



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

TESIS

**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y EFECTO DE LA MIEL DE *Melipona
beecheii* EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE
Helicobacter pylori ATCC 49503.”**

PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

MYRNA JANETH LARA TORRES

ASESORES:

Dra. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ

Dr. DENIS ISRAEL MAGAÑA ORTIZ

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

05 DE ABRIL DEL 2017



DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-113/2017

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

MÉRIDA, YUCATÁN A 16 DE MARZO DE 2017

C. MYRNA JANET LARA TORRES
PASANTE DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LOS
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

De acuerdo al fallo emitido por su asesora la **Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez**, su coasesor el Dr. Denis Israel Magaña Ortiz y la comisión revisora integrada por el Dr. Luis Fernando Cuevas Glory y el M.C. Jesús Manuel Ramón Sierra, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y EFECTO DE LA MIEL DE *Melipona beecheii* SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE *Helicobacter pylori* ATCC 49503”

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES


DR. DANIEL ARCANGEL LÓPEZ SAURI
ENCARGADO DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
DALs/faa.



S.E.P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MÉRIDA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



SEP Instituto Tecnológico de Mérida, Km.5 Carretera Mérida-Progreso A.P 911
C.P 97118 Mérida Yucatán, México, Tels. 964-50-00. Ext. 10001, 10401
10601, 10201 e-mail: itm@itmerida.mx http://www.itmerida.mx



RECONOCIMIENTO
A LA CALIDAD SEP
2012
100 POR CIENTO EN
SUS PROGRAMAS DE
BUENA CAUSA



DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a todas las personas que han sido una influencia positiva en mi vida, a aquellos que han creído en mí incluso en los momentos en los que yo he tenido dudas, a los que me acompañaron en este viaje de principio a fin, a mis amigos de Los Mochis, Sinaloa quienes a pesar de la distancia han estado siempre para lo que he necesitado.

Pero principalmente, éste trabajo se lo dedico a mi familia, a mi madre Myrna Yadira Torres Caravantes, a mi padre Marcial Enrique Lara Díaz y a mi hermana Iliana Karely Lara Torres porque gracias a ellos, soy lo que soy.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios por la vida y por permitirme concluir una etapa más. A la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez por haber respondido cada una de mis llamadas y cada uno de mis correos para resolver mis dudas sobre los requisitos para el ingreso a la maestría, por facilitarme la presentación de los exámenes de admisión y por todo el apoyo brindado durante mi estancia y la elaboración de mi proyecto. Al Dr. Denis Israel Magaña Ortiz por su paciencia para enseñarme cada una de las técnicas necesarias para realizar los experimentos, por su guía y persistencia para encaminarme a concluir mi tesis, y sobre todo, por haber sido más que un asesor, un amigo.

Al M. C. Jesús Manuel Ramón Sierra a quien tuve la oportunidad de conocer durante un año, tiempo durante el cual lo consideré un gran amigo, por procurar la existencia de materiales y reactivos para las actividades de todos los que trabajamos en el Laboratorio de Microbiología Aplicada y Molecular. A todos mis compañeros de laboratorio quienes me ayudaron en la preparación de soluciones y en la resolución de muchas dudas, gran parte de este trabajo es gracias a ustedes. A mis compañeros de generación por su apoyo en las materias que compartimos.

A todos los que se atrevieron a ser mis amigos, en especial a Mónica Isabel Morales Cortés y Gilberto Alvarado Farjat, mi familia de Mérida, con quienes compartí infinidad de momentos, risas y lágrimas. Y finalmente al comité de selección de aspirantes por aceptarme en el programa de la Maestría en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología dándome la oportunidad de vivir esta experiencia maravillosa.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.	2
2.1. Miel	2
2.2. Composición de la miel.	3
2.3. Propiedades antimicrobianas de la miel.	5
2.3.1. Osmolaridad.	5
2.3.2. Acidez.	5
2.3.3. Peróxido de hidrógeno.	6
2.3.4. Otros componentes.	7
2.4. Péptidos antimicrobianos de la miel.	8
2.5. Abejas sin aguijón.	9
2.6. Composición de la miel de abejas sin aguijón.	11
2.7. Usos de la miel de las abejas sin aguijón.	12
2.7.1. Enfermedades oculares.	12
2.7.2. Desórdenes de la piel.	12
2.7.3. Desórdenes digestivos.	13
2.8. <i>El género Helicobacter.</i>	13
2.9. <i>Helicobacter pylori.</i>	14
2.9.1. Morfología.	15
2.9.2. Factores de virulencia.	15
2.9.2.1. Ureasa.	15
2.9.2.2. Flagelos.	18
2.9.2.3. Adhesinas.	18
2.9.2.4. Isla de patogenicidad Cag-PAI.	19
2.9.2.5. Citotoxina de vacuolización VacA.	20
2.9.3. Tratamientos médicos para combatir a <i>Helicobacter pylori.</i>	22
3. JUSTIFICACIÓN.	24
4. HIPÓTESIS.	25
5. OBJETIVOS.	26

5.1.	Objetivo general.	26
5.2.	Objetivos específicos.	26
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.	27
6.1.	Activación de la cepa <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	27
6.2.	Determinación de la actividad antimicrobiana de la miel de <i>Melipona beecheii</i> contra <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	27
6.3.	Evaluación del efecto de la miel de <i>Melipona beecheii</i> en la actividad de ureasa de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	28
6.4.	Extracción de los componentes proteicos de la miel de <i>Melipona beecheii</i> .	28
6.5.	Cuantificación del extracto proteico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> .	28
6.6.	Determinación del perfil proteico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> .	29
6.7.	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto proteico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> contra <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	29
6.8.	Extracción de ADN de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	29
6.9.	Detección de la presencia de los genes de interés de estudio de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	30
6.10.	Extracción de ARN de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	31
6.11.	Síntesis de ADNc.	32
6.12.	Análisis de la expresión génica de los genes de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503 mediante qRT-PCR.	32
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	33
7.1.	Activación de la cepa <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	33
7.2.	Determinación de la actividad antimicrobiana de la miel de <i>Melipona beecheii</i> contra <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	34
7.3.	Evaluación del efecto de la miel de <i>Melipona beecheii</i> en la actividad de ureasa de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	37
7.4.	Extracción, cuantificación y determinación del perfil proteico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> .	39

7.5.	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto proteico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> contra <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	41
7.6.	Extracción de ADN de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	42
7.7.	Extracción de ARN de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	43
7.8.	Detección de la presencia de los genes de interés de estudio de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	44
7.9.	Detección de la presencia del mensajero a partir de ADNc.	46
7.10.	Análisis de la expresión génica de los genes de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503 mediante qRT-PCR.	48
8.	CONCLUSIÓN.	55
9.	PERSPECTIVAS.	56
	BIBLIOGRAFÍA.	57

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1 Composición de la miel producida por <i>Apis mellifera</i> .	4
Tabla 2 Comparación de la composición de la miel de abejas sin aguijón y la miel de <i>Apis mellifera</i> .	11
Tabla 3 Secuencia de los oligonucleótidos diseñados.	31
Tabla 4 Cálculos del análisis de la expresión del gen <i>ureA</i> en condiciones control.	49
Tabla 5 Cálculos del análisis de la expresión del gen <i>ureA</i> en tratamiento de 1% de miel.	50
Tabla 6 Cálculos del análisis de la expresión del gen <i>ureA</i> en tratamiento de 3% de miel.	50
Tabla 7 Cálculos del análisis de la expresión del gen <i>vacA</i> en condiciones control.	50
Tabla 8 Cálculos del análisis de la expresión del gen <i>vacA</i> en tratamiento de 1% de miel.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1 <i>La abeja Melipona beecheii.</i>	10
Figura 2 Activación de la cepa <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	34
Figura 3 Morfología de microscópica de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503	
Figura 4 Actividad antimicrobiana de la miel de <i>Melipona beecheii</i> contra <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	34
Figura 5 Crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503 en medio BA 10% SFB con 5% de miel.	36
Figura 6 Efecto de la miel de <i>Melipona beecheii</i> sobre la actividad de ureasa de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	38
Figura 7 Electroforesis de los componentes proteicos de la miel de <i>Melipona beecheii.</i>	40
Figura 8 Actividad antimicrobiana del extracto proteico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> contra <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	42
Figura 9 Electroforesis de ADN de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	43
Figura 10 Electroforesis de ARN de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503.	44
Figura 11 Amplificación del gen <i>hsp60</i> .	45
Figura 12 Amplificación del gen <i>sigma80</i> .	45
Figura 13 Amplificación del gen <i>vacA</i> .	46
Figura 14 Amplificación del gen <i>ureA</i> .	46
Figura 15 Amplificación de ADNc para el gen <i>hsp60</i> y <i>sigma80</i> .	47
Figura 16 Amplificación de ADNc para el gen <i>ureA</i> y <i>vacA</i> .	47
Figura 17 Curva melt para la validación de la especificidad de los oligonucleótidos.	48
Figura 18 Amplificación de los genes en condiciones control y tratamiento con miel.	49
Figura 19 Análisis de la expresión génica del gen <i>ureA</i> .	51
Figura 20 Análisis de la expresión génica del gen <i>vacA</i> .	53

