e integridad del estómago de los ratones inoculados con NPs sin cargar, en comparación con ratones sin inocular (Angsantikul *et al.*, 2018).

Por otro lado, NPs de quitosano conjugadas con fucosa y cargadas con berberina, principal alcaloide de la planta *Coptis chinensis*, fueron probadas contra la berberina de forma libre. Las NPs con 6 mg/l de berberina mostraron un $37.4 \pm 5.1\%$ de inhibición del crecimiento de *H. pylori in vitro*, contra una inhibición de $25.9 \pm 3.7\%$ de la berberina libre a esa misma concentración. También se probó en un modelo de ratones C57BL/6 la erradicación de *H. pylori*. Los ratones fueron inoculados con 1×10^9 UFC de *H. pylori* y se separaron en grupos a los que les administró los siguientes tratamientos: agua desionizada, solución de berberina, extracto de *C. chinensis* (12% de berberina), NPs de quitosano y fucosa sin berberina o NPs de quitosano y fucosa cargadas con berberina. Los resultados mostraron la presencia de 264 ± 32 UFC/estómago de *H. pylori*/estómago en ratones tratados con agua desionizada, 248 ± 21 UFC/estómago con las NPs sin cargar, 198 ± 24 y 178 ± 18 UFC/estómago con el extracto de *C. chinensis* y la berberina libre, respectivamente y, la mayor inhibición del crecimiento fue dada por las NPs cargadas con berberina, obteniendo 129 ± 21 UFC/estómago (Lin *et al.*, 2015).

Otro tipo de NPs poliméricas que se han probado contra *H. pylori* fueron hechas con gliadina. Estas NPs encapsularon omeprazol o claritromicina y se comparó el efecto contra la claritromicina ($0.4 \mu\text{g/mL}$) y el omeprazol ($0.6\text{-}0.8 \mu\text{g/mL}$) de forma libre. Se reportó un efecto máximo del 46.7% de inhibición del crecimiento de *H. pylori* con la claritromicina libre y 27.3% con omeprazol libre. Mientras que las NPs de gliadina con claritromicina mostraron una inhibición máxima del crecimiento de la bacteria de 67.4% y una inhibición del 38.9% de las NPs con omeprazol. Además, probaron el efecto de las NPs con claritromicina y omeprazol en conjunto y se obtuvo un efecto sinérgico entre estas dos, pues la inhibición aumentó a 83.7% (Ramteke & Jain, 2008).

En cuanto a NPs metálicas, se han ensayado NPs de hierro y oro elaboradas a partir de una síntesis mediada por aceite de oliva (O), extracto de raíz de regaliz (L) y aceite de coco (C) (OLC-Fe@Au NPs) contra *H. pylori*. Se determinó que estas NPs lograron inhibir a la bacteria al 100%, mostrando un mayor efecto inhibitorio que el aceite de coco (15% inhibición), el extracto de regaliz (39%), el aceite de oliva (45%) y que el extracto de estos tres juntos (OLC) (65%). Además, se encontró que las OLC-Fe@Au NPs poseían un efecto gastroprotector del 98.3% en un experimento de ulceración inducida por etanol en ratas

Wistar. No se reportó citotoxicidad de estas NPs con 1000 $\mu\text{g/mL}$ en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (Al-Radadi, 2022).

Otra ventaja que presentan las NPs es que se les pueden adicionar elementos a su superficie, lo cual podría ayudar a que las NPs sean más específicas. En un estudio se elaboraron NPs de PLGA con un derivado de quitosano conjugado con ureido UCCs-2/TPP, lo que provocó que las NPs fueran sensibles al pH, logrando llegar de manera más eficaz al estómago debido a la diferencia de pH con respecto a las demás partes del cuerpo y, una vez allí, liberar el fármaco que se utilizó que, en este caso, fue amoxicilina. Los ratones control presentaron 6.97×10^{10} UFC/estómago de *H. pylori*, con las NPs sintetizadas 6.25×10^{10} UFC/estómago y con la amoxicilina libre 6.8×10^{10} UFC/estómago. *In vitro*, la amoxicilina por sí sola inhibió el crecimiento de *H. pylori* en un 60%, pero al estar la amoxicilina dentro de las NPs funcionalizadas con UCCs se alcanzó un 70% de inhibición (Luo *et al.*, 2018).

De los artículos anteriores y de algunos otros reportes (Amin *et al.*, 2014; Gurunathan *et al.*, 2015; Nazari *et al.*, 2014) podemos destacar que, en la mayor parte de los casos, las NPs cargadas mejoran el efecto que se está ensayando, pero no logran una inhibición o erradicación total.

2.2 Nanopartículas de óxido de hierro contra *Helicobacter pylori*.

Existen dos trabajos reportados que exploran el efecto de NPs de óxido de hierro contra la inhibición del crecimiento de *H. pylori*. Sharaf *et al.* 2019, probaron NPs de óxido de hierro (maghemita) sintetizadas en presencia de un extracto acuoso del alga *Spirulina platensis* contra distintas cepas de *H. pylori* multirresistentes. Estas NPs presentaron una CMI de 3.1 $\mu\text{g/mL}$ en el 80% de las cepas y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ en las cepas restantes, en comparación del extracto de *S. platensis* que no presentó inhibición. Los autores indican que el posible mecanismo de acción se basa en que los iones de las NPs reaccionan con los grupos SH de las proteínas de la superficie de las bacterias, lo que descompone la pared celular, oxidando a las bacterias y llevándolas a la muerte. Sin embargo, en este trabajo no se determinó el efecto de las NPs vacías, o sea sin el extracto del alga, por lo que habría que llevar a cabo este control para corroborar su propuesta. Finalmente, sus NPs no presentaron citotoxicidad

en una línea celular epitelial, proponiendo que esto puede deberse a su tamaño relativamente grande (más de 100 nm de largo) y a la presencia de grupos amino positivamente cargados (Sharaf *et al.*, 2019).

El segundo trabajo es el realizado por Yang *et al.*, (2020), en este caso se sintetizaron NPs de óxido de hierro superparamagnéticas y amoxicilina co-cargadas con partículas de quitosano y ácido poliacrílico (SPIO/AMO@PAA/CHI) las cuales se probaron contra *H. pylori in vitro* e *in vivo*. En el experimento *in vitro*, se determinó el porcentaje de inhibición de formación de biofilm contra 3 cepas de *H. pylori*, dos de las cepas mostraron a las 48 h una inhibición ligeramente mayor (3 a 5%) con las SPIO/AMO@PAA/CHI comparado con la amoxicilina de forma libre. En ratones inoculados con *H. pylori*, se determinó una tasa de erradicación del 60% con las SPIO/AMO@PAA/CHI y de 20% con la amoxicilina de forma libre (Yang *et al.*, 2020).

Los metales de las NPs, en este caso el hierro, podrían interactuar en algún momento con la bacteria, de tal manera que es importante hacer notar que *H. pylori* puede metabolizar a este metal. Cuenta con un genoma que codifica 11 proteínas que están involucradas en el transporte del hierro y dos proteínas más que tienen un papel en su almacenamiento. FeoB (HP0687), es la proteína encargada de transportar el hierro en forma ferrosa (Fe^{2+}), que es la principal forma de hierro que se encuentra de forma libre en el ambiente ácido y microaerófilico del estómago. Pero también cuenta con actividad de reductasa férrica para convertir hierro férrico (Fe^{3+}) a Fe^{2+} y que pueda ser transportado por FeoB. Asimismo, cuenta con la proteína ferritina Pfr que funciona como depósito de hierro intracelular para proteger a *H. pylori* de cantidades tóxicas de hierro y del estrés oxidativo (Kusters *et al.*, 2006).

2.3 Ácido anacárdico y *Helicobacter pylori*

El ácido anacárdico es un fitoquímico bioactivo que se ha aislado de plantas de la familia Anacardiaceae como *Amphipterygium adstringens*, conocido en México como “cuachalalate” y que es empleado tradicionalmente contra la gastritis, las úlceras y el cáncer gástrico. Se

trata de una mezcla de compuestos con un ácido salicílico y una cadena hidrocarbonada de 15 a 19 carbonos la cual puede o no tener dobles ligaduras (Castillo-Juarez *et al.*, 2007). Dentro de la mezcla de ácidos anacárdicos, el ácido 6-pentadecil salicílico (6SA; C15:0) (Fig. 7) es el más abundante (Mata *et al.*, 1991) y es al que se le han atribuido más efectos biológicos (Hemshkhar *et al.*, 2011).

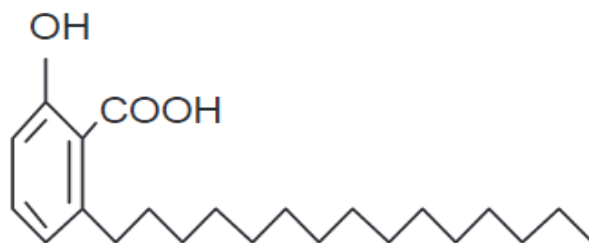


Fig. 7. Estructura química del ácido 6-pentadecil salicílico C15:0 (Tomado de Hemshkhar *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que el 6SA posee actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, antiobesidad, anticancerígena, inhibitoria de las histonas acetiltransferasas y de NF- κ B, entre otras (Hemshkhar *et al.*, 2011).

En cuanto a su acción antineoplásica, se demostró su efecto citotóxico en líneas celulares cancerígenas como las de adenocarcinoma gástrico (AGS), de leucemia mielógena humana (K562) (Alam-Escamilla *et al.*, 2015), de cáncer de mama (BT-20), de cáncer cervicouterino (HeLa) (Kubo *et al.*, 1993) y de cáncer de próstata (LNCaP) (Tan *et al.*, 2012). Asimismo, ha mostrado reducir tumores en un modelo murino de cáncer de mama (Gnanaprakasam *et al.*, 2021). Esto con la gran ventaja de no tener efectos inmunosupresores, es decir, que no afecta a las células normales del sistema inmune como las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (Alam-Escamilla *et al.*, 2015).

Respecto a sus efectos *in vivo*, se han realizado ensayos de toxicidad aguda y subaguda empleando una mezcla de ácidos anacárdicos (que incluye al 6SA) en un modelo de ratón BALB/c, mostró que la dosis letal mínima aguda es >2000 mg/kg de peso, ya que esta concentración no produjo ningún síntoma. En cuanto al ensayo de toxicidad subaguda, se administró la mezcla a diferentes dosis a machos y hembras por 30 días. La dosis de 300 mg/kg de peso fue segura ya que no hubo alteraciones en ninguna de las variables estudiadas.

A dosis de 600 y 1000 mg/kg de peso, se encontró que sólo las hembras tuvieron leves alteraciones en los niveles de hemoglobina, hematocrito y urea (Carvalho *et al.*, 2011).

Centrándonos nuevamente en el presente trabajo, el 6SA también ha sido probado contra *H. pylori* y la concentración mínima inhibitoria sobre su crecimiento es de 5 µg/mL (datos no publicados).

Considerando la creciente resistencia que *H. pylori* presenta actualmente a los antibióticos utilizados, el 6SA representa una alternativa potencial para usarse en el tratamiento de erradicación de la bacteria ya que es una molécula novedosa, se requiere una baja concentración para inhibir el crecimiento de *H. pylori* y se ha visto que no presenta citotoxicidad en células normales (Alam-Escamilla *et al.*, 2015). De tal manera, surge la pregunta de que si su presentación en NPs podría potenciar su efecto antibiótico.

Previamente, se reportó la síntesis y caracterización de NPs de óxido de hierro cubiertas de ácido anacárdico obtenido del aceite de cáscaras de la semilla de la Nuez de la India (*Anacardium occidentale*), otro integrante de la familia Anacardiaceae. Estas NPs demostraron poseer buena estabilidad, previniendo la aglomeración entre ellas y manteniendo sus propiedades paramagnéticas, lo que muestra que podrían tener aplicaciones médicas (Ribeiro *et al.*, 2013). Sin embargo, no se reportó su efecto sobre *H. pylori*, ni alguna actividad biológica.

3. Hipótesis

Las nanopartículas de magnetita cargadas con ácido anacárdico 6-pentadecil salicílico (6SA) inhibirán el crecimiento de *H. pylori in vitro* mejor que el 6SA de forma libre.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori in vitro* de nanopartículas de magnetita cargadas con ácido 6-pentadecil salicílico (6SA) en comparación con el efecto

del compuesto libre, con el fin de que puedan ser utilizadas en el tratamiento de erradicación de la bacteria.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener un lote de bacterias perfectamente identificadas para realizar los experimentos propuestos.
- Evaluar el efecto de los controles positivos (metronidazol, amoxicilina y 6SA) sobre el crecimiento de *H. pylori* por el método de dilución para validar la metodología utilizada.
- Determinar el efecto de las NPs vacías sobre el crecimiento de *H. pylori* por el método de dilución.
- Determinar el efecto de las NPs cargadas con 6SA sobre el crecimiento de *H. pylori* por el método de dilución.
- Analizar e identificar cambios morfológicos en *H. pylori* en presencia de las NPs (cargadas y sin cargar) mediante imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (STEM).

5. Materiales y métodos

5.1 Cepa y Cultivo de *Helicobacter pylori* en medio sólido

Se utilizó la cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504, Cag A+, Vac A+ y resistente a metronidazol.

Para realizar los experimentos, se generó un lote lo suficientemente grande de *H. pylori* en medio sólido. Las bacterias se cultivaron en cajas de Agar Casman Base (DIFCO) adicionado con 5% de sangre desfibrinada de carnero. Se agregaron a las cajas cuatro antibióticos para evitar el crecimiento de organismos no deseados: 10 mg/L vancomicina, 5 mg/L trimetoprima, 2.5 mg/L polimixina B y 2 mg/L anfotericina B.

Las cajas se sembraron por extensión masiva con un asa de siembra (espátula de Drigalski) y se incubaron por 24 h a 37 °C en condiciones microaerofílicas (10% CO₂, 5% O₂).

Las bacterias se cosecharon en viales con medio de cosecha, el cual fue elaborado con medio Brucella Broth (DIFCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL), 10% de glicerol y 10 mg/L vancomicina. Los viales se pesaron con el medio de cosecha sin haber añadido a la bacteria. Una vez agregada la cosecha de *H. pylori* a los viales, estos fueron pesados nuevamente para obtener la diferencia y así obtener el peso del botón de las bacterias. Finalmente, se almacenaron a una temperatura de -70 °C hasta su utilización.

5.2 Identificación de *Helicobacter pylori*

Una vez que se produjo el lote de *H. pylori*, se realizaron pruebas bioquímicas de identificación de *H. pylori* con ensayos rápidos de ureasa, catalasa, oxidasa y, adicionalmente, se identificó mediante una tinción de Gram y la observación microscópica de la morfología de las bacterias.

5.2.1 Prueba ureasa

Fundamento: Para detectar la presencia de ureasa, se realiza la prueba con rojo fenol (que es un indicador de pH) y urea. La prueba se basa en el principio de que el rojo fenol tiene un color ámbar cuando se encuentra en un pH cercano a 6.8. Al momento de adicionar la ureasa, se lleva a cabo la hidrólisis de la urea y el pH se alcaliniza hasta 8.2, cambiando su coloración a un rosa brillante (Brink, 2019).

Procedimiento: Para llevar a cabo esta prueba, se tomaron 10 µL de una solución de fenol al 0.05% y 2% de urea a pH 7 y se colocó sobre un portaobjetos. Con un asa bacteriológica se colocó una pequeña cantidad del cultivo de *H. pylori* sobre la gota de la solución, se mezcló y se observó si hubo un cambio en la coloración del rojo fenol. Un viraje en el color de ámbar a rojo o rosa brillante indica que la prueba es positiva; si no hay un cambio en la coloración entonces la prueba es negativa.

5.2.2 Prueba catalasa

Fundamento: La catalasa es una enzima que se encuentra en el citoplasma, el periplasma y se sugiere que también en el exterior celular de *H. pylori*. Esta enzima es responsable de evitar el daño provocado por las especies reactivas de oxígeno que se liberan en un evento de inflamación. Esto es crucial para la supervivencia de *H. pylori* (Harris & Hazell, 2003). La reacción realizada por la catalasa sobre el peróxido de hidrógeno es la ruptura de dos moléculas de peróxido de hidrógeno convirtiéndolas en una molécula de oxígeno y dos moléculas de agua (Nandi *et al.*, 2019).

