

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Centro de Investigación Diagnóstico y Referencia
Departamento de Bacteriología – Micología
Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias y Helicobacter
Laboratorios Biológicos-Farmaceúticos

Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de *Curcuma longa* L. frente a *Helicobacter pylori*

Autor: Lic. Yandy Ybalmea Gómez

TESIS PARA OPTAR POR TÍTULO DE MASTER EN BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA

La Habana, 2019

Cuba



Curcuma longa L.

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Centro de Investigación Diagnóstico y Referencia
Departamento de Bacteriología – Micología
Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias y Helicobacter
Laboratorios Biológicos-Farmaceúticos

Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de *Curcuma longa* L. frente a *Helicobacter pylori*

Autor: Lic. Yandy Ybalmea Gómez

Tutores: Prof. Onelkis Feliciano Sarmiento, MSc

Prof. Rafael Llanes Caballero, MSc

Asesores: Lic. Alexis Diaz Garcia, DrC

Lic. Arianna Yglesias, MSc

TESIS PARA OPTAR POR TÍTULO DE MASTER EN BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA

La Habana, 2019

Cuba



RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria que coloniza la mucosa gástrica y es la principal causa de gastritis, úlcera y cáncer gástrico. Debido a la significación clínica y al incremento a nivel internacional de la multidrogoresistencia de *H. pylori* resulta necesaria la búsqueda de nuevas estrategias que mejoren las tasas de erradicación. Dentro de estas, los compuestos naturales han demostrado su efecto antimicrobiano y la capacidad de restablecer la eficacia de las drogas convencionales. Con el objetivo de evaluar el efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de *Curcuma longa* (Cu) en aislados de *H. pylori*, se determinó la concentración inhibitoria media frente al extracto de 10 aislados bacterianos por el ensayo de MTT, así como los índices de combinación (IC) y de reducción de la dosis (IRD) frente a los antimicrobianos metronidazol (MET), levofloxacina (LVX) y rifampicina (RIF) en 6 de ellos, mediante formato de tablero de damas. Luego se evaluó el efecto antiinflamatorio de *Curcuma longa* sobre macrófagos (MØ) peritoneales coinfectados con diferentes relaciones de bacteria/MØ. Nueve de los 10 aislados de *H. pylori* estudiados fueron sensibles al extracto de Cu. Se observó sinergismo en las combinaciones Cu-LVX, Cu-MET y Cu-RIF con valores superiores a concentración mínima inhibitoria del antimicrobiano, los mejores IC e IRD fueron 4,57 y 28 287,30 veces la concentración del extracto de *C. longa* y MTZ, respectivamente. Al combinar la Cu con las multiplicidades bacterianas se observó una reducción en los niveles de H₂O₂, óxido nítrico e IL-1β. El extracto de cúrcuma mostró potencial antimicrobiano individual o combinado, así como antioxidante y antiinflamatorio. Esto sugiere la capacidad renovadora de la efectividad de los antimicrobianos convencionales reduciendo el fenómeno de la resistencia antimicrobiana así como su propiedades protectoras del epitelio gástrico en pacientes infectados por *H. pylori*.

Índice

I. INTRODUCCION	3
I.1.Objetivos específicos.....	5
II. MARCO TEÓRICO	6
II.1. Características generales del microorganismo	6
II.1.1. Factores de virulencia	7
II.2. Epidemiología	8
II.3. Aspectos clínicos	9
II.4. Respuesta inmune.....	11
II.4.1. Mecanismos de evasión del Sistema Inmune	13
II.5. Diagnóstico	15
II.6. Inmunoprofilaxis.....	15
II.7. Tratamiento	16
II.7.1. Esquemas de tratamiento.....	18
II.7.2. Resistencia microbiana.....	20
II.8 <i>Curcuma longa</i> L.	22
III. MATERIALES Y METODOS.....	26
III.1. Diseño general	26
III.2. Recolección del material vegetal y preparación del extracto hidroalcohólico de <i>Curcuma longa</i>	26
III.3. Aislados de <i>Helicobacter pylori</i> y condiciones de cultivo	27
III.4. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media del extracto de <i>C. longa</i> frente a <i>H. pylori</i>	27
III.5. Evaluación in vitro de la combinación del extracto de <i>C. longa</i> y los fármacos convencionales frente <i>H. pylori</i>	28
III.6. Estudio en macrófagos peritoneales	30
III.6.1. Obtención de macrófagos peritoneales	30
III.6.2 Determinación del efecto del extracto de <i>C. longa</i> sobre la viabilidad celular de macrófagos peritoneales	31
III.6.3 Determinación del efecto de <i>Helicobacter pylori</i> sobre la viabilidad celular de macrófagos peritoneales	32
III.6.4. Determinación del efecto de la combinación de <i>C. longa</i> y <i>Helicobacter pylori</i> sobre la viabilidad celular de macrófagos peritoneales.....	32
III.6.5. Determinación de cambios morfológicos por microscopía de contraste de fases.....	33
III.6.6. Determinación del evento de apoptosis	33
<i>Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de Curcuma longa frente a Helicobacter pylori</i>	



III.6.7. Efecto de <i>H. pylori</i> sobre el estado de activación de los macrófagos peritoneales	33
Determinación de peróxido de hidrógeno	34
Determinación de ON	34
Determinación de la citoquina IL-1 β en el sobrenadante de cultivo	34
III.7. Análisis de los resultados	35
III.8. Consideraciones éticas en el uso de animales de experimentación	35
IV. RESULTADOS	36
IV.1. Actividad antimicrobiana in vitro del extracto de <i>C. longa</i> frente a aislados de <i>Helicobacter pylori</i>	36
IV.2. Efecto antimicrobiano combinado del extracto de <i>C. longa</i> y los antimicrobianos en aislados de <i>Helicobacter pylori</i>	37
IV.3. Efecto individual del extracto de <i>C. longa</i> y <i>Helicobacter pylori</i> sobre la viabilidad de macrófagos peritoneales	39
IV.4. Efecto combinado del extracto de <i>C. longa</i> y <i>Helicobacter pylori</i> sobre la viabilidad celular de macrófagos peritoneales	42
IV.5. Eventos de muerte celular inducidos por el tratamiento individual y combinado del extracto de <i>C. longa</i> y <i>Helicobacter pylori</i> sobre macrófagos peritoneales	43
IV.6. Efecto del extracto de <i>C. longa</i> y <i>Helicobacter pylori</i> sobre el estado de activación de los macrófagos peritoneales	44
V. DISCUSIÓN	48
VI. CONCLUSIONES	60
VII. RECOMENDACIONES	61
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

Introducción



I. INTRODUCCION

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, microaerofílica y flagelada que posee varios determinantes de virulencia entre los que se encuentran las adhesinas, la elaboración de toxinas, citotoxina asociada a antígeno (CagA), citotoxina vacuolizante (VacA) (Bernardini *et al.*, 2007) y la enzima ureasa. Varios estudios indican que la persistencia de la infección de esta bacteria y el efecto de los factores de virulencia está asociada con el desarrollo de diferentes enfermedades gastroduodenales como gastritis crónica, úlcera péptica, linfoma de tipo MALT y carcinoma gástrico (Ando *et al.*, 2006). En 1994, la Agencia de Investigación para el Cáncer la clasificó como un carcinógeno humano de tipo I (Humans, 1994).

La infección por *H. pylori* es común a nivel mundial y se ha estimado que más del 60% de la población se encuentra infectada por este microorganismo (Shang *et al.*, 2005). Para el control de las enfermedades gastroduodenales como consecuencia de la infección por *H. pylori* la erradicación es la solución más apropiada. Los regímenes estándares para el tratamiento de la infección por *H. pylori* involucran varios tipos de antimicrobianos e inhibidores de la bomba de protones (Sarkar *et al.*, 2016). Sin embargo, el amplio uso de los antimicrobianos ha condicionado altas tasas de resistencia antimicrobiana a nivel mundial. En el 2017 la Organización Mundial de la Salud enunció 12 bacterias que amenazan la salud humana, dentro de las cuales se encontró con una alta prioridad *H. pylori* resistente a claritromicina (Otero *et al.*, 2018). En un estudio reciente en nuestro laboratorio se obtuvo una resistencia a metronidazol del 95% mientras que a claritromicina del 25% (Fu, 2018). Estos elementos despiertan la necesidad de desarrollar nuevos agentes antibacterianos contra la infección por la bacteria que sean altamente efectivos, seguros, dirigidos a blancos celulares específicos y de bajo costo.

Los compuestos derivados de plantas han demostrado su potencialidad terapéutica y quimiopreventiva contra diferentes enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y neoplásicas (Darvesh *et al.*, 2012). Se ha

Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de Curcuma longa frente a Helicobacter pylori



demostrado que los componentes dietéticos presentes en las especias, nueces, verduras y frutas han suprimido la carcinogénesis en modelos *in vitro* de cáncer (Darvesh *et al.*, 2012; Sarkar *et al.*, 2016). Los polifenoles, con propiedades efectivas antioxidantes y antiinflamatorias pueden modular importantes moléculas de señalización de un enorme interés farmacológico. Catequinas en el té verde, licopeno en los tomates, resveratrol en las uvas y el vino rojo, quercetina en la manzana y cebollas, así como curcumina en la *Curcuma longa* para nombrar algunos, han mostrado considerable efecto anticarcinógeno en varios órganos (piel, hígado, pecho, pulmón y próstata).

La curcumina es un pigmento polifenólico amarillo encontrado en las raíces de la planta *Curcuma longa*. Esta planta es miembro de la familia zingiberaceae y crece principalmente en la India y el Sudeste Asiático (Jurenka, 2009). Algunos estudios sugieren que la cúrcuma tiene diversas propiedades como antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, antiproliferativa, antifúngica y antimicrobiana (Sarkar *et al.*, 2016). En cuanto a esta última propiedad la India es uno de los países que más estudios brinda acerca de esta temática (Ronita *et al.*, 2009).

A nivel internacional se ha observado un aumento en la utilización de los productos herbarios con fines médicos que motivó la emisión de normas regulatorias por parte de la Organización Mundial de la Salud. En Cuba el Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) ha establecido nuevas políticas y el marco legal para asegurar la calidad, la seguridad y la eficacia de los mismos. Este órgano, basado en datos experimentales, pretende incluir varias plantas medicinales en la Farmacopea Cubana de Plantas Medicinales dentro de las cuales se encuentra *C. longa* (González *et al.*, 2007).

Los estudios realizados en nuestro país con la *C. longa* abordan su caracterización fitoquímica (Freire *et al.*, 2015), su actividad antiparasitaria contra el agente causal de la malaria (Fernández *et al.*, 2011); su actividad insecticida contra el género *Aedes* (Leyva *et al.*, 2008) pero no aquellos que refieran su actividad antimicrobiana.



Debido a las actividades pleotrópicas del extracto, la posible variación en el contenido de polifenoles de las plantas cultivadas en diferentes zonas geográficas del mundo y al riesgo de emergencia y prevalencia de aislados de *H. pylori* multidrogoresistentes en nuestro país, resultaría de utilidad la evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio de la *C. longa* frente a *H. pylori* que cursa con la colonización y destrucción de la mucosa epitelial y provoca el desbalance del estado redox.

I.1.Objetivos específicos

- 1) Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de *Curcuma longa* frente a aislados de *Helicobacter pylori*.
- 2) Determinar el efecto combinado del extracto de *Curcuma longa* y los antimicrobianos metronidazol, levofloxacin y rifampicina frente a aislados de *Helicobacter pylori*.
- 3) Evaluar el efecto del extracto de *Curcuma longa* y *Helicobacter pylori* sobre macrófagos peritoneales.

Marco teórico

II. MARCO TEÓRICO

II.1. Características generales del microorganismo

Helicobacter pylori (*H. pylori*) fue descubierto en 1979 por el patólogo australiano Robin Warren, quien en investigaciones posteriores (a partir de 1981), junto a Barry Marshall, logró aislar este microorganismo presente en la mucosa de estómagos humanos (Marshall *et al.* 1985). Originalmente se describió como *Campylobacter pylori*, pero debido a sus diferencias con las especies de *Campylobacter* identificadas, su patrón de ácidos grasos, así como la existencia de diferencias genéticas se propuso como un nuevo género: *Helicobacter* (Solnick *et al.*, 2001).

Desde el punto de vista morfológico, *H. pylori* es un bacilo gram negativo, curvo, consta de 3 a 6 flagelos polares envainados y una estructura terminal en forma de bulbo, con un tamaño de 2,5-5 μm aproximadamente (Solnick *et al.*, 2001; Wang, 2014). Esta estructura le garantiza la motilidad a través de la pared gástrica, lo que unido a la presencia de una proteína de 53 kD denominada flagelina, constituyen importantes factores de virulencia (Wan-Sheng *et al.*, 2005).

Posee requerimientos nutricionales especiales para el crecimiento, siendo considerado una bacteria fastidiosa o de difícil crecimiento (Valmaña *et al.*, 2003; Llanes *et al.*, 2014). Necesita de una atmósfera de microaerofilia (5 % de O_2 , 10% de CO_2 y 85 % de N_2), alta humedad, temperatura de 35-37 °C y un tiempo de incubación de 5 a 10 días. Crece en medios sólidos enriquecidos como Agar Columbia, Agar Brucella, Agar Wilkins-Chalgren, Agar Mueller-Hinton y Agar Helicobacter, suplementado con 5 a 7% de sangre de carnero, pudiéndose utilizar además suero de caballo, suero fetal bovino, e isovitalex y una combinación de al menos 4 antimicrobianos que inhiben el crecimiento de la microbiota acompañante (Cervantes y García, 2015). De todos los medios de cultivo, la base de agar Columbia suplementada con 7 % de sangre y los antibióticos trimetoprim, vancomicina, cefsulodina y anfotericina B, ha sido la más empleada para el



aislamiento de *H. pylori* (Megraud, 2005). Las colonias tienen un diámetro de 1-2 mm, son transparentes, translúcidas, húmedas y no producen hemólisis. Desde el punto de vista metabólico, el microorganismo elabora escasas enzimas como la citocromo oxidasa, catalasa y ureasa, las que resultan útiles para su identificación definitiva (Buzas, 2015).

II.1.1. Factores de virulencia

La bacteria posee varios factores de virulencia entre los que se encuentran: adhesinas, proteínas de membrana interna, la elaboración de toxinas, citotoxina asociada a antígeno (CagA), citotoxina vacuolizante (VacA) y la enzima ureasa (Bernardini *et al.*, 2007; Chmiela *et al.*, 2017).

Los flagelos y adhesinas son factores fundamentales para la colonización del epitelio gástrico. *H. pylori* posee de dos a seis flagelos monopolares que garantizan la movilidad y la adhesión al epitelio gástrico los cuales están compuestos por dos tipos diferentes de flagelinas (FlaA y FlaB) con pesos moleculares de 53 y 54 kDa respectivamente (Clyne *et al.*, 2000). Las adhesinas son proteínas de superficie que junto a diferentes receptores utiliza la bacteria para adherirse al epitelio gástrico. Estudios que utilizan anticuerpos para obstaculizar la adherencia de esta bacteria sugieren que la unión de adhesinas y receptores a la superficie de las células del hospedero se realiza simultáneamente (Beswick, 2006; Chmiela *et al.*, 2017).

El gen *vacA*, de 3,9 kb, codifica para la proteína VacA de 139 kDa que induce la vacuolización de las células epiteliales, la muerte celular y la destrucción de la integridad del epitelio (Gonzalez *et al.*, 2011). Por otro lado, la producción en grandes cantidades de la enzima ureasa por *H. pylori* neutraliza el pH ácido estomacal hasta 6 ó 7 en su entorno, lo que facilita su desplazamiento hacia la superficie de las células de la mucosa donde el pH se aproxima a la neutralidad y permite la colonización del tejido. Entre el 50-60 % de los aislamientos de *H. pylori* presentan un segmento de 40 Kb conocido como Isla de patogenicidad (PAI del inglés: *Patogenicity Island*) que contiene más de 20 genes, en uno de sus extremos



está posicionado el gen *cagA* que codifica para la proteína CagA altamente inmunogénica de 110-140 kDa. En esta región además se encuentra el gen *picB*, que induce la producción de interleucina-8 por las células del epitelio gástrico (Chmiela *et al.*, 2017).

II.2. Epidemiología

H. pylori muestra una distribución mundial aunque presenta diferencias dentro y entre los diferentes países según el grado de desarrollo de los mismos. Se estima que más del 50% de la población mundial está infectada con esta bacteria (Sarkar *et al.*, 2016). La prevalencia de la infección por *H. pylori* ha cambiado durante los últimos años con una tendencia a disminuir en la mayoría de los países (Krzyżek *et al.*, 2017). En los países subdesarrollados, la prevalencia excede el 50% de la población a la edad de 5 años, pudiendo llegar al 90% en los adultos (Cattoir *et al.*, 2007).

El hombre constituye el único reservorio de la infección por *H. pylori* en condiciones naturales, aunque también ha sido aislado en primates (Cave, 1997). La adquisición de este microorganismo está sujeta a distintos factores de riesgo como la edad, el estado inmunológico del individuo, el estatus socioeconómico y el nivel educacional bajo, el consumo de fuentes de agua contaminadas y la presencia de otros miembros de la familia infectados por esta bacteria (Larussa *et al.*, 2015).

La transmisión de esta bacteria hoy en día continúa sin esclarecimiento. A pesar de ello se han postulado tres vías por las cuales podría acceder al hospedero: vía gastro-oral, oral-oral y fecal-oral (Krzyżek *et al.*, 2017). La vía oral-oral está respaldada por la identificación de *H. pylori* en los surcos gingivales de la placa dental y de su genoma en la saliva (Loster *et al.*, 2009). La vía oro-gástrica, se relaciona a pacientes sometidos a endoscopia superior con una mala desinfección de los gastroscopios y a los casos de reflujo gastro-esofágico, pues los niños vomitan generalmente más que los adultos y se llevan objetos a la boca con mayor frecuencia (Ford *et al.*, 2010). La vía fecal-oral, pudiera justificarse por la identificación del genoma y antígenos bacterianos de *H. pylori* en las heces. En este



sentido, la presencia de formas concoides de la bacteria en aguas residuales de pozos, ríos o aguas marinas que forman parte del consumo humano, implica una de las fuentes de infección (Twing *et al.*, 2011).

Debido a la persistencia de la infección de esta bacteria y al riesgo de que millones de personas desarrollen enfermedades como inflamación gástrica, úlceras y carcinoma la Organización Mundial de la Salud en 1994 clasifico a *H. pylori* como carcinógeno grupo 1 con alto riesgo de producir cáncer gástrico (Sarkar *et al.*, 2016).

II.3. Aspectos clínicos

Cuando *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica humana se produce una gastritis superficial que puede permanecer así durante el resto de la vida o bien, al cabo de los años o décadas desarrollar una úlcera péptica o una gastritis atrófica que podría ser el primer paso para la evolución a cáncer gástrico (Figueiredo *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2011).

La gastritis crónica es una enfermedad inflamatoria crónica de la mucosa estomacal, que puede generar desde la atrofia leve de la mucosa hasta el desarrollo de adenocarcinomas (Rubin *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2011). Las causas de esta atrofia son múltiples, sin embargo la mayoría son debidas a la presencia de *H. pylori*, pues la respuesta inflamatoria desarrollada induce la apoptosis del epitelio gástrico (Takeshima *et al.*, 2009). Otras causas de gastritis crónica son las de origen inmunológico como anticuerpos citotóxicos o contra el factor intrínseco, el consumo recurrente de alcohol, el tabaquismo, y la radiación. Si bien la gastritis crónica se caracteriza por estar eritematosa con pliegues aumentados de tamaño en un comienzo, estos suelen volverse aplanados y finos por el mencionado daño epitelial. Morfológicamente la gastritis crónica, tiene varios patrones de presentación sin embargo con la infección por la bacteria la tendencia es a encontrar la lesión limitada a la zona del antro (Rubin *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2011).

La úlcera en términos generales se considera una pérdida de la continuidad del epitelio. En el caso de la úlcera péptica, la ubicación más frecuente es la primera



porción del duodeno. Esta lesión se ha asociado a diferentes patologías, pero la principal relación es con la presencia del bacilo bien sea en el antro o en el duodeno. La presencia en el antro favorece el aumento en la cantidad de ácido que llega al duodeno lo cual daña el epitelio (McColl, 2010), mientras que la presencia en el duodeno, favorece la formación de úlceras mediante la acción de las células dendríticas y la subsiguiente activación de la respuesta inmune (Andres *et al.*, 2010). Esta es una de las patologías que se ve favorecida con la erradicación del microorganismo, entre otras cosas por la disminución de la respuesta inmune inflamatoria y el daño generado al epitelio gástrico.

Las personas infectadas por *H. pylori* presentan un riesgo seis veces mayor de desarrollar cáncer gástrico, debido a que el microorganismos tiene capacidad de causar dicha patología oncológica. Sin embargo no depende solo de la infección por cepas virulentas del microorganismo, sino que la susceptibilidad del hospedero y los factores externos son los que determinan el desarrollo de cáncer. Es importante aclarar que el desarrollo de esta patología asociada a la infección por el microorganismo se da usualmente por cambios secuenciales de la mucosa (González, 2010). En el caso de la infección por *H. pylori*, el tipo de cáncer no solo se ubica en la región antral del estómago, sino que además es de variante intestinal (Fuentes *et al.*, 2009).

El linfoma de Tejido Linfático Asociado a Mucosa o MALT, es un cúmulo no encapsulado pero delimitado de linfocitos, sobretodo linfocitos B. Adicionalmente estas agrupaciones se localizan en la mucosa del sistema digestivo, aunque también se hallan presentes en el sistema respiratorio y urinario. Cuando está presente la infección por el *H. pylori*, se inicia la activación de la respuesta inmune secundaria a diferentes antígenos (Tsai, 2010) por lo que dentro de los factores de riesgo relacionados tanto con el adenocarcinoma como el linfoma tipo MALT, está la presencia de cepas positivas para el gen *cagA*. Los estudios han demostrado que este gen interactúa con los linfocitos B, uniéndose con receptores de tirosina-quinasa estimulando su activación (Lin *et al.*, 2010) a la vez que frena la apoptosis y favorece la conversión linfocítica así como el desarrollo de linfoma tipo MALT, el cual puede variar su grado de malignidad.

Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de Curcuma longa frente a Helicobacter pylori



II.4. Respuesta inmune

H. pylori induce una respuesta inmune tanto innata como adaptativa en el hospedero, siendo la primera la que juega el papel fundamental (Ieni *et al.*, 2016). Sin embargo, la persistencia de la bacteria en el estómago demuestra que esta respuesta no es efectiva en la eliminación de la infección y de manera adicional contribuye a la patogénesis de la infección (Santos, 2015).