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, microaerofílica que infecta a aproximadamente el 50% de la población mundial. Esta bacteria provoca enfermedades tales como la gastritis crónica, úlcera péptica y es considerada por la Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer como agente carcinogénico tipo 1. Las infecciones generadas por esta bacteria son tratadas con múltiples fármacos, sin embargo, el aumento de cepas resistentes ha llevado a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos para la erradicación del microorganismo. Desde la antigüedad, la miel de *Melipona beecheii* ha sido empleada en el tratamiento de trastornos digestivos. Por tal motivo, el objetivo general de este trabajo es evaluar la actividad antimicrobiana y el efecto de la miel de *Melipona beecheii* en la expresión de genes de virulencia de *Helicobacter pylori* ATCC 49503. Como resultado se obtuvo que la miel de *Melipona beecheii* inhibió el crecimiento de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 a partir de una concentración de 10%. Así mismo la actividad de ureasa de la bacteria se redujo empleando una concentración de 1% de miel. Con respecto a los componentes de la miel, el extracto proteico obtenido presentó actividad antimicrobiana a partir de una concentración de 400 µg. En los análisis de expresión se determinó que la miel en una concentración de 1% redujo la expresión del gen de virulencia *ureA* y aumentó la expresión del gen de virulencia *vacA* de *Helicobacter pylori* ATCC 49503. Como conclusión se tiene que la miel de *Melipona beecheii* puede ser una alternativa para el tratamiento de las enfermedades causadas por el patógeno *Helicobacter pylori*. Para complementar este trabajo se podría evaluar si las proteínas contenidas en la miel también afectan la expresión de los genes de virulencia.

1. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, microaerofílica, de forma en espiral, que coloniza el estómago del ser humano e infecta a más de la mitad de la población mundial. Produce enfermedades gastrointestinales tales como gastritis, úlcera gástrica y el desarrollo de carcinoma gástrico (Wen *et al*, 2009). Las infecciones causadas por *Helicobacter pylori* son comúnmente tratadas con amoxicilina, claritromicina, metronidazol y tetraciclina, en asociación con sales de bismuto (subcitrato, subsalicilato) e inhibidores de la bomba de protones (omeoprazol, pantoprazol, lansoprazol) (Alarcón *et al.*, 2009). Sin embargo, estos tratamientos presentan efectos secundarios tales como diarrea, náuseas y distensión estomacal, lo que conlleva a la suspensión del tratamiento y por ende a la ineficacia del mismo, debida principalmente a la resistencia a los antibióticos de los patógenos, además de la destrucción de la microflora humana (Patel, 2013).

La miel es un compuesto natural que ha sido empleado en la medicina tradicional de nuestros antepasados para el tratamiento de diversas enfermedades entre ellas las relacionadas con el tracto gastrointestinal. A la miel se le atribuyen sus propiedades curativas y antimicrobianas debido a su elevada acidez, su alta osmolaridad y a su contenido de peróxido de hidrógeno, pero además, ésta incluye dentro de su composición azúcares, proteínas, compuestos fenólicos, flavonoides, enzimas, entre otros componentes que contribuyen a su actividad antimicrobiana y que le confieren múltiples mecanismos de acción que pueden ayudar a combatir la resistencia a los antibióticos por parte del microorganismo (Stephens *et al*, 2015).

Este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la miel de *Melipona beecheii* sobre la expresión de genes de virulencia de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Miel.

En el mundo existen alrededor de 20,000 diferentes especies de abejas, que varían en forma y tamaño pero que comparten la característica de visitar flores para colectar su alimento: néctar para su demanda energética y polen como fuente de proteína. Todas estas especies se ubican en el orden *Himenoptera*, familia *Apidae* y se diferencian de acuerdo a la subfamilia a la que pertenecen, *Apinae*, que agrupa a las especies de abejas utilizadas para la obtención de miel y *Meliponinae*, que tiene como característica principal la ausencia de un aguijón funcional (Mendieta, 2002).

El concepto general de la miel está restringido para el producto de las abejas de la especie *Apis mellifera* (subfamilia *Apidae*) y se define de acuerdo al Codex Alimentarius como una sustancia natural dulce producida a partir del néctar de las plantas, de secreciones de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos chupadores en partes vivas de las plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que se madure (Codex Alimentarius, 2001).

En general, la miel se compone principalmente de agua y azúcares predominantemente glucosa y fructosa, además de otras sustancias como ácidos orgánicos, enzimas, flavonoides, compuestos fenólicos, minerales, productos de la reacción de Maillard y partículas sólidas derivadas de la recolección. Presenta una coloración que varía de casi incolora a pardo oscuro debido a la presencia de pequeñas cantidades de pigmentos como carotenoides, clorofila y xantofila. Muestra una densidad entre 1.39 y 1.44 kg/L. Su consistencia puede ser fluida, viscosa, total o parcialmente cristalizada dependiendo del grado de humedad y de la temperatura de almacenamiento. La cantidad de la presencia de estos componentes así como de sus características físicas y organolépticas tales como su aroma y sabor, varían de acuerdo al origen floral y geográfico de la miel así como de su procesamiento, manipulación y tiempo de almacenamiento (Codex Alimentarius, 2001; Erejuwa *et al*, 2012; Moniruzzaman *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2007; Suescún *et al.*, 2008; Stephens *et al*, 2015).

El producto obtenido de las especies de abejas sin aguijón no puede ser denominado miel ya que no se incluye dentro de los estándares de calidad establecidos para la miel de la especie *Apis mellifera*, por consiguiente, se ha sugerido el término de “Elixir divino” para las mieles de la subfamilia *Meliponinae* (Vit *et al.*, 2004).

2.2. Composición de la miel.

La composición de la miel de la especie *Apis mellifera* está regida por la normatividad y los estándares de calidad establecidos por la Unión Europea, la Comisión del Codex Alimentarius, la Comisión internación de la miel así como por la NMX-F-036-1997-NORMEX. Las características principales se enlistan en la Tabla 1.

Los azúcares constituyen el componente mayoritario de la miel, siendo la glucosa y la fructosa los más abundantes. Éstos le confieren características como higroscopicidad, viscosidad y baja actividad de agua (A_w). El contenido de azúcares reductores no debe ser inferior a 65g/100g de miel mientras que el contenido de sacarosa tiene como límite 5g/100g de miel. El agua es segundo componente más abundante en la miel, su contenido determina el grado de conservación de la misma. La humedad es un parámetro fisicoquímico relacionado con las condiciones climáticas y con el grado de maduración de la miel, su valor puede variar dependiendo de los cuidados que se tomen durante su extracción y almacenamiento; puede aumentar debido a sus características higroscópicas o disminuir cuando se almacena en ambientes con poca humedad. Un contenido de humedad elevado conlleva a una fermentación durante su almacenamiento que modifica su sabor y textura. El contenido de humedad en la miel no debe superar el 20% (Codex Alimentarius, 2001; Moo-Huchin *et al.*, 2016; NMX-F-036-1997-NORMEX; Suescún, 2008).

La acidez mejora la actividad antioxidante de la miel y contribuye a su sabor así como a su actividad antimicrobiana. Las variaciones existentes entre los valores de acidez se deben al origen floral, a la estación del año en que fue cosechada, a la cantidad de ácidos orgánicos presentes y al grado de fermentación. En mieles normales, el valor de pH

promedio oscila entre 3.0 y 4.5 mientras que la acidez no debe superar los 50 meq de ácido por kilogramo. El contenido de ceniza expresa la cantidad de minerales presentes en la miel y su valor no debe ser mayor a 0.6g/100g de miel.

Tabla 1: Composición de la miel producida por *Apis mellifera* (Codex Alimentarius, 2001; NMX-F-036-1997-NORMEX).