Procedimiento: Para realizar la prueba de identificación de la catalasa, se tomaron 10 µL de peróxido de hidrógeno al 3% y se colocaron en un portaobjetos. Con un asa bacteriológica se tomó una pequeña cantidad de bacterias, se colocó encima de la gota de peróxido de hidrógeno y se observó si había formación de burbujas (oxígeno liberado por la acción de la catalasa). Si se da la producción de burbujas, la prueba es positiva para reconocer la presencia de catalasa, pero si no la hay, entonces es negativa.

5.2.3 Prueba oxidasa

Fundamento: *H. pylori* es una bacteria microaerofílica, la cual utiliza a la enzima citocromo c oxidasa tipo cbb₃ al final de su cadena respiratoria (Nagata *et al.*, 1996) para catalizar la oxidación del citocromo c al tiempo que se reduce oxígeno para formar agua (Shields & Cathcart, 2010).

Para detectar a la enzima citocromo c oxidasa, las pruebas utilizan un reactivo llamado dihidrocloruro de N, N, N', N'tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD). El TMPD se encuentra en un estado reducido (rico en electrones) e incoloro. Como parte de la cadena respiratoria, la oxidasa toma un electrón de cada uno de cuatro citocromos c, resultando en citocromos c oxidados por falta de electrones. Posteriormente, la enzima transfiere cuatro electrones al oxígeno molecular y, junto con cuatro protones, forma dos moléculas de agua. Los citocromos oxidados podrían tomar electrones de otros componentes de la cadena respiratoria, pero al entrar en contacto con el TMPD, el cual cuenta con electrones disponibles (reducido), los citocromos toman estos electrones para así volver a su estado reducido; mientras que el

TMPD, al quedarse en estado oxidado, adquiere una coloración azul oscuro (Shields & Cathcart, 2010).

Procedimiento: Para realizar la prueba de oxidasa se tomó con un asa una pequeña cantidad de *H. pylori* y se colocó sobre uno de los cuadros de una laminilla de pruebas para determinar oxidasa (Dry Slide Oxidase, DIFCO) impregnada con TMPD. Si la parte del cuadro de la laminilla en donde tocó el asa con bacterias se tiñe de azul oscuro entonces la prueba es positiva.

5.2.4 Tinción de Gram

Fundamento: La tinción de Gram utiliza un colorante principal y uno secundario. Se basa en la distinción de las bacterias en dos grandes grupos, Gram positivas y Gram negativas, dependiendo de la composición de su pared celular y su capacidad de retención del colorante principal. En esta técnica se utiliza generalmente cristal violeta o azul de metileno como colorante principal, yodo como fijador, etanol o acetona como decolorante y safranina o fucsina básica como colorante secundario (Tripathi & Sapra, 2022).

Las bacterias Gram positivas son aquellas bacterias que retienen el colorante principal al no ser decoloradas dado que cuentan con una mayor cantidad de peptidoglicano en su pared celular. Estas se tiñen de azul o violeta. Mientras que las bacterias Gram negativas, no retienen el colorante principal, pues la pared celular de este otro tipo de bacterias tiene mayor contenido de lípidos, el cual es disuelto con el decolorante, provocando la pérdida de la primera tinción y permitiendo que se tiñan con el segundo colorante. Estas bacterias lucen un color rosa o rojo (Tripathi & Sapra, 2022).

Procedimiento: Se realizó un frotis con agua destilada y una pequeña cantidad de *H. pylori* obtenida de las cajas con medio sólido de las que fueron cosechadas las bacterias para elaborar el lote. Una vez seco el frotis, se agregaron gotas de solución de cristal violeta al 1%, después se aplicó lugol, se lavó con una solución de alcohol-acetona y, finalmente, se aplicó la safranina al 2.5%. Se observa al microscopio el frotis y se corrobora si *H. pylori*, al ser Gram-negativa, se tiñe de color rosa-rojo.

La identificación de la bacteria finaliza al analizar en el frotis las formas características de *H. pylori*.

5.3 Cultivo de *Helicobacter pylori* en medio líquido

Los experimentos se realizaron utilizando cultivos líquidos en Caldo Mueller-Hinton (DIFCO) suplementado con 0.2% de β -ciclodextrina. Para evitar el crecimiento de organismos no deseados, se agrega 10 mg/L vancomicina, 5 mg/L trimetoprima, 2.5 mg/L polimixina B y 2 mg/L anfotericina B.

Cada experimento se realizó descongelando un vial de aquellos que fueron almacenados tras su crecimiento en medio sólido, se resuspendió hasta quedar perfectamente homogeneizado y se añadió una cantidad a caldo Mueller-Hinton de modo que alcanzara una absorbencia (A_{600}) de 0.23. Se incubó a 37 °C en condiciones microaerófilas (10% CO₂, 5% O₂) con agitación a 150 rpm por 5 h hasta alcanzar una A_{600} alrededor de 0.3 (Fig. 8). En este punto *H. pylori* se encuentra al inicio de la fase logarítmica de crecimiento y corresponde a 9.71×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL determinado por la técnica de dilución seriada y conteo de colonias en placa (Ver Anexo 1).



Fig. 8. Cultivo de *Helicobacter pylori* en caldo Mueller Hinton. Cultivo incubado a 37 °C con 10% CO₂ y 5% O₂.

5.4 Determinación de la Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a compuestos por el método de dilución en medio líquido para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Fundamento: La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja de algún compuesto a la cual se presenta una inhibición del 100% del crecimiento de un microorganismo, expresada en $\mu\text{g/mL}$ o en mg/L .

La CMI permite determinar el nivel de susceptibilidad o de resistencia que presenta el microorganismo al compuesto presentado. Es un método muy útil para determinar el nivel de resistencia de bacterias ante los antibióticos. Los métodos para determinar la CMI pueden ser por dilución en agar o en medio líquido o en tiras impregnadas con un gradiente de concentraciones del compuesto a probar (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021). En este trabajo se utilizó el método de dilución en medio líquido.

Procedimiento: A partir de un cultivo líquido de *H. pylori* en el inicio de la fase logarítmica con una A_{600} cercana a 0.3 (preparado como se indicó en la sección anterior, 6.3), se colocaron 1.5 mL de cultivo en cada pozo de una placa de 24 pozos y se le agregaron 10 μL de cada una de las variables a probar de forma independiente [amoxicilina (Sigma-Aldrich), metronidazol (Sigma-Aldrich), 6SA (Sigma Aldrich), NPs sin cargar y NPs cargadas con 6SA] en distintas concentraciones. Cada una de las concentraciones se evaluó por triplicado y los controles por sextuplicado, los cuales contenían únicamente el disolvente correspondiente (agua destilada estéril o dimetil sulfóxido; DMSO), dependiendo del que se haya utilizado para disolver la variante a probar.

Se registraron los valores de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm (A_{600}) del cultivo en el tiempo cero (tiempo inicial) y se incubó la caja bajo condiciones microaerofílicas por 24 h, tiempo al cual se registraron los valores de absorbancia (tiempo final) (Fig. 9).

Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento de *H. pylori*, se obtuvo la diferencia entre los valores obtenidos en el tiempo final menos el tiempo inicial de cada una de las variables a probar y se tomó como 100% el crecimiento del cultivo control de *H. pylori* (en presencia de agua o DMSO), como se muestra a continuación:

$$\Delta A = A_{t_f} - A_{t_i} \rightarrow \text{Control} = 100\% \text{ crecimiento}$$

$$\Delta A = A_{t_f} - A_{t_i} \rightarrow \text{Experimental} = X\% \text{ crecimiento}$$

$$\% \text{ inhibición} = 100\% - X\% \text{ crecimiento}$$

En donde: A= Absorbencia, t_f = Tiempo final, t_i = Tiempo inicial.

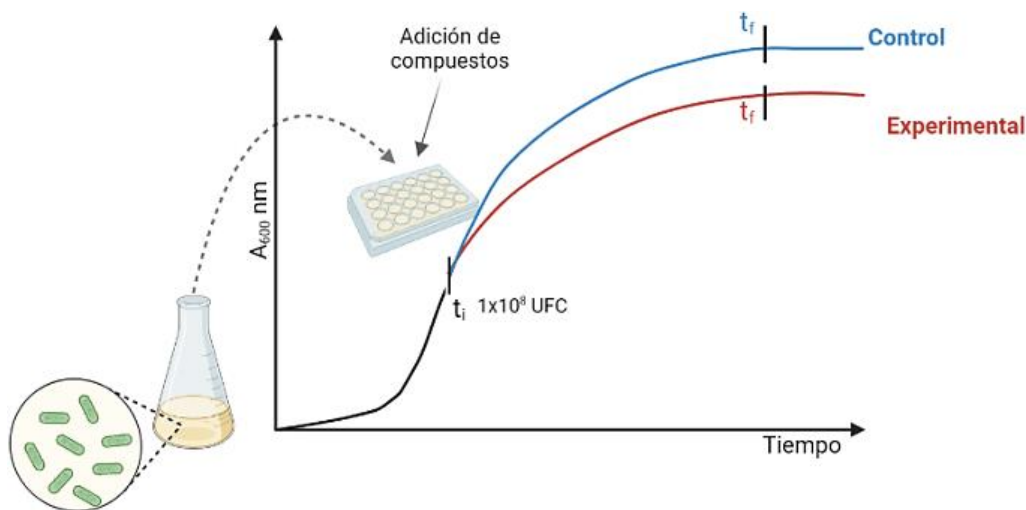


Fig. 9. Determinación de la susceptibilidad de compuestos de *Helicobacter pylori* en medio líquido para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria. La gráfica representa la curva temporal del crecimiento de *H. pylori* a una absorbancia de 600 nm. Al inicio, el cultivo se realiza en un matraz, el cual, al llegar a la fase logarítmica de crecimiento, se transfiere a una placa de 24 pozos para poder añadir los compuestos a ensayar. t_i representa al tiempo inicial y t_f al tiempo final.

5.5 Nanopartículas (NPs) utilizadas

La síntesis y caracterización de las nanopartículas (NPs) vacías y cargadas con el ácido anacárdico (6SA) fue llevada a cabo por el grupo de trabajo del Dr. Jaime Santoyo del Departamento de Física del CINVESTAV, IPN.

Básicamente, la síntesis se basa en un método químico de co-precipitación de sales de hierro de acuerdo con Alvarado-Noguez *et al.*, en 2023, y que se describe a continuación brevemente:

El proceso inició con la preparación de las dos siguientes disoluciones:

- a) 3.48 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 12.5 mL de H_2O
- b) 1.26 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 3.15 mL de H_2O

Cada disolución se agitó a 200 rpm a 70 °C.

Se tomaron 2.5 mL de la disolución a) y 0.65 mL de la b) y fueron mezclados en un matraz de tres cuellos junto con 10 mg de 6SA (parte orgánica). El precipitado que se forma son las nanopartículas, las cuales se separan con la ayuda de un imán. Se lavan 4 veces con agua destilada/etanol 1:1, dos veces más con agua, sonicando entre cada lavado. Al final, se liofilizan para obtener las NPs que serán utilizadas en los ensayos posteriores (Fig. 10).

Las NPs no cargadas se sintetizaron de manera semejante por co-precipitación, pero en ausencia del 6SA.

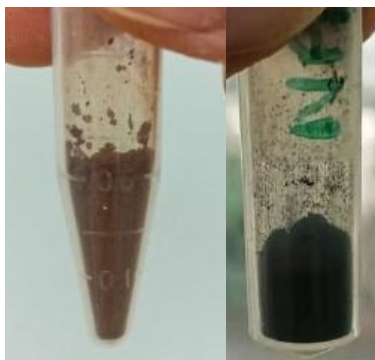


Fig. 10. Nanopartículas (NPs) sintetizadas. Izquierda: NP-6SA de color marrón. Derecha: NPs sin cargar de color negro.

Las NPs fueron caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar el tamaño, la morfología y la estructura cristalina de la muestra de acuerdo con (Ramirez-Núñez *et al.*, 2018). A partir de las micrografías obtenidas por microscopía TEM, se determinó que el diámetro de las NPs vacías fue, en promedio, de 13.57 nm. En cuanto a las NPs cargadas con 6SA (NP-6SA), el núcleo de magnetita se observó uniforme, cuasi esférico. Sin embargo, el recubrimiento de 6SA no fue uniforme, observándose en forma similar a hojuelas alrededor de los núcleos de magnetita.

5.6 Estandarización de las condiciones óptimas para suspender NPs para utilizarlas en los experimentos de la determinación de susceptibilidad

Para realizar los ensayos de susceptibilidad a las NPs se requería preparar una suspensión madre o *stock* de 18.75 mg/mL, de manera que al añadir 10 μ L en el pozo con las bacterias se obtuviera una concentración final de 125 μ g/mL. A partir del *stock* se realizarían diluciones seriales 1:1. Tanto las NPs sin cargar como las NP-6SA se pesaron en una balanza analítica en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, posteriormente, se trataron de suspender en agua o DMSO en condiciones de esterilidad. Las muestras fueron agitadas en el vórtex por 30 s y, dado que la suspensión en DMSO fue más estable, se eligió como disolvente para tratar de obtener una mezcla más homogénea.

Para lograr una suspensión más homogénea y estable, las muestras fueron sonicadas en un sonicador Ultrasonic Cleaner CD-2800 (Boque Systems 35W) por 10 min a 28 °C.

Las NP-6SA se mantuvieron a 4 °C, hasta el momento de agregarlas a los experimentos, para evitar que el 6SA disminuyera su efectividad.

5.7 Muestras de cultivos de *Helicobacter pylori* analizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido (STEM)

Para obtener imágenes por Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido (STEM) se prepararon cultivos de *H. pylori* sin tratar (controles), tratadas con NPs vacías y NPs-6SA. En estas últimas dos muestras se eligió la concentración de NP-6SA a la que se obtuvo el 50% de inhibición del crecimiento de la bacteria y se utilizó esa misma concentración para obtener la muestra de las NPs sin cargar.

Un volumen total de 2.5 mL de cada uno de estos cultivos fue centrifugado secuencialmente en tubos Eppendorf de 200 μ L a 2000 rpm por 1 min en una microcentrífuga Centronix 1236V. Se descartó el sobrenadante (correspondiente al medio) para solo dejar un botón de 2 mm aproximadamente que contenía a las bacterias) (Fig. 11). Finalmente, se añadieron 10 μ L de medio nuevo a cada tubo para que las bacterias no se secan por completo hasta su procesamiento para analizarse por STEM.

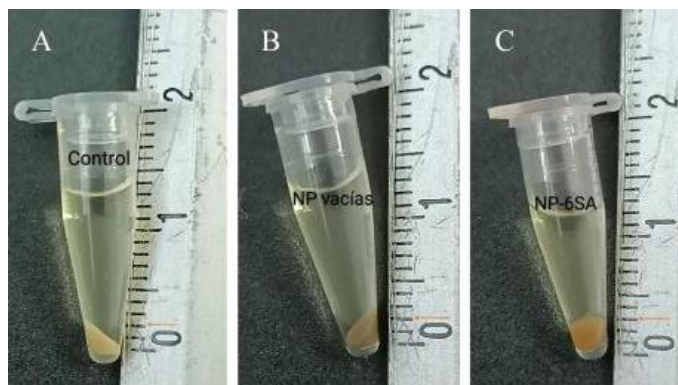


Fig. 11. Botones de las muestras de *Helicobacter pylori* para preparación STEM. A: Control: *H. pylori* + DMSO, **B:** NPs vacías + *H. pylori* y **C:** NP-6SA + *H. pylori*.

5.8 Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido (STEM)

Las preparaciones para evaluarse por STEM fueron realizadas en la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina, UNAM. A continuación, se describe brevemente la técnica:

Las muestras se resuspendieron y fijaron con glutaraldehído al 25% por 2 h. Se lavaron 3 veces con cacodilato de sodio al 0.1 M por 10 min. Luego, las muestras fijadas se trataron con osmio por 2 h y se vuelven a lavar 3 veces por 10 min.