La respuesta inmune innata es la primera defensa que presenta el sistema inmunológico ante cualquier patógeno. Está comprendida por tres partes diferentes: barreras físicas como membranas mucosas y el ácido del estómago; células efectoras como neutrófilos y macrófagos y por último factores solubles como péptidos antimicrobianos y el complemento. La activación innata de neutrófilos y macrófagos está determinada por el reconocimiento de PAMPs (del inglés, pathogen-associated molecular patterns) por PRRs (del inglés, pattern recognition receptors) de dichas células. La unión de los PRRs a los desencadena una cascada de señalización que termina con la fagocitosis del patógeno y la secreción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno así como otros factores inflamatorios. Los PAMPs de *H. pylori* son reconocidos por TLRs (del inglés, toll-like receptors) de los tipos 4 y 5. Los TLR 4 reconocen los componentes lipopolisacáridicos de la pared, mientras que los TLR 5 son activados por la flagelina. Además *H. pylori* activa otro tipo de receptor innato, el NOD-1 (del inglés, Nucleotide binding oligomerization domain containing 1), el cual reconoce productos del peptidoglicano de bacterias gram negativas. Cepas de *H. pylori* con el gen *cagPAI* intacto pueden activar el receptor NOD-1 por inyección de peptidoglicano dentro del citosol de las células epiteliales mediante el sistema de secreción tipo IV. Esto activa el factor de transcripción NF- κ B que trae consigo la secreción de citocinas proinflamatorias como la interleucina 8 (IL-8). Por lo tanto *H. pylori* controla la inmunidad innata mediante la activación selectiva de NOD-1 y TLR 4 y TLR 5. Este control de activación de receptores de la inmunidad innata desata entonces la iniciación de una respuesta inflamatoria en el epitelio gástrico.



La primera señal de la infección por *H. pylori* es la inflamación del epitelio gástrico. Las células del epitelio secretan citocinas, las que reclutan neutrófilos, macrófagos y linfocitos al sitio de infección. Tanto las células del epitelio gástrico como las células inmunes presentes en la sangre periférica secretan varios tipos de citocinas como, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α e IFN- γ . La IL-12 favorece la diferenciación de células T inmaduras en células Th1 y Th2, donde la respuesta Th1 es la dominante. Estas células secretan interleucinas proinflamatorias como IL-2 e IFN- γ . *H. pylori* regula la respuesta Th1 por medio de la IL-10 que favorece la diferenciación de linfocitos antiinflamatorios como Th2 y Treg. Estos últimos se encuentran en gran medida en la mucosa gástrica infectada por *H. pylori* lo que sugiere que su presencia disminuya la respuesta inmune inflamatoria (Krzyżek *et al.*, 2017).

Los macrófagos tienen una mayor influencia en la inflamación, patología y enfermedad. Varios estudios reflejan los mecanismos de activación de este tipo celular para potenciar la eliminación de *H. pylori*. Shen y colaboradores demostraron que la producción de óxido nítrico y la actividad bactericida de macrófagos se favorecía con la presencia de la citoquina inflamatoria quimiotaxina 2 derivada de células leucocitarias (LECT2) (Shen *et al.*, 2016). Hardbower y colaboradores reportaron que la ornitina descarboxilasa (ODC), enzima con un papel en la carcinogénesis, es un importante regulador de la activación de macrófagos en respuesta a la infección por *H. pylori*. Este grupo también reportó que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE) de macrófagos, incrementa la señalización de la activación de los mismos en la mucosa gástrica cuando está presente la bacteria. Además, el RFCE fosforilado potencia la señalización de macrófagos mediante NF-k β y MAPK1/3 frente a la infección por *H. pylori* (Hardbower *et al.*, 2017).

Por otra parte los monocitos, macrófagos y células dendríticas presentes en la lámina propia de la mucosa gástrica juegan un papel esencial en la presentación de antígenos y la iniciación de la respuesta inmune adaptativa. Diferentes estudios han concluido que la respuesta humoral contra *H. pylori* no es esencial en la erradicación de este patógeno. Los linfocitos B producen anticuerpos, especialmente de clase

Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de Curcuma longa frente a Helicobacter pylori



IgA secretora, la cual no activa al complemento y por la adherencia a la bacteria permite que evada la respuesta inmune. En humanos, la IgA es de la subclase IgA1, que no es polimérica y carece de la cadena J, por lo que es inestable y susceptible de degradación por proteasas; esto y los bajos niveles de IgA e IgG que se unen a la superficie de la bacteria, evitan la activación de la respuesta inmune. La unión de los anticuerpos al receptor Fc en los leucocitos tiene una función inhibitoria y promueve la liberación de citocinas antiinflamatorias como IL-10 (Sánchez-Zauco *et al.*, 2010).

Estudios en ratones deficientes de linfocitos B que fueron inmunizados con una vacuna profiláctica desarrollaron gastritis y mostraron una respuesta similar a ratones no inmunizados. Además se han correlacionado los altos niveles de IgG e IgA anti-*H.pylori* en suero de pacientes, con el posterior desarrollo de gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico, por lo que la repuesta de anticuerpos no promueve protección (Chmiela *et al.*, 2017).

II.4.1. Mecanismos de evasión del Sistema Inmune

Helicobacter pylori establece una infección crónica con éxito logrando un delicado equilibrio entre la inducción de la respuesta inmune y la supervivencia en un entorno inflamatorio gracias a diversas maneras de evasión del sistema inmune (Taslima *et al.*, 2014).

En la respuesta innata inicial, los PAMPs, que son un grupo de moléculas de microorganismos patogénicos que en condiciones normales son reconocidos por PRRs, los cuales median la activación de la respuesta inflamatoria. *H. pylori* poseen varios mecanismos que evaden su reconocimiento a través de los TLRs. El primero es cambiando y reestructurando la capa de lipopolisacárido (LPS) y la flagelina; y el segundo es mimetizando molecularmente los grupos antigénicos de Lewis presentes en las células epiteliales humanas con componentes bacterianos. La fagocitosis de la bacteria y la quimiotaxis de las células inmunes al sitio de la infección se ve desfavorecida al no poder ser estimulada la producción de



interleucina 8 (IL-8) mediada por el reconocimiento por los PRRs (Cadamuro *et al.*, 2015).

Otro mecanismo es la evasión de la muerte fagocítica mediante el retardo en la polimerización de la actina y la inhibición de la formación del fagosoma y fagolisosoma (Aziz *et al.*, 2014). Estudios previos han encontrado que el LPS de *H. pylori* disminuye la regulación de los primeros mecanismos de respuesta inmune desatados por el hospedero como la fagocitosis y la actividad celular proporcionada por las NK (del inglés, natural killer) (Richter *et al.*, 2016).

La inmunidad adaptativa se afecta mediante la presentación de antígenos por inducción de apoptosis de macrófagos y por disminución de la maduración de macrófagos y células dendríticas (Mnich *et al.*, 2015). La expresión de la glicoproteína de muerte celular programada 1 ligando-1 (integrina B7-H1) en células gástricas ha mostrado una modulación de la movilización de linfocitos T durante la infección causada por *H. pylori*. La función de B7-H1 es inhibir linfocitos T efectores y estimular las células dendríticas a incrementar la secreción de la citoquina antiinflamatoria 10 (IL-10). B7-H1 por unión al receptor de muerte programada 1 de la superficie de células T inhibe la proliferación y diferenciación de linfocitos T vírgenes y promueven la actividad de células regulatorias, las cuales disminuyen la regulación de linfocitos T efectores.

Por otra parte las células T reguladoras, las cuales poseen la habilidad de suprimir la respuesta antitumoral y antiinfecciosa muestran un aumento en tejidos gástricos donde existe tumor gástrico. Este tipo de linfocito suprime la proliferación de células T y producción de Interferon gamma (IFN)- γ inducido por *H. pylori*. Además estos linfocitos T reguladores incrementan los niveles de expresión de I-selectina y el receptor 4 de quimoquina C-C, lo que hace que disminuya su función regulatoria. Estos receptores pueden estar involucrados en la infiltración de linfocitos regulatorios específicos a antígenos de *H. pylori* presentes en tejido gástrico infectado. Por otra parte la baja actividad de los linfocitos regulatorios puede promover el mantenimiento de la infección y promover la propagación de las células tumorales (Das *et al.*, 2006).



II.5. Diagnóstico

Existe una variedad de pruebas diagnósticas para la identificación de *H. pylori*, sin embargo, ninguna puede ser aplicada por si sola como referencia para el diagnóstico de la bacteria (Lopes *et al.*, 2014). Para el diagnóstico de *H. pylori* se cuenta con las pruebas invasivas y no-invasivas. Las pruebas invasivas son aquellas que se realizan por vía endoscópica, permitiendo valorar la presencia de *H. pylori*, determinar el grado de compromiso de la mucosa gástrica y obtener muestras de ella, estas incluyen el estudio histopatológico, la prueba rápida de la ureasa y el cultivo (Kanna *et al.*, 2013).

Las pruebas no-invasivas son aquellas que no implican la necesidad de realizar endoscopia, permiten estimar la ausencia o presencia de infección activa por *H. pylori*, realizándolo de modo directo o por la detección y respuesta de anticuerpos contra la infección que pueden ser sugestivos o no de infección activa (Frías *et al.*, 2017), siendo estas la serología, la prueba del aliento a urea y la prueba de antígenos fecales (Kanna *et al.*, 2013). Por último, se encuentran los métodos moleculares, que permiten detectar a *H. pylori* a partir de muestras biológicas obtenidas de modo invasivo, como una muestra de tejido gástrico, o también de modo no-invasivo como muestras obtenidas de la cavidad oral o de materia fecal y por lo general estas suelen realizarse de forma no-invasiva (Frías *et al.*, 2017).

II.6. Inmunoprofilaxis

La erradicación de *H. pylori* con antibacterianos requiere de la asociación de múltiples fármacos, lo que se asocia al mal cumplimiento de la terapia por parte del paciente y desarrollo de resistencia antimicrobiana por parte del patógeno. Por otra parte, la eficacia inconsistente de los antimicrobianos, fármacos que no son accesibles en la mayoría de la población, costos para su uso en gran escala, efectos adversos y el riesgo de reinfección, hacen recomendable el desarrollo de una vacuna.



Actualmente los inmunoprolácticos están elaborados a partir de antígenos involucrados en la patogénesis de la infección, como las proteínas VacA, CagA, HP-NAP, ureasa, HP0231, adhesinas (BabA y SabA), o bien son lisados bacterianos unidos a la toxina colérica como adyuvante y se han probado en animales, previniendo la infección experimental. Sólo algunas vacunas se han probado en humanos, sin embargo no confieren la protección adecuada. También se han empleado adyuvantes como el hidróxido de aluminio, con lo cual se genera una vacuna prometedora. Esta última formulación induce la respuesta de células T con la producción de IFN- γ , MIP-2, CXCL5, y CXCL1, las cuales favorecen el reclutamiento de los neutrófilos en el estómago, siendo estas últimas muy importantes en la erradicación de *H. pylori*. Como la respuesta de anticuerpos específicos no es suficiente para la protección contra *H. pylori*; se requiere también una respuesta celular efectiva. Recientemente se han usado oligonucleótidos CpG sonicados como vacunas, los cuales inducen una fuerte respuesta sistémica y local de tipo Th1 (Sánchez-Zauco *et al.*, 2010).

Por otro lado es notable el avance en la búsqueda de candidatos vacunales contra *H. pylori*. Ejemplo de ello lo tenemos en la nueva vacuna recombinante oral desarrollada por el grupo de trabajo liderado por el Dr. Quan-Ming Zou de la Universidad Médica Militar Tercera en Chongqing, China. Esta vacuna utiliza una subunidad B de ureasa fusionada con una subunidad de enterotoxina B termolábil. Hasta el momento el ensayo se encuentra en fase tres y ha mostrado una eficacia de un 72% (Quan-Ming *et al.*, 2015).

II.7. Tratamiento

En la actualidad no existen medicamentos exclusivos para erradicar la infección por *H. pylori* (Chey *et al.*, 2017). Desde hace décadas se dispone de los mismos antibióticos: bismuto, amoxicilina, tetraciclina, claritromicina, metronidazol furazolidona (Shiotani *et al.*, 2017). Más recientemente quinolonas (levofloxacin, sitafloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin) y rifamicinas (rifampicina y rifabutina) (Graham *et al.*, 2016). Los consensos más recientes coinciden en que el tratamiento

Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de Curcuma longa frente a Helicobacter pylori



debe durar 14 días (Otero *et al.*, 2015) excepto los que contienen rifabutina, que pueden ser de 10 días (Gisbert *et al.*, 2017). La eficacia mínima exigida es 90% y ningún esquema es 100% eficaz, por lo cual se debe disponer de tratamientos de segunda, tercera línea, y de rescate o salvamento. La tabla 1 muestra un resumen de las líneas de tratamiento y los tipos de terapias. En la actualidad ya no se recomienda la terapia secuencial (Malfertheiner *et al.*, 2017).

Tabla 1. Líneas de tratamiento y tipos de terapias empleadas en la erradicación de la infección por *Helicobacter pylori*.

PRIMERA LÍNEA		
Terapia Clásica	AMX+CLA+IBP	No usar cuando la prevalencia de la resistencia a claritromicina es mayor de un 15%
Terapia Concomitante	AMX+CLA+MTZ+IBP	Tres antimicrobianos
Terapia Cuádruple	TET+MTZ+BIS+IBP	Dos antimicrobianos + sales de bismuto
SEGUNDA LÍNEA		
Terapia Cuádruple	TET+MTZ+BIS+IBP	Dos antimicrobianos + sales de bismuto
Terapia con Fluoroquinolonas	LEV+AMX+IBP	
TERCERA LÍNEA		
Terapia Cuádruple	TET+MTZ+BIS+IBP	Dos antimicrobianos + sales de bismuto
Terapia con Rifabutina	RFB+AMX+IBP	

Leyenda: Amoxicilina (AMX), claritromicina (CLA), metronidazol (MTZ), tetraciclina (TET), levofloxacina (LEV), rifabutina (RFB), bismuto (BIS) e inhibidor de la bomba de protones (IBP).

Terapia cuádruple clásica. Este es el esquema más antiguo con buena eficacia (Dore *et al.*, 2016). Su eficacia mínima esperada es de 95%, independientemente del nivel de resistencia al metronidazol (Lu *et al.*, 2013). La principal dificultad es la



cantidad de tabletas. Tratamientos de 7-10 días y resistencia a metronidazol mayor a 30%, disminuyen la eficacia a menos de 90% (Gisbert *et al.*, 2017).

Terapia híbrida. Consta de dos fases consecutivas de 7 días (Graham *et al.*, 2017). En los primeros 7 días: IBP + amoxicilina en dosis estándar u optimizadas (3 o 4 veces al día) más IBP dos veces al día y en la última semana los medicamentos de la primera semana más dos antibióticos adicionales, usualmente claritromicina (500 mg) + Metronidazol/Tinidazol (500 mg), ambos dos veces al día. Su eficacia es de 97% (Hsu *et al.*, 2011). Cuando hay resistencia combinada a claritromicina y a metronidazol superior al 9% (resistencia dual), la eficacia es menor al 90% (Lu *et al.*, 2013).

Terapia concomitante. Es recomendada porque la resistencia dual (simultánea) para claritromicina y metronidazol, no es frecuente (Furuta *et al.*, 2010). De esta manera, el metronidazol eliminará *H. pylori* resistente a claritromicina y al contrario, este eliminaría, las resistentes a metronidazol. Cuando hay resistencia dual, la eficacia disminuye notablemente (Ducoumau *et al.*, 2016). La eficacia global se encuentra entre un 88-90% (Shiotani *et al.*, 2017).

II.7.1. Esquemas de tratamiento

Los esquemas para erradicar *H. pylori*, se construyen con los antibióticos clásicos, en diferentes combinaciones y dosis asociados a altas dosis de inhibidores de la bomba de protones (IBP) (Gisbert *et al.*, 2017).

Tratamientos de primera línea. Es el tratamiento que se brinda por primera vez e idealmente debería basarse en pruebas de susceptibilidad, por cultivo o por pruebas moleculares (Gisbert, 2014). Cuando se basa en la susceptibilidad a los antibióticos, es superior al empírico, con eficacia de 94,7% versus 71,9% (Park *et al.*, 2017). Sin embargo, el cultivo y las pruebas moleculares no están disponibles en todas partes y por lo tanto, lo usual es dar tratamientos empíricos (Otero *et al.*, 2015). La elección



de una terapia empírica, debería tener en cuenta el patrón de resistencia local a los antibióticos.

Cuando la resistencia a claritromicina es menor de 15%, se recomienda utilizar este antibiótico en terapia triple de 14 días (Marcus *et al.*, 2015). Si es mayor a 15%, se debería adicionar bismuto dos veces al día o reemplazarla por Levofloxacina (Malfertheiner *et al.*, 2017). Si la resistencia a esta última es mayor al 20%, igualmente se puede adicionar bismuto, para construir una terapia cuádruple.

Con este perfil de resistencia, la recomendación sería adicionar subsalicilato de bismuto, dos tabletas, dos veces al día, a las terapias triples de 14 días con esos antibióticos. Otras terapias elegibles son la terapia cuádruple clásica con bismuto, terapias híbridas o terapias concomitantes. Las terapias cuádruples con bismuto no necesitan pruebas de susceptibilidad (Malfertheiner *et al.*, 2017).

Tratamientos de segunda y de tercera línea. Cuando fracasa el tratamiento de primera línea, el de segunda línea, se elige con cualquiera de los esquemas que no tengan los antibióticos utilizados en el inicial. Así mismo, también se eligen los tratamientos de tercera línea. Otras terapias alternas pueden ser la cuádruple clásica, concomitantes o híbridas (Gisbert *et al.*, 2017)

Tratamientos de rescate. Estos tratamientos son de cuarta línea, cuando tres tratamientos previos han fallado (Malfertheiner *et al.*, 2017). Los antibióticos para estos esquemas son furazolidona o rifabutina (Shiotani *et al.*, 2017). La furazolidona es un inhibidor de la mono amino oxidasa, altamente eficaz contra diversos microorganismos, es económico, pero disponible en muy pocos países. Se utiliza en terapias cuádruples con bismuto con amoxicilina o tetraciclina más IBP (Lu *et al.*, 2013). La rifabutina es un derivado de la rifamicina-S, frecuentemente utilizado para tratar el “complejo *Micobacterium avium intracelular*” en pacientes con infección por VIH. Tiene excelente actividad *in vitro* contra *H. pylori*. Es un medicamento costoso, no disponible en todas partes. Produce efectos adversos en el 22% de los pacientes tratados, siendo el más temido, la mielotoxicidad (leucopenia y trombocitopenia), por lo cual es necesario un cuadro hemático al final del tratamiento (Gisbert *et al.*, 2012).

II.7.2. Resistencia microbiana

En cada país o región es necesario investigar esquemas de tratamiento y elegir los de mayor eficacia independientemente de los consensos o guías internacionales o de los metaanálisis (Suzuki *et al.*, 2012). Estos últimos incluyen trabajos de países con diferentes patrones de resistencia de *H. pylori* incluso diferente perfil de metabolismo de los IBPs (Prazeres *et al.*, 2002). Además, no todos los estudios incluidos han evaluado la susceptibilidad pre-tratamiento a los diferentes antibióticos, un requisito exigido en las investigaciones sobre tratamiento de *H. pylori* (González *et al.*, 2002).

La resistencia bacteriana es la principal causa del fracaso de las terapias antimicrobianas. La baja adherencia también es una causa de fallas en la erradicación (Chuah *et al.*, 2011). La resistencia de *H. pylori* puede ser: primaria o natural, que se define como la incapacidad intrínseca del antibiótico para erradicar la infección desde el primer tratamiento y secundaria o adquirida, que se desarrolla después de un tratamiento con un antibiótico al cual la bacteria era sensible. La resistencia desarrollada por *H. pylori* se debe esencialmente a mutaciones cromosomales y se transmite en forma vertical por poblaciones bacterianas resistentes a la descendencia, con un aumento progresivo de la resistencia.

Las fluoroquinolonas, macrólidos e imidazoles, tienen resistencia cruzada con los de la misma clase (Martínez *et al.*, 2014). El aumento progresivo de la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos ha determinado que en la actualidad la eficacia de las terapias triples es de 60-70%, comparado con un 90% o más en el pasado (Kuo *et al.*, 2012).

Los nitroimidazoles, como el metronidazol, son activados al ingresar en la célula por la enzima NADPH nitrorreductasa, los transforma en intermediarios imidazoles que ocasionan daños estructurales en el ADN, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular. La resistencia a nitroimidazoles involucra dos genes



denominados *rdxA* y *frxA*. El gen *rdxA* codifica para una NADPH nitrorreductasa insensible al oxígeno, dona electrones y activa al metronidazol. El gen *frxA* codifica para la NADPH flavinoxidorreductasa y contribuye en la activación del metronidazol en el interior celular. Las mutaciones que inactivan el gen *rdxA* originan codones de parada o sustituciones que hacen a la proteína disfuncional. En algunos casos, el gen *frxA* promueve la aparición de resistencia y en otros se presenta mutando junto con el gen *rdxA* (Martínez *et al.*, 2014).

La amoxicilina es una penicilina semisintética que inhibe la síntesis de la pared bacteriana ocasionando un desequilibrio osmótico y lisis bacteriana. La resistencia se presenta por mutaciones de las proteínas ubicadas en la superficie de la membrana celular (PBPs, del inglés penicillin binding proteins). La mutación PBP1A presenta mayor afinidad por el fármaco y al manifestarse afecta su efectividad antibiótica. La mutación S414R sola puede ocasionar fenotipos resistentes. Otras mutaciones informadas son la S402G, E406A, S417T, T555S, N561Y, S542R, T540I y I562V (Ortiz *et al.*, 2006).

La claritomicina es un macrólido sintético que inhibe la síntesis de proteínas bacteriana al unirse a la subunidad ribosomal 50s e inhibe la translocación del ARN de transferencia que se utiliza en la síntesis de polipéptidos. La resistencia a claritromicina se presenta por mutaciones puntuales en el gen *rrn* 23S que codifica para el ARNr 23S. Las mutaciones responsables de 90% de los casos de resistencia se producen por sustitución de la adenina por citosina o guanina en la posición 2142 (A2142C o 2142G) o de una adenina por una guanina en posición 2143 (A2143G), otras mutaciones son menos frecuentes como la A2143G.