COMPONENTE	VALOR
Humedad (%)	20
Azúcares reductores (g/100g)	65
Sacarosa (g/100g)	5
Cenizas (g/100g)	0.6
HMF >6 meses (mg/kg)	80
HMF <6 meses (mg/kg)	40
Acidez (meq/kg)	50
Diastasa	8
Proteínas y aminoácidos (%)	0.2-2

La composición de la miel incluye también la presencia de distintas enzimas siendo la diastasa la de mayor importancia, ésta enzima se encarga de romper el almidón en moléculas de glucosa y es muy sensible a la temperatura por lo cual se emplea como parámetro para determinar el envejecimiento y calentamiento de la miel. Su valor no debe ser menor de 8 unidades Schade; una unidad Schade corresponde a la actividad enzimática de 1g de miel que hidroliza 0.01g de almidón en 1h a 40°C. Otro parámetro empleado para determinar el envejecimiento y calentamiento de la miel es el contenido de hidroximetilfurfural (HMF). Este compuesto se forma por la degradación de la fructosa en presencia de ácidos y su valor no debe superar los 80mg/kg en mieles con más de 6 meses de envasado. El contenido de nitrógeno en la miel se debe a las proteínas y aminoácidos asociados a la presencia de polen, su valor es muy pequeño, varía entre 0.2 y 2% (Codex Alimentarius, 2001; Moo-Huchin *et al.*, 2016; NMX-F-036-1997-NORMEX; Suescún, 2008).

2.3. Propiedades antimicrobianas de la miel.

Desde tiempos ancestrales la miel ha sido utilizada para el tratamiento de múltiples enfermedades y ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra diversos patógenos tanto Gram negativos como Gram positivos así como hongos y levaduras. Esta actividad antimicrobiana es atribuida principalmente a la osmolaridad que presenta la miel debido a su alto contenido de azúcares y a su baja humedad, a su elevada acidez y al contenido de peróxido de hidrógeno determinado por la actividad de las enzimas glucosa oxidasa y catalasa (Mandal y Mandal, 2011).

2.3.1. Osmolaridad.

Los azúcares representan el componente mayoritario de la miel (82.4%); dentro de estos se encuentran principalmente fructosa (38.5%) y glucosa (31%) y otros azúcares en menor proporción tales como maltosa y sacarosa (12.9%). Esta elevada cantidad de azúcares le confiere a la miel una alta osmolaridad, característica que contribuye a su actividad antimicrobiana. La osmolaridad le permite inhibir el crecimiento de microorganismos por deshidratación de los mismos. La miel, por su alto contenido de azúcares es considerada una solución sobre saturada; cuando las células bacterianas son expuestas en este tipo de soluciones, las moléculas de agua contenidas en su interior tienden a migrar hacia el medio extracelular para lograr un equilibrio osmótico, provocando la deshidratación de la célula y por ende su muerte. Cuando la miel es diluida pierde esta propiedad, sin embargo, esta sigue siendo capaz de inhibir el crecimiento de bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas, hongos y levaduras, lo que indica que existen otros factores que contribuyen a la actividad antimicrobiana de la miel (Al-Nahari *et al*, 2015; Mandal y Mandal, 2011; Vázquez *et al.*, 2016).

2.3.2. Acidez.

La miel posee un pH con valores entre 3.0 y 4.5 el cual es lo suficientemente ácido para impedir el crecimiento de múltiples patógenos que se desarrollan generalmente en ambientes neutros. Este valor de pH se debe principalmente a la presencia de ácido glucónico que se forma en la miel por efecto de la enzima glucosa oxidasa que descompone a la glucosa en peróxido de hidrógeno y ácido glucónico; y a la presencia

de otros ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, butírico, málico, láctico, succínico, acético y fólico. Patógenos tales como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes* son capaces de crecer en ambientes con un valor de pH mínimo de 4.3, 4.0, 4.4 y 4.5 respectivamente, por lo tanto, en las mieles no diluidas, la acidez es un factor antibacteriano significativo. Cuando la miel es diluida se modifica el pH a valores cercanos a lo neutro, sin embargo, la miel ha demostrado tener actividad antimicrobiana en una concentración de 20% contra *Pseudomonas aeruginosa*, contra *Helicobacter pylori* a partir de una concentración de 10%, contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus epidermis* a partir de 50%. De tal manera que la acidez no es un factor central en el efecto antibacteriano de la miel (Estrada *et al.*, 2005; Mandal y Mandal, 2011; Olaitan *et al.*, 2007; Vázquez *et al.*, 2016; Shenoy *et al.*, 2012).

2.3.3. Peróxido de hidrógeno.

Cuando las abejas realizan el proceso de recolección del néctar de las plantas, le adicionan una enzima propia denominada glucosa oxidasa. Ésta enzima durante el proceso de fabricación de la miel descompone las moléculas de glucosa presentes en la miel produciendo peróxido de hidrógeno y ácido glucónico. Sin embargo, en la miel también se encuentra otra enzima proveniente del polen que las plantas denominada catalasa, esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno, por lo cual su contenido en la miel es muy variable (Mandal y Mandal, 2011; Vázquez *et al.*, 2016).

El peróxido de hidrógeno se utiliza comúnmente como desinfectante de equipos médicos en concentraciones que van desde 0.8 M hasta 8 M. Este compuesto presenta actividad antimicrobiana contra varias especies de bacterias patógenas, entre ellas *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus spp.* y esporas de *Bacillus*. Su mecanismo de acción radica en el daño oxidativo irreversible ocasionado sobre la membrana, las proteínas, las enzimas y el ADN de los microorganismos. El contenido de peróxido de hidrógeno en la miel es muy variable, sin embargo, es aproximadamente 900 veces menor que la concentración que se utiliza comúnmente para la desinfección de equipos médicos y aproximadamente 50 veces menor que las concentraciones que han

provocado la muerte de células de mamíferos, levaduras y bacterias en estudios in vitro (Bizerra *et al.*, 2012).

Existen mieles que de manera natural no cuentan con la presencia de peróxido de hidrógeno y que presentan actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos, tal es el caso de la miel de Manuka. También en estudios realizados con mieles tratadas con catalasas para eliminar el contenido de este compuesto, se ha demostrado que éstas son capaces de inhibir el crecimiento de ciertos patógenos. Esto indica que existen otros componentes y factores en la miel responsables de su efecto antimicrobiano. Existen microorganismos capaces de producir catalasas que pueden usar en defensa para protegerse del peróxido de hidrógeno presente en la miel degradándolo a oxígeno y agua y que, sin embargo, su crecimiento se ve afectado por efecto de la miel (Mandal y Mandal, 2011; Vázquez *et al.*, 2016).

2.3.4. Otros componentes.

La miel es una mezcla compleja, dentro de su composición también se encuentra la presencia de ácidos fenólicos y flavonoides tales como ácido cafeico, catequina, ácido clorogénico, quercetina, apigenina, miricetina, ácido elágico, ácido felúrico, kampferol, ácido hidroxibenzoico, naringenina, pinocembrina, crisina, ácido vanílico, ácido cumárico, ácido cinámico, ácido benzoico, entre otros. Estos componentes provienen principalmente del polen de las plantas, por lo cual, el contenido de los mismos dependen tanto del origen botánico como geográfico de donde provenga la miel. En un estudio realizado con un extracto de compuestos fenólicos obtenido de mieles de Portugal, se demostró que en conjunto, éstos fueron capaces de inhibir el crecimiento de patógenos como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus lentus* y *Escherichia coli*. (Estevinho *et al.*, 2008; Martínez, 2011; Whadan, 1998).

Dentro de su composición, también destaca la presencia de diversos péptidos y proteínas en la miel que posiblemente contribuyan a su actividad antimicrobiana.

2.4. Proteínas y péptidos antimicrobianos de la miel.

Los péptidos antimicrobianos son pequeñas moléculas compuestas de 10 a 50 residuos de aminoácidos que forman parte importante del sistema inmune innato de todos los organismos vivos, incluyendo plantas, vertebrados, bacterias e insectos, y presentan actividades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias y antivirales (Guihelmelli *et al.*, 2013).

Dentro de los péptidos con actividad antimicrobiana presentes en la miel se encuentran las apidaecinas que han sido aisladas de la hemolinfa de las abejas de la especie *Apis mellifera*. Las apidaecinas presentan 3 isoformas: apidaecina Ia (HbIa), apidaecina Ib (HbIb) y apidaecina II (HbII), tienen una longitud de 18 aminoácidos y un peso molecular de 2,100 Da, presentan un alto contenido de prolina (33 %) que les confiere estabilidad a bajos valores de pH (2) y altas temperaturas (100 °C) y son capaces de inhibir el crecimiento de patógenos humanos, principalmente bacterias Gram-negativas como *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (Casteels *et al.*, 1989; Li *et al.*, 2006). De la hemolinfa de las abejas también ha sido posible aislar un polipéptido denominado hymenoptaecina. La hymenoptaecina se caracteriza por tener un peso molecular de 10,500 Da, una longitud de 93 aminoácidos dentro de los cuales el mayor porcentaje corresponde a residuos de glicina (Casteel *et al.*, 1993). Otro péptido presente en la miel es la abaecina que se caracteriza por ser rico en prolina. En estudios realizados con hymenoptaecina y abaecina aislados de *Bombus pascuorum* y *Bombus terrestris* se demostró que ambos péptidos son capaces de generar cambios morfológicos en la membrana y una disminución en la cantidad de flagelos de *Escherichia coli*. De manera particular, la hymenoptaecina genera poros afectando la permeabilidad de la membrana y la abaecina interactúa con la proteína chaperona DnaK de la misma bacteria (Rahnamaeian *et al.*, 2015).