Acto seguido, las muestras pasaron por un tren de deshidratación con etanol y se terminó de deshidratar con tolueno. Después de la fijación y deshidratación, se siguió un proceso de infiltración en dos pasos:

- 1) Resina – tolueno 1:1 por 24 h y
- 2) Resina – tolueno 3:1 por 24 h

Finalmente, se realizó una inclusión en resina total por 24 h a 60 °C (Fig. 12 A).

De cada muestra se realizaron varios cortes semifinos, de los cuales se obtuvieron posteriormente cortes ultrafinos por medio de un ultramicrotomo Leica EM UC7. Estos cortes ultrafinos se trataron con acetato de uranilo y citrato de plomo para lograr un contraste al momento de visualizar las muestras en el microscopio. Se colocaron de uno a dos cortes ultrafinos en cada rejilla de cobre (Fig. 12 B).

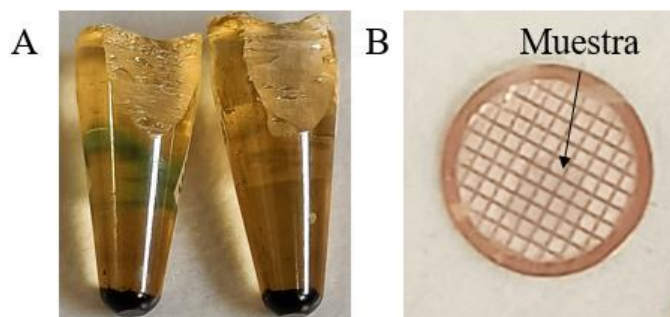


Fig. 12. Muestras para análisis por STEM. A: Inclusiones en resina de las muestras de NPs vacías y NP-6SA y B: corte ultrafino en rejilla de cobre. La flecha señala el corte ultrafino colocado en la rejilla.

Las muestras procesadas se observaron por el personal de la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina en un Microscopio Electrónico de Transmisión de Barrido (STEM) Zeiss Crossbeam 550 mediante el programa Smart SEM para computadora.

Se obtuvieron de 4 a 8 micrografías por muestra a diferentes aumentos.

6. Análisis estadístico

Se realizaron al menos tres experimentos y cada concentración se probó por triplicado. Con estos datos se obtuvo la media y la desviación estándar (DE) de la media de cada concentración.

Se determinó si los resultados obtenidos con cada una de las variables presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control mediante una prueba de Kruskal-Wallis, y entre variables con la prueba t de Student no pareada o U de Mann-Whitney, dependiendo de los resultados, con ayuda del programa GraphPad Prism 8. Se consideraron los resultados como estadísticamente significativos con una $P < 0.01$ (Anexo 2).

7. Resultados y Discusión

7.1 Lote de *Helicobacter pylori* en medio sólido para los ensayos

El cultivo de *H. pylori* en las cajas de agar sangre tras 24 h se observó como un tapete translúcido de aspecto húmedo, que fue fácilmente cosechado (Fig. 13 A, B y C).

Se logró obtener un lote de *H. pylori* con más de 100 viales, los cuales contuvieron, cada uno, un promedio de 30 mg de masa húmeda de bacterias (Fig. 13 D).

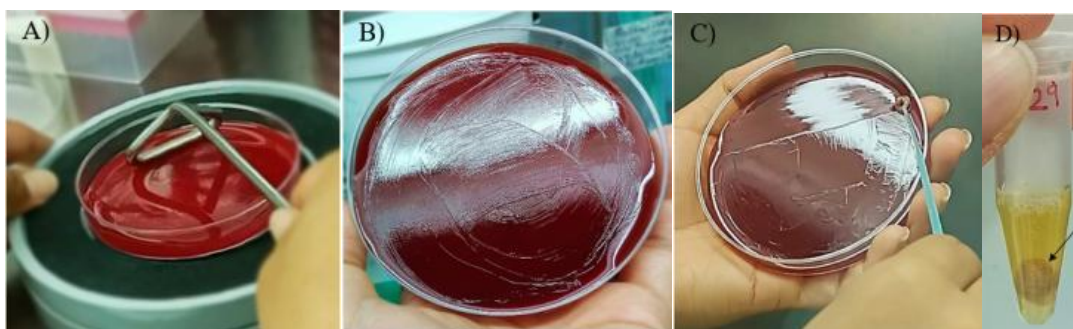


Fig. 13. Cultivo de *Helicobacter pylori* en cajas de agar sangre. A) Proceso de siembra por el método de extensión, B) crecimiento de *H. pylori* después de 24 h, C) cosecha y D) botón de *H. pylori* (flecha) cosechada lista para ser almacenada a -70°C .

7.2 Identificación de *Helicobacter pylori*

Tras haber producido el lote de *H. pylori*, se procedió a realizar las pruebas de identificación bioquímica y a elaborar frotis fijos para verificar la identidad de la bacteria.

La positividad de las tres pruebas bioquímicas realizadas, ureasa, catalasa y oxidasa fue demostrada de la siguiente manera:

En la prueba de la ureasa se obtuvo un claro viraje en el color del rojo fenol de color ámbar a un color rosa brillante indicando la alcalinización del medio debida a la reacción de la ureasa de *H. pylori* (Fig. 14 A). Por su parte, al realizar la prueba de catalasa se observó la formación de abundantes burbujas en el agua oxigenada al añadir una asada de *H. pylori*, mostrando la liberación de oxígeno por la ruptura del H_2O_2 gracias a la acción de la enzima (Fig. 14 B). En cuanto a la prueba de la oxidasa, al colocar un poco de *H. pylori* en la placa

Dry Slide, se pudo observar la aparición inmediata de un color azul intenso (Fig. 14 C), el cual es resultado de la actividad de la enzima citocromo oxidasa de la bacteria.

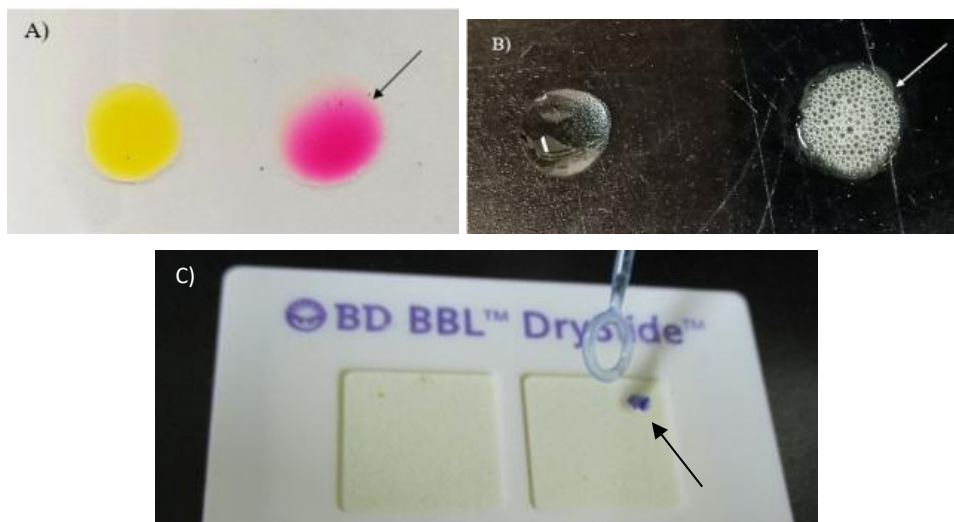


Fig. 14 Pruebas de identificación bioquímica. A) Prueba de ureasa; a la izquierda gota del reactivo con rojo de fenol, a la derecha después de la adición de *H. pylori*, el color vira a un tono rosado indicando ureasa positiva. B) Prueba de catalasa; a la izquierda se encuentra una gota de agua oxigenada, a la derecha después de añadir *H. pylori*, produciéndose burbujas. C) Prueba de oxidasa, en presencia de *H. pylori*, la placa de la prueba se torna azul (flecha) correspondiendo a un resultado positivo.

Además de las pruebas bioquímicas, se elaboraron al menos cinco frotis a partir de las cajas con medio sólido de las que fue cosechada *H. pylori*. Se les realizó la tinción de Gram y, después de secarse, se observaron al microscopio. Al revisar todas las muestras, se observaron células teñidas en color rojo por la safranina, indicando que las bacterias observadas son Gram negativas. La forma de las bacterias fue, en mayor medida, de bacilos curvados (Fig. 15). Se tomaron al azar 4 campos de observación/frotis y se calculó un porcentaje de más del 50% de formas bacilares curvadas en “u” o “v” y el resto correspondió a bacilos sin curvatura. No se observaron formas cocoides. Las formas observadas son características de los cultivos de *H. pylori*.

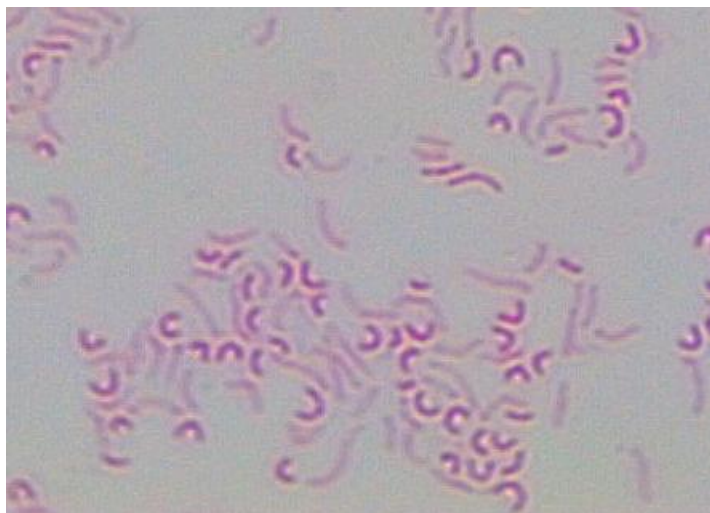


Fig. 15. Identificación morfológica de *Helicobacter pylori*. Imagen al microscopio óptico de campo claro a 100x a partir de un frotis fijo de un cultivo de *H. pylori*, con tinción de Gram. El color rojo indica que las bacterias son Gram⁻. Las bacterias lucen su característica forma de bacilos curvados “u” o “v” y también se observan algunos bacilos no curvados.

En conjunto, el hecho de presentarse positividad en las tres pruebas bioquímicas (ureasa, oxidasa y catalasa), además del resultado de la tinción de Gram y las observaciones de la morfología clásica de la bacteria, permite identificar inequívocamente a *H. pylori* como la bacteria cultivada y cosechada.

El lote de bacterias obtenido e identificado fue suficiente para realizar todos los experimentos en este trabajo.

7.3 Estandarización de las condiciones óptimas para suspender NPs para determinar la susceptibilidad

Para obtener una suspensión adecuada de NPs para agregar en los ensayos de susceptibilidad, se probaron los dos disolventes más utilizados en experimentos con *H. pylori*: el agua y el DMSO. En particular, se ha determinado que el DMSO, a la concentración final empleada en el ensayo (0.66%), no afecta el crecimiento de dicha bacteria (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

Al suspender las NPs con agua se observaron múltiples partículas insolubles, a pesar de una fuerte agitación (vórtex) hasta por 3 min. Cuando se utilizó DMSO y el mismo tiempo de

agitación, la suspensión obtenida, fue más homogénea (Fig. 16 C), pero las NPs se precipitaban con bastante rapidez (Fig. 16 D), lo cual impedía poder realizar correctamente las diluciones seriadas que se requerían en los experimentos. Por tanto, se decidió agitar por 30 s en el vórtex y continuar con un paso de sonicación por 10 min; la suspensión obtenida (Fig. 16 E) fue homogénea y no precipitó al menos por 40 min, tiempo suficiente para realizar las diluciones seriales y añadirlas a los experimentos. Utilizando este procedimiento fueron preparadas las NPs que se utilizaron en todos los experimentos.

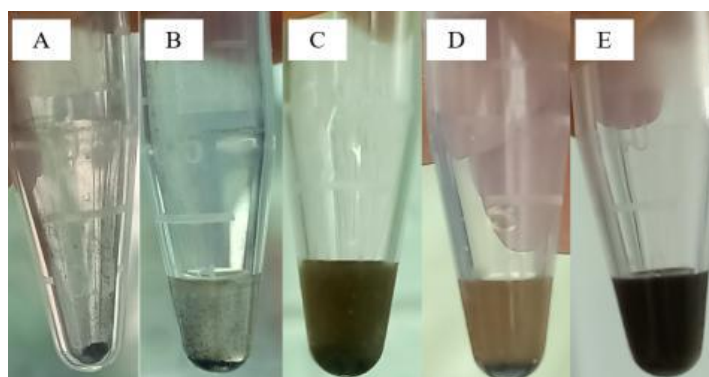


Fig. 16. Condiciones óptimas para suspender las nanopartículas (NPs). NPs sin cargar suspendidas en DMSO. A: NPs vacías pesadas, B: con DMSO agregado, y C: agitadas por 3 min en el vórtex, D: NPs de C, después de unos segundos se forma un precipitado. E: NPs agitadas por 30 s y sonicadas por 10 min; ya no se observan precipitados.

7.4 Determinación de la Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a compuestos por el método de dilución en medio líquido para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

7.4.1 Antibióticos de referencia: Amoxicilina y Metronidazol

En primer lugar, se ensayaron los antibióticos de referencia, ya que sus valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *H. pylori* se tienen estandarizados.

Se probó la amoxicilina, que es un antibiótico al cual la cepa utilizada de *H. pylori* (ATCC 43504) es susceptible. Con la amoxicilina se observó una inhibición concentración-

dependiente lográndose un $96.6 \pm 8.5\%$ de inhibición del crecimiento de *H. pylori* con $0.045 \mu\text{g/mL}$ (CMI = $0.045 \mu\text{g/mL}$) (Fig. 17).

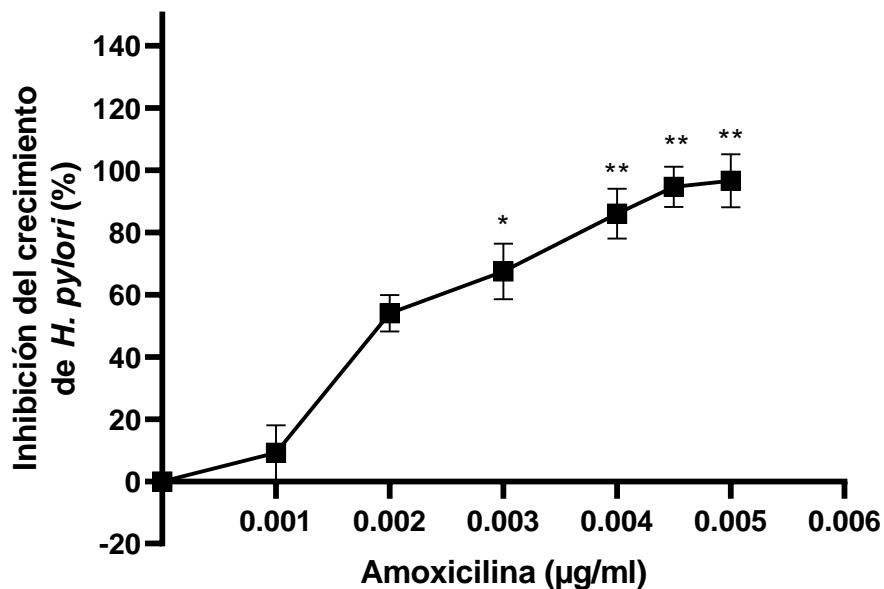


Fig. 17. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por amoxicilina. Cada punto representa la media de 8 experimentos \pm DE. Valores estadísticamente significativos con respecto al control, * $P < 0.01$, ** $P < 0.0001$ de acuerdo con la prueba Shapiro-Wilk.

A continuación, se ensayó el metronidazol, antibiótico al cual es resistente la cepa utilizada (ATCC 43504). También se observó una inhibición concentración-dependiente, obteniéndose un valor de CMI = $250 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 18).