Las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteica bacteriana uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma e inhiben la unión de los aminoácidos a la cadena polipeptídica en formación. La mutación puntual en el gen *rrn* 16S codifica para el ácido ribonucleico ribosomal 16S de la subunidad 30S e impide la unión del aminoacil ARN de transferencia. Las mutaciones se encuentran en la tripleta de



bases adenina, guanina, adenina en las posiciones 926 a la 928 (AGA 926- 928) del gen *rrn* 16s en la llamada caja C. Las mutaciones en las posiciones 965 a 967 que codifica para la proteína de flujo TetA (P) disminuye la afinidad del antibiótico (Zullo *et al.*, 2011).

Las fluoroquinolonas actúan inhibiendo las topoisomerasas bacterianas. La topoisomerasa IV y la topoisomerasa II o Girasa del ADN compuesta de dos subunidades A y dos B codificada por el gen *gyrA*. La girasa del ADN ayuda a remover el superenrollamiento del ADN al inicio de la replicación y mantiene la estructura helicoidal del ADN. Las quinolonas detienen la replicación del ADN porque inhiben la subunidad A de la girasa del ADN en la región determinante de resistencia a quinolonas QRDR (del inglés Quinolone Resistance Determining Region) y las mutaciones de esta región originan resistencia a levofloxacin. Las mutaciones en el gen *gyrA* en las posiciones 91 (Asp91Gly, Asn, Ala o Tyr), 87 (Asn87Lys) y 88 (Ala88Val) (Martínez *et al.*, 2014).

II.8 *Curcuma longa* L.

La Cúrcuma como es más ampliamente conocida pertenece al Reino: *Plantae*, División: *Magnoliophyta*, Clase: *Liliopsida*, Subclase: *Zingiberidae*, Orden: *Zingiberales*, Familia: *Zingiberaceae*, Género: *Curcuma*, Especie: *C. longa* Linn. Mundialmente se conoce también por otros nombres como yuquilla (amarilla), turmérico, jengibrillo, entre otros (Clapé y Alfonso, 2011).

Es una planta perenne de casi un metro de altura, con rizomas subterráneos aromáticos, amarillo brillante en su interior, de los cuales se extrae la cúrcuma. Las hojas son grandes, anchas y con pecíolos largos verde claro. Las flores amarillas se agrupan en espigas basales con brácteas violáceas. El fruto es capsular, globoso, con semillas ovoides y ariladas (Figura 1) (Clapé y Alfonso, 2011). Esta planta tiene una distribución en países tropicales y subtropicales pero



principalmente crece en la India y el Sudeste Asiático (Kwiecien *et al.*, 2019) y en nuestro país es frecuente en el centro y oriente de Cuba (Clapé y Alfonso, 2011).

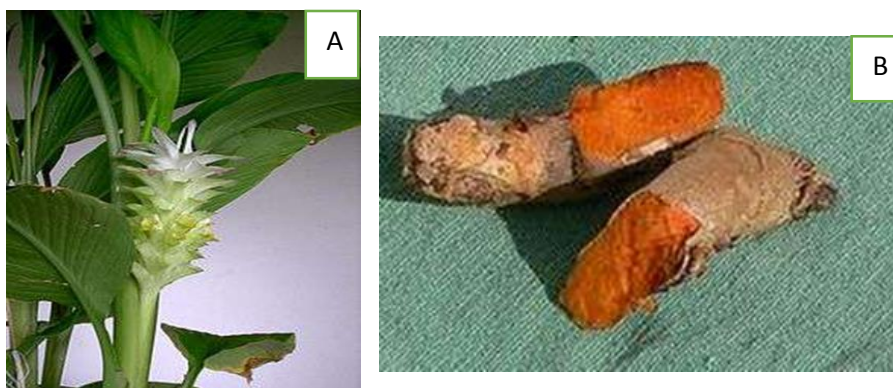


Figura 1. *Curcuma longa* L. Planta en su habitat natural (A); Rizoma de la planta (B).

Las raíces de la planta son utilizadas para la extracción de un polvo amarillento el que contiene fundamentalmente el polifenol natural curcumina (ácido turmérico), además de un aceite esencial en el parénquima cortical, rico en sesquiterpenos (turmerona, atlantona y curcumenol), monoterpenos (borneol, alcanfor, terpineno, entre otros), así como hidrocarburos terpénicos (felandreno, sabineno, cineol y turmerol) (Clapé y Alfonso, 2011). La proporción de estos componentes (tanto en el aceite esencial como en la oleorresina) varía entre los rizomas frescos y secos: en los primeros aparecen mayormente turmerona aromática, α -turmerona y β -turmerona; en los segundos, turmerona aromática, α -santaleno y en menor proporción curcumeno aromático, α -turmerona, β -turmerona y burlona (Singh, 2010). Además, contiene almidón, goma, oxalato de calcio, así como proteasas (con alto contenido en alanina y glutamato) (Nagarathnam, 2010).

Estudios demuestran que aunque la principal fuente de curcumina es la *C. longa*, ha sido igualmente extraída de especies como *C. aromatica*, *C. phaecaulis*, *C. zedoaria*, *C. xanthorrhiza*, *C. mangga* dentro de un total de más de 120 especies identificadas (Basnet *et al.*, 2011). El extracto alcohólico obtenido de la Cúrcuma

está compuesto principalmente por tres polifenoles curcuminoides: curcumina I (diferuloilmetano), curcumina II (desmetoxi curcumina) y curcumina III (bisdesmetoxi curcumina) (Sarkar *et al.*, 2016). En Cuba Freire y colaboradores después de realizar un análisis fitoquímico de los rizomas de las plantas obtenidas obtuvieron que los mismos contienen un 5.9% de curcuminoides, estando de esta manera representados los tres tipos: curcumina I, curcumina II y curcumina III (Freire *et al.*, 2014).

El pigmento amarillo se utiliza comúnmente como agente colorante en las comidas, aunque tiene amplio uso en la medicina tradicional en el tratamiento de diferentes desórdenes como el reumatismo, esguinces, nariz mucosa, enfermedades epidérmicas, heridas, diarrea, dispepsia, fiebres intermitentes, desórdenes hepáticos, parásitos intestinales, descargas urinarias, niveles de azúcar en sangre, inflamación, estreñimiento, leucoderma, amenorrea e inflamación cólica (Kidd, 2009). Algunos estudios sugieren que la cúrcuma tiene diversas propiedades como antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, antiproliferativa, antifúngica y antimicrobiana (Sarkar *et al.*, 2016).

Varios de estos estudios internacionales refieren por ejemplo que la suplementación de curcumina muestra un efecto antiinflamatorio mediado por la supresión del gen NF- κ B p65 en el epitelio gástrico de modelos animales murinos (Sintara *et al.*, 2010) así como la disminución en la producción de mediadores inflamatorios como citocinas, quimoquinas, receptores tipo toll y MyD88 durante la infección por *H. pylori* (Santos *et al.*, 2015). Otro demuestra que la curcumina es más eficiente en el restablecimiento de los niveles diferentes tipos de metaloproteinasas que la triple terapia lo que destaca el gran potencial terapéutico de la curcumina (Kundu *et al.*, 2011). Otro estudio demostró que la permanencia en el estómago en el tiempo de microesferas de curcumina pudo erradicar completamente la infección por *H. pylori* (Ali *et al.*, 2014).



Los estudios realizados en nuestro país con la *C. longa* abordan su caracterización fitoquímica (Freire *et al.*, 2014), su actividad antiparasitaria contra el agente causal de la malaria (Fernández *et al.*, 2011); su actividad insecticida contra el género *Aedes* (Leyva *et al.*, 2008) pero no aquellos que refieran su actividad antimicrobiana ni antiinflamatoria. Debido a las actividades pleotrópicas del extracto y al riesgo de emergencia y prevalencia de cepas multidrogoresistentes en la comunidad resultaría de utilidad el estudio del extracto de *C. longa* frente a *H. pylori* que cursa con la colonización y destrucción de la mucosa epitelial y provoca el desbalance del estado redox.

Materiales y métodos

III. MATERIALES Y METODOS

III.1. Diseño general

Se realizó un estudio experimental durante el periodo de junio de 2018 a mayo de 2019, en los Laboratorios Nacional de Referencia de Neisserias y Helicobacter (LNRNH) y Biológicos-Farmacéuticos (LABIOFAM) pertenecientes al Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK). El estudio constituyó una tarea del proyecto Empresarial de LABIOFAM titulado “Desarrollo de formulación a partir de las propiedades de *Curcuma longa* L.” (código: L0512). La ausencia de claritromicina en polvo para realizar los estudios de combinación de drogas representó una limitación del estudio.

III.2. Recolección del material vegetal y preparación del extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa*

El rizoma de la planta *Curcuma longa* L. se colectó en la provincia de Pinar del Rio. La selección del material vegetal para la preparación posterior del extracto, se realizó teniendo en cuenta la clasificación de arborescencia del Jardín Botánico Nacional (número de registro: 9700178). Las plantas recolectadas se trasladaron para la Unidad de productos químicos, farmacéuticos y plásticos perteneciente a LABIOFAM en donde se preparó el extracto en su forma hidroalcohólica.

Para la preparación del extracto de cúrcuma, el material vegetal se secó a temperatura ambiente, se pulverizó y la extracción se realizó mediante maceración durante 7 días en etanol al 80 % según la Norma Ramal de Salud Pública 311. El líquido obtenido, se extrajo por decantación, se filtró en papel de filtro y se envasó en recipientes de vidrio. El solvente se eliminó por evaporación a presión reducida por 24 horas. Al momento de su uso el extracto seco se pesó y se diluyó en etanol 70% para obtener una solución hidroalcohólica a una concentración de 10 mg/mL. Esta solución se trasladó hacia el LNRNPH del IPK y se conservó a 4°C hasta su posterior evaluación. A partir de aquí se utilizará indistintamente los términos:



extracto de *C. longa* como se nombra la planta en latín y extracto de cúrcuma, como se conoce comúnmente.

III.3. Aislados de *Helicobacter pylori* y condiciones de cultivo

Para la evaluación del efecto antimicrobiano se seleccionaron 10 aislados provenientes de pacientes con síntomas gastroduodenales conservados a -80°C en caldo triptona soya más glicerol al 20% en el LNRNPH. La codificación de los aislados, los valores de susceptibilidad determinados en un estudio previo (Lei Fu, 2018) y las categorías interpretativas frente a los antimicrobianos se muestran en el anexo 1. De los 10 aislados incluidos, siete fueron resistentes a alguno de los antimicrobianos y tres fueron resistentes a como mínimo a tres familias de antimicrobianos (aislados MDR). La cepa de referencia *H. pylori* ATCC 43504 se incluyó en los diferentes estudios.

La aislados se sembraron en medio agar Columbia (Biolife, Italia), suplementado al 10% con sangre de carnero, 1% con suero fetal bovino (Biochrom, Alemania) y como suplemento inhibidor VCNT (vancomicina, colistina, nistatina y trimetropim) (Biolife). Posteriormente las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia (10% CO₂, 5% O₂, y 85% N₂) (sobres Campy Packs, Oxoid) en una jarra de 2,5L (Oxoid, Inglaterra) durante 72 horas a 37°C. Para la re-identificación de las colonias de *H. pylori* se realizaron las pruebas de la ureasa y coloración de Gram (Llanes *et al.*, 2010). Las suspensiones bacterianas se prepararon con una turbidez similar a la escala 3 de McFarland (1x10⁸ ufc/mL), en Caldo Cerebro-Corazón (Biolife, Italia), con suplemento enriquecedor Vitox (Biolife, Italia) e inhibidor VCNT (Biolife, Italia).

III.4. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media del extracto de *C. longa* frente a *H. pylori*

La evaluación del efecto antimicrobiano del extracto frente al cultivo en caldo Brucella estandarizado, preparado como se describió anteriormente, se realizó mediante el microensayo en placa de 96 pozos (Greiner BioOne, Alemania). Se

Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de Curcuma longa frente a Helicobacter pylori



adicionaron 50 μ L de la suspensión bacteriana de *H. pylori* disueltas en medio de cultivo de caldo Brucella a una placa de cultivo celular de 96 pozos de fondo plano en presencia de diluciones seriales dobles de la cúrcuma, en un intervalo de concentraciones entre 3.12 μ g/mL-200 μ g/mL, en un volumen final de 100 μ L. El dimetilsulfoxido (DMSO) como solvente se evaluó en condiciones similares al extracto. Las bacterias disueltas en ausencia de tratamiento representaron el control de crecimiento. Como droga de referencia se utilizó el antimicrobiano metronidazol con un intervalo de concentración de 2-256 μ g/mL. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C, posteriormente el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-25 difenil tetrazolio (MTT) (0,5 mg/mL) se adicionó a todos los pozos y las placas se incubaron por 3 horas adicionales. Luego del periodo de incubación, se adicionaron 80 μ L de DMSO y las placas se incubaron por 15 minutos adicionales.

La absorbancia se midió en un lector de placas de ELISA (Revelation Dynex Technologies, España) a 570 nm. Se utilizó como referencia la lectura a una longitud de onda de 630 nm. Con los valores de absorbancia determinados se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento partir de la ecuación: %inhibición= 100-(A₅₇₀ (BT)/ A₅₇₀ (BNT)) x100; donde BT es la bacteria tratada con el extracto y BNT la bacteria sin tratar con el extracto o el control. La evaluación se realizó empleando tres réplicas en cada caso y se realizaron tres ensayos. A partir de los valores de viabilidad celular para cada tratamiento, se determinó la CI₅₀ (concentración del extracto que reduce a la mitad el crecimiento bacteriano).

III.5. Evaluación in vitro de la combinación del extracto de *C. longa* y los fármacos convencionales frente *H. pylori*

La evaluación del extracto de cúrcuma en combinación con los antimicrobianos utilizados en la terapia de primera, segunda y tercera línea (metronidazol, levofloxacina y rifampicina) se realizó mediante el método de Tablero de Damas (Picazo, 2000). Para ello se seleccionaron dos aislados resistentes a metronidazol (9A, 31C), dos resistentes a levofloxacina (35C, 48A) y dos resistentes a rifampicina (12A y 20A) (Anexo 1). Las diluciones seriadas dobles desde 0 a 2 veces el valor de la CI₅₀ del extracto y la CMI del antimicrobiano se inocularon en una microplaca

Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de Curcuma longa frente a Helicobacter pylori



(Anexo 2) en condiciones similares a las descritas en el acápite anterior. Se calculó la fracción afectada (Fa) para cada tratamiento mediante la siguiente expresión: 100-porcentaje de células viables/100. Los valores de Fa se introdujeron en el software CompuSyn (Programa para la cuantificación de sinergismo y antagonismo en combinación de drogas, versión 1.0, ComboSyn, EE.UU) para la obtención del índice de combinación (IC) y el índice de reducción de la dosis (IRD). El $IC < 1$: sinergismo, $IC=1$ o muy próximo a 1: efecto aditivo y $IC > 1$: antagonismo. Mientras que el $IRD > 1$ y < 1 : favorable y no favorable reducción de las dosis, respectivamente, para $IRD = 1$: no existe reducción de las dosis (Chou, 2006). Los criterios para la evaluación del tipo de interacción farmacológica se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de la interacción farmacológica entre drogas combinadas según el índice de combinación

Rango del IC	Tipo de Interacción	Rango de IC	Fortaleza de la interacción
<0,9	Sinergismo	<0,1	Muy fuerte
	Sinergismo	0,1-0,3	Fuerte
	Sinergismo	0,3-0,7	NC
	Sinergismo	0,7-0,85	Moderado
	Sinergismo	0,85-0,88	Ligero
0,9-1	Aditividad	0,9-1	NC
>1	Antagonismo	1,1-1,2	Ligero
	Antagonismo	1,2-1,45	Moderado
	Antagonismo	1,45-3,3	NC
	Antagonismo	3,3-10	Fuerte
	Antagonismo	>10	Muy fuerte

Leyenda: IC: índice de combinación, NC: No se clasifica, IRD: índice de reducción de la dosis.

Adicionalmente, los resultados también se graficaron en forma de isoblograma (Anexo 3) construido a partir de los índices de combinación entre drogas según el programa CompuSyn. En el isoblograma el eje de las Y representa la dosis de



C. longa mientras que el eje X, la dosis del antimicrobiano. La interpretación de este gráfico se realizó de la manera siguiente: la zona bajo la línea diagonal que intercepta los dos extremos de ambos ejes representa el área de sinergismo, sobre esta línea la zona de aditividad y por encima de la línea de antagonismo. A continuación se detalla la definición de los términos empleados anteriormente.

Sinergismo: La actividad de las dos drogas combinadas es significativamente mayor que la adición de las actividades de los dos antimicrobianos separados.

Aditividad: La actividad de las dos drogas combinadas es la aproximadamente la suma de las actividades de los dos antimicrobianos separados.

Antagonismo: La actividad de las dos drogas combinadas es significativamente menor que la suma de las actividades de los dos antimicrobianos separados.

III.6. Estudio en macrófagos peritoneales

III.6.1. Obtención de macrófagos peritoneales

Para la obtención de los macrófagos (MØ) se emplearon ratones BALB/c machos de entre 30-35g / 8 semanas de nacidos previamente suministrados por el CENPALAB. Los ratones se colocaron en jaulas por grupos de 5-6 animales con acceso libre al agua, a los alimentos y bajo condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, temperatura de 25°C, humedad del 70%. Estos animales se adaptaron a su nuevo ambiente por más de 3 días antes de comenzar los experimentos.

Para favorecer el reclutamiento de MØ en la cavidad peritoneal de los ratones, 72 horas antes de la extracción celular, se inoculó vía intraperitoneal de 3-5 mL de caldo tioglicolato (BioCen, Cuba) al 3%. Transcurrido este periodo de tiempo, los animales se sometieron a la eutanasia por dislocación cervical según las normas internacionales establecidas (AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition). En la cavidad peritoneal se adicionaron 5 mL de medio de cultivo RPMI-1640 frío. La cavidad peritoneal distendida se masajeó durante varios segundos, se colectaron los MØ y se determinó la concentración celular por conteo en cámara de

Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de Curcuma longa frente a Helicobacter pylori



Neubauer. Las células se ajustaron a una concentración final de 1×10^6 células/mL en medio RPMI-1640 y se adicionaron 100 μ L por pozo en una placa de 96 pozos de fondo plano de cultivos celulares. Las células se incubaron por 2 horas en atmósfera de 5% CO₂ y al cabo de este tiempo se lavaron dos veces con medio RPMI-1640 suplementado con SFB 10% para remover las células no adherentes.

III.6.2 Determinación del efecto del extracto de *C. longa* sobre la viabilidad celular de macrófagos peritoneales

A las células adheridas se le adicionaron 50 μ L de medio RPMI-1640 en el cual se disolvió previamente el extracto en diluciones dobles seriadas para quedar a concentración final de 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/mL en el pozo. Las placas de 96 pozos se incubaron durante 24 horas. En paralelo, se utilizaron un grupo de células cultivadas en medio de cultivo en ausencia del extracto de cúrcuma como control de viabilidad, las cuales representaron el 100%.

Para determinar el efecto del extracto sobre la viabilidad de los macrófagos peritoneales se utilizó el ensayo del MTT. Con este objetivo se adicionaron 10 μ L de una solución estéril de MTT (5 mg/mL en PBS estéril) a cada pozo y se incubó bajo las mismas condiciones durante 3 horas. Al concluir este intervalo de tiempo, el medio se decantó cuidadosamente y se adicionó posteriormente 150 μ L/pozo de una solución de DMSO. Tras incubar nuevamente a 37°C durante 30 min, la absorbancia a 560 nm se midió utilizando un lector de microplacas (MRX Revelation Dynex Technologies, España). Se utilizó como referencia la lectura a una longitud de onda de 630 nm. Se emplearon 3 réplicas de cada concentración de extracto y se realizaron 3 ensayos. El porcentaje de viabilidad se calculó de la siguiente manera: $A_{570} (CT) / A_{570} (CNT) \times 100$; donde CT es la célula tratada con el extracto y CNT la célula sin tratar con el extracto o el control. Adicionalmente se calcularon los valores de CI₅₀ (concentración del extracto que reduce a la mitad la viabilidad celular) del extracto.



III.6.3 Determinación del efecto de *Helicobacter pylori* sobre la viabilidad celular de macrófagos peritoneales

Para los estudios en MØ se empleó la cepa de *H. pylori* ATCC 43504. Los MØ inmaduros se lavaron una vez con PBS 1X y se sembraron en placa de 24 pozos a una densidad de 5×10^5 células por pozo en 1mL de medio de cultivo. La biomasa de *H. pylori* se recuperó de las placas de cultivo con hisopo y se resuspendió en medio de cultivo celular con una densidad óptica de 0,1 a 600 nm que corresponde a 3×10^7 ufc/mL. La bacteria se añadió a los macrófagos con una multiplicidad de infección (MI) de 100:1, 50:1, 25:1, 5:1, 1:1 y los cocultivos se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas.

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de Rojo neutro (Repetto and Zuri, 2008). A cada multiplicidad se les añadió 200 µL del reactivo rojo neutro 0,1 mg/mL (Gibco, EE.UU) previamente diluido 1/80. La placa teñida se incubó durante 3 horas a 37°C con 5% CO₂. Transcurrido ese tiempo se adicionó una solución de fenol-calcio helado por 5 minutos para lograr la fijación del colorante durante y luego se incubó con 200 µL de ácido acético-etanol (v/v) durante 15 minutos. La absorbancia a 540 nm se midió utilizando un lector de microplacas (MRX Revelation Dynex Technologies). Se realizaron tres replicas y se incluyeron controles de crecimiento tanto para MØ como para la bacteria.

III.6.4. Determinación del efecto de la combinación de *C. longa* y *Helicobacter pylori* sobre la viabilidad celular de macrófagos peritoneales

Para la evaluación del efecto combinado del extracto de *C. longa* y la bacteria sobre macrófagos se procedió de manera similar al ensayo de combinación. En este caso se combinó el rango de concentraciones del extracto divididas en dos grupos, uno por encima de la CI₅₀ del con las diferentes MI evaluados previamente en una placa de cultivos celulares de 24 pozos. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de Rojo neutro. Los valores de absorbancia se utilizaron para calcular la Fa para cada tratamiento mediante la siguiente expresión: 100-porcentaje de



viabilidad/100. Los valores de Fa se introdujeron en el software CompuSyn para la obtención del índice de combinación (IC) y el índice de reducción de la dosis (IRD).

III.6.5. Determinación de cambios morfológicos por microscopía de contraste de fases

Los ensayos se realizaron en placas de 24 pozos de poliestireno fondo plano para cultivos celulares (Costar Corning, EE.UU). Después de la aplicación de los tratamientos, se observaron cambios morfológicos en el Microscopio IX-71 (Olympus Corporation, Tokyo, Japón). Las imágenes fueron capturadas utilizando la cámara DP-72 (Olympus Corporation, Tokyo, Japón).