Otro componente proteico que puede ser encontrado en la miel es la royalisina proveniente de la jalea real excretada por las glándulas hipofaríngeas de las abejas. La royalisina es una molécula catiónica conformada por una secuencia de 51 aminoácidos que posee un peso molecular que oscila entre 4,000 y 5,523 Da, presenta un alto

contenido de cisteínas que le confieren una estructura globular compacta, estabilidad a bajos valores de pH y altas temperaturas, además, muestra actividad antimicrobiana contra bacterias Grampositivas tales como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y *Clostridium* (Fujiwara *et al*, 1990). Dentro de la jalea real también han sido encontradas otras proteínas denominadas Major Royal Jelly Proteins (MRJP). Estas proteínas se presentan en 5 formas diferentes, MRJP1 con un peso molecular de 55 kDa, MRJP2 de 49 kDa, MRJP3 de 60-70 kDa, MRJP4 y MRJP5 de 77-87 kDa. Una de las características principales de estas proteínas es la presencia de moléculas de manosa en su estructura que contribuye a su actividad antimicrobiana. Presentan actividad antimicrobiana contra patógenos Gram negativos y Gram positivos como *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (Bucekova y Majtan, 2016; Brudzynski, 2015; Schmitzová *et al*, 1998).

Los componentes proteicos mencionados anteriormente son provenientes de la miel de la especie *Apis mellifera*. Para la miel de las especies de abejas sin aguijón aún no existen reportes de péptidos y proteínas aisladas e identificadas.

2.5. Abejas sin aguijón.

Las abejas sin aguijón también denominadas meliponinos, son insectos altamente sociales que se distribuyen en las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Se agrupan en colonias que van desde pocas docenas hasta 100,000 o más obreras, viven entre rocas, muros viejos, troncos y cavidades de árboles (Quezada, 2005; Kumar *et al*, 2012; Michener, 2000).

Taxonómicamente, los meliponinos pertenecen al orden *Hymenoptera*, la familia *Apidae*, subfamilia *Apinae* y la tribu *Meliponini*. Estos insectos se caracterizan principalmente por la ausencia de un aguijón funcional; las obreras y las reinas solo poseen vestigios del aguijón que tuvieron en el pasado. A diferencia de los otros grupos de abejas, algunas de las venas de sus alas son muy tenues y otras están completamente ausentes. Además, poseen una estructura pilosa en forma de cepillo en el extremo más ancho de la tibia, conocido como penicillium (Quezada-Euan, 2005; Vit *et al*, 2004).

Existen aproximadamente 400 especies de abejas sin aguijón, pertenecientes a cerca de 50 géneros. De éstos, cerca de 300 especies (30 géneros) se encuentran en el continente americano, 40 (14 géneros) en el sureste de Asia, 50 (10 géneros) en África, 4 (1 género) en la Isla de Madagascar y 10 (2 géneros) en Australia. En México se reporta la presencia de al menos 46 especies de meliponinos, de los cuales, *Cephalotrigona zexmeniae*, *Melipona beecheii*, *Melipona yucatanica*, *Nannotrigona perilampoides*, *Partamona bilineata*, *Plebeia Plebeia frontalis*, *Plebeia Plebeia moureana*, *Plebeia Plebeia parkeri*, *Plebeia Plebeia pulchra*, *Scaptotrigina pectoralis*, *Trigona (Frieseomelitta) nigra nigra*, *Trigona Trigona fulviventris*, *Trigona Trigona fuscipennis*, *Trigonisca Trigonisca maya*, y *Trigonisca Trigonisca pipioli* han sido reportadas en el estado de Yucatán (Quezada-Euan, 2005).



Figura 1: La abeja *Melipona beecheii*.

En Península de Yucatán, la abeja *Melipona beecheii* es la especie de abejas sin aguijón más importante debido a su producción de miel y a sus propiedades medicinales. En lengua maya fue denominada “Xunan cab”.

2.6. Composición de la miel de abejas sin aguijón.

Para la miel de abejas sin aguijón no existen normas que regulen su composición a diferencia de la miel de *Apis mellifera*, sin embargo, existen algunas propuestas que determinan los valores de sus componentes.

De acuerdo con Vit *et al.* (2004) los estándares para la composición de la miel de las abejas sin aguijón debería ser la siguiente: 30% de humedad, 6g/100g de sucrosa para la miel de *Melipona*, 70 meq/100g de acidez, 0.5g/100g de ceniza y 40 mg/100g de HMF.

En la tabla 2 se muestra la comparación de la composición entre la miel de *Apis mellifera* y la miel de las abejas sin aguijón.

Tabla 2: Comparación de la composición de la miel de abejas sin aguijón y la miel de *Apis mellifera* (Vit *et al.*, 2004).

COMPONENTE	<i>Apis mellifera</i>	<i>Melipona</i>
Contenido de agua (g/100g)	20	30
Azúcares reductores (g/100g)	65	50
Sacarosa (g/100g)	5	6
Acidez (meq/100g)	40	70
Ceniza (g/100g)	0.5	0.5
HMF (mg/100g)	40	40
Diastasa	8	3

En el análisis de los parámetros fisicoquímicos de distintas muestras de mieles de la especie *Melipona beecheii* realizado por Moo-Huchin (2015) se reportó que el porcentaje de humedad se encuentra por encima del límite establecido por la miel de la especie *Apis mellifera*, con valores entre 21 y 25.3 %; el contenido de ceniza varía entre 0.01 y 0.6%, valores que se encuentran dentro de los parámetros establecidos por el Codex Alimentarius para la miel de la especie *Apis mellifera* el cual estipula un valor máximo de 0.5%; la cantidad de sólidos solubles que presenta se encuentra entre 72.8 y 77.3° Brix que resultan menores a los de la miel de *Apis mellifera*, debido a que la miel de *Melipona*

tiene un mayor contenido de humedad. De acidez se reportaron valores desde 13 hasta 71 meq/kg, esto se debe a que su composición está en función de la fuente floral y de la época de recolección; el pH varía de 2.6 a 3.3. El contenido de azúcares reductores se encontró entre 57.1 y 74.2g/100g, en donde la mayor parte de las muestras atendían la cantidad mínima establecida por el Codex Alimentarius. La cantidad de HMF varía entre 4 y 45.5 mg/kg, estos valores no exceden el límite máximo permisible para la miel de *Apis* el cual corresponde a 40 mg/kg.

2.7. Usos de la miel de abejas sin aguijón.

A la miel, por sus características fisicoquímicas y su composición compleja, se le atribuyen propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes, entre otras; ha sido empleada desde la antigüedad en la medicina tradicional maya para el tratamiento de enfermedades de los sistemas respiratorio, digestivo, circulatorio e inmunológico y de órganos sensoriales como la piel, ojos, oídos, lengua, encías y dientes; también se ha empleado como remedio contra las picaduras de escorpiones, arañas, tarántulas, hormigas y serpientes venenosas (Vázquez *et al.*, 2016).

2.7.1. Enfermedades oculares.

La miel ha sido empleada en el tratamiento de afecciones oftalmológicas como blefaritis, queratitis, conjuntivitis, lesiones corneales, quemaduras químicas y térmicas de los ojos. La aplicación tópica de la miel es capaz de reducir el enrojecimiento, hinchazón, secreción de pus y el tiempo de erradicación de las bacterias que generan algunas de estas enfermedades tales como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Pseudomonas aeruginosa*, también acelera la cicatrización de las heridas en la córnea aumentando la proliferación de los queratocitos (Esteraf-Oskouei y Najafi, 2013; Majtanova *et al.*, 2016).

2.7.2. Desórdenes de la piel.

La miel ha sido empleada como apósito sobre quemaduras y heridas, actuando como un calmante, reduciendo la inflamación, estimulando la generación de tejido y ayudando a la cicatrización. También funciona como una barrera contra los microorganismos debido

a su baja actividad de agua y su elevada osmolaridad, previniendo de esta manera alguna infección. Presenta actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y Gram-positivas así como un efecto antifúngico contra algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, es efectiva en el tratamiento de candidiasis causada por el patógeno *Candida albicans* y de las micosis cutáneas como la tiña y el pie de atleta. Su aplicación tópica es eficaz en el tratamiento de la dermatitis seborreica y la caspa (Esteraf-Oskouei y Najafi, 2013).