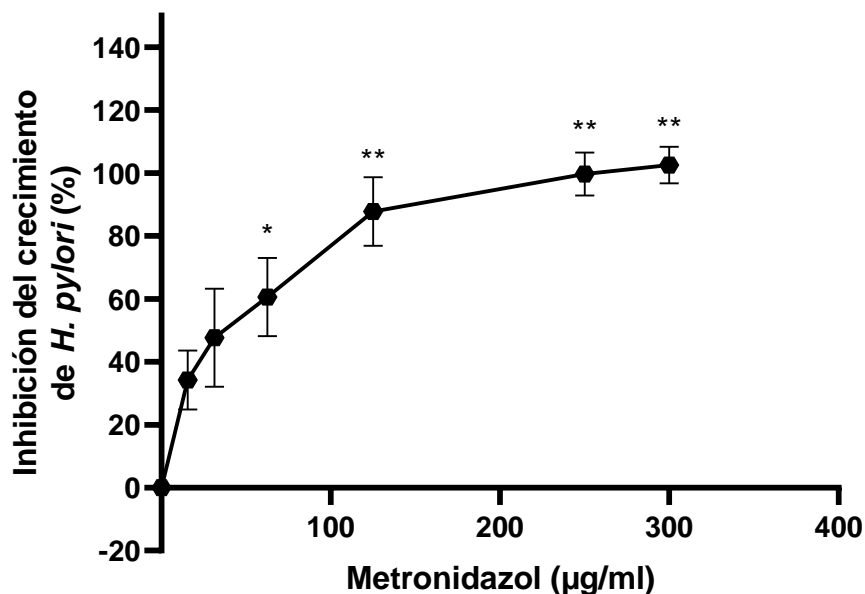


Fig. 18. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por metronidazol. Cada punto representa la media de 8 experimentos \pm DE. Valores estadísticamente significativos con respecto al control, * $P < 0.01$, ** $P < 0.0001$ de acuerdo con la prueba Shapiro-Wilk.

De acuerdo con las guías publicadas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) y el Comité Europeo sobre Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST), la CMI que presenta *H. pylori* ante la amoxicilina es de $\leq 0.12 \mu\text{g/mL}$ y ante el metronidazol está en el rango de $64 - 256 \mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2007; EUCAST, 2023). Considerando que las CMI obtenidas en nuestros ensayos con ambos antibióticos están dentro de los límites reportados, podemos concluir que el método utilizado está correctamente validado y se pudo continuar con los ensayos de Susceptibilidad con los demás compuestos.

7.4.2 Ácido 6-pentadecil salicílico 6SA

A continuación, se determinó la susceptibilidad de *H. pylori* hacia el ácido 6-pentadecil salicílico (6SA). Previamente, en este laboratorio se había determinado que la CMI del 6SA era de $5 \mu\text{g/mL}$, por lo que se procedió a corroborar este resultado con el 6SA utilizado para elaborar las NPs-6SA (Sigma Aldrich).

El 6SA inhibió el crecimiento de la bacteria de manera concentración-dependiente, como se puede observar en la Fig. 18. Hasta la concentración de 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no hay una inhibición significativa, pero con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se alcanzó la máxima inhibición de $121 \pm 4.6\%$, la cual no aumentó a pesar de elevar la concentración a 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 19). Los resultados coinciden con lo previamente obtenido en el laboratorio.

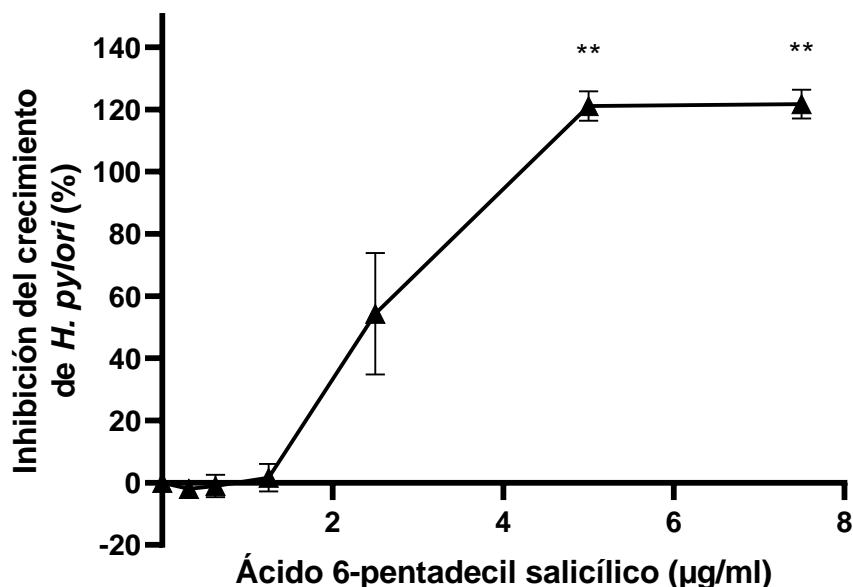


Fig. 19. Determinación de la Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* al ácido 6-pentadecil salicílico (6SA). Cada punto representa la media de 4 experimentos \pm DE. Valores estadísticamente significativos con respecto al control, ** $P < 0.0001$ de acuerdo con la prueba Shapiro-Wilk.

Es importante hacer notar que el 6SA no solo inhibe al 100% el crecimiento de la bacteria, sino que la inhibición llega hasta 120%; tener inhibiciones mayores al 100% es posible dado que, para obtener los porcentajes de crecimiento de la bacteria, se restan las $At_{\text{final}} - At_{\text{inicial}}$, de tal manera que se están obteniendo valores de absorbancia finales menores que las iniciales, lo cual es un indicador de que las bacterias no solo dejan de crecer en el cultivo, sino que están presentando lisis. Esto coincide con el efecto bactericida contra *H. pylori* reportado previamente de la mezcla de ácidos anacárdicos que se obtiene de *A. adstringens*, la cual está compuesta de varios ácidos anacárdicos y el 6SA es el componente mayoritario (46.8%) (Castillo-Juárez et al., 2007).

En 1999, Kubo *et al.* reportaron una CMI $>800 \mu\text{g/mL}$ del 6SA contra *H. pylori* (Kubo *et al.*, 1999), la diferencia entre la CMI que obtuvimos y la de estos autores puede deberse al método utilizado, ya que ellos la determinaron por el método de dilución en agar, mientras que aquí se empleó el método de dilución en caldo. De hecho, dichos autores comentan que fue difícil solubilizar al 6SA en su medio y que, en consecuencia, no es posible establecer un valor de CMI de manera inequívoca. Como ya se mencionó el 6SA es muy poco soluble en medios acuosos y cuando se emplea el método de difusión en agar es necesario, previo al vaciado de las cajas, realizar la dilución del compuesto en la matriz del agar donde se pueden formar agregados del mismo, haciendo su difusión a las membranas de la bacteria menos eficaz. En cambio, en el método de dilución en caldo puede ser más fácil que el compuesto llegue a las membranas de *H. pylori* ya que está en constante agitación. Al respecto, Castillo-Juárez *et al.*, en 2007 ya habían discutido esta misma situación sobre la mezcla de ácidos anacárdicos de *A. adstringens*, concluyendo que el método de dilución en caldo podría ser mejor para probar compuestos hidrófobos, como el 6SA.

Por otra parte, también se ha reportado que el 6SA inhibe el crecimiento de otras bacterias. Por ejemplo, *Streptococcus mutans* tiene varios valores de CMIs reportados, de $104 \mu\text{g/mL}$ (Rivero-Cruz *et al.*, 2011), de $3.13 \mu\text{g/mL}$ (Himejima & Kubo, 1991) y de $0.78 \mu\text{g/mL}$ (Green *et al.*, 2008); *Porphyromonas gingivalis* tiene una CMI= $126 \mu\text{g/mL}$ (Rivero-Cruz *et al.*, 2011); en *Bacillus subtilis* se reporta una CMI= $12.5 \mu\text{g/mL}$, *Brevibacterium ammoniagenes* tiene una CMI= $25 \mu\text{g/mL}$, *Propionibacterium acnes* una CMI= $0.39 \mu\text{g/mL}$, *Streptococcus aureus* una CMI= $100 \mu\text{g/mL}$ y en *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* y *Penicillium chrysogenum* se ha reportado una CMI $>100 \mu\text{g/mL}$ (Himejima & Kubo, 1991).

Con excepción de *P. acnes*, *B. subtilis* y *S. mutans*, los valores de CMIs reportados en la mayoría de las bacterias son mayores ($\geq 100 \mu\text{g/mL}$) al valor de la CMI de *H. pylori*, $5 \mu\text{g/mL}$. Aunque con estos datos no es posible decir que el 6SA es un compuesto selectivo hacia *H. pylori*, la CMI obtenida con el 6SA libre se encuentra entre las más bajas, lo que indica que pueda haber algún mecanismo más específico de inhibición del crecimiento de *H. pylori*.

Se han hecho varios estudios tratando de determinar los mecanismos por los cuales el ácido anacárdico posee esta actividad antibacteriana, algunos de ellos han sugerido su interacción

con la membrana debido al carácter lipofílico de la cadena del 6SA (Saedtler *et al.*, 2020). Además, se ha reportado que inhibe a la enzima ubicua gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en bacterias Gram positivas (Gómez *et al.*, 2019); considerando que *H. pylori* también posee dicha enzima (Elliott *et al.*, 2008), cabría la posibilidad de que también fuera su blanco. Por otro lado, en el laboratorio donde se llevó a cabo esta tesis se determinó la inhibición completa de la girasa de *H. pylori* por el 6SA (datos no publicados).

7.4.3 NPs vacías

En la Fig. 19 se muestra el efecto de las NPs vacías sobre el crecimiento de *H. pylori*. A concentraciones de hasta 31.25 $\mu\text{g/mL}$ ($12.08 \pm 9.18\%$ de inhibición) no tuvieron un efecto inhibitorio significativo sobre la bacteria. No obstante, a concentraciones mayores (62.5 y 125 $\mu\text{g/mL}$), se presenta una inhibición significativa de su crecimiento, siendo la mayor inhibición del $27.69 \pm 5.8\%$ con 125 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 20).

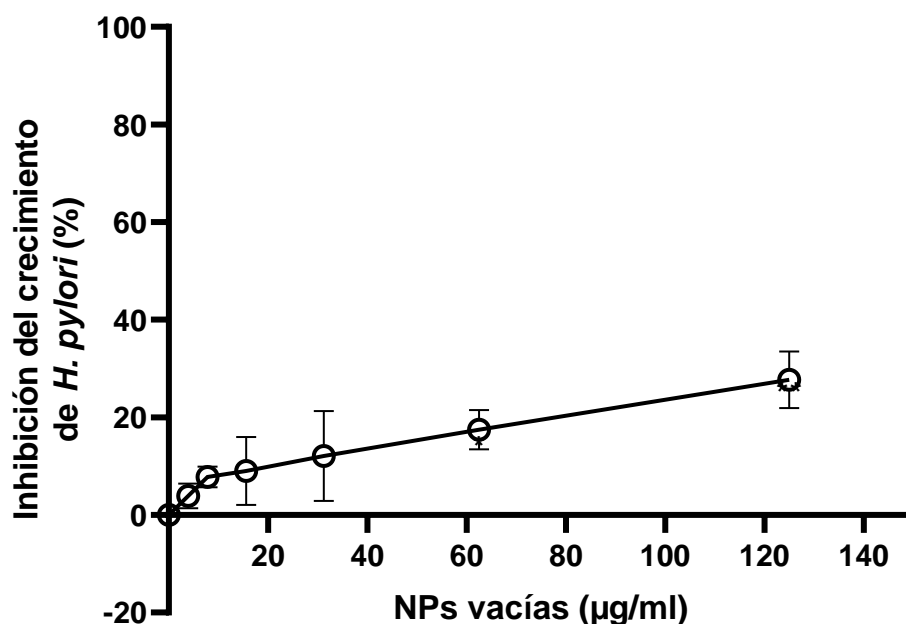


Fig. 20. Determinación de la Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a nanopartículas (NPs) vacías. Cada punto representa la media de 7 experimentos \pm DE. Valores estadísticamente significativos con respecto al control, * $P < 0.01$, ** $P < 0.0001$ de acuerdo con la prueba Shapiro-Wilk.

7.4.4 NP-6SA

En el caso de las NP-6SA, se observó una inhibición del crecimiento de *H. pylori* dependiente de la concentración, logrando el máximo de inhibición ($136.26 \pm 7.2\%$) con la concentración más alta agregada ($125 \mu\text{g/mL}$) (Fig 21). Como ya se comentó, esta inhibición mayor al 100% también se observó a partir de $5 \mu\text{g/mL}$ de 6SA en forma libre, indicando que el 6SA en las NPs sigue presentando la característica de provocar lisis en *H. pylori*, aunque en este caso, la inhibición llegó casi hasta 140% y, aunque no se probaron concentraciones mayores, la tendencia parecería indicar que podría seguir aumentando al elevar la concentración.

Únicamente a las tres concentraciones más bajas (3.9 a $15.62 \mu\text{g/mL}$), no se tuvo un efecto inhibitorio estadísticamente significativo.

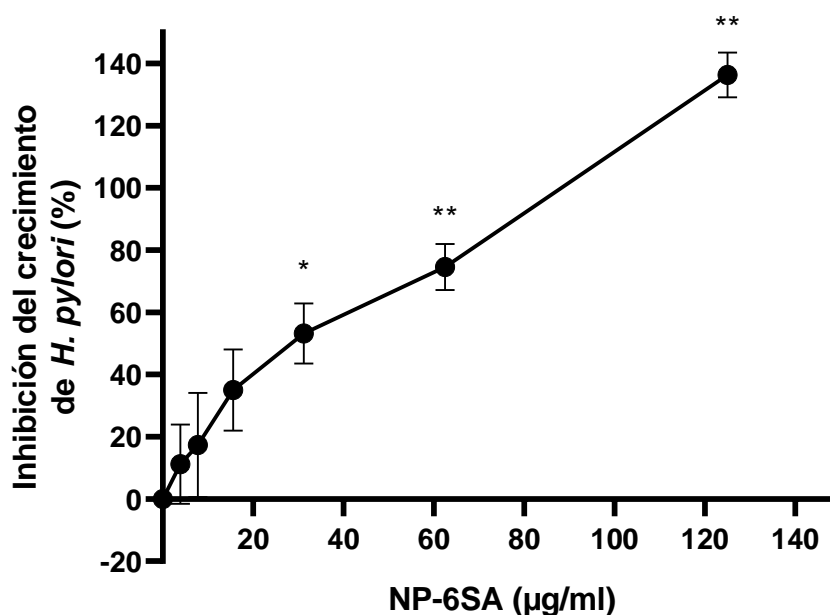


Fig. 21. Determinación de la Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a nanopartículas cargadas con ácido 6-pentadecil salicílico (NP-6SA). Cada punto representa la media de 5 experimentos \pm DE. Valores estadísticamente significativos con respecto al control, * $P < 0.01$, ** $P < 0.0001$ de acuerdo con la prueba Shapiro-Wilk.

Cabe hacer notar que, al prepararse las diluciones, tanto las NPs vacías como las NP-6SA presentaron coloración, de tal forma que, al momento de tomar las lecturas de A_{600} de los

tiempos iniciales, se registraron valores más altos en comparación con los controles. Este aumento es proporcional a la cantidad añadida de NPs, como se puede visualizar claramente en la Fig. 22 en el caso de las NP-6SA.

Después de las 24 h de incubación, y a pesar de que las placas se encontraban en agitación constante, fue común encontrar un precipitado en los controles con solo *H. pylori*. Sin embargo, éste parece incrementarse en los pozos con las NPs (vacías y cargadas) particularmente en los pozos con mayores concentraciones de NPs (Fig. 22 Tf). Debido a esto, se tuvo especial cuidado de resuspender cada uno de los pozos para que estuviera perfectamente homogeneizado y poder obtener una lectura uniforme del tiempo final.