III.6.6. Determinación del evento de apoptosis

El efecto de los tratamientos en la ocurrencia de la muerte celular por apoptosis se verificó mediante el empleo del colorante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), el cual tiñe el ADN nuclear, por ello es empleado para determinar el efecto, en la inducción de cambios morfológicos en el núcleo de las células producto de la ocurrencia de la muerte celular por apoptosis. Para investigar estos cambios morfológicos a los macrófagos peritoneales se les extrajo el medio de cultivo y se añadió a la placa 500 μ L de solución de fijación durante 2 minutos. Las placas se lavaron con agua destilada dos veces y posteriormente se añadieron 300 μ L del colorante DAPI (Sigma, EE.UU) a una concentración final de 1 μ g/mL. El análisis de las células apoptóticas se realizó por el empleo de un microscopio de fluorescencia (Olympus IX-71, Japón) empleando el filtro de 480 nm.

III.6.7. Efecto de *H. pylori* sobre el estado de activación de los macrófagos peritoneales

Se evaluó el efecto de *H. pylori* sobre la viabilidad, activación de los MØ y la expresión de los mediadores inflamatorios. Las bacterias a la MI evaluadas previamente se adicionaron al cultivo de macrófagos en presencia y ausencia del extracto de *C. longa*. Las placas se incubaron por 24 horas en atmósfera de 5% CO₂



a 37°C. Al cabo de este tiempo se colectó el sobrenadante y se almacenó a -20°C para la determinación de los niveles de óxido nítrico (ON) y citoquina IL-1 β .

Determinación de peróxido de hidrógeno. Una vez extraído el sobrenadante, a los macrófagos provenientes de los diferentes tratamientos contenidos en las placas de 96 pozos se les adicionará 100 μ L de una solución tampón (Anexo 4). Al cabo de 1 h de incubación a 37°C, se adicionarán 10 μ L de NaOH 1 M y se medirá la absorbancia a 620 nm en un lector de placas de ELISA. En este experimento se incluyó una curva de peróxido de hidrogeno con un intervalo de concentración desde 0 hasta 500 μ M. A partir del análisis de regresión lineal de la curva de H₂O₂ y la interpolación de los valores de absorbancia de cada tratamiento se calculó la concentración de peróxido de los tratamientos.

Determinación de ON. Los sobrenadantes provenientes de los macrófagos peritoneales expuestos a los diferentes tratamientos se ensayaron para la determinación de ON. Se tomaron 100 μ L de cada sobrenadante los que se mezclaron con una cantidad equivalente del reactivo de Griess (Anexo 5). Al cabo de 10 minutos de incubación la solución se leyó en un lector de placas de ELISA a 540 nm. En paralelo se empleó una curva estándar de nitrito de sodio (NaNO₂) con intervalo de concentración de 0 hasta 1mM.

Determinación de la citoquina IL-1 β en el sobrenadante de cultivo. El nivel de IL-1 β presente en el sobrenadante de cultivo de M $\emptyset$ se analizó mediante un estuche comercial ELISA (BD OptEIA™; BD Biosciences, San Diego, CA, USA) según recomendaciones del fabricante.



III.7. Análisis de los resultados

Los valores de CI_{50} del extracto se determinaron a partir de las curvas de concentración-efecto (DO_{600nm}/MTT) mediante el análisis de regresión sigmoideal. Los valores de absorbancia determinados en el ensayo de viabilidad celular se utilizaron en el cálculo del porcentaje de viabilidad utilizando la siguiente expresión; $\% = (abs_{tratados}/abs_{control}) \times 100$. Para los análisis estadísticos realizados, se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). En todas las variables se evaluó la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Levene. En los casos analizados en los cuales no existió distribución normal, ni homogeneidad de varianza, incluso después de las transformaciones de los datos, se aplicó el método no paramétrico Kruskal Wallis y las comparaciones múltiples se realizaron por la prueba de Dunn. Por otra parte, las diferencias en los niveles de expresión de H_2O_2 , ON y las citocinas en los diferentes tratamientos *in vitro* se realizó la prueba paramétrica ANOVA de dos vías (factor grupo de tratamiento) y como método de comparación múltiple la prueba de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

III.8. Consideraciones éticas en el uso de animales de experimentación

El protocolo experimental estuvo en concordancia con la Directiva 2010/63/ue del parlamento europeo y del consejo del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Directiva 2010/63 /ue). Se realizó en el área de aislamiento de vectores y riesgo biológico II del Bioterio, IPK. En el diseño de los experimentos con animales se siguió lo descrito en la guía internacional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (2011). El protocolo de esta investigación se aprobó por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de ética del IPK que incluye el Comité de Investigación y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) con el código **CEI-PK 72-18** (Anexo 6).

Resultados



IV. RESULTADOS

IV.1. Actividad antimicrobiana in vitro del extracto de *C. longa* frente a aislados de *Helicobacter pylori*

Como se observa en la tabla 3, el extracto de *C. longa* tuvo un efecto antimicrobiano frente a nueve de los 10 aislados clínicos de *H. pylori* evaluados. Los valores de concentración inhibitoria media de los aislados resistentes y MDR oscilaron entre 0,29-120 µg/mL. El aislado 20C, resulto ser resistente frente al extracto con un valor superior a los 100 µg/mL.

Tabla 3. Valores de Concentración Inhibitoria Media del extracto de *Curcuma longa* frente aislados de *Helicobacter pylori*.

Aislados [‡]	CI ₅₀ ± DE
9A	0,35 ± 0,13
12A	0,29 ± 0,02
14A [¥]	26 ± 4,08
20A [¥]	106 ± 8,2
20C [¥]	120 ± 2,83
31C	3,9 ± 0,01
35A	1,03 ± 0,16
39C	70 ± 9,80
48A	1,06 ± 0,05
58A	26 ± 3,18
ATCC 43504	40 ± 4,55

Leyenda: [‡]Código del LNRNP, CI₅₀: Concentración Inhibitoria Media, DE: desviación estándar, [¥] aislados multidrogaresistentes. Los resultados son la media ± DE de tres experimentos independientes



IV.2. Efecto antimicrobiano combinado del extracto de *C. longa* y los antimicrobianos en aislados de *Helicobacter pylori*

Al evaluar el efecto de la combinación del extracto de *C. longa* con los antimicrobianos obtuvimos para cada aislado 36 valores de índice de combinación e índice de reducción de la dosis (Anexo 7). La combinación de *C. longa* con metronidazol y rifampicina frente a los aislados 9A y 12A resultó ser antagónica, interacciones que en 9A se calificaron como fuerte antagonismo. En este mismo aislado, cuatro de los puntos que mostraron sinergismo coincidieron con el valor de CMI para metronidazol (256 µg/mL) combinado con un intervalo de concentraciones del extracto de *C. longa* de 0,175 a 0,021 µg/mL (Figura 2). El comportamiento de los aislados 48A y 35A fue interesante pues solo se observó sinergismo con la CMI para levofloxacina (32 µg/mL) y bajas concentraciones del extracto.

Numerosas interacciones sinérgicas se obtuvieron en los aislados 20A y 31C a partir de la combinación entre el extracto con la rifampicina y el metronidazol, respectivamente. Ambos aislados también mostraron en estas interacciones los valores superiores de índice de reducción de la dosis para ambos productos llegando a ser en el orden de los $4,15 \times 10^{14}$ veces menos el valor de la CMI de rifampicina (Anexo 7).

Todos los aislados estudiados mostraron efecto sinérgico, como se observa en los puntos internos del isoblograma, de manera independiente al antimicrobiano empleado. Para rifampicina y metronidazol por ejemplo se observó gran sinergismo y antagonismo con valores inferiores a la CMI del antimicrobiano. Es importante resaltar el comportamiento positivo de la combinación de rifampicina con *C. longa* del aislado MDR 20A, pues en el paciente portador de este aislado este antimicrobiano constituye la única alternativa de tratamiento. El comportamiento homogéneo solo se observó para levofloxacina con concentraciones bajas del extracto de *C. longa*, hecho que resulta alentador para este antimicrobiano utilizado en la segunda línea de tratamiento.

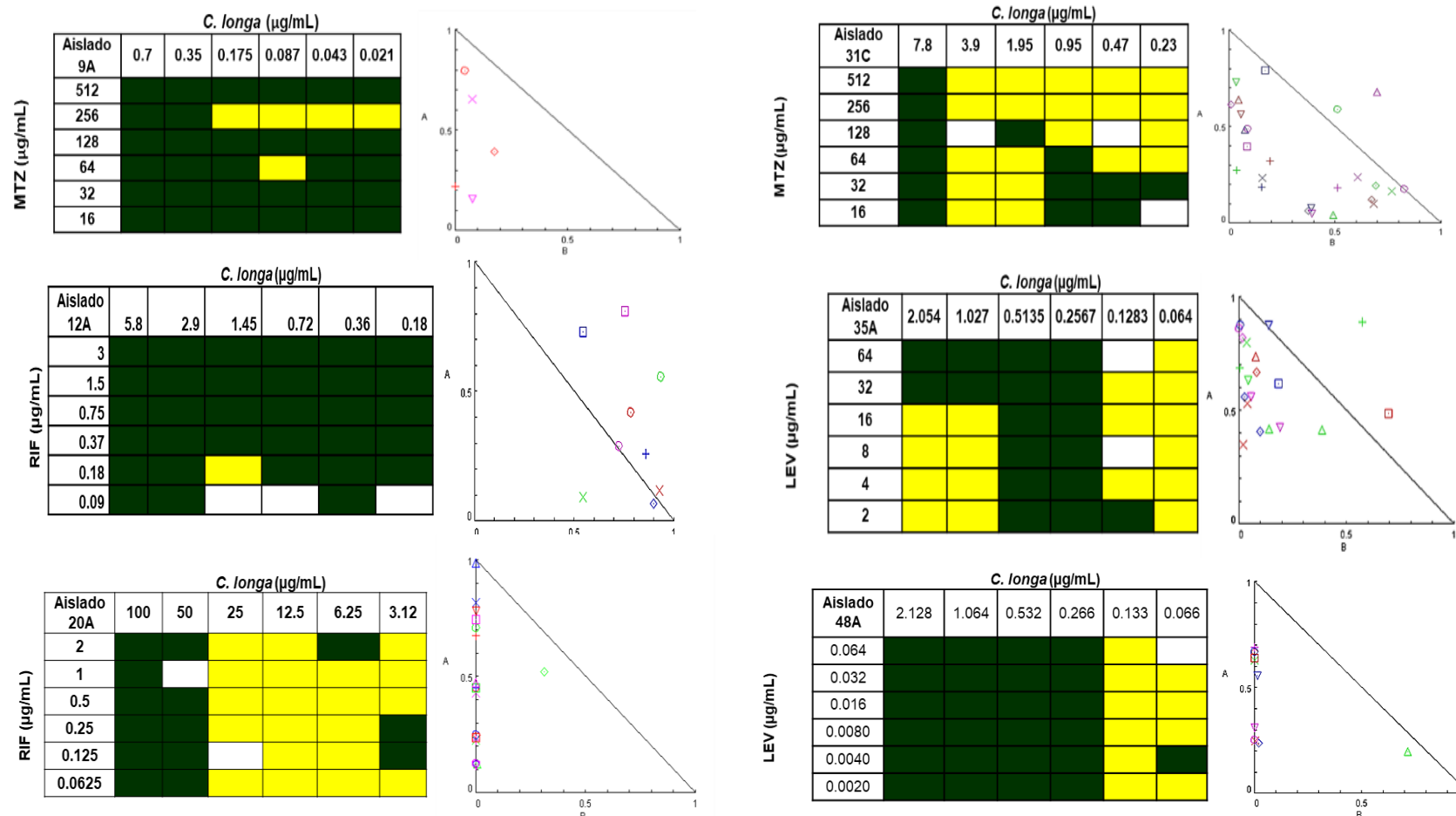


Figura 2. Imágenes representativas del ensayo de Tablero de Damas y el Isoblograma obtenido con el programa CompuSyn versión 1.0 para la evaluación del efecto combinado entre *C. longa* y los antimicrobianos frente a los aislados de *Helicobacter pylori* 9A, 12A, 20A, 31C, 35A y 48A. La zona verde representa la combinación con efecto antagónico, la zona blanca con efecto aditivo y la zona amarilla el sinérgico. A la derecha del esquema se grafica el isoblograma cuyo eje de las Y representa la dosis de *C. longa* mientras que el eje X la dosis del antimicrobiano. La zona bajo la línea diagonal que intercepta los dos extremos del eje representa el área de sinergismo, sobre esta línea la zona de aditividad y por encima de la línea de antagonismo.



La tabla 4 muestra los mejores valores de combinación y de reducción de la dosis del extracto de *C. longa* y los antimicrobianos empleados frente a los seis aislados de *H. pylori* evaluados. Se observó sinergismo, que incluso en algunos fue fuerte, con valores de reducción de la dosis de ambos compuestos que oscilaron entre 1,83-28 287,30 veces el valor de la concentración del producto. El aislado 9A fue el que mostró los mejores valores de IRD de 4,57 y 28 287,30 veces la concentración del extracto de *C. longa* y metronidazol, respectivamente. Nótese además que el aislado 20A, resistente también al extracto, mostró el índice de combinación para rifampicina más bajo, con valores elevados de IRD para ambas drogas de 8,49 y 6 664,31 veces.

Tabla 4. Análisis de los índices de Reducción de la Dosis de las mejores combinaciones entre *C. longa* y los antimicrobianos frente a seis aislados de *Helicobacter pylori*.

Aislados	AMB	Mejor combinación de <i>C. longa</i> + AMB (µg/mL)	IC	Tipo y grado de interacción farmacológica	IRD <i>C. longa</i>	IRD AMB
9A	MTZ	0,175 + 256	0,219	Sinergismo fuerte	4,57	28 287,30
12A	RIF	0,145 + 0,187	0,638	Sinergismo	1,83	10,97
20A	RIF	3,12 + 1	0,118	Sinergismo fuerte	8,49	6 664,31
31C	MTZ	0,39 + 512	0,311	Sinergismo	3,65	6,44
35A	LVX	0,064 + 8	0,368	Sinergismo	2,87	49,45
48A	LVX	0,066 + 2	0,254	Sinergismo fuerte	3,95	800

Leyenda: AMB: antimicrobiano MTZ: metronidazol; RIF: rifampicina LVX: levofloxacina; IC: Índice de combinación; IRD: Índice de Reducción de la Dosis, IRD>1 se considera favorable y <1 se considera no favorable. Los valores de IC e IRD se generaron por el programa Compusyn 1.0. El tipo y grado de interacción farmacológica se estimó según Chou, 2006.

IV.3. Efecto individual del extracto de *C. longa* y *Helicobacter pylori* sobre la viabilidad de macrófagos peritoneales

El efecto del tratamiento individual del extracto de *C. longa* y de las multiplicidades de infección de *H. pylori* sobre la viabilidad de macrófago posterior a las 24 horas



de incubación se muestra en la figura 3. Solo a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ del extracto disminuye significativamente ($p < 0,001$) la viabilidad celular en comparación con las células controles tratadas solo con medio de cultivo (Figura 3A). Mientras que diferencias estadísticamente significativas se alcanzaron a partir de la relación de infección *H. pylori* / macrófago de 25:1, 50:1 y 100:1, respectivamente (Figura 3B). El valor de CI_{50} obtenido para el extracto de *C. longa* fue de $31 \pm 2,15$.

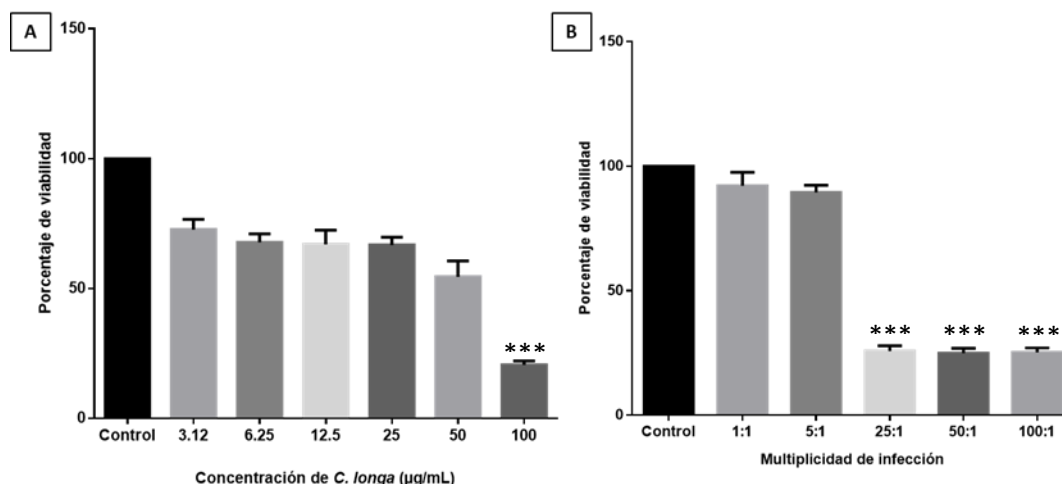


Figura 3. Efecto del extracto de *Curcuma longa* y de *Helicobacter pylori* sobre la viabilidad macrófagos peritoneales. Los gráficos muestran la media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de células viables de las células tratadas con diferentes concentraciones del extracto de *C. longa* (A) y diferentes multiplicidades de infección de la cepa *Helicobacter pylori* ATCC 43504 (B). El control representa las células con medio de cultivo. Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se realizó el análisis estadístico mediante el método no paramétrico Kruskal Wallis y las comparaciones múltiples por la prueba de Dunn. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,001$ (***). Se empleó el paquete estadístico de GraphPad versión 5.01.

En la Figura 4 se muestran los cambios morfológicos observados por microscopía de contraste de fase de los macrófagos peritoneales incubados durante 24 horas con los tratamientos en donde se observaron diferencias estadísticamente significativas, con respecto al control. En todas las células tratadas, se observó una



ruptura de la monocapa celular proporcional a la multiplicidad de infección y a la concentración del extracto de *C. longa*.

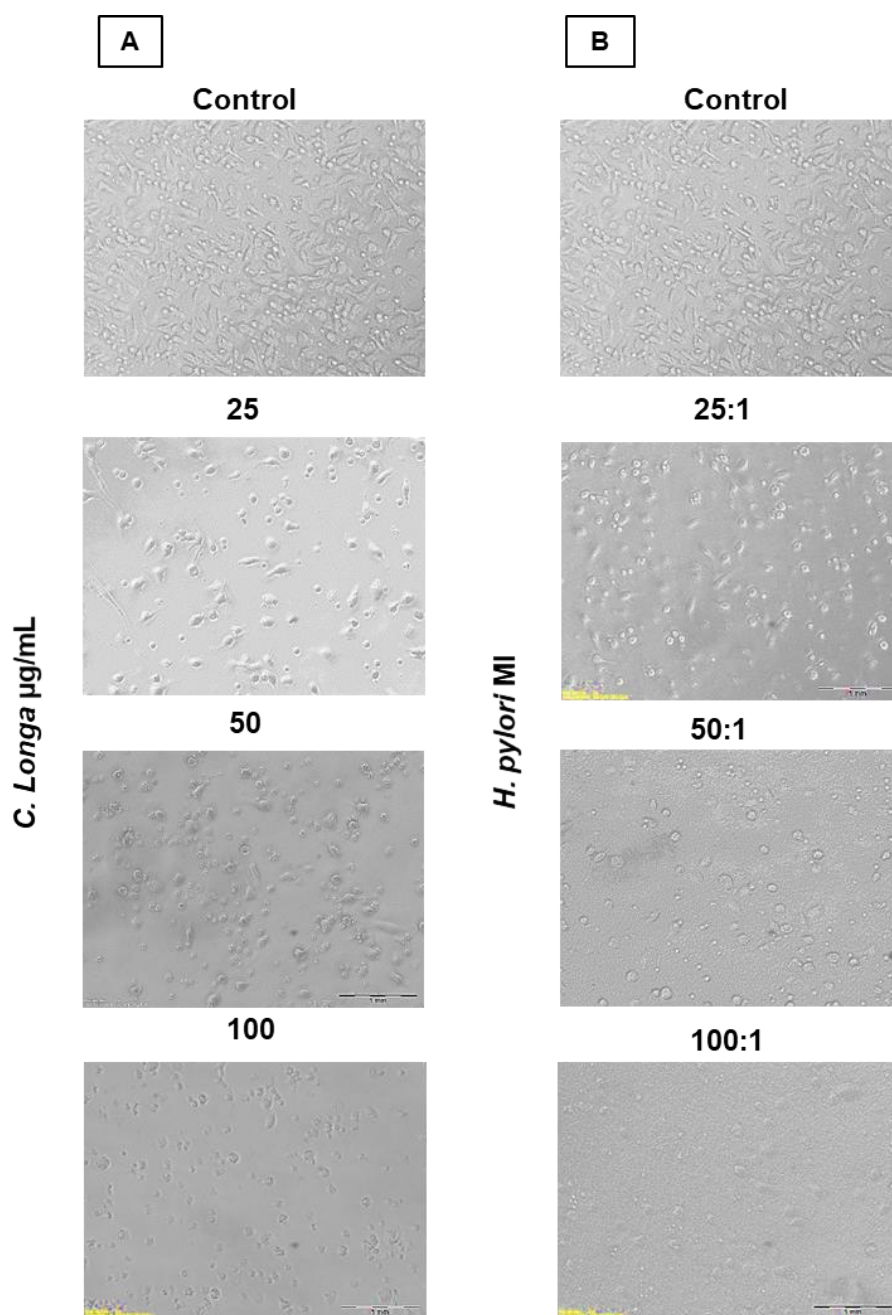


Figura 4. Cambios morfológicos inducidos por el extracto de *C. longa* y *Helicobacter pylori* sobre macrófagos peritoneales. Transcurridos 24 horas de incubación con diferentes concentraciones del extracto de *C. longa* (A) y diferentes multiplicidades de infección de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 (B). Las imágenes fueron capturadas utilizando la cámara DP-72 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Aumento 400X. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces.



IV.4. Efecto combinado del extracto de *C. longa* y *Helicobacter pylori* sobre la viabilidad celular de macrófagos peritoneales

La combinación de concentraciones del extracto inferiores a 12,5 $\mu\text{g/mL}$ con la relación de 25, 50 y 100 de *H. pylori* /macrófago, permitió mantener la viabilidad celular en aproximadamente el 70% (Figura 5A). Sin embargo, al combinar las más altas multiplicidades de *H. pylori* con concentraciones del extracto superiores a 25 $\mu\text{g/mL}$ se observó una pérdida de la viabilidad de macrófago similar al control celular inoculado con la bacteria (Figura 5B). Por lo tanto, concentraciones de *C. longa* entre 3,12-12,5 $\mu\text{g/mL}$ permitieron mantener la viabilidad de macrófago frente a una alta carga bacteriana.