2.7.3. Desórdenes digestivos.

En la medicina tradicional maya, varias enfermedades del tracto digestivo tales como diarrea, cólicos, parasitosis y disentería eran tratadas con miel. Uno de los pasos iniciales para el desarrollo de las infecciones en el tracto gastrointestinal es la adherencia de los microorganismos a las células epiteliales de la mucosa. La miel posee componentes capaces de alterar las cargas electrostáticas y la hidrofobicidad que le permite a las bacterias unirse a las células huésped. También ayuda a reparar la mucosa intestinal dañada, estimula el crecimiento de nuevos tejidos y actúa como un agente antiinflamatorio. Otro mecanismo gastroprotector de la miel es la reducción salivar de nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) y la formación de óxido nítrico (NO) el cual interviene en la preservación de los capilares de la mucosa gástrica y en el aumento de la producción de mucosa. (Esteraf-Oskouei y Najafi, 2013; Vázquez *et al.*, 2016).

La gastritis, la dispepsia, la presencia de úlceras estomacales e intestinales, el desarrollo de Linfoma MALT y de cáncer gástrico son algunas enfermedades gastrointestinales asociadas entre otros factores, al patógeno *Helicobacter pylori*. En algunos estudios realizados, se ha demostrado que la miel es capaz de inhibir el crecimiento de esta bacteria empleando concentraciones a partir de 10% (Manyi-Loh *et al.* 2010; Ndip *et al.*, 2007).

2.8. El género *Helicobacter*.

Las bacterias que pertenecen al género *Helicobacter* son Gram negativas, no forman esporas, tienen forma curva, espiral o fusiforme, miden 0.2-1.2 μm de diámetro y 1.5-10

µm de longitud, presentan actividad flagelar dada por uno o varios flagelos envainados o no envainados y que pueden ser polares, bipolares o peritricos dependiendo de la especie. Crecen en condiciones microaerofilicas, es decir, en bajas concentraciones de oxígeno (5-10%), no son capaces de hidrolizar gelatina, caseína, almidón ni tirosina, son rojo de metilo y Voges-Proskauer negativo, es decir, no fermentan la glucosa, presentan actividad oxidasa, la mayoría de las especies producen catalasa, ureasa y fosfatasa alcalina (Solnick *et al*, 2001).

El género *Helicobacter* está compuesto por 32 especies validadas con nombre, estas especies se subdividen en especies de *Helicobacter* de tipo gástrico y en especies de *Helicobacter* de tipo enterohepático. Las especies de *Helicobacter* de tipo enterohepático colonizan el intestino y el hígado de su huésped, la expresión de la ureasa es variable. Algunas de las especies de este grupo son *Helicobacter canis* (perro), *Helicobacter hepaticus* (ratón), *Helicobacter pullorum* (pollos). Las especies de *Helicobacter* de tipo gástrico colonizan la mucosa del estómago de su huésped, que van desde humanos y primates no humanos hasta mamíferos domesticados y salvajes, expresan ureasa que les permite colonizar en el ambiente hostil de ese nicho. Algunas de las especies representativas de este grupo son *Helicobacter felis* (gatos, perros), *Helicobacter mustelae* (hurón), *Helicobacter bizzozeronii* (perro), *Helicobacter suncus* (musaraña), *Helicobacter heilmanni* (humano) y *Helicobacter pylori* (humano) que se considera la especie de mayor patogenia de este género.

2.9. *Helicobacter pylori*.

Una de las primeras descripciones de la presencia de especies del género *Helicobacter* en estómagos de mamíferos fue realizada por el italiano Guilio Bizzozero en 1893, quien encontró pequeños espirilos Gram negativos, de 3-8 µm de longitud y 3-7 flagelos monopolares en la capa de la mucosa del estómago de perros (Figura, 1996). Tres años después, el alemán Hugo Salomon observó bacterias de forma en espiral en el estómago de perros y gatos, informó que estos organismos habitan los hoyos gástricos de las glándulas pilórica y fúndica y fue capaz de propagar dichas bacterias desde el moco

gástrico de los animales infectados a ratones blancos no infectados mediante la alimentación (Dannon, 2001).

A principios del siglo veinte W. Krienitz, otro alemán, detectó gérmenes con forma en espiral en los estómagos de los pacientes con carcinoma gástrico. Sin embargo, ninguno de ellos sospechó que ese microorganismo sería la principal causa de las enfermedades gastrointestinales (Janulaytè-Günther, 2003).

2.10. Morfología.

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa que forma parte de la biota intestinal humana, presenta forma en espiral (no espiroqueta), mide aproximadamente 3 µm de longitud y 0.5 µm de diámetro, cuenta con alrededor de 7 flagelos, ubicados generalmente en un extremo de la bacteria y que le ayudan a desplazarse sobre medios viscosos como la mucosa gástrica, es microaerófilico, requiere oxígeno en concentraciones menores a las presentes en la atmósfera, se desarrolla en un ambiente neutro, aunque es capaz de sobrevivir en medios ácidos con pH igual a 2 gracias a la actividad de su enzima ureasa (Bik, 2006; Lawal, 2014).

Algunos de los factores de virulencia del microorganismo se describen a continuación.

2.11. Factores de virulencia.

2.11.1. Ureasa.

Helicobacter pylori es un microorganismo que se desarrolla en ambientes neutros, sin embargo, es capaz de colonizar el ambiente hostil del estómago humano. Esta capacidad se la confiere la producción de grandes cantidades (10-15% de las proteínas totales) de la enzima ureasa (urea amidohidrolasa EC 3.5.1.5). La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea produciendo amoniaco y carbamato; el carbamato a su vez se descompone en una molécula de amoniaco y una de ácido carbónico. En una solución, el ácido carbónico liberado y las dos moléculas de amoniaco se encuentran en equilibrio con sus formas desprotonadas y protonadas, respectivamente, dando como resultado un incremento en el pH. (Kao, 2016; Matongo y Nwodo, 2014; Mobley, 1996).

La ureasa es codificada por un conjunto de 7 genes: *ureA* y *ureB* que codifican las subunidades estructurales de la enzima, mismas que presentan pesos moleculares de 26.5 kDa y 60.3 kDa respectivamente; *ureE*, *ureF*, *ureG* y *ureH* que codifican para proteínas accesorias que se encargan de la inserción de iones níquel en el sitio activo de la enzima que sirven para su adecuada actividad catalítica y por último *ureI* que codifica una proteína que, cuando el pH del medio desciende por debajo de un valor de 6.5, es capaz de formar poros en la membrana que permiten el ingreso de urea hacia el interior de la bacteria. Estos genes, a excepción de *ureI*, presentan homología con los genes que codifican la ureasa de bacterias como *Proteus mirabilis*, *Klebsiella aerogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Bacillus spp.* termofílicos. Esta enzima posee un peso molecular de aproximadamente 550 kDa y se conforma por la asociación de seis copias de cada una de sus subunidades A y B; en cada una de las subunidades B se encuentra un sitio activo que posee 2 iones níquel. La ureasa puede ensamblarse perfectamente en ausencia de las proteínas accesorias y de los iones níquel, sin embargo, esta no presentaría actividad catalítica (Mobley, 2001).

Debido al requerimiento de níquel para el funcionamiento correcto de la enzima, la bacteria cuenta con una proteína de membrana denominada NixA que se encarga de la transportación de iones níquel hacia el interior de la célula, esta proteína posee un peso molecular de 34 kDa y es codificada por el gen *nixA*. La inactivación de esta proteína conlleva a una disminución de la actividad de la ureasa debido a los bajos niveles de níquel en la bacteria (Akada, 2000; Merrell *et al.*, 2003; Mobley, 1996).

La ureasa se expresa en el citoplasma de la bacteria. Algunos autores afirman que también es posible encontrarla en la superficie de la célula, sin embargo, no existe un mecanismo de secreción propuesto. Existen distintos sistemas de secreción en las bacterias: el sistema de secreción tipo I que está constituido por una proteína de membrana externa que forma un canal en dicha membrana, un transportador ABC (ATP binding cassette) localizado en la membrana interna y una proteína periplasmática que se denomina proteína de fusión. Este grupo de proteínas se encuentran en el mismo

grupo de genes en el que se encuentran las proteínas que serán secretadas (Marcus y Scott, 2001).

Se encuentran también el sistema de secreción tipo II en el cual la proteína secretada requiere de una secuencia señal hidrofóbica amino terminal que se escinde durante el proceso de secreción para que adquiera su conformación nativa. El sistema de secreción tipo III que requiere de una maquinaria compuesta por alrededor de 20 proteínas que al igual que el sistema de secreción tipo I, se encuentran dentro del mismo grupo de genes que las proteínas secretadas, y finalmente el sistema de secreción tipo IV que también requiere de la presencia de una secuencia señal amino terminal para la exportación de las proteínas (Marcus y Scott, 2001).