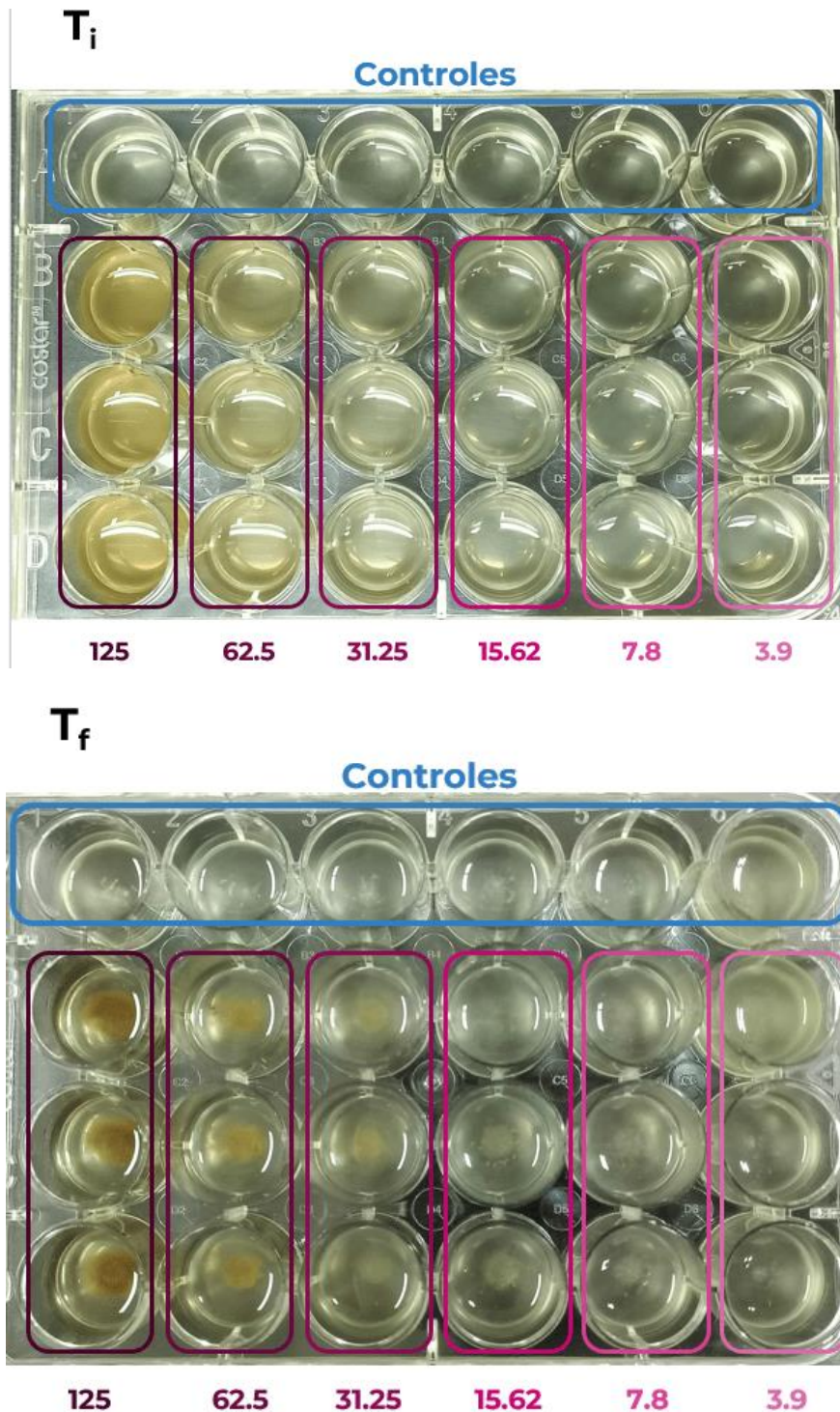


Fig. 22. Ejemplo de placa utilizada en la Determinación de la Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a NP-6SA. Placa de 24 pozos con cultivo de *H. pylori* en medio líquido Mueller Hinton Broth. T_i; Tiempo inicial. Los controles corresponden a la primera fila (recuadro azul), las diferentes concentraciones de NP-6SA (µg/mL) agregadas se indican con los rectángulos de color magenta a rosa. T_f; Tiempo final. Se utiliza la misma disposición y clave de colores que en T_i. Se observan asentamiento de bacterias en el fondo de los pozos control, así como asentamientos mayores en los pozos con las concentraciones más altas de NP-6SA.

7.4.5 NPs vacías vs NP-6SA

Para visualizar mejor los resultados, en la Fig. 23 se presentan los resultados de las Figs. 20 y 21 en conjunto, donde es muy evidente la inhibición presentada por las NPs-6SA, la diferencia entre los 2 grupos es estadísticamente significativa.

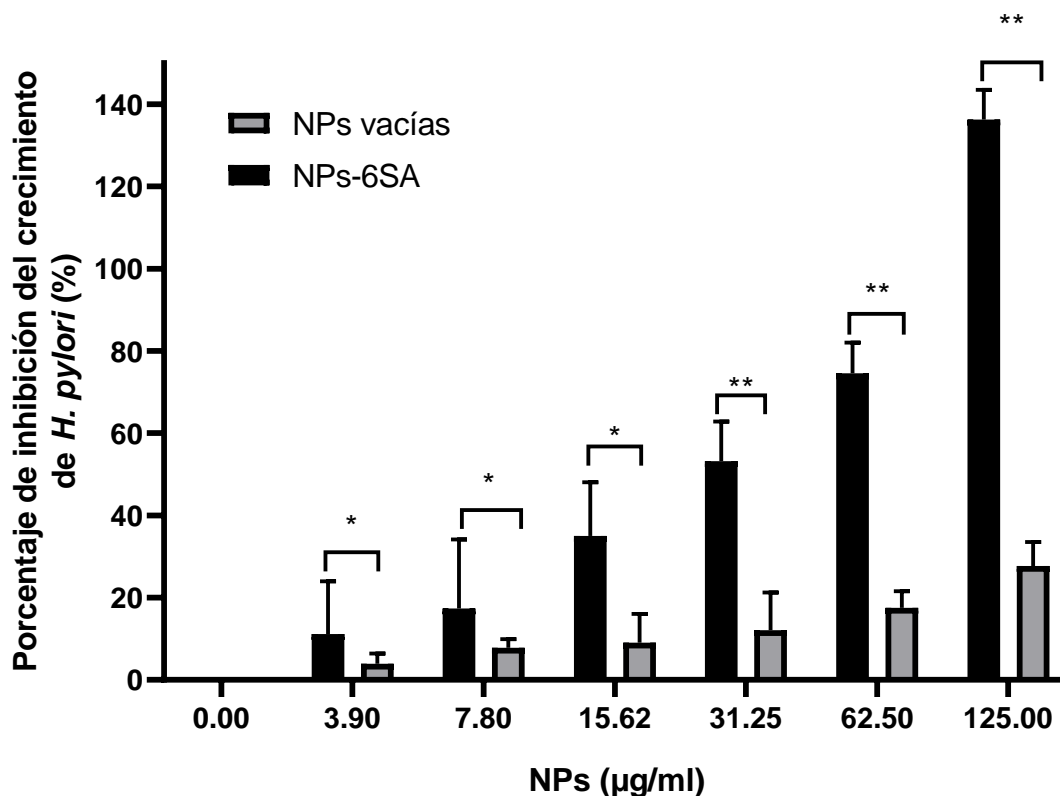


Fig. 23. Comparación de la inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* entre nanopartículas sin cargar (NPs vacías) y nanopartículas cargadas con 6SA (NP-6SA). Valores estadísticamente significativos comparando ambos tipos de NPs. *, $P < 0.05$. **, $P < 0.001$ de acuerdo con la prueba estadística de t de Student no pareada.

Considerando que las NPs vacías tienen un efecto inhibitorio probablemente debido a las lesiones en su superficie (Sharaf *et al.*, 2019), principalmente a concentraciones altas, se restó al % Inhibición de las NP-6SA el % Inhibición de las NPs vacías para obtener el % inhibición neta, el cual correspondería al efecto del 6SA usando como acarreador a las NPs (Tabla 1 y Fig. 24).

Tabla 1. Inhibición neta del crecimiento de *Helicobacter pylori* por NP-6SA.

NPs (µg/mL)	Promedio %inhibición NPs-6SA	Promedio %inhibición NPs vacías	%Inhibición Neto [NP-6SA - NP vacías]
3.9	11.170	0.226	10.944
7.8	17.369	5.308	12.060
15.62	35.043	7.051	27.992
31.25	53.201	12.504	40.697
62.5	74.578	12.824	61.754
125	136.260	32.697	103.564

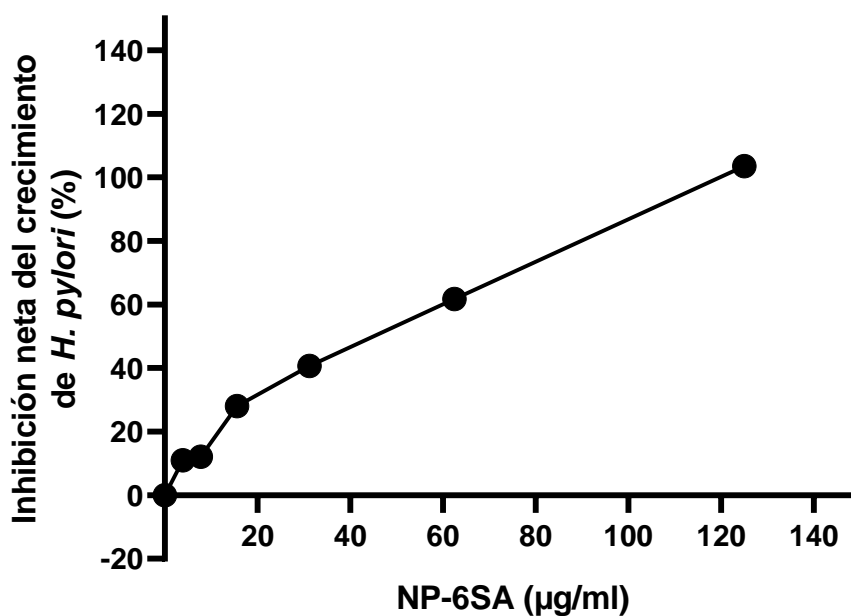


Fig. 24. Inhibición neta del crecimiento de *Helicobacter pylori* dada por nanopartículas cargadas con 6SA (NP-6SA).

7.4.6 Comparación del efecto del 6SA libre y las NP-6SA sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*

Para poder realizar una comparación más precisa entre el efecto del 6SA de forma libre y en NPs, se calculó la concentración de 6SA que tendrían las NPs en el supuesto de que todo el compuesto hubiera sido incorporado a ellas.

Considerando que para preparar las NPs de magnetita se partió de las siguientes diluciones:

- a) 3.48 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 12.5 mL de H_2O
- b) 1.26 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 3.15 mL de H_2O

Y que, de a) se tomaron 2.5 mL (0.696 g Fe^3) y de b) se tomaron 0.65 mL (0.26 g Fe^2) para mezclarse en el matraz de tres cuellos junto con 10 mg de 6SA, entonces la masa total de la mezcla para obtener las NPs sería:

$0.696 \text{ g Fe}^3 + 0.26 \text{ g Fe}^2 + 0.01 \text{ g 6SA} = 0.966 \text{ g totales}$, lo que correspondería al 100% de la mezcla.

Por lo tanto,

$$966 \text{ mg totales de NPs} - 100\%$$

$$10 \text{ mg 6SA} - X$$

$$X = 1.0352\% \text{ de 6SA}$$

Ahora bien, considerando que el 6SA representa el 1.0352% del peso de las NPs, se pudieron hacer los cálculos para determinar la cantidad de 6SA presente en las concentraciones preparadas para realizar la prueba de Determinación de Susceptibilidad (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración calculada de ácido anacárdico 6SA ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en las NP-6SA

NP-6SA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	6SA($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0	0
3.9	0.0404
7.8	0.0807
15.6	0.1617
31.25	0.3235
62.5	0.647
125	1.294

Con esta información se graficó el porcentaje de inhibición neto obtenido por las NPs-6SA (Tabla 1) contra la concentración calculada de 6SA que contenían (Fig. 25) y se comparó con la inhibición del 6SA de forma libre (Fig. 19).

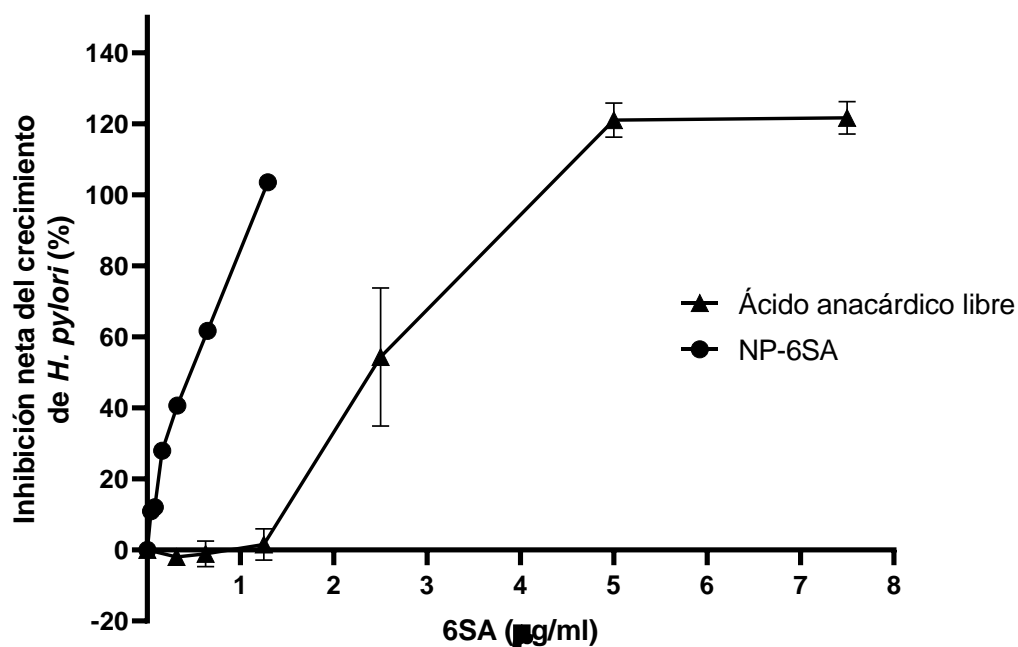


Fig. 25. Comparación de la inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* entre las nanopartículas cargadas con 6SA (NP-6SA) considerando la cantidad calculada de 6SA que contienen y el ácido anacárdico (6SA) de forma libre.

Como se puede observar en la Fig. 24, las NP-6SA tienen una actividad más potente, pues con menos concentración de 6SA se logra un mayor efecto. En el caso del 6SA libre, el 100% de inhibición se logró con 5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que con las NP-6SA, se alcanzó con 1.29 $\mu\text{g/mL}$, es decir con casi 4 veces menos cantidad. De este análisis, es claro que las NPs de magnetita ayudaron a potenciar la actividad del 6SA sobre la inhibición del crecimiento de *H. pylori* cumpliendo con la hipótesis planteada.

Previamente, se había propuesto al 6SA de forma libre como un posible antibiótico a usarse en la terapia anti-*H. pylori* debido a su baja CMI (5 $\mu\text{g/mL}$), la cual es notablemente más baja a la del metronidazol (250 $\mu\text{g/mL}$), uno de los antibióticos más empleados en los tratamientos y al que se ha generado mucha resistencia. Así que, los resultados obtenidos nos muestran que el 6SA en NPs mejora considerablemente su acción, lo que nos indica que, probablemente esta presentación podría ser una mejor alternativa en el tratamiento de erradicación de *H. pylori*. No obstante, aún faltaría realizar estudios para determinar sus efectos sobre un modelo *in vivo*, como podría ser en modelo murino o en jerbos mongoles, ya que en ellos se pueden simular condiciones parecidas a la infección por *H. pylori* en seres humanos (Ansari & Yamaoka, 2022).