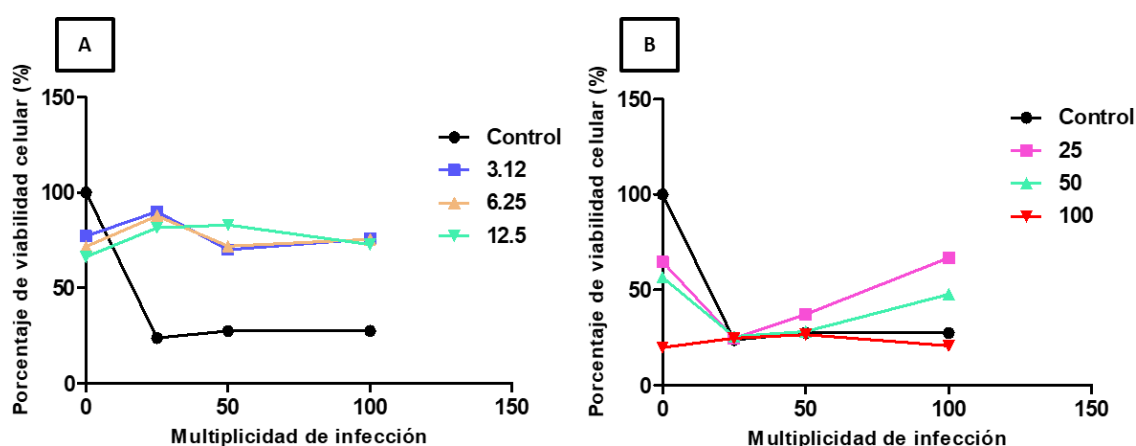


Figura 5. Efecto de la combinación del extracto de *C. longa* y *Helicobacter pylori* sobre la viabilidad de macrófagos peritoneales. Los gráficos muestran la media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de células viables tratadas con una multiplicidad de infección de *H. pylori* ATCC 43504 de 25:1, 50:1, 100:1 y la combinación con 3.12, 6.25 y 12.5 (A) y 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ (B) de *C. longa* en 24 horas. Como control se incluyó el porcentaje de viabilidad de macrófagos cocultivados con cada multiplicidad. Se realizaron tres experimentos independientes con 3 réplicas cada uno. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***). Se empleó el paquete estadístico GraphPad versión 5.01.



IV.5. Eventos de muerte celular inducidos por el tratamiento individual y combinado del extracto de *C. longa* y *Helicobacter pylori* sobre macrófagos peritoneales

Para determinar los efectos del tratamiento simple y combinado del extracto de *C. longa* y *H. pylori* sobre los eventos de muerte celular en macrófagos peritoneales, se empleó el marcador de núcleo DAPI mediante microscopía de fluorescencia. En la figura 6, se muestran las microfotografías de los tratamientos de macrófagos con valores superiores e inferiores a la CI_{50} del extracto, con las multiplicidades de infección *H. pylori*, así como la combinación de ambas. A diferencia de lo que ocurre en las células no tratadas, se detecta la presencia de núcleos con la cromatina altamente condensada y la formación de cuerpos apoptóticos (flechas amarillas), estos cambios morfológicos caracterizan a una muerte celular por apoptosis. Sin embargo, estas características se observan con menor intensidad cuando se incuban las células infectadas con altas multiplicidades (≥ 25) de con concentraciones del extracto superiores a 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de cúrcuma.

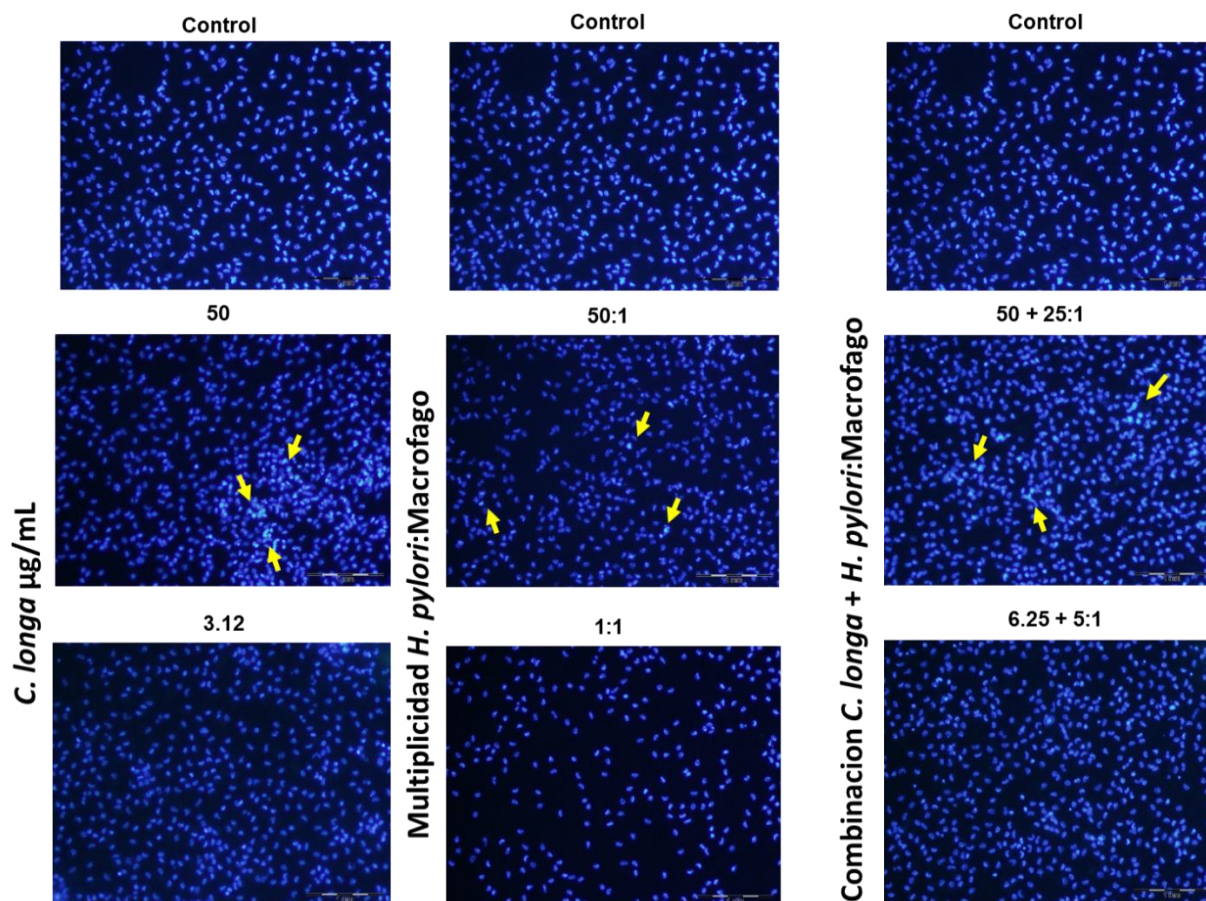


Figura 6. Marcaje con DAPI de los macrófagos peritoneales tratados con distintas concentraciones del extracto de *C. longa* y multiplicidades de infección de *Helicobacter pylori*. Los macrófagos se incubaron con los tratamientos durante 24 horas. Las flechas amarillas indican la presencia de células apoptóticas. Aumento 400x. Las imágenes fueron capturadas utilizando la cámara DP-72 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

IV.6. Efecto del extracto de *C. longa* y *Helicobacter pylori* sobre el estado de activación de los macrófagos peritoneales

El tratamiento de las células con el extracto de *C. longa* no estimuló la producción de peróxido de hidrógeno por el macrófago, cuyos valores fueron similares al del control (Figura 7A). Sin embargo, la producción de óxido nítrico resultó ser elevada frente a concentraciones del extracto inferiores a 12,5 µg/mL y superiores a 25 µg/mL (Figura 7C). Se observó un aumento de la concentración de peróxido de hidrógeno y óxido nítrico proporcional a la relación bacteria / macrófago con valores significativos a partir de 100 y 50 de multiplicidad de infección para H₂O₂ y ON, respectivamente (Figura 7B y 7D).

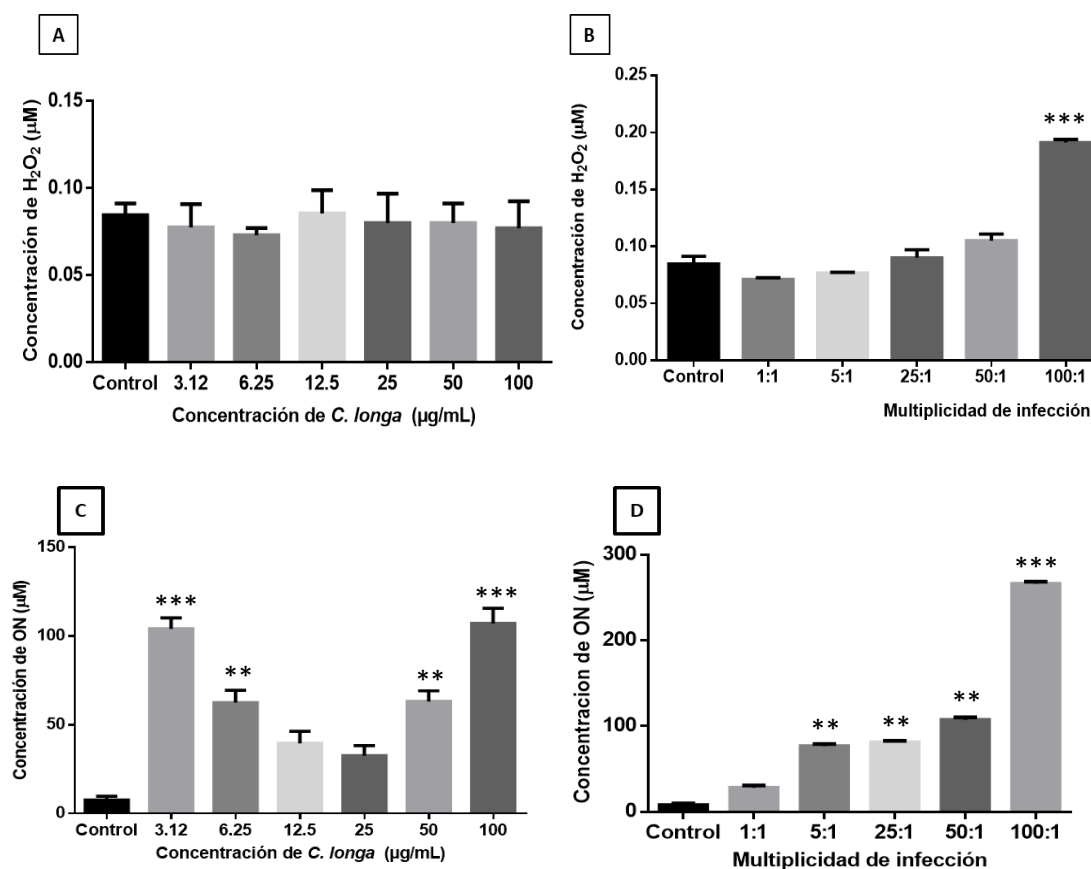


Figura 7. Efecto del extracto de *Curcuma longa* y de *Helicobacter pylori* sobre la producción de peróxido de hidrógeno y óxido nítrico en macrófagos peritoneales. Los gráficos muestran la media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de células viables de las células tratadas con diferentes concentraciones del extracto de *C. longa* (A, C) y diferentes multiplicidades de infección de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 (B, D). Gráficos A y B niveles de producción de H_2O_2 ; gráficos C y D niveles de producción de ON. El control representa las células con medio de cultivo. Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se realizó el análisis estadístico mediante el método no paramétrico Kruskal Wallis y las comparaciones múltiples por la prueba de Dunn. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***). Se empleó el paquete estadístico de GraphPad versión 5.01

Como se muestra en la figura 8, se observó una reducción en la producción de peróxido de hidrógeno celular a partir de la relación 50 bacterias / macrófago con la combinación de las diferentes concentraciones del extracto de *C. longa* (Figura 8A y 8B). El óxido nítrico se comportó de manera diferente, pues se constató la



disminución de la producción de este metabolito en un rango de concentración del extracto de 6,25-50 $\mu\text{g/mL}$ para todas multiplicidades de infección evaluadas (Figura 8C y 8D).

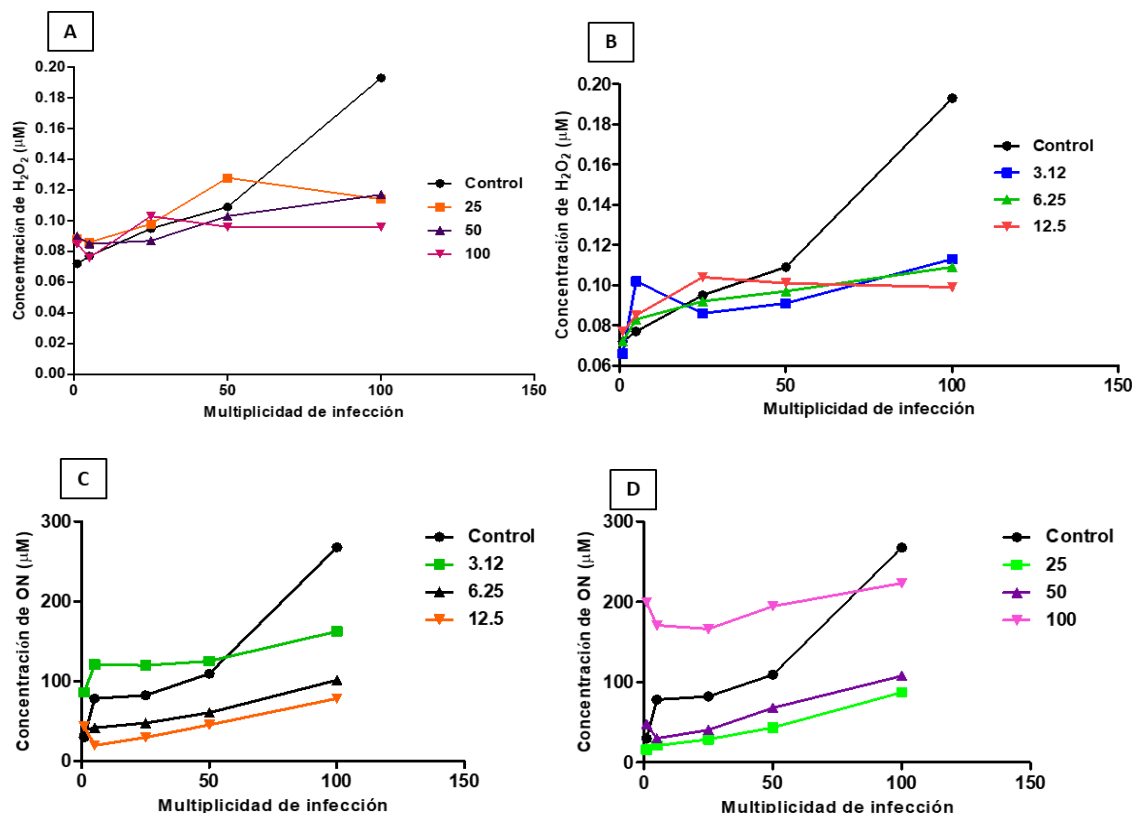


Figura 8. Efecto de la combinación del extracto de *Curcuma longa* y de *Helicobacter pylori* sobre la producción de peróxido de hidrógeno y óxido nítrico en macrófagos peritoneales. Los gráficos muestran la media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de células viables de las células tratadas con diferentes concentraciones del extracto de *C. longa* (A, B, C, D) y multiplicidades de infección de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 de 1:1, 5:1, 25:1, 50:1 y 100:1. Gráficos A y B niveles de producción de H_2O_2 ; gráficos C y D niveles de producción de ON. El control representa las células cocultivadas con *H. pylori*. Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se realizó el análisis estadístico mediante el método no paramétrico Kruskal Wallis y las comparaciones múltiples por la prueba de Dunn. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***). Se empleó el paquete estadístico GraphPad versión 5.01.

Al evaluar la producción de la IL-1 β se observó que frente al tratamiento con las diferentes multiplicidades de infección hubo una creciente producción de esta citoquina en el sobrenadante de cultivo celular no siendo así para el tratamiento con el extracto de la planta. En cuanto al efecto combinado hubo una disminución en la producción de IL-1 β cuando se



utilizaron las diferentes concentraciones de *C. longa* y las diferentes multiplicidades de infección (Figura 9B y 9A).

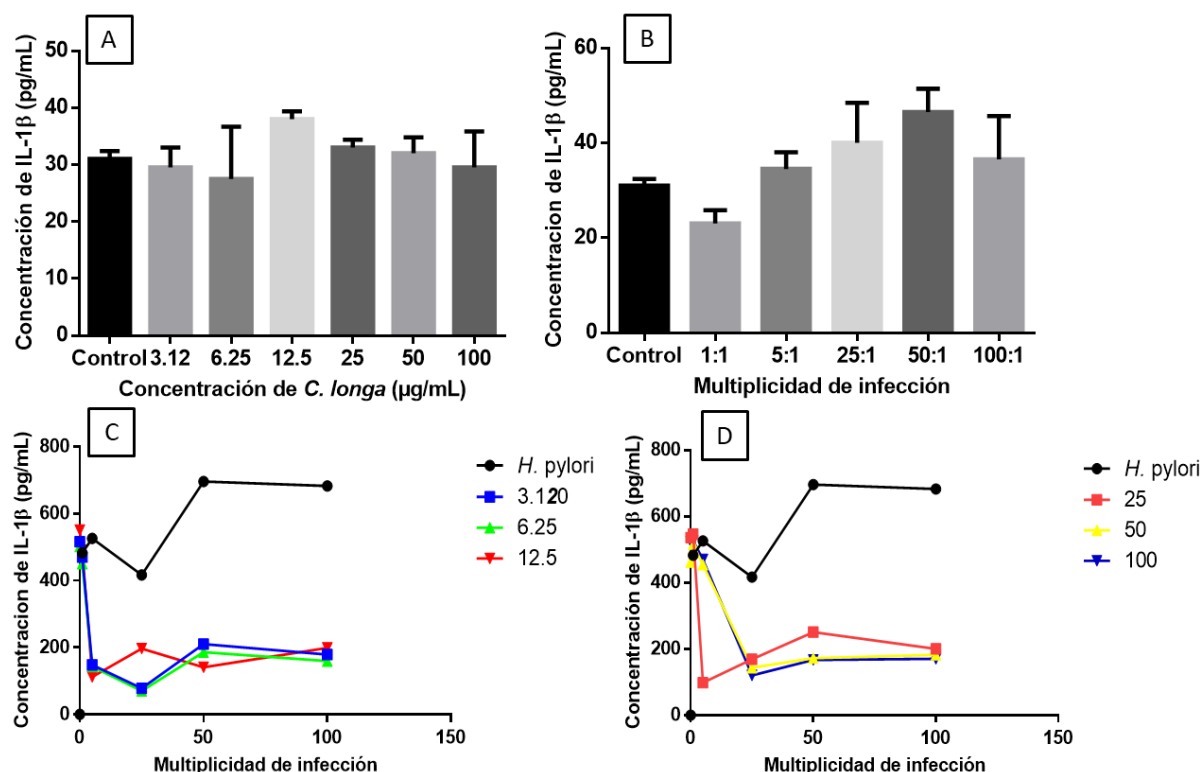


Figura 9. Efecto individual y combinado del extracto de *Curcuma longa* y de *Helicobacter pylori* sobre la producción de citoquina IL-1β en sobrenadante de cultivo de macrófagos peritoneales. Los gráficos muestran la media $\pm$ desviación estándar de la concentración de interleucina IL-1β con diferentes concentraciones del extracto de *C. longa* (A) y cocultivadas con diferentes multiplicidades de infección de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 (B). Los gráficos (C) y (D) muestran el efecto combinado de *H. pylori* y de *C. longa* sobre la producción de interleucina IL-1β. El control representa las células con medio de cultivo. Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se realizó el análisis estadístico mediante el método no paramétrico Kruskal Wallis y las comparaciones múltiples por la prueba de Dunn. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***). Se empleó el paquete estadístico de GraphPad versión 6.01

Discusión



V. DISCUSIÓN

La resistencia antimicrobiana reviste en la actualidad gran interés a nivel internacional (Otero *et al.*, 2018). La tasas de resistencia globales de *H. pylori* para metronidazol y claritromicina oscilan entre 26,7-17,2% siendo superiores en países en desarrollo comparado a países desarrollados. En un estudio reciente realizado en Cuba los aislados de *H. pylori* mostraron porcentajes de resistencia del 94,7%, 56,3%, 25% y 6,2% frente a metronidazol, levofloxacina, claritromicina y rifampicina, respectivamente (Fu, 2018). Además se identificaron aislados MDR con resistencia a drogas de segunda y tercera línea de tratamiento. En la actualidad un gran número de investigaciones se han enfocado a la adición de plantas medicinales al tratamiento convencional lo cual pudiera incrementar las tasas de erradicación (Aşkar y Deveboynu, 2018).

En el presente estudio se evaluaron las propiedades antimicrobianas individuales del extracto de *C. longa* frente a aislados clínicos de *H. pylori*. La literatura internacional recomienda que para que un extracto crudo sea considerado promisorio debe tener un valor de concentración inhibitoria por debajo de 100 µg/mL (Cos *et al.*, 2006, Gibbons, 2008). El extracto demostró un buen efecto antimicrobiano en 9 de 10 aislados resistentes y MDR evaluados con valores de concentración inhibitoria media entre 0,29-100 µg/mL. La sensibilidad mostrada por los aislados sugiere que la curcumina, principio activo del extracto, actúa por un mecanismo diferente a los antimicrobianos inhibiendo el crecimiento bacteriano. Dentro de estos mecanismos se encuentran: uno, la inhibición del ensamblaje dinámico de FtsZ (protofilamento bacteriano) el cual polimeriza anillos en forma de Z alrededor de la célula para favorecer la división celular (Rai *et al.*, 2008) y dos, a través de la inhibición de la enzima shikimate deshidrogenasa (SDH) que participa en la ruta de síntesis de aminoácidos aromáticos y folatos.



La ruta Shikimate como se denomina, no existe en humanos ni animales por lo que la SDH constituye una diana alternativa al tratamiento. La curcumina es un competidor no selectivo de la SDH y en *H. pylori* esta enzima es codificada por el gen *aroE* (Han *et al.*, 2006). Las variaciones en la concentración inhibitoria que se observa entre los aislados se deben a diferencias en la asimilación de cúrcuma por la bacteria y no a polimorfismos genéticos en el gen *aroE* (Patil *et al.*, 2018).