En el grupo de las ureasas no existen proteínas secretoras codificadas, tampoco contienen secuencias señal escindibles, lo cual hace que este tipo de secreciones sean improbables para la enzima de *Helicobacter pylori*. El ensamblaje de la ureasa para que sea activa requiere de la expresión de otros cuatro genes, y al menos de que sus productos también sean secretados, la enzima extracelular debería ser liberada ya ensamblada; el peso molecular de esta enzima es de alrededor de 550 kDa, de tal manera que no es posible que atraviese la membrana celular (Marcus y Scott, 2001).

Debido a que la presencia de la enzima ureasa en el exterior de la bacteria no puede explicarse mediante mecanismo de secreción de proteínas conocidos, se ha propuesto el concepto de “muerte celular altruista” en el cual se explica que una proporción de la población de la bacteria se lisa, provocando la liberación de la ureasa citoplasmática que posteriormente se adhiere a la membrana de las células vivas. La ureasa que se encuentra en el exterior de la bacteria contribuye a la resistencia a la exposición transitoria a los ácidos, sin embargo, debido a que esta se inactiva a valores de pH inferiores a 5, se cree que es la enzima citoplasmática la que le aporta mayor resistencia y protección a los medios ácidos ya que esta presenta mayor actividad cuando el pH desciende de 5.5 (Marcus y Scott, 2001).

La ureasa es considerada un factor de virulencia importante en el proceso de colonización de la bacteria, se ha demostrado que cepas mutantes de *Helicobacter pylori* que carecen de la enzima ureasa no son capaces de colonizar el estómago de cerdos gnotobioticos y ratones. (Eaton *et al.*, 1991; Tsuada *et al.*, 1994).

2.11.2. Flagelos.

Helicobacter pylori posee un grupo de 4-7 flagelos envainados localizados en uno de los polos de la célula que le ayudan a desplazarse a través del ambiente viscoso, penetrar la capa de la mucosa gástrica y colonizar el epitelio gástrico. Cada uno de estos flagelos mide alrededor de 3 μm de longitud y se encuentran recubiertos por una membrana relativamente resistente a los ácidos que los protege de su desintegración en el estómago. Presentan un pequeño bulbo en su extremo distal que representa una dilatación de la membrana que los recubre (Hurtado *et al.*, 1994; Spohn, 2001; Suerbaum, 1995). Se componen de tres elementos estructurales: un cuerpo basal incrustado en la pared celular que contiene las proteínas implicadas en la rotación y en la quimiotaxis, un filamento externo de forma helicoidal que funciona como una hélice cuando se gira sobre su base y un gancho que sirve de unión entre el cuerpo basal y el filamento (Spohn, 2001). El filamento está conformado principalmente de dos polímeros de flagelinas, FlaA que posee un peso molecular de alrededor de 57 kDa y FlaB de aproximadamente 56 kDa, y son codificadas por los genes *flaA* y *flaB* respectivamente. FlaB se localiza cerca del gancho y forma la base del filamento, FlaA representa la proteína más abundante y compone el resto del filamento (Kostrzynska, 1991; Otteman, 2002; Suerbaum, 1995).

2.11.3. Adhesinas.

Cuando *Helicobacter pylori* coloniza la capa de la mucosa que recubre el epitelio gástrico, la interacción de las adhesinas bacterianas con los receptores celulares del huésped, protege a la bacteria del desplazamiento del estómago causado por las fuerzas generadas por los movimientos peristálticos y el vaciado gástrico (Kao *et al.*, 2016).

Una de las proteínas de adherencia que emplea esta bacteria en la persistencia de su infección es la adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo (BabA). BabA es una

proteína que posee un peso molecular de 78 kDa aproximadamente (Kao *et al.*, 2016), es codificada por el gen *babA*, el cual tiene dos alelos, *babA1* y *babA2*, siendo específicamente *babA2* quien codifica para dicha proteína (Olivares *et al.*, 2006). La presencia del alelo *babA2* se correlaciona con la presencia de *cagA* y de los alelos *s1* y *m1* de *vacA*, los cuales se asocian con cepas de mayor virulencia, un grado más elevado de inflamación y mayor daño en el epitelio gástrico (Hatakeyama, 2004; Olivares *et al.*, 2006; Van Doorn, 1998). *Helicobacter pylori* emplea a BabA para unirse a los antígenos de Lewis B fucosilados del grupo sanguíneo (Le^b) (α -1, 3/4 difucosilado), a los residuos terminales de fucosa que se encuentran en los antígenos A, B, y O del grupo sanguíneo que se expresan en la superficie de mucinas (MUC1 y MUC5B) y en las células del epitelio gástrico cuando la bacteria inicia su infección en el estómago. Los antígenos de Lewis son glucolípidos que se encuentran en el plasma y en otras secreciones que se adhieren a los eritrocitos. BabA también es capaz de unirse a la mucina MUC5B, a proteínas ricas en prolina y a la glicoproteína gp-340 presentes en la saliva (Kalali *et al.*, 2014; Kao *et al.*, 2016; Oleastro *et al.*, 2013).

Otra proteína relacionada con la adhesión de *Helicobacter pylori* es la proteína activadora de neutrófilos (NAP). NAP es codificada por el gen *napA* y puede ser localizada en la membrana plasmática externa de la bacteria. Ésta proteína tiene afinidad por las ceramidas presentes en las membranas plasmáticas celulares, por las ceramidas sulfatadas, por los antígenos del grupo sanguíneo SO₃-Lewis^a y en menor medida por los Lewis^x y SO₃-Lewis^x (Olivares *et al.*, 2006).

2.11.4. Isla de patogenicidad Cag-PAI.

La citotoxina asociada al gen del antígeno A (CagA) es una proteína que tiene un peso molecular que oscila entre 121-145 kD codificada por el gen *cagA*. El gen *cagA* se localiza en uno de los extremos de una inserción de ADN de 40 kb conocida como Isla de patogenicidad *cag* (*cag* PAI). La isla de patogenicidad *cag* PAI contiene 31 genes putativos, de los cuales, se cree que 6 codifican componentes de un sistema de secreción bacteriano tipo IV, el cual se especializa en la transferencia de una variedad de complejos multimoleculares a través de la membrana hacia el espacio extracelular o hacia el interior

de otras células. La isla de patogenicidad *cag* PAI no se expresa en todas las cepas de *Helicobacter pylori*, las cepas *cagA* positivo se asocian con mayores grados de inflamación gástrica y mayor virulencia que las cepas *cagA* negativo (Yamazaki *et al.* 2005; Wen *et al.*, 2009; Hatakeyama, 2004).

Después de la adhesión de *Helicobacter pylori cagA* positivo a las células del epitelio gástrico, la proteína CagA es inyectada desde bacteria hacia el interior de las células huésped por el sistema de secreción bacteriano tipo IV y sufre una fosforilación en un residuo de tirosina. La fosforilación de tirosina ocurre en el único motivo presente en la región C-terminal (EPIYA Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) mediada por la familia SRC de tirosina quinasas y c-ABL quinasa. La proteína CagA-tirosina fosforilada interactúa con el dominio homólogo Src2 (SH2) que contienen las proteínas citoplasmáticas tirosina fosfatasa (SHP-2), tirosina quinasa (CSK) y la proteína adaptadora (CRK) de la célula huésped y altera su actividad (Yamazaki *et al.* 2005; Wen *et al.*, 2009).

La proteína SHP-2 está activamente involucrada en la regulación de la difusión, migración y adhesión de las células. La alteración de la actividad de la proteína SHP-2 mediante CagA puede inducir la proliferación anormal y el movimiento de las células del epitelio gástrico (Yamazaki *et al.* 2005).

De manera independiente a la fosforilación, CagA interactúa con las proteínas de unión ZO-1, la proteína de adhesión celular E-Cadherina y su proteína asociada β -Catenina, el receptor de factor de crecimiento de hepatocitos c-Met, la proteína adaptadora GRB-2 y la quinasa PAR1, provocando la pérdida de la polaridad celular, la inducción de la respuesta de los efectos pro-inflamatorios y mitogénicos que propician el desarrollo del cáncer gástrico (Wen *et al.*, 2009).