Hay que hacer notar que la cantidad de 6SA de las NPs calculada en esta sección está sobre el supuesto de que todo el compuesto hubiera sido incorporado a las NP al sintetizarse, no obstante, esto debe corroborarse por alguna técnica de cuantificación. Sin embargo, la inhibición del crecimiento que se observa con las NPs-6SA, brinda una opción más para administrar el 6SA de manera segura, eficiente y costo-efectiva (Suppiah *et al.*, 2023).

7.5 Microscopía Electrónica de Transmisión de barrido (STEM) de *Helicobacter pylori* en presencia y ausencia de NP sin cargar y cargadas (NP-6SA)

Complementariamente, se decidió evaluar si la presencia de NPs modificaba las características físicas de *H. pylori*. En primer lugar, se obtuvieron fotografías a poco aumento (2.54 - 5.59 KX, equivalente a 2,540 - 5,590 aumentos) para poder tener una imagen general

de las muestras: bacterias control, con NP vacías y con NP-6SA, en ésta última se utilizó una concentración que diera una inhibición del crecimiento del 50% (Fig. 26).

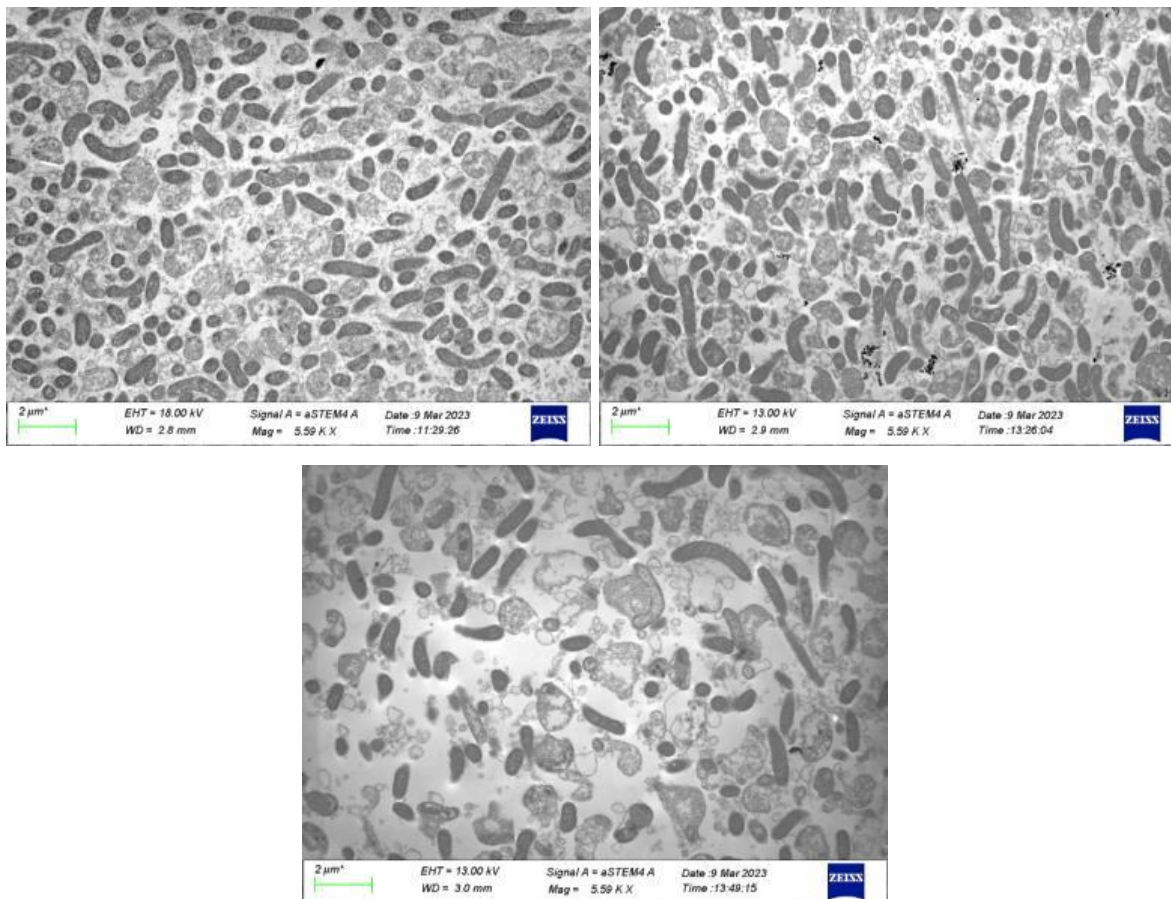


Fig. 26. Microfotografías en STEM de *Helicobacter pylori* a bajo aumento (5.59 KX). A) Control, B) en presencia de NPs vacías y c) en presencia de NPs-6SA.

Posteriormente, se fueron aumentando las imágenes hasta donde el microscopio lo permitió sin destruir la muestra con la intención de localizar a las NPs y, en las fotografías obtenidas con los mayores aumentos, se observaron unos gránulos negros y densos dentro de las células de *H. pylori* que se pensaron podrían ser las NPs, sin embargo, esta idea se deshecho ya que también se observaron en las fotografías de las muestras control (Fig. 27 A y B).

También se puede apreciar en las imágenes de STEM, que la morfología de las bacterias control y tratadas con las NPs vacías se observa normal, como bacilos ligeramente curvados

y su citoplasma se muestra relativamente homogéneo (Fig. 27 A y B). En cambio, las micrografías de las bacterias tratadas con NPs-6SA (a una CMI 50%), revelan menor número de células normales y mayor número de bacterias en estado degenerado, rodeadas de membranas rotas o discontinuas y algunas separadas de la pared celular (Fig. 27 C-D). También se observan bastantes membranas redondas completamente vacías (Fig. 27 C).

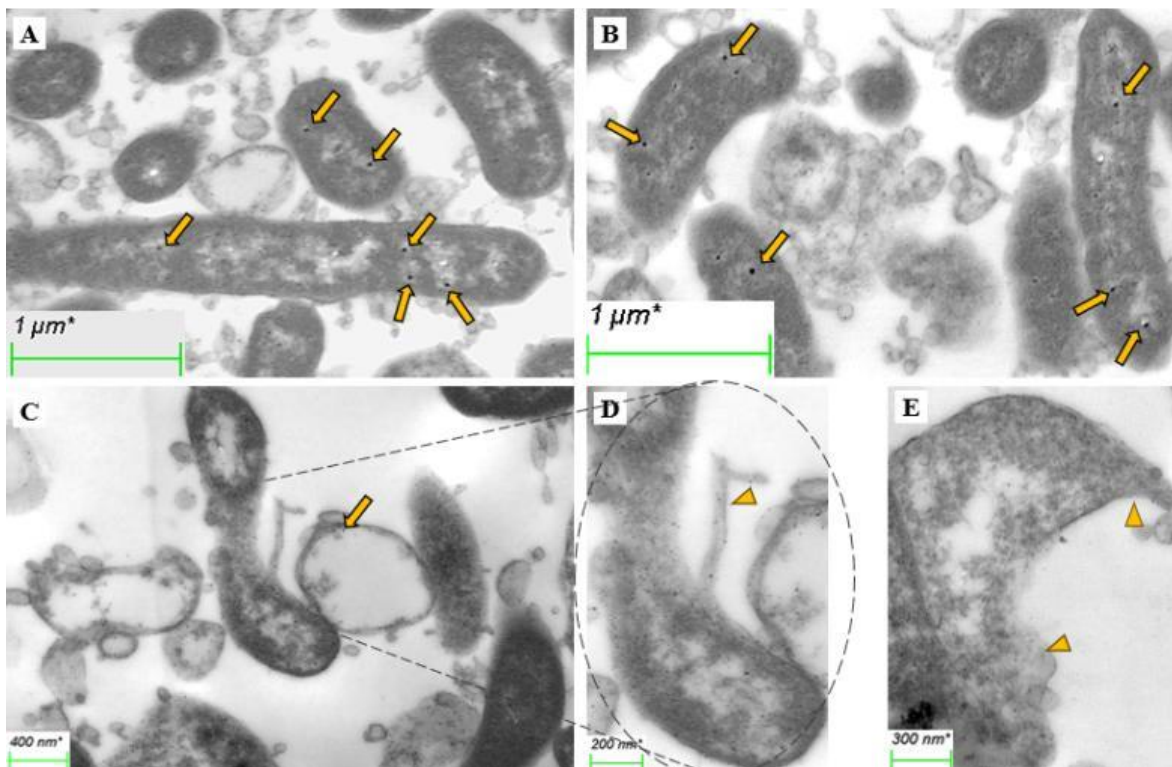


Fig. 27. Imágenes de STEM de *Helicobacter pylori* sin tratamiento y tratadas con NPs vacías y NP-6SA. A: *H. pylori* control, B: *H. pylori* + NPs vacías, C, D y E: *H. pylori* + NP-6SA. Las flechas indican los gránulos observados. Las cabezas de flechas indican el desprendimiento de la membrana, D y E: deformación de la bacteria y derrame del contenido citoplasmático.

Ya que con las imágenes STEM no se pudo diferenciar la localización de las NPs en las células, se procedió a cuantificar el número de bacterias íntegras contra lisadas en cada una de las micrografías tomadas (Tabla 3). Se consideró una bacteria íntegra y, supuestamente viva, aquella que presentó la membrana sin alteraciones y con un contenido celular normal, y una bacteria lisada (muerta), aquella que presentó daño en la membrana o sin contenido celular.

Tabla 3. Conteo y porcentaje de células de *Helicobacter pylori* íntegras vs. lisadas visualizadas en las fotografías STEM capturadas

	Aumento	N° bacterias íntegras	%vivas	N° bacterias lisadas	%muertas
<i>H. pylori</i> control	2.54 K X	724	86.4	114	13.6
	5.59 K X	233	86	38	14
	5.59 K X	307	82.3	66	17.7
	15.16 K X	37	78.7	10	21.3
		Promedio	83.35 ± 3.6%	Promedio	16.65 ± 3.6%
<i>H. pylori</i> + NPs vacías	2.54 K X	790	88.8	100	11.2
	5.59 K X	226	81.3	52	18.7
	14.10 K X	37	71.2	15	28.8
	28.06 K X	14	70	6	30
		Promedio	77.82 ± 8.9%	Promedio	22.17 ± 8.9%
<i>H. pylori</i> + NP-6SA	2.54 K X	281	64.9	152	35.1
	5.59 K X	93	65.5	49	34.5
	9.02 K X	27	55.1	22	44.9
	22.52 K X	10	55.6	8	44.4
	28.01 K X	6	54.5	5	45.5
	41.15 K X	7	63.6	4	36.4
		Promedio	59.86 ± 5.3%	Promedio	40.14 ± 5.3%

En la Tabla 4 podemos observar que, en promedio, hay más bacterias íntegras que lisadas en las muestras del control ($83.35 \pm 3.6\%$) y en las tratadas con las NP vacías ($77.82 \pm 8.9\%$). Sin embargo, en el tratamiento de *H. pylori* con NP-6SA, el promedio de bacterias íntegras baja al $59.86 \pm 5.3\%$. Los datos obtenidos son consistentes con los resultados de los ensayos de susceptibilidad en los que se obtuvo el 50% de inhibición, lo cual coincide relativamente con el 40% de células lisadas que se contabilizaron en las micrografías. Además, las imágenes sugieren fuertemente el efecto bactericida del 6SA.

8. Conclusiones

Se logró obtener un lote de *H. pylori* e identificarlo mediante pruebas bioquímicas y tinción de Gram, con el cual se pudieron realizar los ensayos de susceptibilidad de compuestos para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los antibióticos de referencia (metronidazol y amoxicilina), del ácido anacárdico 6-pentadecil salicílico (6SA) de forma libre y de las nanopartículas (NPs) tanto sin cargar (NPs vacías) como cargadas con 6SA (NP-6SA).

Se determinó que las NPs vacías, hasta la concentración de 31.25 $\mu\text{g/mL}$, no tienen efecto inhibitorio del crecimiento de *H. pylori* significativo y con 125 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo un máximo de inhibición de $27.69 \pm 5.8\%$. En tanto que las NP-6SA lograron inhibir completamente el crecimiento de la bacteria a esta misma concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$.

Considerando que durante la síntesis de las NPs se hubiera incorporado todo el 6SA, se hizo el cálculo de la concentración de 6SA añadida en los experimentos y se concluyó que las NPs como vehículo del 6SA potenciaron su efecto hasta 3.8 veces, pues la CMI del 6SA de forma libre fue de 5 $\mu\text{g/mL}$ y en las NPs-6SA fue de 1.29 $\mu\text{g/mL}$. Bajo esta premisa, podemos decir que se cumplió la hipótesis de trabajo ya que las NP-6SA tienen un mayor efecto inhibitorio del crecimiento de *H. pylori* que el 6SA de forma libre.

El efecto bactericida, previamente reportado de los ácidos anacárdicos puede corroborarse en las imágenes de STEM, donde se observaron las células de *H. pylori* lisadas.

9. Perspectivas

Las NP-6SA mostraron potencial como posible terapia alternativa de la erradicación de *Helicobacter pylori* por su inhibición del crecimiento y su mayor potencia que el 6SA libre, por lo que el próximo paso sería determinar su toxicidad y citotoxicidad para posteriormente probarlas en un modelo *in vivo*. Así mismo, elucidar el mecanismo por el que las NP-6SA ejercen una mejor inhibición del crecimiento de *H. pylori* comparado con el 6SA de forma libre.

También sería relevante realizar pruebas que permitan calcular de manera certera la concentración de 6SA en las NPs.

10. Referencias

Al-Radadi, N. S. (2022). Microwave assisted green synthesis of Fe@Au core-shell NPs magnetic to enhance olive oil efficiency on eradication of *Helicobacter pylori* (life preserver). *Arabian Journal of Chemistry*, 15(5), 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103685>

Alam-Escamilla, D., Estrada-Muñiz, E., Solís-Villegas, E., Elizondo, G., & Vega, L. (2015). Genotoxic and cytostatic effects of 6-pentadecyl salicylic anacardic acid in transformed cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 777(1), 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.11.008>

Alvarado-Noguez, M. L., Matías-Reyes, A. E., Pérez-González, M., Tomás, S. A., Hernández-Aguilar, C., Domínguez-Pacheco, F. A., Arenas-Alatorre, J. A., Cruz-Orea, A., Carbajal-Tinoco, M. D., Galot-Linaldi, J., Estrada-Muñiz, E., Vega-Loyo, L., & Santoyo-Salazar, J. (2023). Processing and Physicochemical Properties of Magnetite Nanoparticles Coated with *Curcuma longa* L. Extract. *Materials*, 16(8), 1-23. <https://doi.org/10.3390/ma16083020>

Amin, M., Hameed, S., Ali, A., Anwar, F., Shahid, S. A., Shakir, I., Yaqoob, A., Hasan, S., Khan, S. A., & Sajjad-Ur-Rahman. (2014). Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Structural Features and *in Vivo* and *in Vitro* Therapeutic Effects against *Helicobacter pylori* Induced Gastritis. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2014, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2014/135824>

Andersen, L., & Wadström, T. (2001). Basic Bacteriology and Culture. En H. Mobley, G. Mendz, & S. Hazell (Eds.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2444/>

Angsantikul, P., Thamphiwatana, S., Zhang, Q., Spiekermann, K., Zhuang, J., Fang, R. H., Gao, W., Obonyo, M., & Zhang, L. (2018). Coating Nanoparticles with Gastric Epithelial Cell Membrane for Targeted Antibiotic Delivery against *Helicobacter pylori* Infection. *Advanced Therapeutics*, 1(2), 1-20. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800016>

Ansari, S., & Yamaoka, Y. (2022). Animal Models and *Helicobacter pylori* Infection. *Journal of Clinical Medicine*, *11*, 1-19. <https://doi.org/10.3390/jcm11113141>

Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W. I., de La Cruz-Herrera, C. F., & Romero, I. (2014). Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(6), 1450–1469. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i6.1450>

Baj, J., Forma, A., Sitarz, M., Portincasa, P., Garruti, G., Krasowska, D., & Maciejewski, R. (2021). *Helicobacter pylori* virulence factors—mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. *Cells*, *10*(1), 1–37. <https://doi.org/10.3390/cells10010027>

Baker, D. A. (2020). Plants against *Helicobacter pylori* to combat resistance: An ethnopharmacological review. *Biotechnology Reports*, *26*, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00470>

Bosques-Padilla, F. J., Remes-Troche, J. M., González-Huezo, M. S., Pérez-Pérez, G., Torres-López, J., Abdo-Francis, J. M., Bielsa-Fernandez, M. V., Camargo, M. C., Esquivel-Ayanegui, F., Garza-González, E., Hernández-Guerrero, A. I., Herrera-Goepfert, R., Huerta-Iga, F. M., Leal-Herrera, Y., Lopéz-Colombo, A., Ortiz-Olvera, N. X., Riquelme-Pérez, A., Sampieri, 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), 325–341. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.05.003>

Boyanova, L., Hadzhiyski, P., Gergova, R., & Markovska, R. (2023). Evolution of *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics: A Topic of Increasing Concern. *Antibiotics*, *12*(2), 1-19. MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020332>

Brink, B. (2019). Urease Test Protocol. American Society for Microbiology. <https://asm.org/getattachment/ac4fe214-106d-407c-b6c6-e3bb49ac6ffb/urease-test-protocol-3223.pdf>

Brock, T. G. (2 de enero de 2012). *Infections in Cancer*. Cayman Chemical. <https://www.caymanchem.com/news/infections-in-cancer>

Carvalho, A. L. N., Annoni, R., Silva, P. R. P., Borelli, P., Fock, R. A., Trevisan, M. T. S., & Mauad, T. (2011). Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *135*(3), 730–736. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.002>

Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H., & Romero, I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, *114*(1), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.022>

Chandrakala, V., Aruna, V., & Angajala, G. (2022). Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems. *Emergent Materials*, *5*(6), pp. 1593–1615. <https://doi.org/10.1007/s42247-021-00335-x>

CLSI. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, *27*(1), 144.