Por otro lado, uno de los aislados MDR (20C) fue resistente al extracto de *C. longa*. Esto pudiera estar dado por diferencias en la resistencia intrínseca al compuesto activo del extracto o por bajas concentraciones del compuesto con actividad antimicrobiana, debido a que los extractos son una mezcla de componentes químicos activos e inactivos.

No existen estudios previos en Cuba que evalúen la actividad antibacteriana de la *C. longa*. Una investigación previa que evalúa el extracto de cúrcuma aislado de hojas frente al parásito *Plasmodium falciparum* obtuvo concentraciones inhibitorias medias mayores de 100 mg/mL (Fernandez *et al.*, 2011). La evaluación en la India de 65 aislados de *H. pylori* arrojó un rango de concentraciones inhibitorias entre 5-50 µg/mL (Ronita *et al.*, 2009). Por su parte, Mahady y colaboradores, obtuvieron de la evaluación de la curcumina y del extracto hidroalcohólico de cúrcuma inhibición frente a 19 aislados de *H. pylori* (Mahady *et al.*, 2002). Aunque el extracto ha mostrado actividad antibacteriana persisten las diferencias en los valores de concentración de inhibición del producto. Las diferencias se deben a las variaciones en el contenido químico del extracto que dependen del método de extracción utilizado, del método de determinación de la actividad antimicrobiana, las dosis evaluadas, la procedencia geográfica de la planta así como el estadio en que se encuentra el desarrollo y la extracción del producto (Patil *et al.*, 2018).



El extracto de cúrcuma también ha sido evaluado frente a patógenos nosocomiales como *Echerichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* resistente, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Enterococcus faecalis* con valores superiores de concentración inhibitoria que oscilaron entre 4,87-78 mg/mL.

El uso de múltiples drogas permite accionar en blancos diversos, diferentes subpoblaciones o varias enfermedades al mismo tiempo. El empleo de varias drogas con modos de acción diferente puede también dirigir el efecto contra un blanco determinado y que su tratamiento sea más efectivo. El desarrollo favorable posible del sinergismo incluye; 1) incremento de la eficacia del efecto terapéutico, 2) disminución de la dosis manteniendo la misma eficacia y evadiendo la toxicidad, 3) minimizar o disminuir al mínimo el desarrollo de resistencia antimicrobiana, 4) suministrar el sinergismo selectivo contra el blanco terapéutico (eficacia del sinergismo) y no contra el hospedero (antagonismo tóxico). Por estos beneficios terapéuticos, la combinación de drogas ha sido ampliamente utilizada y se ha convertido en una alternativa principal en el tratamiento de las enfermedades más mortales tales como el cáncer y enfermedades infecciosas, incluyendo el sida (Chou, 2006).

Los primeros estudios de interacciones enfocados a la erradicación de la infección por *H. pylori* se centraron en combinación de macrólidos e inhibidores de la bomba de protones (IBP) (Malizia *et al.*, 1998). Los investigadores en dicho estudio, reportan la potenciación del efecto de los macrólidos en presencia de los IBP, lanzoprazol y omeprazol frente a 38 aislados de *H. pylori*. En un estudio posterior realizado por Chen y colaboradores al combinar los antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la infección por la bacteria encuentran sinergismo frente a claritromicina solo en los aislados de *H. pylori* susceptibles (Cheng *et al.*, 2015). Estos elementos resultaron decisivos para demostrar *in vitro* que la monoterapia no resultaba efectiva, no solo debido a la resistencia antimicrobiana sino también, producto a la ubicación de la bacteria en el mucus gástrico lo que hace más difícil que una simple droga ejerza su acción.

Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de Curcuma longa frente a Helicobacter pylori



La combinación de extracto *C. longa* frente a metronidazol, levofloxacin y rifampicina en el presente estudio mostró un efecto sinérgico en todos los aislados, con la particularidad que en dos aislados resultó ser solo a partir de la concentración mínima inhibitoria del antibiótico evaluado. En la literatura internacional no abundan reportes en los que se utilicen la cúrcuma en combinación con antimicrobianos frente a *H. pylori*. El más representativo es un estudio reciente *in vivo* con ratones Balb/c inoculados con *H. pylori* (Ranjbar y Mohammadi, 2018). En el mismo no se observaron diferencias en cuanto a los grupos de ratones tratados con curcumina y antimicrobianos de manera individual, pero si se observó sinergismo cuando se combinaron las drogas lográndose una reducción de los niveles de gastrina, IFN- γ y de enzimas que participan en la peroxidación lipídica en los animales.

La actividad antibacteriana combinada del extracto de cúrcuma ha sido explorada en otras bacterias resistentes. Sasidharan y colaboradores (2014), utilizan el método de tablero de damas y obtienen un sinergismo significativo de cúrcuma con cefalosporinas de tercera generación frente a bacterias asociadas a enfermedades diarreicas (Sasidharan *et al.*, 2014). Otros autores obtienen una reducción de la concentración mínima inhibitoria de oxacilina, ampicilina, ciprofloxacina y norfloxacina al evaluar estos antimicrobianos en combinación con la cúrcuma frente a aislados SARM (Mun *et al.*, 2013). Un estudio reciente realizado en un asilado de *E. coli* enterotoxigénica obtienen un efecto sinérgico al evaluar tres concentraciones de cúrcuma con 12 antimicrobianos por el método de difusión por disco (Rangel-Castañeda *et al.*, 2019).

En la actualidad, variados son los estudios que han demostrado los efectos sinérgicos de componentes de extractos de plantas con diferentes antimicrobianos frente a *H. pylori*, con una posible mejora en las tasas de erradicación (Judaki *et al.*, 2017). La evaluación del extracto acuoso de *Hibiscus sabdariffa* L. muestra



sinergismo con claritromicina y metronidazol frente a aislados de *H. pylori* con una reducción de la dosis 40 y 46 veces, respectivamente (Hassan *et al.*, 2016). Por su parte, la oleorresina de la planta *Pistacia vera* L. en combinación con levofloxacin con valores por debajo de la CMI del producto natural produce un efecto sinérgico al eliminar la formación de biofilm de aislados de *H. pylori* MDR (Lodovico *et al.*, 2019).

Los reportes anteriormente citados tiene en común que se realizan en aislados resistentes a los antimicrobianos utilizados en el tratamiento convencional. No obstante sería interesante evaluar los aislados de *H. pylori* susceptibles, teniendo en cuenta la posible reducción de las dosis del antimicrobiano a emplear en estos casos. Los mecanismos de sinergismo farmacológico se relacionan con la acción en múltiples dianas de la pared celular bacteriana, efectos farmacocinéticos y fisicoquímicos como por ejemplo, el mejoramiento de la solubilidad y biodisponibilidad del compuesto así como por acción en los mecanismos de resistencia.

En la fase aguda de la infección por *H. pylori* se desarrolla una gastritis mediada por los macrófagos. La mucosa normal de un adulto está poblada por pequeñas agrupaciones de estas células, hecho que se modifica durante la infección por la bacteria pues las proteínas de *H. pylori* inducen la circulación de monocitos que infiltran el epitelio gástrico. Además, el daño epitelial inducido por el microorganismo le permite entrar a la lámina propia y encontrar a los macrófagos. Esto demuestra que los macrófagos tiene una función importante en la defensa del hospedero frente a la infección por *H. pylori*. Ante la colonización bacteriana, los macrófagos responden secretando citocinas incluyendo IL-12p70 e IL-23 que estimulan la respuesta TH1 y TH2, respectivamente.

Para que esta infección por *H. pylori* persista, el microorganismo desarrolla varias estrategias de evasión que resisten la eliminación por el sistema inmunológico como



el retardo en la fagocitosis mediada por macrófago y la afectación de la presentación de antígenos por dichas células que inhibe el desarrollo de la respuesta TH1 y la secreción de IFN- γ . Dubois and Boren postulan que *H. pylori* es invasivo y que puede ser un organismo intracelular facultativo (Dubois y Boren, 2007). En Taiwán un grupo de investigadores demostró que *H. pylori* no solo se multiplica en macrófago sino también en células dendríticas y epiteliales (Ya-Hui *et al.*, 2009). Este nuevo descubrimiento tiene muchas implicaciones para el ciclo de vida de la bacteria en el hospedero pues incrementa su resistencia frente al tratamiento con antimicrobianos y evita el ataque inmune a través de anticuerpos humorales.

Los macrófagos proinflamatorios (M1) y antiinflamatorios (M2) desempeñan claramente papeles importantes en la progresión de varias enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, las terapias que apuntan a la polarización y función de los macrófagos ya sea bloqueando su tráfico a los sitios de inflamación, o sesgando la polarización del fenotipo M1 a M2 pueden ser promisorias en varias enfermedades inflamatorias (Krzyżek *et al.*, 2017).

Los polifenoles derivados de la dieta tienen potentes propiedades antioxidantes naturales. Dentro de este grupo de polifenoles, se ha demostrado que la curcumina suprime las respuestas inflamatorias de los macrófagos. La curcumina reduce significativamente las moléculas coestimulantes y también inhibe la activación de MAPK y la translocación de NF- κ B p65 (Patil *et al.*, 2018). Estos mecanismos explican la recuperación de la viabilidad de macrófago al combinar la bacteria a diferentes multiplicidades de infección con contracciones del extracto inferiores a 12,5 μ g/mL en la presente investigación.

La curcumina también puede polarizar / repolarizar macrófagos hacia el fenotipo M2. Los macrófagos tratados con curcumina han demostrado ser altamente eficientes en la captura de antígenos y en la endocitosis a través del receptor de



manosa (Krzyżek *et al.*, 2017). Estos nuevos hallazgos proporcionan nuevas perspectivas para la comprensión del papel inmunofarmacológico de la curcumina, así como su potencial terapéutico para impactar la polarización y función de los macrófagos en el contexto de la enfermedad relacionada con la inflamación. Sin embargo, los efectos precisos de la curcumina en la migración, diferenciación, polarización y funciones inmunoestimuladoras de los macrófagos siguen siendo desconocidos.

Similar a los resultados obtenidos en el presente estudio, otros autores reportan la muerte celular abrupta de monocitos y macrófagos causada por altas multiplicidades de infección de *H. pylori*. Dichos reportes plantean que ocurre a través de la activación de las vías Erk, arginasa II o la dependiente de mitocondria (Min *et al.*, 2015). También se ha reconocido la activación de la muerte celular mediante el mecanismo de autofagia la cual se caracteriza por la formación de vesículas "autofagosomas", que envuelven proteínas desnaturalizadas, orgánulos celulares, agregados de proteínas desintegrados y dañados. El contenido de autofagosomas es posteriormente vertido en lisosomas para su posterior degradación enzimática (Ya-Hui *et al.*, 2009). Sin embargo, un grupo de investigadores demuestran que la coinfección por *H. pylori* a baja multiplicidad de infección (10:1) de la línea de macrófago murino RAW264.7 provoca en estas células la supresión de la expresión de genes que codifican la síntesis de ADN y de moléculas asociadas al ciclo celular (Tan *et al.*, 2015). Esto explicaría porque en nuestro estudio las bajas multiplicidades (1:1 y 5:1) no afectan la viabilidad de macrófago.

Estudios recientes muestran buenos efectos en la prevención de la apoptosis con el empleo de bajas dosis de curcumina. La proporción de apoptosis temprana en los grupos tratados con dosis medias y altas de curcumina aumentó significativamente, mientras que la proporción de la apoptosis tardía disminuyó de manera significativa. El efecto de la curcumina en prevenir la transformación de los estadios de la apoptosis de tardía a temprana necesita aún ser investigada.



Es conocido que la sobreexpresión del gen p53 aumenta los niveles basales de la proteína P53, la cual representa la principal proteína reguladora de la apoptosis (Mirzayans *et al.*, 2012). La muerte celular inducida por P53 está asociada a la función de esta proteína como factor de transcripción, ya que por esta vía puede influir en la activación y sobreexpresión de genes apoptóticos como el caso de bax y la supresión de genes anti-apoptóticos como *bcl-2* (Mirzayans *et al.*, 2012; Ouyang *et al.*, 2012).

La medición de la apoptosis se realiza frecuentemente mediante microscopía de fluorescencia, que muestra imágenes de cuerpos apoptóticos y condensación de cromatina en comparación con células de control no apoptóticas (Saha *et al.*, 2013; Ansil *et al.*, 2014). Aunque los procesos celulares subyacentes son característicos de la apoptosis, la evidencia metodológica está limitada por la falta de cuantificación y análisis estadístico de un número suficiente de núcleos.

Debido a su alta especificidad y disponibilidad para la cuantificación, el colorante DAPI se ha convertido en el método de elección en la tinción de núcleos (Tarnowski *et al.*, 1991) por su capacidad para detectar significativamente modulaciones específicas de la morfología nuclear durante la apoptosis y, por lo tanto, proporciona una herramienta alternativa para la cuantificación experimental de la apoptosis en modelos de cultivos celulares. Las ventajas de la tinción de ADN nuclear con colorantes fluorescentes intercalantes de ADN (por ejemplo, yoduro de propidio, DAPI), para análisis de la morfología nuclear podrían proporcionar un método simple y de bajo costo para la detección de apoptosis. Además, el análisis de los cambios en la morfología nuclear muestra eventos apoptóticos de varias etapas sucesivas de apoptosis que comprenden etapas tempranas (por ejemplo, condensación de cromatina), así como etapas tardías y muy tardías de apoptosis (por ejemplo, encogimiento del núcleo y más tarde la formación de cuerpos apoptóticos) (Mandelkow y cols., 2017).



Los cuerpos apoptóticos son vesículas de tamaño pequeño de $<1.0 \mu\text{m}$ que contienen ADN cromosómico fragmentado por lo que parecen positivos después de la tinción con DAPI y están ausentes en las células no apoptóticas (Mandelkow y cols., 2017). Sin embargo, el DAPI es excluido en células que no son viables o que están implicadas en otros procesos de muerte celular distintos a la apoptosis. Uno de estos procesos de muerte celular controvertido es la catástrofe mitótica (Kobayashi *et al.*, 2017). En el campo de la biología de la irradiación (IR), la catástrofe mitótica se considera un modo importante de muerte celular inducida por IR que es diferente de otros mecanismos de muerte celular. Otros estudios argumentan que la catástrofe mitótica no es un modo distinto de muerte celular, sino un proceso que precede a la muerte celular, incluida la apoptosis y la necrosis (Vakifahmetoglu *et al.*, 2008; Imreh *et al.*, 2016). Por lo tanto, la apoptosis y la catástrofe mitótica pueden superponerse en cierta medida y el DAPI los mide como un solo evento pues comparten rasgos morfológicos reconocidos por este colorante (Kobayashi *et al.*, 2017). Por esta razón se debe ser cauteloso en la especificidad de los resultados y generalmente utilizar otros ensayos diseñados específicamente para cada modo de muerte celular para aumentar la solidez de las conclusiones experimentales (Kobayashi *et al.*, 2017).

El balance de utilización de oxígeno por el cuerpo se afecta cuando los animales se encuentran bajo estrés oxidativo, pues en estas condiciones aumenta la secreción de las especies reactivas del oxígeno (ERO). El exceso de ERO reacciona biológicamente con moléculas activas las cuales pueden causar daño oxidativo a las células y producir cáncer, enfermedades cardíacas e inflamación crónica. El mantenimiento y mejoramiento del estado oxidativo, especialmente a través de producto natural, son esenciales para el proceso fisiológico en animales.



Estudios recientes han propuesto al macrófago como un modelo apropiado para las investigaciones antioxidativas. Incluso estudios previos han demostrado que la virulencia de algunas bacterias es debido a su habilidad de inducir la muerte de macrófagos activados a través de la estimulación de la producción de ERO. Las ERO en exceso se convierten en peróxido de hidrógeno el cual difunde fácilmente a través de las membranas celulares y generan altas cantidades de radicales hidroxilos reactivos y tóxicos por la reacción de Fenton, vía de catalización del grupo hemo, que por último produce la muerte del macrófago. El macrófago es importante en la defensa del hospedero pues es el encargado de reconocer y eliminar patógenos microbianos. Por la importancia del macrófago en el sistema inmunológico y su vulnerabilidad a las ERO, la utilización de estas células como modelo de pesquisaje de drogas puede proveer una plataforma científica intuitiva para la búsqueda del efecto antioxidante de los productos naturales en el sistema inmunológico.

La curcumina, componente activo principal del extracto de *C. longa*, estructuralmente contiene grupos hidroxilos en la posición orto de anillos aromáticos que participan en la regulación de las enzimas de la fase 2 de detoxificación. Un estudio muestra que 10 μ M de curcumina puede disminuir los niveles de ERO en macrófagos peritoneales de ratas. De manera interesante, otro estudio observa un efecto dual de la curcumina sobre las ERO. Dosis medias y bajas de curcumina tienen un efecto contundente en la eliminación de ERO mientras altas dosis de curcumina intensifican la producción de ERO. Esto se debe a que la curcumina incrementa la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, responsables de la disminución de los niveles celulares de las ERO (Gobert *et al.*, 2016).

Una posible explicación a la disminución de los niveles de producción de H_2O_2 y ON con todas las concentraciones de extracto de *C. longa* excepto 25 μ g/mL puede deberse a la curcumina inhibe la activación del canal TRPM2 (del inglés, Transient

Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de Curcuma longa frente a Helicobacter pylori



receptor potential melastatin 2). Este es un canal no selectivo, permeable a cationes que se activa de manera directa mediante la ribosa adenosina difosfato e indirecta bajo condiciones de estrés oxidativo por la vía de formación de H_2O_2 (Kwiecien *et al.*, 2019), este canal responde frente a las ERO secretadas en sitios inflamatorios mediante la secreción de citocinas y quimoquinas esenciales en el control de la inflamación especialmente en tejidos mucosales. El impacto del canal TRPM2 en la producción de ERO y citocinas inflamatorias pudiera propiciar la colonización gástrica exitosa de la bacteria y el daño en el epitelio.

La apoptosis de macrófago puede ser inducida por numerosas moléculas efectoras, incluyendo el ON (Gobert y Wilson, 2016). Estudios *in vivo* demuestran que la mayor expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa ocurre en macrófagos, fuente fundamental de la enzima, por lo tanto la regulación de su producción modula los niveles de apoptosis de estas células (Gobert y Wilson, 2016). La enzima inducible óxido nítrico sintasa y la generación de ON son factores claves en la muerte de *H. pylori* en el interior del fagocito. La arginasa bacteriana, codificada por el gen *rocF* es utilizada por *H. pylori* como estrategia para disminuir la disponibilidad de L-arginina, que es necesaria para la producción de ON y por ende, regular el efecto antibacteriano de ON (Gobert *et al.*, 2000).

La muerte del macrófago contribuye a la inflamación mucosal mediante la liberación de citocinas proinflamatorias tales como la IL-1. Además, la pérdida de macrófagos activados es similar a la disminución de la respuesta inmunológica frente al patógeno. Esto pudiera limitar la inflamación bajo ciertas condiciones pero contribuiría a la imposibilidad del hospedero de eliminar la infección.

En el presente estudio se observó una disminución de la producción por macrófagos de IL-1 β , no estadísticamente significativa, al combinar las concentraciones del extracto con las diferentes relaciones de bacteria /macrófago. La curcumina reduce



la producción de citocinas iniciada por células T inducida por NF-B, incluyendo el tipo Th1, citocinas IL-2 e IFN, inhibiendo aún más la proliferación de linfocitos. Dicho compuesto, puede bloquear la diferenciación del subconjunto Th1 al suprimir en macrófagos la producción de IL-12, a la vez que mejora la proliferación de la subclase Th2 caracterizada por un mayor perfil de citocinas antiinflamatorias (Robinson *et al.*, 2017). Además, varios estudios han indicado tratamiento con curcumina aumenta la actividad fagocítica de los macrófagos. Sería útil en próximos estudios evaluar citocinas inflamatorias y antiinflamatorias.

Los ensayos preclínicos son fundamentales para la posible identificación y luego utilización de compuestos activos derivados de productos herbarios. La literatura internacional aboga por la necesidad de ensayos clínicos más controlados con estos productos. La curcumina es uno de los compuestos que ha sido evaluado combinado al régimen de la triple terapia mejorando el estrés oxidativo y los cambios histológicos en la gastritis asociada a *H. pylori* (Judaki *et al.*, 2017). En Cuba son escasos los estudios que evalúan las potencialidades medicinales de la planta *Curcuma longa* L. Hasta donde conocemos, este constituye el primer reporte que integra la evaluación del posible efecto antibacteriano, combinado con drogas convencionales y antiinflamatorio. A pesar de ser una especie introducida y adaptada a las condiciones climáticas del país, los resultados de la evaluación del extracto demuestran su potencial antibacteriano, antioxidante y antiinflamatorio.

Conclusiones



VI. CONCLUSIONES

- ✓ El extracto de *Curcuma longa* mostró potencialidades como antimicrobiano frente a la mayoría de los aislados clínicos de *H. pylori* resistentes y multidrogoresistentes, lo que lo convierte en una posible alternativa terapéutica frente a la emergencia de la resistencia de la bacteria.
- ✓ La combinación de drogas con el extracto vegetal *in vitro* propició un sinergismo fuerte en concentraciones mínimas inhibitorias del antimicrobiano así como una disminución de la dosis de ambos productos que posibilitará su utilización futura como complemento en el tratamiento frente a *H. pylori*.
- ✓ El tratamiento de los macrófagos peritoneales coinfectados por *H. pylori* con el extracto de *Curcuma longa* provocó una disminución de la citotoxicidad celular, hecho que resulta positivo para una mejor respuesta inmune innata.
- ✓ La disminución de la producción de especies reactivas del oxígeno en macrófagos peritoneales frente al tratamiento con el extracto de *Curcuma longa* fue evidente, lo que sugiere su uso como producto antioxidante.
- ✓ El tratamiento con el extracto de *Curcuma longa* disminuyó los niveles de producción de IL-1 β en macrófagos que se traduce en un efecto antiinflamatorio que propicia una mayor respuesta inmunológica frente a los mecanismos de persistencia de la infección por *H. pylori*.

Recomendaciones



VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Curcuma longa* en un mayor número de aislados de *H. pylori* sensibles y resistentes.
- ✓ Evaluar el efecto de la combinación de claritromicina con el extracto de *Curcuma longa* frente aislados de *H. pylori*.
- ✓ Determinar otros eventos de muerte celular mediante la detección de los niveles de expresión de genes relacionados con la apoptosis como *p53*, *bax* y *bcl-2*.
- ✓ Evaluar la secreción de otras citocinas en macrófagos peritoneales.