2.11.5. Citotoxina de vacuolización VacA

En 1988 Leunk descubrió en el filtrado de un cultivo de *Helicobacter pylori* una molécula citotóxica capaz de producir la vacuolización intracelular en líneas celulares de mamíferos, tiempo después, esta molécula recibió el nombre de “toxina vacuolizante”

debido a su capacidad de inducir la formación de vacuolas en las células. Esta toxina está compuesta por dos subunidades: p33 y p55, tiene un peso molecular aproximadamente de 87 kDa y no presenta homología entre otras especies de *Helicobacter* ni entre otras especies de bacterias Gram negativas. Esta proteína es codificada por el gen *vacA*, que está presente en todas las cepas de *Helicobacter pylori*, sin embargo, no todas las cepas son capaces de producir la vacuolización debido a las diferencias alélicas que presenta este gen (Kusters, 2006; Leunk, 1988; Martínez-Carrillo, 2014; Palframan, 2012; Trujillo, 2014; Van Dorn, 1998).

El polimorfismo de la secuencia del gen *vacA* se ha identificado en tres regiones: en la región de la secuencia señal (s1 y s2) que codifica el péptido señal, en la región intermedia (i1, i2 e i3) y en la región media (m1 y m2) que contiene el dominio de unión a las células p58 involucradas en la defensa antitumoral. La variación alélica tipo s2 a diferencia de la tipo s1 codifica una proteína VacA con un segmento adicional de aminoácidos hidrofílicos situado en la región N-terminal que impide que la toxina induzca la vacuolización. Los alelos m1 y m2 difieren en una secuencia codificada de 148 aminoácidos que afecta la especificidad de diversos receptores celulares. De tal manera que la combinación alélica s1/m1 se asocia con altos niveles de vacuolización, la combinación s1/m2 presenta un nivel intermedio y la combinación s2/m2 que producen muy poca o no producen ésta citotoxina y por ende no es capaz de generar la vacuolización (Kusters, 2006; Leunk, 1988; Martínez-Carrillo, 2014; Palframan, 2012; Trujillo, 2014; Van Dorn, 1998).

VacA es la principal exotoxina de *Helicobacter pylori*, ésta induce la vacuolización del citoplasma de la células epiteliales, la despolarización de la membrana, la disfunción mitocondrial, el proceso de autofagia, la inhibición de la función de las células T y la muerte celular. También es capaz de formar poros en la membrana de las células epiteliales provocando la liberación de urea (que sirve para la actividad de la enzima ureasa de la bacteria) y aniones de la célula huésped (Nakashima *et al*, 2015).

2.12. Tratamientos médicos para combatir a *Helicobacter pylori*.

Existen tres grupos de fármacos que empleados en combinación, resultan ser efectivos en el tratamiento de las enfermedades causadas por *Helicobacter pylori*: inhibidores de la bomba de protones que ayudan a disminuir la producción de ácido en el estómago permitiendo que los tejidos dañados por la infección sanen (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol), compuestos de bismuto (subsalicilato de bismuto, ranitidina-citrato de bismuto) y antibióticos (amoxicilina, tetraciclina, macrólidos: claritromicina; nitroimidazoles: metronidazol y tinidazol). Estos grupos de fármacos se asocian para dar lugar a distintas terapias dentro de las cuales se encuentran la terapia triple que consta de la combinación de un inhibidor de la bomba de protones y dos antibióticos que pueden ser amoxicilina y claritromicina (o metronidazol); la terapia triple clásica que se constituye de un compuesto de bismuto, metronidazol y tetraciclina (o amoxicilina); y la terapia cuádruple que consiste en la combinación de un compuesto de bismuto, de un inhibidor de la bomba de protones y los antibióticos tetraciclina y metronidazol que pueden ser sustituidos por amoxicilina y claritromicina respectivamente. La duración de los tratamientos varía entre 7-14 días dependiendo de las características de cada paciente. Las concentraciones de los fármacos se suministran de la siguiente manera: claritromicina 500 mg/8-12 h, amoxicilina 1g/8-12 h, tetraciclina 500 mg/6 h, metronidazol 400-500 mg/6 h, subsalicilato de bismuto 525 mg/6 h, ranitidina-citrato de bismuto 400 mg/12 h, omeprazol 20-40 mg/24 h, lansoprazol 30 mg/12 h, pantoprazol 40 mg/12 h. (Alarcón, 1999; De Boer, 2000; Sierra, 2014; Suerbaum, 2002).

Sin embargo, la aplicación de estas terapias presenta algunos efectos secundarios tales como la producción de heces con coloración negra y estreñimiento producido por los compuestos de bismuto, enrojecimiento de la piel, dolor de cabeza, náuseas, vómito, diarrea, sudoración y aumento de la frecuencia cardiaca. Otras desventajas que se presentan son el elevado número de comprimidos que deben ingerirse, el periodo de duración del tratamiento que se extiende hasta 14 días, la resistencia de algunas cepas hacia algunos antibióticos principalmente metronidazol y claritromicina lo cual disminuye la eficiencia del tratamiento. Además, los antibióticos suministrados son de amplio espectro, es decir, que afecta por igual a todas las bacterias dependiendo del mecanismo

de acción del fármaco, por lo cual se verán afectadas inclusive las bacterias benéficas que forman parte de la microbiota natural humana (Patel *et al*, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN.

Helicobacter pylori infecta a más del 50% de la población a nivel mundial, coloniza el estómago humano y produce enfermedades gastrointestinales tales como gastritis crónica, úlcera gástrica y es considerada por la Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer como agente carcinógeno tipo 1 ya que es uno de los principales factores que conducen al desarrollo de carcinoma gástrico. Generalmente, estas enfermedades son tratadas con distintas terapias que incluyen antibióticos, inhibidores de la bomba de protones y compuestos de bismuto, sin embargo, éstos presentan múltiples efectos secundarios tales como diarrea, vómito, enrojecimiento de la piel, estreñimiento, entre otros, que en muchos casos lleva a la suspensión del tratamiento; no suelen ser específicos, por lo que destruyen la microflora natural del intestino, y en los últimos años, se ha incrementado la cantidad de cepas resistentes a dichos medicamentos. Por tales motivos, es necesario la búsqueda de nuevos compuestos para combatir éstas enfermedades. Una alternativa son los compuestos naturales tales como la miel de *Melipona beecheii*, que al ser una mezcla compleja de compuestos bioactivos puede poseer distintos mecanismos de acción y que ha sido empleada para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

4. HIPÓTESIS.

La miel de *Melipona beecheii* posee actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori* ATCC 49503 y puede afectar la expresión de sus genes de virulencia.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

- Evaluar la actividad antimicrobiana y el efecto de la miel de *Melipona beecheii* en la expresión de los genes de virulencia de *Helicobacter pylori* ATCC 49503

5.2. Objetivos específicos.

- Evaluar la actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* sobre *Helicobacter pylori* ATCC 49503.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii* sobre *Helicobacter pylori* ATCC 49503.
- Evaluar el efecto de la miel de *Melipona beecheii* en la expresión de los genes de virulencia de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Activación de la cepa *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

La activación de la cepa *Helicobacter pylori* se realizó en 3 distintos medios de acuerdo a las instrucciones dadas en la hoja técnica de activación de la ATCC (American Type Culture Collection). El vial que contenía la cepa se vertió en un tubo con 5 ml de caldo Mueller Hinton y se le denominó “Tubo madre”. Para la activación en medio líquido se prepararon 3 tubos con 5 mL de caldo Mueller Hinton, 3 tubos con 5 ml de caldo Brucella enriquecido con 10% de suero fetal bovino (BB 10% SFB) y 3 tubos con 5 mL de caldo Tripticasa de soya enriquecido con 5% de sangre (TSB 5% sangre). De cada uno de los diferentes medios, se tomaron 2 tubos y se les adicionaron 5 μ L de vancomicina (10^{mg}/_{mL}). Todos los tubos fueron inoculados con 250 μ L de la solución que contenía el tubo madre. Para la activación en medio sólido se prepararon 3 cajas con agar Mueller Hinton, 3 cajas con agar Brucella enriquecido con 10% de suero fetal bovino (BA 10% SFB) y 3 cajas con agar Tripticasa de soya enriquecido con 5% de sangre (TSA 5% sangre), todas adicionadas con una concentración de 100 ^{μ g}/_{mL} vancomicina (10^{mg}/_{mL}). Cada una de las cajas se inoculó con 250 μ L de la solución del tubo madre. Las cajas y los tubos, fueron incubados a 37°C en una atmósfera microaerofílica (85% nitrógeno, 10% CO₂ y 5% O₂) durante un periodo de 72 horas.

6.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* contra *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

Para la determinación de la actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* se empleó el método de dilución en agar (Schwalbe *et al.*, 2007). Se utilizó la cepa *Helicobacter pylori* ATCC 49503 cultivada en medio BA 10% SFB a 37 °C durante 72 horas en condiciones microaerofílicas. Se prepararon placas con medio BA 10% SFB y miel en concentraciones de 5, 10, 20 y 30% ν/ν adicionadas con una concentración de 100 ^{μ g}/_{mL} de vancomicina (10^{mg}/_{mL}). Se ajustó una suspensión de bacterias en solución salina a 0.5 en la escala de McFarland que corresponde a 0.1 de absorbancia a 600 nm para obtener una concentración de 1x10⁸ UFC. Se inocularon las placas con 100 μ L de la suspensión y se incubaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Los

controles se prepararon con el mismo medio sin miel, se usó tetraciclina ($100\mu\text{g}/\text{mL}$) como control positivo.