Cover, T. L., & Blaser, M. J. (2009). *Helicobacter pylori* in Health and Disease. *Gastroenterology*, *136*(6), 1863–1873. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.073>

Elliott, P. R., Evans, D., Greenwood, J. A., & Moody, P. C. E. (2008). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of an NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Helicobacter pylori*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, *64*(8), 723–726. <https://doi.org/10.1107/S1744309108020320>

EUCAST. (2023). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.xlsx

Gnanaprakasam, J. N. R., López-Bañuelos, L., & Vega, L. (2021). Anacardic 6-pentadecyl salicylic acid induces apoptosis in breast cancer tumor cells, immunostimulation in the host and decreases blood toxic effects of taxol in an animal model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *410*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115359>

Gómez, S., Querol-García, J., Sánchez-Barrón, G., Subías, M., González-Alsina, À., Franco-Hidalgo, V., Albertí, S., de Córdoba, S. R., Fernández, F. J., & Vega, M. C. (2019). The antimicrobials anacardic acid and curcumin are not-competitive inhibitors of Gram-positive bacterial pathogenic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by a mechanism unrelated to human C5A anaphylatoxin binding. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00326>

Graham, D. Y., & Fischbach, L. (2010). *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut*, *59*(8), 1143–1153. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.192757>

Gravina, A. G., Zagari, R. M., De Musis, C., Romano, L., Loguercio, C., & Romano, M. (2018). *Helicobacter pylori* and extragastric diseases: A review. *World Journal of Gastroenterology*, *24*(29), 3204–3221. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i29.3204>

Green, I. R., Tocoli, F. E., Lee, S. H., Nihei, K. ichi, & Kubo, I. (2008). Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *43*(6), 1315–1320. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.08.012>

Gurunathan, S., Jeong, J. K., Han, J. W., Zhang, X. F., Park, J. H., & Kim, J. H. (2015). Multidimensional effects of biologically synthesized silver nanoparticles in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and human lung (L132) and lung carcinoma A549 cells. *Nanoscale Research Letters*, *10*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0747-0>

Harris, A. G., & Hazell, S. L. (2003). Localization of *Helicobacter pylori* catalase in both the periplasm and cytoplasm, and its dependence on the twin-arginine target protein, KapA, for activity. *FEMS Microbiology Letters*, *229*(2), 283–289. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00850-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00850-4)

Hemshekhar, M., Sebastin Santhosh, M., Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2011). Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: A pharmacological overview. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, *110*(2), 122–132. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00833.x>

Himejima, M., & Kubo, I. (1991). Antibacterial Agents from the Cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) Nut Shell Oil. *J. Agric. Food Chem*, *39*, 418–421.

Hooi, J. K. Y., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M. Y., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D. Y., Wong, V. W. S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, *153*(2), 420–429. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>

Hunt, J. R., Zito, C. A., & Johnson, L. A. K. (2009). Body iron excretion by healthy men and women. *American Journal of Clinical Nutrition*, *89*(6), 1792–1798. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27439>

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (1994). Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Vol. 61). World Health Organization. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK487794/>

Johnston, R. L. (2012). Metal Nanoparticles and Nanoalloys. En Johnston, R. L. y Wilcoxon, J. P., Eds. *Frontiers of Nanoscience*, 1–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096357-0.00006-6>

Kayali, S., Manfredi, M., Gaiani, F., Bianchi, L., Bizzarri, B., Leandro, G., Di Mario, F., & De'angelis, G. L. (2018). *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: State of the art. *Acta Biomedica*, *89*, 72–76. <https://doi.org/10.23750/abm.v89i8-S.7947>

Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, *10*(2), 1–21. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>

Kubo, I., Ochi, M., Vieira, P. C., & Komatsu, S. (1993). Antitumor Agents from the Cashew (*Anacardium occidentale*) Apple Juice. *Food Chem*, *41*, 1012–1015.

Kubo, J., Lee, J. R., & Kubo, I. (1999). Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(2), 533–537. <https://doi.org/10.1021/jf9808980>

Kusters, J. G., Van Vliet, A. H. M., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449–490. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>

Lin, Y. H., Lin, J. H., Chou, S. C., Chang, S. J., Chung, C. C., Chen, Y. S., & Chang, C. H. (2015). Berberine-loaded targeted nanoparticles as specific *Helicobacter pylori* eradication therapy: *In vitro* and *in vivo* study. *Nanomedicine*, 10(1), 57–71. <https://doi.org/10.2217/nmm.14.76>

Lotfipour, F., Valizadeh, H., Milani, M., Bahrami, N., & Ghotaslou, R. (2015). Study of Antimicrobial Effects of Clarithromycin Loaded PLGA Nanoparticles against Clinical Strains of *Helicobacter pylori*. *Drug Research*, 66(1), 41–45. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1548910>

Luo, M., Jia, Y. Y., Jing, Z. W., Li, C., Zhou, S. Y., Mei, Q. B., & Zhang, B. Le. (2018). Construction and optimization of pH-sensitive nanoparticle delivery system containing PLGA and UCCs-2 for targeted treatment of *Helicobacter pylori*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 164, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.008>

Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Rio, F., & Delgado, G. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphypterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 34, 147–154.

Nagata, K., Tsukita, S., Tamural, T., & Sone, N. (1996). A cb-type cytochrome=c oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 142, 1757–1763.

Nandi, A., Yan, L.-J., Kumar Jana, C., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress-and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-19

Nazari, P., Dowlatabadi-Bazaz, R., Mofid, M. R., Pourmand, M. R., Daryani, N. E., Faramarzi, M. A., Sepehrizadeh, Z., & Shahverdi, A. R. (2014). The antimicrobial effects and metabolomic footprinting of carboxyl-capped bismuth nanoparticles against *Helicobacter pylori*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(2), 570–579. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0571-x>

Nejati, S., Karkhah, A., Darvish, H., Validi, M., Ebarhimpour, S., & Nouri, H. R. (2018). Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders. *Microbial Pathogenesis*, *117*, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.016>

O'Connor, A., Gisbert, J. P., McNamara, D., & O'Morain, C. (2010). Treatment of *Helicobacter pylori* Infection 2010. *Helicobacter*, *15*(SUPPL. 1), 46–52. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2010.00774.x>

Olaizola, A., & Lin, M. (agosto de 2020). *Introduction to Polymer Nanoparticles for Drug Delivery*. Ascension Sciences. <https://ascensionsciences.com/newsroom/technical-articles/introduction-polymer-nanoparticles-drug-delivery/>

O'Rourke, J., & Bode, G. (2001). Morphology and Ultrastructure. En: H. Mobley, G. Mendz, & S. Hazell (Eds.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2452/>

Pan-In, P., Banlunara, W., Chaichanawongsaroj, N., & Wanichwecharungruang, S. (2014). Ethyl cellulose nanoparticles: Clarithromycin encapsulation and eradication of *H. pylori*. *Carbohydrate Polymers*, *109*, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.025>

Ramirez-Nuñez, A. L., Jimenez-Garcia, L. F., Goya, G. F., Sanz, B., & Santoyo-Salazar, J. (2018). In vitro magnetic hyperthermia using polyphenol-coated Fe₃O₄γFe₂O₃ nanoparticles from *Cinnamomum verum* and *Vanilla planifolia*: The concert of green synthesis and therapeutic possibilities. *Nanotechnology*, *29*(7) 1-18. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aaa2c1>

Ramteke, S., & Jain, N. (2008). Clarithromycin- and omeprazole-containing gliadin nanoparticles for the treatment of *Helicobacter pylori*. *Journal of Drug Targeting*, *16*(1), 65–72. <https://doi.org/10.1080/10611860701733278>

Ribeiro, V. G. P., Barreto, A. C. H., Denardin, J. C., Mele, G., Carbone, L., Mazzetto, S. E., Sousa, E. M. B., & Fechine, P. B. A. (2013). Magnetic nanoparticles coated with anacardic acid derived from cashew nut shell liquid. *Journal of Materials Science*, *48*(22), 7875–7882. <https://doi.org/10.1007/s10853-013-7477-4>

Rivero-Cruz, B. E., Esturau, N., Sanchez-Nieto, S., Romero, I., Castillo-Juárez, I., & Rivero-Cruz, J. F. (2011). Isolation of the new anacardic acid 6-[16'Z-nonadeceny]-salicylic acid and evaluation of its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Natural Product Research*, 25(13), 1282–1287. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.534996>

Sachs, G., Weeks, D. L., Melchers, K., & Scott, D. R. (2003). The Gastric Biology of *Helicobacter pylori*. *Annual Review of Physiology*, 65, 349–369. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142156>

Saedtler, M., Förtig, N., Ohlsen, K., Faber, F., Masota, N., Kowalick, K., Holzgrabe, U., & Meinel, L. (2020). Antibacterial Anacardic Acid Derivatives. *ACS Infectious Diseases*, 6(7), 1674–1685. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00378>

Safarov, T., Kiran, B., Bagirova, M., Allahverdiyev, A. M., & Abamor, E. S. (2019). An overview of nanotechnology-based treatment approaches against *Helicobacter pylori*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 17(10), 829–840. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1677464>

Samrot, A. V., Sahithya, C. S., Selvarani A, J., Purayil, S. K., & Ponnaiah, P. (2021). A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100042>

Sangaiya, P., & Jayaprakash, R. (2018). A Review on Iron Oxide Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 31(11), 3397–3413. <https://doi.org/10.1007/s10948-018-4841-2>

Sharaf, S. M. A., Abbas, H. S., & Ismaeil, T. A. M. (2019). Characterization of spirugenic iron oxide nanoparticles and their antibacterial activity against multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. *Egyptian J. of Phycol*, 20, 1-28.

Shields, P., & Cathcart, L. (2010). Oxidase Test Protocol. <https://asm.org/getattachment/00ce8639-8e76-4acb-8591-0f7b22a347c6/oxidase-test-protocol-3229.pdf>

Solnick, J. V., & Vandamme, P. (2001). Taxonomy of the *Helicobacter* Genus. En H. Mobley, G. Mendz, & S. Hazell (Eds.). *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2463/>

Sonnenberg, A. (2022). Epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 55(S1), S1–S13. <https://doi.org/10.1111/apt.16592>

Suppiah, D. D., Julkapli, N. M., Sagadevan, S., & Johan, M. R. (2023). Eco-friendly green synthesis approach and evaluation of environmental and biological applications of iron oxide nanoparticles. *Inorganic Chemistry Communications*, 152, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.110700>

Tan, J., Chen, B., He, L., Tang, Y., Jiang, Z., Yin, G., Wang, J., & Jiang, X. (2012). Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling. *Chinese Journal of Cancer Research*, 24(4), 275–283. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2012.10.07>

Torres, J., Camorlinga-Ponce, M., Pérez-Pérez, G., Madrazo-De la Garza, A., Dehesa, M., González-Valencia, G., & Muñoz, O. (2001). Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2677–2680. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2677-2680.2001>

Tripathi, N., & Sapra, A. (14 de agosto de 2023). *Gram Staining*. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>

Wahajuddin, & Arora, S. (2012). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3445–3471. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30320>

Walker, J. M. (n.d.). *Methods in Molecular Biology*. TM Series Editor. <http://www.springer.com/series/7651>

WGO, 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. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506090>

Worku, M. L., Sidebotham, R. L., Walker, M. M., Keshavarz, T., & Karim, Q. N. (1999). The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology. *Microbiology*, *145*, 2803-2811.

Wroblewski, L. E., Shen, L., Ogden, S., Romero-Gallo, J., Lapierre, L. A., Israel, D. A., Turner, J. R., & Peek, R. M. (2009). *Helicobacter pylori* Dysregulation of Gastric Epithelial Tight Junctions by Urease-Mediated Myosin II Activation. *Gastroenterology*, *136*(1), 236–246. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.011>

Yang, S. J., Huang, C. H., Yang, J. C., Wang, C. H., & Shieh, M. J. (2020). Residence Time-Extended Nanoparticles by Magnetic Field Improve the Eradication Efficiency of *Helicobacter pylori*. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *12*(49), 54316–54327. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c13101>

Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, *25*(16), 1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>

Anexo 1. Cuentas viables

En cada uno de los ensayos de Determinación de la Susceptibilidad se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) al tiempo inicial.

Del cultivo líquido de *H. pylori* al inicio de la fase logarítmica (A_{600} 0.3), correspondiente al tiempo inicial de los ensayos, se tomó una alícuota de 100 μ L y se realizaron diluciones seriadas 1/10 (cultivo líquido/ caldo Mueller Hinton) hasta tener 7 diluciones.

Se dividieron cajas de agar Casman con vancomicina (10 mg/L) en 4 cuadrantes, marcándolos por fuera y por debajo de la caja. En cada uno de estos cuadrantes se sembraron 10 μ L de las diluciones correspondientes a 1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} , sembrando la dilución μ g/mL por duplicado. Este proceso se hace por duplicado por cada ensayo.

Las cajas se incubaron por 7 días en condiciones microaerofílicas, se contó el número de colonias (UFC) por cada cuadrante y se realizaron los cálculos correspondientes para obtener el valor de UFC/mL de cultivo. Finalmente, después de todos los ensayos de Determinación de Susceptibilidad a todos los compuestos probados, se elaboró un promedio general:

Dilución	Promedios UFC	Desv. Est.	UFC/mL	Promedio general
1×10^{-5}	101.367	34.925	4.05×10^8	9.71 $\times 10^8$
1×10^{-6}	20.839	8.165	8.34×10^8	
1×10^{-7}	4.188	2.963	1.68×10^8	

Anexo 2 Análisis estadístico

- Amoxicilina

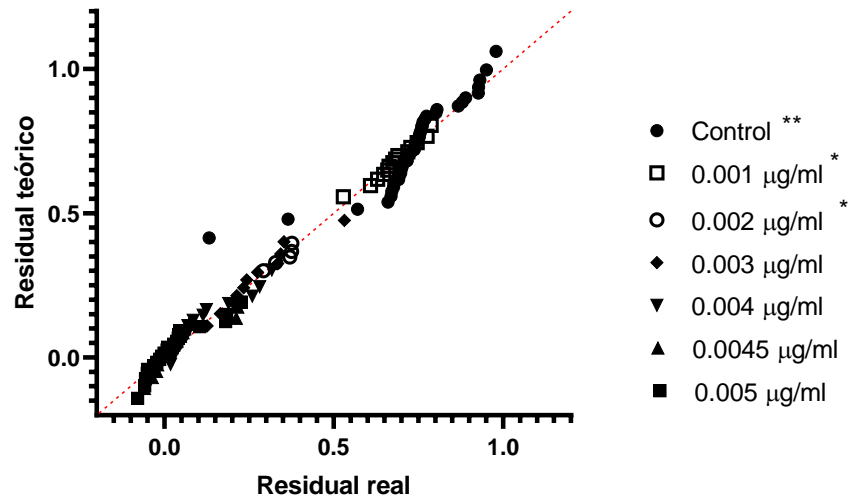


Fig. 26. Prueba de normalidad de los datos de Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* con amoxicilina. Datos no pasaron la prueba de normalidad de acuerdo con el estadístico Shapiro-Wilk: * $P < 0.05$, ** $P < 0.0001$.