Referencias bibliográficas



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali MS, Pandit V, Jain M, Dhar KL. Mucoadhesive micro- particulate drug delivery system of curcumin against *Helicobacter pylori* infection: Design, development and optimization. J Adv Pharm Technol Res 2014;5:48-56. DOI: 10.4103/2231-4040.126996
- Andres S, et al. *Helicobacter pylori* defines local immune response through interaction with dendritic cells. FEMS Immunol Med Microbiol 2010;61(2):168-78.
- AŞKAR Ş, DEVEBOYNU ŞN. Investigation of In-Vitro Antibacterial Activity of Curcuma longa Commercial Extract. Eurasian JHS 2018;1(1):1-6.
- Aziz F, Chen X, Yang X, Yan Q. Prevalence and correlation with clinical diseases of *Helicobacter pylori* cagA and vacA genotype among gastric patients from Northeast China. Biomed Res Int 2014;142980.
- Basnet P, Skalko-Basnet N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. Molecules 2011;16:4567-4598. DOI: 10.3390/ molecules16064567
- Bernardini G, Braconi D, Santucci A. *Helicobacter pylori*: Immunoproteomics related to different pathologies. Expert Rev Proteomics 2007;4(5):680-688.
- Beswick EJ, Suares G, Reyes E. *H. pylori* and host interactions that influence pathogenesis. World J. Gastroenterol 2006;12(35):5599-5605.
- Buzas G.M. *Helicobacter pylori*. Orv Hetil 2015;156(6):203-10.
- Cadamuro AC, Rossi AF, Matos J, Fucuta P, Do EP, Acayaba R, Leite KR, Goloni EM, Silva AE. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on TLR2 and TLR4 expression in patients with gastric lesions. Mediators Inflamm 2015;481972.
- Cattoir V, Nectoux J, Lascols C. Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a gyrA polymorphism associated with hypersusceptibility. Int J Antimicrob Agents 2007;29(4):389-96.
- Cave. Epidemiology and Transmission of *Helicobacter pylori* Infection. How Is *Helicobacter pylori* Transmitted? Gastroenterology 1997;113:S9-S14.
- Cervantes E, García Rafael. *Helicobacter pylori* y la respuesta inmune. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab 2015;62(2):112-118
- Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. ACG clinical guideline: treatment of *Helicobacter pylori* infection. Am J Gastroenterol 2017;112(2):212-39.
- Chmiela M, Karwowska Z, Gonciarz W, Allushi B, Stączek P. Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer. World J Gastroenterol 2017;23(9):1521-1540. DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i9.1521>



- Chou TC. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol Rev* 2006;58(3):621–681.
- Chuah S-K, Tsay F-W, Hsu PI, Wu DC. A new look at anti- *Helicobacter pylori* therapy. *World J Gastroenterol* 2011;17:3971-3975.
- Clapé O, Alfonso A. Advances in the pharmacological and toxicological characterization of the herbal medicine *Curcuma longa* Linn. *MEDISAN* 2011;16(1):97
- Clyne M, OCroinin T, Suerbaum S, Josehans C, Drumm B. Adherence of isogenic flagella negative mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* to human and ferret gastric epithelial cells. *Infect. Immun* 2000;68(7):4335-4339.
- Comparative in vitro antimicrobial susceptibility and synergistic activity of antimicrobial combination against *Helicobacter pylori* isolates in Taiwan. Cheng A, Sheng WH, Liou JM, Wang HP, Wu MS, Lin JT. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2015;48:72-79
- Cos P, Vlietinck AJ, Bander Berghe D, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof-of-concept. *Journal of Ethnopharmacology* 2006;106:290–302. Doi:10.1016/j.jep.2006.04.003
- Das S, Suarez G, Beswick EJ, Sierra JC, Graham DY, Reyes VE. Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: its potential role in regulating T cells during *Helicobacter pylori* infection. *J Immunol* 2006;176:3000-3009.
- De R, Kundu P, Swarnakar S, Ramamurthy T, Chowdhury A. Antimicrobials activity of Curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(4):1592-1597.
- Dore MP, Lu H, Graham DY. Role of bismuth in improving *Helicobacter pylori* eradication with triple therapy. *Gut* 2016;65(5):870-8.
- Dubois A, Boren T. *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cell Microbiol* 2007;9:1108-16
- Ducoumau A, Bénéjat L, Sifré LE, Lehours P, Mégraud F. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in 2014 in France detected by phenotypic and genotypic methods. *Clin Microbiol Infect* 2016;22(8):715-8.
- Fernández A, Mendiola J, Acuña D, Caballero Y, Scull R, Gutiérrez Y. Actividad antimalárica y citotoxicidad de extractos hidroalcohólicos de seis especies de plantas usadas en la medicina tradicional cubana. *Rev Cub Med Trop* 2011;63(1):52-7.
- Figueiredo C, Machado J, Yamoaka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2005;10(1):14-20.
- Frías JS, Otero W. Aspectos prácticos en métodos diagnósticos para la infección por *Helicobacter pylori*: una revisión narrativa. *Rev. gastroenterol. Perú* 2017;37(3).



- Fu L. Diagnóstico y resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori*. Instituto de Gastroenterología, abril-septiembre 2018 [tesis de maestría]. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri; 2018.
- Fuentes E, Carmolina M, Maldonado C. Infección, inflamación y cáncer gástrico. Salud pública de México 2009;51(5):427-433.
- Furuta T, Graham DY. Pharmacologic aspects of eradication therapy for *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol Clin North Am 2010;39(3):465-80.
- Gibbons S. Phytochemicals for Bacterial Resistance – Strengths, Weaknesses and Opportunities. Planta Med 2008;74:594–602
- Gisbert JP, Calvet X. Review article: rifabutin in the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2012;35(2):209-21.
- Gisbert JP, McNicholl AG. Optimization strategies aimed to increase the efficacy of H.pylori eradication therapies. Helicobacter 2017;22(4):e12392.
- Gisbert JP. Enfermedades relacionadas con la infección por *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Hepatol 2014;37(Supl. 3):42-52.
- Gobert A, Daulouede S, Lepoivre M, Boucher J, Bouteille B, Buguet A, Cespuglio R, Veyret B, Vincendeau P. L-Arginine Availability Modulates Local Nitric Oxide Production and Parasite Killing in Experimental Trypanosomiasis. Infection and Immunity 2000;68(8): 4653–4657
- Gobert AP, Wilson KT. The Immune Battle against *Helicobacter pylori* Infection: NO Offense. Trends in Microbiology 2016;24(5):366-376
- Gonzalez C, Figueredo C, Ferreira R, Pardo M, Ruiz J, Alonso P *et al.* *Helicobacter pylori* cagA y vacA genotypes as predictors of progression of gastric preneoplastic lesion: A Long-Term Follow-up in a high-risk area in Spain. Am J Gastroenterol 2011;1.
- González C, Jiménez C. *Helicobacter pylori*, un modelo de bacteria carcinogénica. Rev Esp Med Quir 2010;15(4):242-51.
- González E, Pérez-Pérez GI, Alani-Aguilar O, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza HJ, Bosque-Padilla FJ. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated from northeastern Mexico. J Chemother 2002;14:342-345.
- González RA, Vistel M. Caracterización fitoquímica de la Curcuma longa L. Rev. Cubana Quím. 2015;27(1):9-18.
- Graham DY, Dore MP. *Helicobacter pylori* therapy: a paradigm shift. Expert Rev Anti Infect Ther 2016;14(6):577-85.
- Graham DY, Fagoonee S, Pellicano R. Increasing role for modified bismuth containing quadruple therapies for *Helicobacter pylori* eradication. Minerva Gastroenterol Dietol. H 2017;63(2):77-9.



Referencias bibliográficas

- Hardbower DM, Asim M, Luis PB. Ornithine decarboxylase regulates M1 macrophage activation and mucosal inflammation via histone modifications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114: E751-E760.
- Hassana S, Berchova K, Majerova M, Pokorna M, Svajdlenkaa E. In vitro synergistic effect of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract in combination with standard antibiotics against *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Pharmaceutical Biology* 2016;54(9):1736–1740
- Hsu PI, Wu DC, Wu JH, Graham DY. Modified sequential *Helicobacter pylori* therapy: proton pump inhibitor and amoxicillin for 14 days with clarithromycin and metronidazole added as a quadruple (hybrid) therapy for the final 7 days. *Helicobacter* 2011;16(2):139-45.
- Ieni A, Barresi V, Rigoli L, Fedele F, Tuccari G, Caruso. Morphological and cellular features of innate immune reaction in *Helicobacter pylori* gastritis: A brief review. *International Journal of Molecular Sciences* 2016;17:109
- Judaki A, Rahmani A, Feizi J, Asadollahi K, Hafezi M. Curcumin in combination with triple therapy regimes ameliorates oxidative stress and histopathologic changes in chronic gastritis–associated *Helicobacter pylori* infection. *Arq Gastroenterol* 2017[ahead of print]
- Kanna S, Maradey-Romero C, Fass R. Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Endosc News*. 2013;11(Special edition):51-8.
- Krzyżek P, Gościński G. Frequency and immunological consequences of *Helicobacter pylori* and intestinal parasite co-infections: A brief review. *Annals of Parasitology* 2017;63(4):255–263.
- Kundu P, De R, Pal I, Mukhopadhyay AK, Saha DR, Swarnakar S. Curcumin alleviates matrix metalloproteinase-3 and -9 activities during eradication of *Helicobacter pylori* infection in cultured cells and mice. *PLoS One* 2011;6:e16306. DOI: 10.1371/journal.pone.0016306
- Kuo CH, Kuo FC, Hu HM, Liu CJ, Wang S, Chen YH, et al. The optimal First –Line Therapy of *Helicobacter pylori* Infection in Year 2012. *Gastroenterology Research and Practice* 2012.
- Kwiecien S, Magierowski M, Majka J, Ptak-Belowska A, Wojcik D, Sliwowski Z et al. Curcumin: A Potent Protectant against Esophageal and Gastric Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:1477. Doi:10.3390/ijms20061477
- Larussa T, Leone I, Suraci E, Imeneo M, Luzza F. *Helicobacter pylori* and T helper cells: Mechanisms of immune escape and tolerance. *Journal of Immunology Research* 2015;1-10.
- Lin, W et al. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B lymphocytes, the origin of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer Res* 2010;70(14):5740-8.
- Llanes R, Feliciano O, Gutiérrez O, Gala A, Valdés L, Capó V, et al. Nuevos conocimientos sobre el diagnóstico y la resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* en Cuba. *Revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba* 2014;2(4):1-9.
- Lodovico S, Napoli E, Campli E, Fermo P, Gentile D, Ruberto G. *Pistacia vera* L. oleoresin and levofloxacin is a synergistic combination against resistant *Helicobacter pylori* strains. *Scientific Reports* 2019;9:4646

Evaluación del efecto antimicrobiano y antiinflamatorio del extracto de Curcuma longa frente a Helicobacter pylori



- Lopes AI, Vale FF, Oleastro M. *Helicobacter pylori* infection recent developments in diagnosis. World J Gastroenterol 2014;20(28):9299-313.
- Lu H, Zhang W, Graham DY. Bismuth containing quadruple therapy for *Helicobacter pylori*: lessons from China. Eur J Gastroenterol Hepatol 2013;25(10):1134-40.
- Mahady GB, Pendland SL, Yun G, Lu ZZ. Turmeric (Curcuma longa) and curcumin inhibit growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. Anticancer Res 2002;22(6C):4179-4181
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: The Maastricht V/Florence Consensus Report 2017;66(1):6-30.
- Maliziaa T, Tejadaa M, Marchettib F, Favini P, Pizzarellic G, Campaa M. Synergic interactions of macrolides and proton-pump inhibitors against *Helicobacter pylori*: a comparative in-vitro study. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1998;41(Suppl. B):29-35
- Marcus EA, Sachs G, Scott DR. Colloidal bismuth subcitrate impedes proton entry into *Helicobacter pylori* and increases the efficacy of growth-dependent antibiotics. Aliment Pharmacol Ther 2015;42(7):922-33.
- Martínez J, Henao S, Lizarazo J. Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Latin America and the Caribbean. Rev Col Gastroenterol 2014;29(3)
- McColl K.E. Clinical practice. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med 2010;362(17):1597-604.
- Mégraud F. Comparison of non-invasive tests to detect *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents: results of a multicenter European study. J Pediatr 2005;146(2): 198-203.
- Min G, Yeng C, Conrad K, Vadivelu J, Fai M, Wong W. Suppression of cell division- associated genes by *Helicobacter pylori* attenuates proliferation of RAW264.7 monocytic macrophage cells. Scientific Reports 2015;5:11046. Doi: 10.1038/srep11046
- Mnich E, Gajewski A, Rudnicka K, Gonciarz W, Stawerski P, Hinc K, Obuchowski M, Chmiela M. Immunoregulation of antigen presenting and secretory functions of monocytic cells by *Helicobacter pylori* antigens in relation to impairment of lymphocyte expansion. Acta Biochim Pol 2015;62:641-650.
- Mun SH, Joung DK, Kim YS, Kang OH, Kim SB, Seo YS et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Phytomedicine 2013;20: 714-718.
- Nagarathnam R, Rengasamy A, Balasubramanian R. Purification and properties of cysteine protease from rhizomes of Curcuma longa Linn. J Sci Food Agric 2010;90(1):97-105.
- Ortiz AP, Reis FC, Ferraz LFC, Gerrits MM, Mendoca S, Kuster JG, et al. Differentially expressed genes in responses to amoxicillin in *Helicobacter pylori* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR. FEMS Immunol Med Microbiol 2006;60:226-230.
- Otero W, Gómez M, Otero L, Trespalacios A. *Helicobacter pylori*: ¿cómo se trata en el 2018? Rev Gastroenterol Peru 2018;38(1):54-63



- Otero W, Trespalacios AA, Otero L, Vallejo M, Torres M, Pardo R, et al. Guía práctica para el diagnóstico y tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori* en adultos. Rev Col Gastroenterol 2015;30(Suppl. 1):17-33
- Park CS, Lee SM, Park CH, Koh HR, Jun CH, Park SY, et al. Pretreatment antimicrobial susceptibility-guided vs. clarithromycin-based triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in a region with high rates of multiple drug resistance. Am J Gastroenterol 2014;109(10):1595-602.
- Patil TR, Patil ST, Patil S, Patil A. Effect of Non Antibiotic Antimicrobial Curcuma Longa on *Helicobacter Pylori* Infection. Int J Pharmacogn Chinese Med 2018;2(5):000150.
- Prazeres P, Magalhaes DM, Campos DV, Aguiar G, Nogueira E, Santos A, et al. *Helicobacter pylori* Primary Resistance to Metronidazole and Clarithromycin in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2021-2023.
- Quan-Ming Z et al. *Helicobacter pylori*: nueva vacuna; nuevos conceptos sobre la infección. The Lancet 2015
- Rai D, Singh JK, Roy N, Panda D. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. Biochem J 2008;410(1):147-155.
- Rangel-Castañeda I, Cruz-Lozano J, Zermeño-Ruiz M, Cortes-Zarate R, Hernández-Hernández L, Tapia-Pastrana G. Drug Susceptibility Testing and Synergistic Antibacterial Activity of Curcumin with Antibiotics against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Antibiotics 2019;8(43). Doi:10.3390/antibiotics8020043
- Ranjbar R, Mohammadi A. Synergistic effects of combined curcumin and antibiotic in ameliorating an animal model of *Helicobacter pylori* infection. Biomedical Research 2018;29(8):1702-1707
- Richter C, Mukherjee O, Ermert D, Singh B, Su YC, Agarwal V, Blom AM, Riesbeck K. Moonlighting of *Helicobacter pylori* catalase protects against complement-mediated killing by utilising the host molecule vitronectin. Sci Rep 2016;6:24391.
- Rubin, E et al. El aparato digestivo in Patología estructural: fundamentos clínico-patológicos en medicina. McGraw Hill 2006;619-30.
- Sánchez-Zauco NA, Giono-Cerezo S, Maldonado-Bernal C. Receptores tipo Toll, patogénesis y respuesta inmune a *Helicobacter pylori*. Salud Publica Mex 2010;52(5):447-454.
- Santos AM, Lopes T, Oleastro M, Gato I, Floch P, Benejat L. Curcumin inhibits gastric inflammation induced by *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. Nutrients 2015;7:306-320. Doi:10.3390/nu7010306
- Santos AM, Lopes T, Oleastro M, Gato IV, Floch P, Benejat L, et al. Curcumin inhibits gastric inflammation induced by *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. Nutrients 2015;7: 306-320. DOI: 10.3390/nu7010306



- Sarkar A, De R, Mukhopadhyay A. Curcumin as a potential therapeutic candidate for *Helicobacter pylori* associated diseases. World J Gastroenterol 2016;22(9):2736-2748. DOI: 10.3748/wjg.v22.i9.2736
- Sarkar A, De R, Mukhopadhyay AK. Curcumin as a potential therapeutic candidate for *Helicobacter pylori* associated diseases. World J Gastroenterol 2016;22(9):2736-2748.
- Sasidharan NK, Ravikumar S, Jacob J, Nambisan B. In Vitro Synergistic Effect of Curcumin in Combination with Third Generation Cephalosporins against Bacteria Associated with Infectious Diarrhea
- Shen, HX., Li, L., Chen, Q. LECT2 association with macrophage mediated killing of *Helicobacter pylori* by activating NF- κ B and nitric oxide production. Genet Mol Res 2016;24: 15(4).
- Shiotani A, Lu H, Dore MP, Graham DY. Treating *Helicobacter pylori* effectively while minimizing misuse of antibiotics. Clev Clin J Med 2017;84(4):310-8.
- Singh G, Kapoor IP, Singh P, de Heluani CS, de Lampasona MP, Catalan CA. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn). Food Chem Toxicol 2010;48(4):1026-31.
- Sintara K, Thong-Ngam D, Patumraj S, Klaikeaw N, Chatsuwan T. Curcumin suppresses gastric NF-kappaB activation and macromolecular leakage in *Helicobacter pylori*-infected rats. World J Gastroenterol 2010;16:4039-4046. DOI:10.3748/wjg.v16.i32.4039
- Solnick JV, Schauer BD. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Clin Microb Rev 2001;14:59-97.
- Suárez JL, Reyes GC, Herreros IM. *Helicobacter pylori*: review of physiologic and patologic aspects. MÉD.UIS. 2011;24(3):275-82
- Suzuki RB, Almeida CM, Speranca MA. Absence of *Helicobacter pylori* high tetracycline resistant 16S rDNA AGA929-928TTC genotype in gastric biopsy specimens from dyspeptic patients in the interior of city Sao Paulo, Brazil. BMC Gastroenterology 2012;12:49-54.
- Takeshima, E *et al.* *Helicobacter pylori*-induced interleukin-12 p40 expression. Infect Immun 2009;77(4):1337-48.
- Taslima L, Alzahrani S, Gonzalez J, Pinchuk I, Beswick E, Reyes V. Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol 2014;20(36):12753-12766.
- Tsai H, Hsu P. Interplay between *Helicobacter pylori* and immune cells in immune pathogenesis of gastric inflammation and mucosal pathology. Cell Mol Immunol 2010;7(4):255-9.
- Valmaña C, Gutierrez B. Microbiología y patogenia de la infección por *Helicobacter pylori*. González-Carvajal Pascual M y cols. *Helicobacter pylori* ¿El tercer dogma? Barcelona: Doyma 2003;p. 22-63.



- Wang YC. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. World J Gastroenterol 2014;20(30):10368-10382
- Wan-Sheng J, Jia-Lu H, Kai-Chun W, Jun-Wen Q, Zhe-Yi H, Jie D, et al. *Helicobacter pylori* specific immune response induced by conservative flagellin linear B-cell epitope. World J Gastroenterol 2005;11(23):3528-3532.
- Warren, J and Marshall, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium and active chronic gastritis. The Lancet 1983;321(8336):1273-5.
- Ya-Hui W, Jiunn-Jong W, Huan-Yao L. When *Helicobacter pylori* invades and replicates in the cells. Autophagy 2009;5(4):540-542. DOI: 10.4161/auto.5.4.8167
- Zullo V, Hassan C, Giorgio F, Rosania R, Ierardi E. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. World J Gastrointest Pathophysiol 2011;2:35-41

Anexos

ANEXOS

Anexo 1. Valores de concentración mínima inhibitoria (µg/mL) de diez aislados de *H. pylori* frente a seis antimicrobianos y categorías interpretativas para cada antimicrobiano

Aislados	MTZ	AMO	CLA	TET	LVX	RIF	Fenotipo de resistencia
9A	>256 R	0.016 S	0.023 S	<0.016 S	0.004 S	0.016 S	Resistente
12A	>256 R	<0.016 S	<0.016 S	<0.016 S	0.5 S	1.5 R	Resistente
14A	>256 R	<0.016 S	2 R	0.064 S	2 R	<0.016 S	MDR
20A	>256 R	<0.016 S	12 R	0.064 S	4 R	1 R	MDR
20C	>256 R	<0.016 S	12 R	0.064 S	8 R	0.016 S	MDR
31C	>256 R	0.016 S	0.125 S	<0.016 S	>32 R	0.125 S	Resistente
35A	16 R	<0.016 S	<0.016 S	0.023 S	>32 R	0.023 S	Resistente
48A	0.023 S	0.016 S	0.016 S	0.016 S	>32 R	<0.016 S	Resistente
58A	>256 R	<0.016 S	0.016 S	0.064 S	0.02 S	0.47 S	Resistente
39C	>256 R	<0.016 S	0.125 S	0.016 S	0.002 S	<0.016 S	Resistente

(S) Susceptible

(I) Intermedia

(R) Resistente

Amoxicilina (AMX), claritromicina (CLA), metronidazol (MTZ), tetraciclina (TET), levofloxacina (LEV), rifampicina (RIF)

Intervalos de corte para la cepa de referencia *H. pylori* ATCC 43504: AMX y CLA (0,015-0,12 µg/mL), MET (64-256 µg/mL) y CIP (0.125-16 µg/mL) (Bogaerts et al., 2006).

Anexo 2. Diseño general de la placa de 96 pozos en el ensayo combinaciones según el método del Tablero de damas (Picazo, 2000)

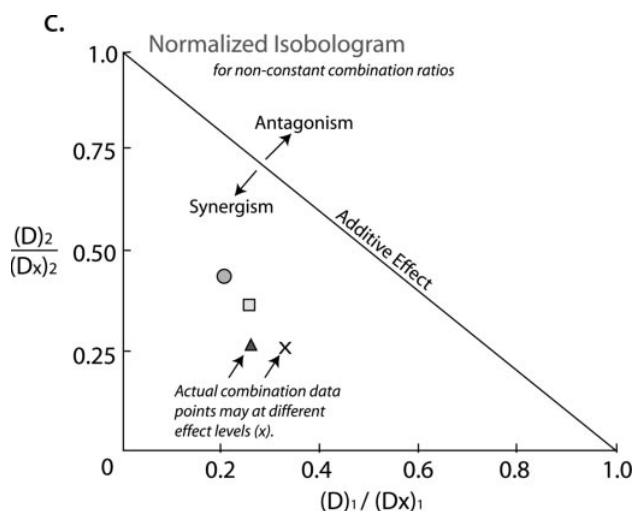
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ctrl - →											
B	Atb+[] ↓ curc+[] →						Atb-[] ↓	Curva de curc ↓	2 x CMI	Curva de Atb ↓	2 x CMI	C+ de Cepa ↓
C									1 x CMI		1 x CMI	
D									0.5 x CMI		0.5 x CMI	
E									0.25 x CMI		0.25 x CMI	
F									0.12 x CMI		0.12 x CMI	
G									0.06 x CMI		0.06 x CMI	
H	curc-[] →								0 x CMI		0 x CMI	

Procedimiento: Esta técnica es una de las más empleadas en el estudio de la actividad combinada, ya que es fácil de llevar a cabo y sus resultados no necesitan operaciones matemáticas complicadas. Su nombre se refiere a que los pocillos que se utilizan forman un tablero (como el ajedrez) donde hay múltiples diluciones de los antimicrobianos en concentraciones superiores o inferiores a la CMI de cada uno de ellos frente al microorganismo a estudiar. Los pasos a desarrollar son los siguientes:

1. En el eje X se colocan las diluciones del antimicrobiano A en las siguientes concentraciones: 0; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1 y 2 veces la CMI. Estas diluciones pueden incrementarse si se considera necesario o existe la posibilidad de que exista antagonismo.
2. En el eje Y se colocan las mismas diluciones para el antimicrobiano B, de forma que la primera casilla es la correspondiente a 0 x CMI de los dos antimicrobianos.
3. Establecer curvas independientes para cada antimicrobiano con las mismas concentraciones utilizadas en la combinación así como un control de crecimiento para la bacteria

De esta manera quedan representadas todas las posibles combinaciones de las diluciones de los dos antimicrobianos, además de los controles para cada antimicrobiano.

Anexo 3. Esquema interpretativo del isoblograma normalizado para combinaciones a razones no constantes



Anexo 4. Preparación de la solución tampón para el ensayo de Peróxido de hidrógeno

Soluciones madres necesarias para el ensayo de H_2O_2

- Dextrosa 100 mM (1,8 g en 100 mL)
- Rojo Fenol 5,3 mM
- K_2HPO_4 100 mM (1,74 g en 100 mL)
- NaCl 1M (5,8 g en 100 mL)
- Peroxidasa VI a 1 mg/mL

(*) Solución tampón para el ensayo (volumen final de 10 mL)

- 550 μ L de Dextrosa 100 mM
- 1 mL de Rojo Fenol 5,3 mM
- 1 mL de K_2HPO_4 100 mM
- 1,4 mL de NaCl 1M
- 100 μ L de Peroxidasa VI
- 5,85 mL de H_2O destilada (volumen final de 10 mL)

Anexo 5. Preparación de Reactivo de Griess para el ensayo de determinación de óxido nítrico

Reactivo de Griess: Sulfonamida + N-naftilendiamina

Se utilizan soluciones de ácido fosfórico al 2 y al 5% para disolver los componentes del reactivo de Griess.

Sulfonamida: 100mg de sulfonamida o ácido sulfarílico y aforar a 10mL con ácido fosfórico al 5%. Agitar e incubar a 30°C en la oscuridad por 10 minutos. Conservar en la oscuridad a 4°C.

N-naftilendiamina: 10mg de N-naftilendiamina y aforar a 10mL con ácido fosfórico al 2%. Diluir y conservar en la oscuridad a 4°C.



Anexo 6. Aprobación por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y el Comité de ética del IPK que incluye el Comité de Investigación y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL)

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ (IPK)

**AVAL DE LA COMISIÓN CIENTÍFICA
ESPECIALIZADA DE MICROBIOLOGÍA**

Por este medio se hace constar que la Comisión Científica Especializada de Microbiología (CCEM), como órgano asesor científico-técnico del Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), ha aprobado el Protocolo de Tesis para optar por el título de Máster en Bacteriología-Micología titulado: ***Helicobacter pylori* y cúrcuma. Efecto antimicrobiano y antiinflamatorio**, del Lic. Yandy Ybalmea Gómez y que tiene como tutores a la Lic. Onelkis Feliciano, MSc. y al Lic. Alexis Díaz, DrC.

Los estudios previos realizados en Cuba a partir de la cúrcuma incluyen su caracterización fitoquímica y su actividad antiparasitaria e insecticida; sin embargo, no existen referencias sobre su actividad antimicrobiana, por lo que la evaluación de un extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* frente a *Helicobacter pylori* constituye una propuesta válida en la búsqueda de alternativas terapéuticas en las infecciones causadas por este patógeno.

La presente propuesta forma parte del proyecto empresarial de Labiofam titulado **Desarrollo de formulación a partir de las propiedades de *Curcuma longa*** (código L0512), aprobado por el Consejo Científico de dicho grupo empresarial.

Dr. Carlos M. Fernández Andreu
Secretario CCEM, IPK



La Habana, 5 de junio de 2018



**COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"**

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 72-18

"*Helicobacter pylori* y cúrcuma. Efecto antimicrobiano y antiinflamatorio"

**INVESTIGADOR PRINCIPAL
Lic. Yandy Ybalmea Gómez**

Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente documento por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:

DICTAMEN

1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.
2. En el protocolo aparecen reflejados de forma clara los aspectos éticos que se ajustan al tipo de investigación propuesta.
3. APROBADO TRAS MODIFICACIONES PROPUESTAS POR EL CICUAL, el protocolo presentado.

Dado, en el IPK, La Habana, a los 21 días del mes de agosto de 2018

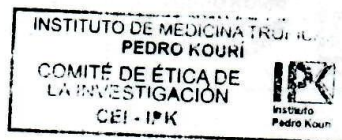

DrCs. Eric Martínez Torres
Presidente CEI-IPK


DrC. María Camila Montalvo Villalva
Miembro


DMVZ. Mario García Rodríguez
Presidente CICUAL


DrC. Ana Margarita Montalvo Alvarez
Miembro


DrC. Iliana Valdés Hernández
Secretaria



Anexo 7. Valores de Índice de combinación e Índice de Reducción de la Dosis correspondientes a cinco aislados de *Helicobacter pylori* y grado de interacción farmacológica (Chou y cols., 2006). Datos generados por el programa Compusyn 1.0.

Aislado 9A					
C. longa (µg/mL)	Antimicrobiano (µg/mL)	Valor de IC	Grado de IC	IRD	IRD
		Metronidazol		EHC	Antimicrobiano
0.7	512	11846.7	Antagonismo fuerte	0.01367	8.49E-5
0.7	256	150.64	Antagonismo fuerte	0.03390	0.00825
0.7	128	1953.56	Antagonismo fuerte	0.01517	5.30E-4
0.7	64	658.393	Antagonismo fuerte	0.01687	0.00167
0.7	32	241.254	Antagonismo fuerte	0.01881	0.00532
0.7	16	59.3414	Antagonismo fuerte	0.02652	0.04623
0.35	512	12.9865	Antagonismo fuerte	0.15729	0.15086
0.35	256	4.23345	Antagonismo fuerte	0.25996	2.58628
0.35	128	5.57485	Antagonismo fuerte	0.20049	1.70338
0.35	64	8.0245	Antagonismo fuerte	0.14556	0.86632
0.35	32	5.62658	Antagonismo fuerte	0.18458	4.78476
0.35	16	4.63451	Antagonismo fuerte	0.21818	19.5626
0.175	512	6.05275	Antagonismo fuerte	0.36917	0.29905
0.175	256	0.21859	Sinergismo fuerte	4.57543	28287.3
0.175	128	1.68794	Antagonismo	0.62501	11.3666
0.175	64	7.29815	Antagonismo fuerte	0.23280	0.33305
0.175	32	2.39393	Antagonismo	0.43636	9.78129
0.175	16	1.77269	Antagonismo	0.56938	61.0338
0.087	512	10.9422	Antagonismo fuerte	0.58557	0.10829
0.087	256	0.73178	Sinergismo	1.52656	13.0351
0.087	128	1.82689	Antagonismo	0.80657	1.70338
0.087	64	0.8394	Sinergismo	1.25721	22.7332
0.087	32	1.38659	Antagonismo	0.80657	6.81352

0.087	16	1.08015	Aditividad	0.95708	28.3241
0.043	512	33.777	Antagonismo muy fuerte	0.88184	0.03063
0.043	256	0.56909	Sinergismo	2.54366	5.68330
0.043	128	81.1412	Antagonismo muy fuerte	0.51828	0.01262
0.043	64	8.71742	Antagonismo fuerte	0.76692	0.13489
0.043	32	8.09143	Antagonismo fuerte	0.67015	0.15153
0.043	16	5.9651	Antagonismo fuerte	0.62748	0.22876
0.021	512	33.1969	Antagonismo muy fuerte	1.80568	0.03063
0.021	256	0.23484	Sinergismo fuerte	6.32433	13.0351
0.021	128	3.63957	Antagonismo fuerte	2.24846	0.31301
0.021	64	4.63419	Antagonismo fuerte	1.80568	0.24508
0.021	32	7.32797	Antagonismo fuerte	1.37220	0.15153
0.021	16	29.066	Antagonismo muy fuerte	0.83316	0.03589

Aislado 35A					
C. longa (µg/mL)	Antimicrobiano (µg/mL)	Valor de IC	Grado de IC	IRD	IRD
				EHC	Antimicrobiano
Levofloxacin					
2.054	64	2.11115	antagonismo	2.87293	0.56719
2.054	32	1.18654	antagonismo	2.04595	1.43314
2.054	16	0.80568	sinergismo	2.40659	2.56308
2.054	80	0.61634	sinergismo	2.35887	5.19736
2.054	4	0.5062	sinergismo	2.45511	10.1124
2.054	2	0.57229	sinergismo	1.88287	24.2801
1.027	64	1.46194	antagonismo	1.12613	1.74236
1.027	32	1.28044	antagonismo	0.98086	3.83240
1.027	16	0.80124	sinergismo	1.62120	5.42272
1.027	80	0.8188	sinergismo	1.35638	12.2627

1.027	4	0.67778	sinergismo	1.58111	22.0681
1.027	2	0.83809	sinergismo	1.22081	52.7403
0.5135	64	1.71783	antagonismo	0.68228	3.96560
0.5135	32	1.49501	antagonismo	0.73399	7.54209
0.5135	16	1.52788	antagonismo	0.68268	15.8560
0.5135	80	2.01935	antagonismo	0.50154	39.2142
0.5135	4	1.59404	antagonismo	0.63328	66.7911
0.5135	2	2.25968	antagonismo	0.44369	170.670
0.2567	64	1.81618	antagonismo	0.59759	7.00350
0.2567	32	1.82282	antagonismo	0.57022	14.4665
0.2567	16	1.37757	antagonismo	0.74857	23.9885
0.2567	80	1.77098	antagonismo	0.57022	57.8659
0.2567	4	1.607	antagonismo	0.62587	108.544
0.2567	2	2.4857	antagonismo	0.40285	294.036
0.1283	64	1.01476	aditividad	1.14089	7.23324
0.1283	32	0.75112	sinergismo	1.49757	11.9951
0.1283	16	0.83543	sinergismo	1.25222	27.1360
0.1283	80	1.0285	aditividad	0.98731	63.9241
0.1283	4	0.88515	sinergismo	1.14089	115.732
0.1283	2	1.31107	antagonismo	0.76465	304.901
0.064	64	0.55999	sinergismo	2.39688	7.00350
0.064	32	0.61675	sinergismo	1.79104	17.1194
0.064	16	0.58754	sinergismo	1.79104	34.2387
0.064	8	0.36823	sinergismo	2.87351	49.4496
0.064	4	0.69456	sinergismo	1.45299	158.175
0.064	2	0.86302	sinergismo	1.16237	368.901

Aislado 12A					
<i>C. longa</i> (µg/mL)	Antimicrobiano (µg/mL)	Valor de IC	Grado de IC	IRD	IRD
		Rifampicina		EHC	Antimicrobiano
5.8	3	8.1965	antagonismo fuerte	0.18923	0.34342
2.9	3	3.32961	antagonismo fuerte	0.67609	0.54039
1.45	3	3.10877	antagonismo	1.08941	0.45644
0.725	3	3.51519	antagonismo fuerte	1.54389	0.34874
0.362	3	7.70976	antagonismo fuerte	1.03491	0.14829
0.181	3	7.12549	antagonismo fuerte	2.10680	0.15036
5.8	1.5	1.497	antagonismo	0.92862	2.38022
2.9	1.5	1.78409	antagonismo	0.93709	1.39478
1.45	1.5	1.27765	antagonismo	1.82877	1.36830
0.725	1.5	1.55439	antagonismo	2.17883	0.91289
0.362	1.5	4.03294	antagonismo fuerte	1.12999	0.31766
0.181	1.5	2.69571	antagonismo	3.22318	0.41921
5.8	0.75	2.93088	antagonismo	0.39645	2.44816
2.9	0.75	1.63296	antagonismo	0.81174	2.49351
1.45	0.75	1.49438	antagonismo	1.06662	1.79586
0.725	0.75	1.56504	antagonismo	1.32262	1.23615
0.362	0.75	3.13367	antagonismo	0.85281	0.50992
0.181	0.75	2.70254	antagonismo	1.58860	0.48238
5.8	0.375	2.78996	antagonismo	0.38730	4.80785
2.9	0.375	1.36922	antagonismo	0.85044	5.17180
1.45	0.375	1.1223	antagonismo	1.16057	3.83659
0.725	0.375	1.20229	antagonismo	1.27301	2.39954
0.362	0.375	1.95783	antagonismo	0.94787	1.10763

0.181	0.375	2.0661	antagonismo	1.23878	0.79437
5.8	0.187	2.68568	antagonismo	0.38730	9.64141
2.9	0.187	1.30244	antagonismo	0.83042	10.1800
1.45	0.187	0.63793	sinergismo	1.82877	10.9757
0.725	0.187	1.3656	antagonismo	0.91240	3.70942
0.362	0.187	3.2764	antagonismo	0.41387	1.16254
0.181	0.187	2.55017	antagonismo	0.65763	0.97128
5.8	0.0937	2.94926	antagonismo	0.34573	17.6080
2.9	0.0937	1.37418	antagonismo	0.75685	18.8963
1.45	0.0937	0.96592	aditividad	1.11282	14.8587
0.725	0.0937	1.04795	aditividad	1.07618	8.42224
0.362	0.0937	1.23853	antagonismo	0.98137	4.55483
0.181	0.0937	1.01439	aditividad	1.37906	3.45712

Aislado 31C					
C. longa (µg/mL)	Antimicrobiano (µg/mL)	Valor de IC	Grado de IC	IRD	IRD
		Metronidazol		EHC	Antimicrobiano
7.8	512	2.43443	antagonismo	0.60492	1.27989
7.8	256	2.15712	antagonismo	0.58113	2.29179
7.8	128	2.13791	antagonismo	0.53608	3.66939
7.8	64	2.49094	antagonismo	0.44253	4.32523
7.8	32	2.37534	antagonismo	0.44253	8.65047
7.8	16	1.67753	antagonismo	0.60492	40.9565
3.9	512	0.3114	sinergismo	3.64800	26.8281
3.9	256	0.57737	sinergismo	2.05479	11.0250
3.9	128	0.96599	aditividad	1.26227	5.75476
3.9	64	0.68912	sinergismo	1.56073	20.6619

3.9	32	0.76401	sinergismo	1.37096	28.9057
3.9	16	0.62409	sinergismo	1.63037	93.2166
1.95	512	0.39126	sinergismo	4.30901	6.28183
1.95	256	0.51395	sinergismo	3.12147	5.16548
1.95	128	1.10137	aditividad	1.70320	1.94464
1.95	64	0.483	sinergismo	2.52454	11.5095
1.95	32	0.56063	sinergismo	2.06270	13.1883
1.95	16	0.62274	sinergismo	1.77012	17.3009
0.95	512	0.88805	sinergismo	5.18195	1.43869
0.95	256	0.84278	sinergismo	4.23397	1.64854
0.95	128	0.34039	sinergismo	5.39915	6.44446
0.95	64	2.60595	antagonismo	1.66009	0.49911
0.95	32	4.05654	antagonismo	1.09632	0.31803
0.95	16	1.382	antagonismo	1.46925	1.42575
0.47	512	0.4644	sinergismo	12.9508	2.58274
0.47	256	0.79577	sinergismo	8.23560	1.48293
0.47	128	0.93186	aditividad	6.10910	1.30179
0.47	64	0.69663	sinergismo	5.49402	1.94321
0.47	32	1.86931	antagonismo	2.88287	0.65684
0.47	16	2.1688	antagonismo	2.15213	0.58680
0.23	512	0.5342	sinergismo	24.2449	2.02860
0.23	256	0.4394	sinergismo	20.5146	2.55978
0.23	128	0.43802	sinergismo	16.1738	2.65819
0.23	64	0.78308	sinergismo	10.1243	1.46134
0.23	32	1.83261	antagonismo	5.71216	0.60330
0.23	16	1.00384	aditividad	5.71216	1.20660

Aislado 48A					
Curcuma longa L. (µg/mL)	Antimicrobiano (µg/mL)	Valor de IC	Grado de IC	IRD	IRD
				EHC	Antimicrobiano
		Levofloxacin			
2.128	64	2.89E+19	antagonismo	8.817	3.5E-20
2.128	32	1.44E+19	antagonismo	8.817	6.9E-20
2.128	16	7.22E+18	antagonismo fuerte	8.817	1.4E-19
2.128	8	3.61E+18	antagonismo	8.817	2.8E-19
2.128	4	1.81E+18	antagonismo	8.817	5.5E-19
2.128	2	9.03E+17	antagonismo fuerte	8.817	1.1E-18
1.064	64	3.84835	antagonismo	0.319	1.4E+00
1.064	32	3.76314	antagonismo	0.346	1.1E+00
1.064	16	3.6042	antagonismo	0.368	1.1E+00
1.064	8	3.22027	antagonismo	0.319	1.1E+01
1.064	4	3.27934	antagonismo	0.308	3.4E+01
1.064	2	3.04658	antagonismo	0.332	2.9E+01
0.532	64	2.06362	antagonismo	0.494	2.5E+01
0.532	32	2.199	antagonismo	0.456	1.2E+02
0.532	16	1.97371	antagonismo	0.510	7.0E+01
0.532	8	2.36909	antagonismo	0.422	1.2E+03
0.532	4	2.33231	antagonismo	0.429	2.0E+03
0.532	2	2.47619	antagonismo	0.404	7.8E+03
0.266	64	1.24214	antagonismo	0.808	2.4E+02
0.266	32	1.38124	antagonismo	0.724	1.7E+03
0.266	16	1.35949	antagonismo	0.736	2.8E+03
0.266	8	1.42508	antagonismo	0.702	9.5E+03
0.266	4	1.33814	antagonismo	0.747	9.3E+03
0.266	2	1.33809	antagonismo	0.747	1.9E+04
0.133	64	0.57001	sinergismo	1.797	7.3E+01
0.133	32	0.66987	sinergismo	1.495	1.2E+03
0.133	16	0.62954	sinergismo	1.591	1.2E+03
0.133	8	0.69047	sinergismo	1.449	6.6E+03
0.133	4	0.66912	sinergismo	1.495	9.3E+03
0.133	2	0.63859	sinergismo	1.566	1.1E+04
0.0665	64	0.91214	aditividad	5.111	1.4E+00
0.0665	32	0.31156	sinergismo	3.231	4.9E+02
0.0665	16	0.25772	sinergismo fuerte	4.219	4.8E+01
0.0665	8	0.25489	sinergismo fuerte	4.017	1.7E+02

0.0665	4	2.45282	antagonismo	0.408	2.8E+02
0.0665	2	0.25422	sinergismo fuerte	3.953	8.0E+02

Aislado 20A					
Curcuma longa L. (µg/mL)	Antimicrobiano (µg/mL)	Valor de IC	Grado de IC	IRD	IRD
				EHC	Antimicrobiano
		Rifampicina			
100.000	2	2.205	antagonismo	0.45348	5.98E20
100.000	1	2.205	antagonismo	0.45348	1.20E21
100.000	0.5	2.205	antagonismo	0.45348	2.39E21
100.000	0.25	2.205	antagonismo	0.45348	4.78E21
100.000	0.125	2.205	antagonismo	0.45348	9.57E21
100.000	0.0625	2.094	antagonismo	0.47760	8.84E23
50.000	2	1.716	antagonismo	0.58263	3653908
50.000	1	1.283	aditividad	0.77934	1.61E16
50.000	0.5	1.348	antagonismo	0.74173	8.30E14
50.000	0.25	1.416	antagonismo	0.70625	4.43E13
50.000	0.125	1.416	antagonismo	0.70625	8.85E13
50.000	0.0625	1.348	antagonismo	0.74173	6.64E15
25.000	2	0.818	sinergismo	1.22213	1.240E8
25.000	1	0.674	sinergismo	1.48345	4.15E14
25.000	0.5	0.708	sinergismo	1.41250	2.21E13
25.000	0.25	0.743	sinergismo	1.34549	1.22E12
25.000	0.125	0.989	aditividad	1.01128	1639.76
25.000	0.0625	0.780	sinergismo	1.28213	1.37E11
12.500	2	0.833	sinergismo	1.92976	3.17858
12.500	1	0.429	sinergismo	2.33052	7307815
12.500	0.5	0.450	sinergismo	2.22258	438258.
12.500	0.25	0.450	sinergismo	2.22258	876516.
12.500	0.125	0.450	sinergismo	2.22258	1753032
12.500	0.0625	0.472	sinergismo	2.12005	106629.
6.250	2	322.824	antagonismo fuerte	3.51417	0.00310
6.250	1	0.252	sinergismo fuerte	4.04511	204.970
6.250	0.5	0.225	sinergismo fuerte	4.44516	438258.
6.250	0.25	0.225	sinergismo fuerte	4.44516	876516.
6.250	0.125	0.248	sinergismo fuerte	4.04511	1639.76
6.250	0.0625	0.236	sinergismo fuerte	4.24010	106629.

3.120	2	0.133	sinergismo fuerte	8.10318	102.485
3.120	1	0.118	sinergismo fuerte	8.49379	6664.31
3.120	0.5	0.126	sinergismo fuerte	8.10318	409.940
3.120	0.25	17E22	antagonismo fuerte	3.58846	5.7E-24
3.120	0.125	21.67E4	antagonismo fuerte	5.83439	4.62E-8
3.120	0.0625	0.124	sinergismo fuerte	8.10318	3279.52