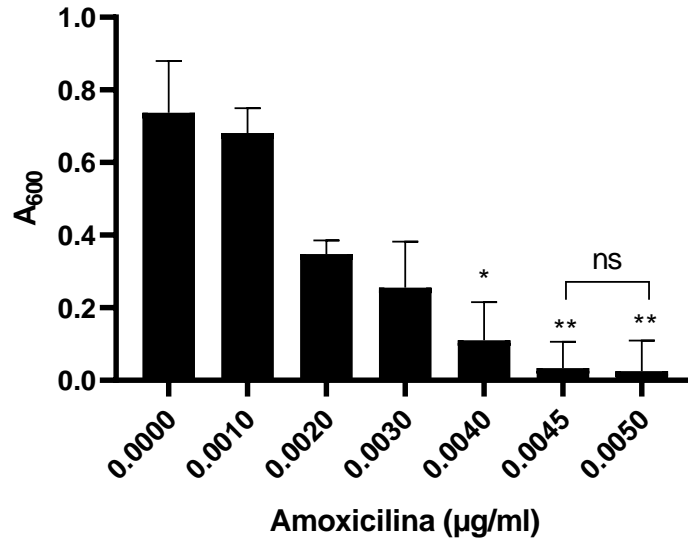


Fig. 27. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por amoxicilina. Inhibición estadísticamente significativa de 0.005 a 0.003 µg/mL de acuerdo con la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* dada por la diferencia de absorbancia entre el tiempo inicial y tiempo final (A_{600}). Valores estadísticamente significativos con respecto al control: * $P < 0.0012$, ** $P < 0.0001$. No hay diferencias significativas entre las dos concentraciones más altas (ns) de acuerdo con una prueba U de Mann-Whitney ($P = 0.5155$).

- Metronidazol

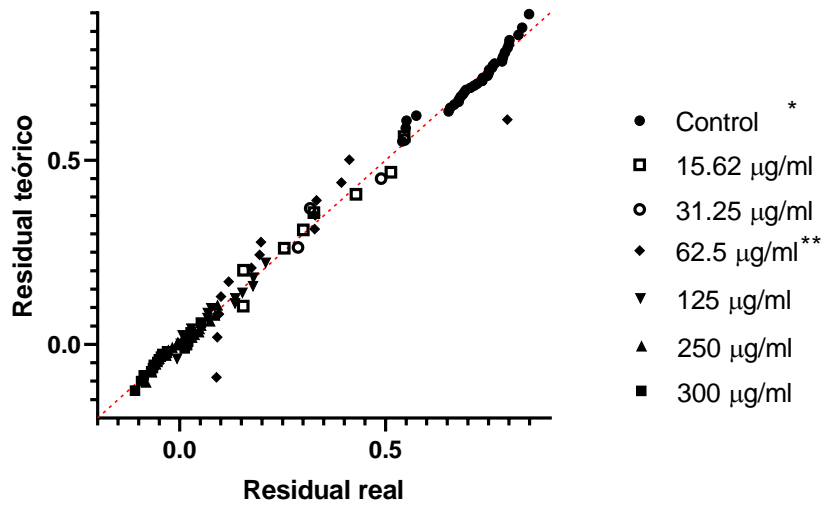


Fig. 28. Prueba de normalidad de los datos de Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* con metronidazol. Datos no pasaron la prueba de normalidad de acuerdo con el estadístico Shapiro-Wilk: * $P < 0.0175$, ** $P < 0.0071$.

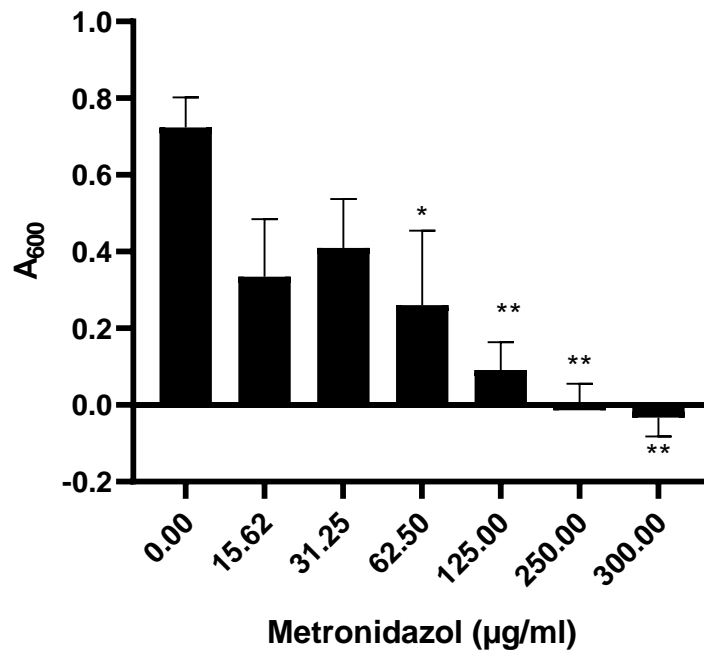


Fig. 29. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por metronidazol. Inhibición estadísticamente significativa de 300 a 62.5 µg/mL de acuerdo con la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* dada por la diferencia de absorbancia ente el tiempo inicial y tiempo final (A_{600}). Valores estadísticamente significativos con respecto al control: * $P < 0.0081$, ** $P < 0.0001$.

- 6SA

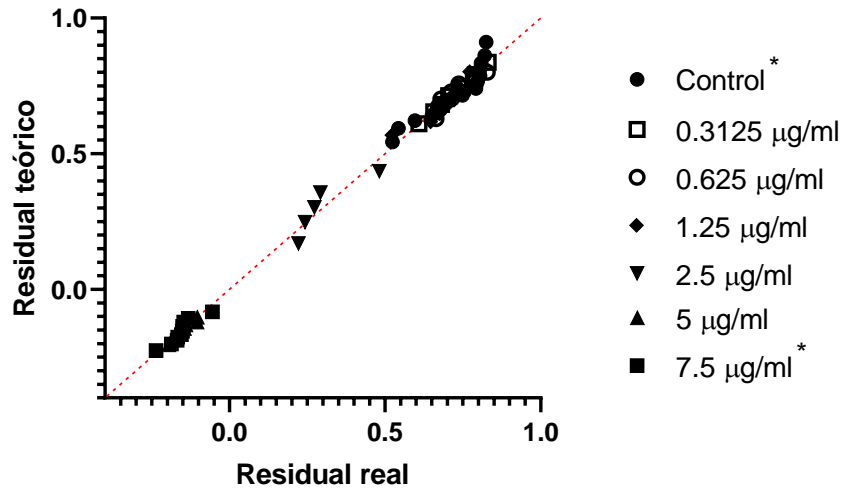


Fig. 30. Prueba de normalidad de los datos de Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* con 6SA. Datos no pasaron la prueba de normalidad de acuerdo con el estadístico Shapiro-Wilk: * $P < 0.05$.

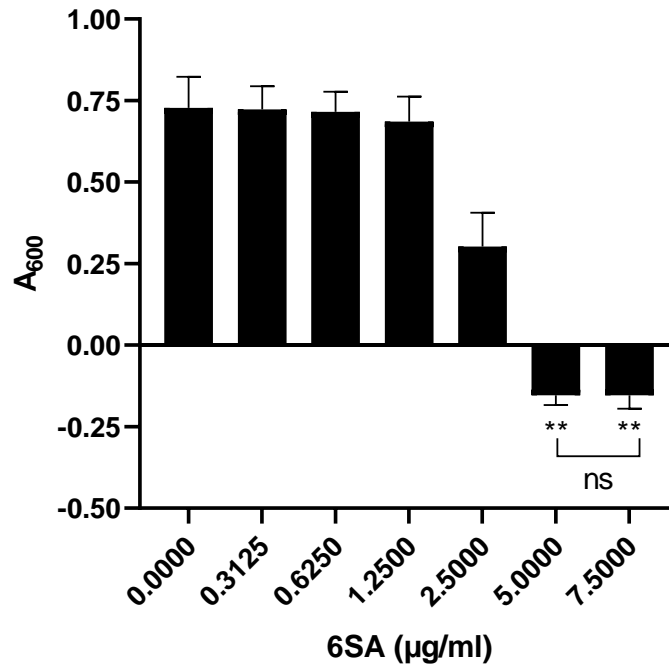


Fig. 31. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por 6SA. Inhibición estadísticamente significativa de 7.5 a 5 µg/mL de acuerdo con la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* dada por la diferencia de absorbancia ente el tiempo inicial y tiempo final (A_{600}). Valores estadísticamente significativos con respecto al control: ** $P < 0.0001$. No hay diferencias significativas entre las dos concentraciones más altas (ns) de acuerdo con una prueba U de Mann-Whitney ($P = 0.9639$).

- NPs vacías

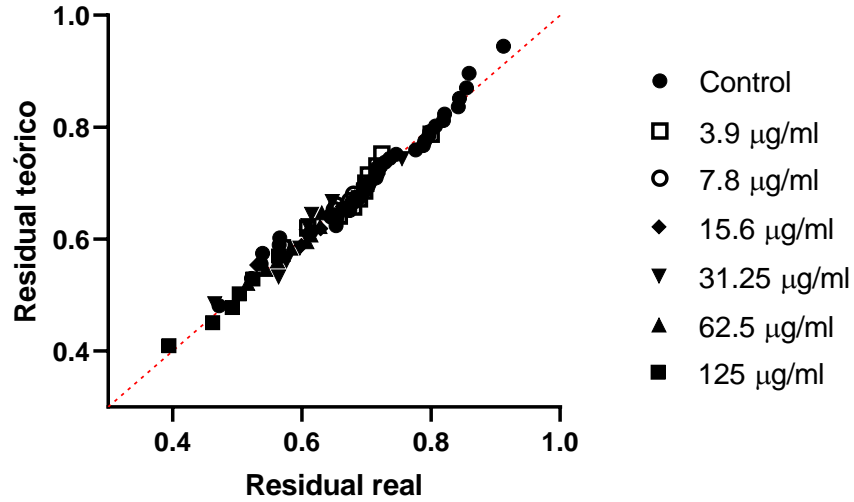


Fig. 32. Prueba de normalidad de los datos de Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* con NPs vacías. Datos pasaron la prueba de normalidad de acuerdo con el estadístico Shapiro-Wilk.

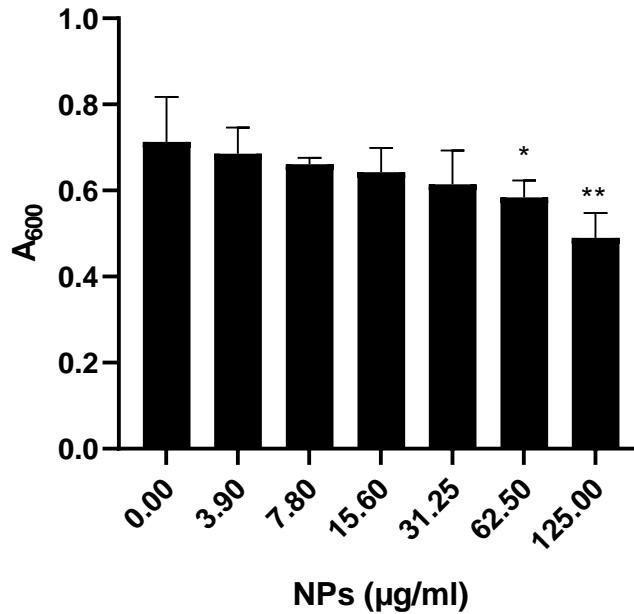


Fig. 33. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por NPs vacías. Inhibición estadísticamente significativa de 125 a 31.25 µg/mL de acuerdo con la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* dada por la diferencia de absorbancia entre el tiempo inicial y tiempo final (A_{600}). Valores estadísticamente significativos con respecto al control: * $P < 0.0009$, ** $P < 0.0001$. No hay diferencias significativas entre las concentraciones de 62.5 y 31.25 µg/mL (ns) de acuerdo con una prueba de t no pareada ($P = 0.3181$).

- NP-6SA

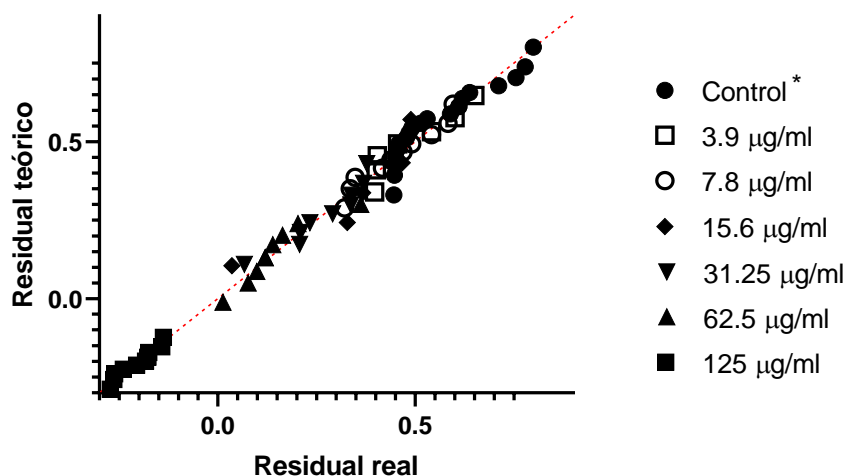


Fig. 34. Prueba de normalidad de los datos de Susceptibilidad de *Helicobacter pylori* con NP-6SA. Datos no pasaron la prueba de normalidad de acuerdo con el estadístico Shapiro-Wilk: * $P < 0.05$.

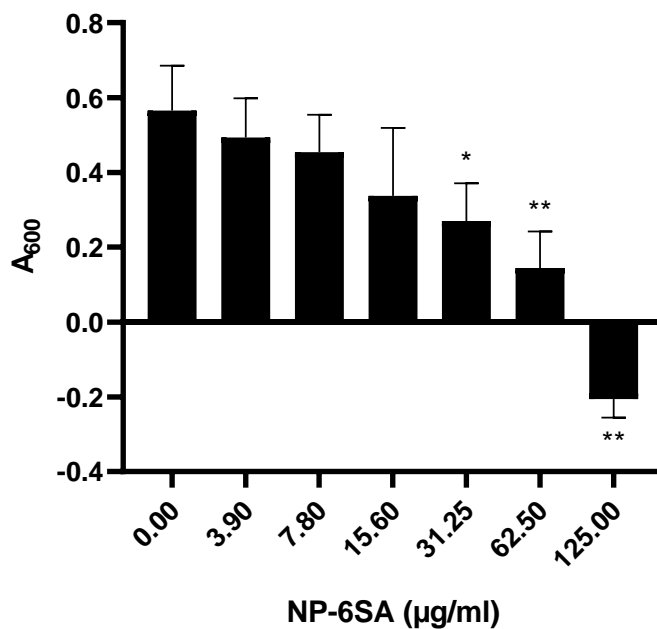


Fig. 35. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por NP-6SA. Inhibición estadísticamente significativa de 125 a 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de acuerdo con la prueba estadística de Kruskal-Wallis. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* dada por la diferencia de absorbancia ente el tiempo inicial y tiempo final (A_{600}). Valores estadísticamente significativos con respecto al control: * $P < 0.01$, ** $P < 0.0001$.