6.3. Evaluación del efecto de la miel de *Melipona beecheii* en la actividad de ureasa de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

Para la evaluación del efecto de la miel de *Melipona beecheii* sobre la actividad de la enzima ureasa de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 se empleó el método de dilución en agar (Schawalbe *et al.*, 2007). Se prepararon cajas con medio de urea agar de acuerdo a Christensen (1946) y miel en concentraciones de 1, 2 y 3% adicionadas con $100\mu\text{g}/\text{mL}$ de vancomicina ($10\text{mg}/\text{mL}$). Se ajustó una suspensión de bacterias a una concentración de 1×10^8 UFC empleando la escala 0.5 de McFarland. En cada una de las cajas se inoculó $100\ \mu\text{L}$ de la suspensión bacteriana y se incubó a 37°C durante 72 horas bajo condiciones microaerófilas. Como control positivo se empleó tetraciclina.

6.4. Extracción de los componentes proteicos de la miel de *Melipona beecheii*.

La extracción de los componentes proteicos de la miel se realizó mediante el método descrito por Schmitzová *et al.* (1998) con algunas modificaciones. Las muestras de miel se diluyeron en un búfer de fosfatos ($50\ \text{mM}\ \text{NaH}_2\text{PO}_4:\text{Na}_2\text{HPO}_4$; $100\ \text{mM}\ \text{NaCl}$; pH 7) empleando $10\ \text{mL}$ de búfer por cada gramo de miel; se agitaron en intervalos de 5 minutos durante 30 minutos y posteriormente se centrifugaron a $5,000\ \text{RPM}$ durante 30 minutos para precipitar el polen y otros residuos presentes en la miel. Las muestras fueron decantadas y la solución obtenida fue sometida a ultrafiltración en columnas Amicon con una membrana de $3\ \text{kDa}$, centrifugando a $5,000\ \text{rpm}$ en periodos de 50 minutos. Cada uno de los pasos fue realizado en hielo. El extracto obtenido fue almacenado a 4°C para análisis posteriores.

6.5. Cuantificación del extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii*.

La cuantificación del contenido proteico del extracto obtenido de la miel de se llevó a cabo con el método de Bradford (1976) usando como estándar una curva de albúmina sérica bovina (BSA). Para la preparación de las muestras se diluyó $1\ \mu\text{L}$ del extracto en $99\ \mu\text{L}$

de agua destilada, se le añadió 1 mL del reactivo de Bradford y se mantuvieron en oscuridad durante 10 minutos. Posteriormente se midió su absorbancia a 595 nm.

6.6. Determinación del perfil proteico de la miel de *Melipona beecheii*.

El perfil del extracto proteico se determinó mediante el método SDS-PAGE desnaturalizante. Para el análisis, se preparó una muestra mezclado 2 µL del extracto proteico con 3 µL de búfer de carga y 15 µL de agua destilada; se incubó a 95°C durante 5 minutos y posteriormente se enfrió en hielo. La muestra se cargó en un gel de electroforesis el cual consistió de un gel separador de acrilamida al 12 % seguido de un gel de apilamiento de acrilamida al 4 %. El gel se corrió a 80 Volts durante 100 minutos y finalmente se realizó una tinción con plata para visualizar las bandas.

6.7. Actividad antimicrobiana del extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii* contra *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

Para determinar la actividad antimicrobiana del extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii* se empleó el método de difusión en disco (Schawalbe *et al.*, 2007). Se preparó una suspensión bacteriana de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 a una concentración de 1×10^8 UFC utilizando la escala 0.5 de McFarland que corresponde a un valor de 0.1 de absorbancia a 600 nm. Se prepararon cajas con medio BA 10% SFB adicionadas con $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ vancomicina ($10 \text{mg}/\text{mL}$); las cajas se inocularon frotando suavemente empleando un hisopo de algodón estéril hasta cubrir totalmente la superficie. Se evaluaron concentraciones de 400, 500 y 600 µg del extracto proteico, se empleó como control tetraciclina y búfer de fosfatos. Se incubó a 37°C durante 72 horas bajo condiciones microaerófilas.

6.8. Extracción de ADN de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

La extracción de ADN de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 se realizó mediante el método CTAB descrito por Velázquez *et al* (2014) con algunas modificaciones. La biomasa obtenida de una placa con medio BA 10 % SFB se suspendió en 800 µL de solución salina 0.85 %. La solución se agitó vigorosamente (vórtex) hasta obtener una mezcla homogénea y se dividió en dos tubos estériles con 400 µL de la mezcla cada uno. A cada

uno de los tubos se añadió 30 μL de SDS (Dodecilsulfato de Sodio) al 10 % y se agitó suavemente para incorporar completamente el reactivo en la solución, posteriormente se adicionó 3 μL de proteinasa K (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y se incubaron a 37°C durante una hora. Una vez transcurrido el tiempo, la mezcla se homogenizó con 100 μL de NaCl 5 M y 80 μL de CTAB (Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio), seguidamente se colocaron los tubos en un baño María a 65°C durante 10 minutos. Al finalizar el periodo de incubación en baño María, se realizaron 3 lavados; cada lavado consistió en agregar 500 μL de Cloroformo/Alcohol Isoamílico (24:1) a la solución obtenida, centrifugar durante 10 minutos a 12,000 rpm, retirar cuidadosamente el sobrenadante y colocarlo en un tubo estéril. El sobrenadante se mezcló con 800 μL de etanol absoluto a -20°C y se dejó precipitar durante 24 horas a la misma temperatura. A continuación, se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 minutos, se decantó el sobrenadante y se añadió 500 μL de etanol absoluto a -20°C, se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar. El pellet fue resuspendido en 20 μL de agua estéril.

6.9. Detección de la presencia de los genes de interés de estudio de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 mediante PCR.

Para verificar la presencia de los genes de interés de estudio se llevaron a cabo reacciones de PCR empleando la muestra de ADN obtenida anteriormente. Se preparó una mezcla para cada uno de los genes a evaluar (*hsp60*, *sigma80*, *ureA* y *vacA*); la mezcla estaba compuesta de 86.4 μL de agua estéril, 28 μL de buffer, 2.8 μL de dNTP's, 7 μL de cada uno de los oligonucleótidos (forward y reverse), 35 μL de Enhancer, 2 μL de polimerasa y 6 μL de ADN. La mezcla se separó en tubos que contenían un volumen de 25 μL excepto el tubo marcado como blanco que no contenía ADN y tenía un volumen final de 20 μL . Los tubos se colocaron dentro de un termociclador empleando un gradiente de temperatura de 45°C a 65°C. Los oligonucleótidos empleados se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3: Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los genes de interés de estudio.

GEN		SECUENCIA	TAMAÑO	GENEBANK
<i>hsp60</i>	FW	ATCGCTCACGGCTATGCAAAA	100 pb	AJ558221.1
	RV	ATTGCATGCCCTCTACGACA	100 pb	
<i>sigma80</i>	FW	TAAAGCCCTTGAAGCCCTG	600 PB	AF0099177.1
	RV	GATCCACCAGGTTCGCATAGG	600 PB	
	FW	GGTGGCTGAAGAAGTGGGG	100 pb	
	RV	ATCATCATTGCCAACTGGGGT	100 pb	
<i>ureA</i>	FW	ACCTGGCGAAGAAAAATCCG	100 pb	GQ403150.1
	RV	GCTTTCGTTGTCTGCTTGCC	100 pb	
<i>vacA</i>	FW	TGGGTAATGTGTGGATGGGC	600 pb	AY737319.1
	RV	CAATAAAGAACGCCCCGCTCG	600 pb	
	FW	GCGTATCTGGCCCTTCATA	100 pb	
	RV	CTTGAGCAGCATTGTGATCA	100 pb	

6.10. Extracción de ARN de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

La extracción de ARN de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 se llevó a cabo adaptando el método de trizol propuesto por Chomczynski *et al.* (1987). En 750 µL de solución salina 0.85 % se resuspendió la biomasa obtenida de una placa con medio BA 10 % SFB, se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos y se decantó la solución. Al pellet obtenido se le añadieron microperlas de cristal, 400 µL de solución de lisis (320 mM C₂H₃NaO₂; SDS 8 %; 16 mM EDTA; pH 4.6) y se agitó vigorosamente (vortex) hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos. Al sobrenadante recuperado se le añadió 400 µL de trizol, se agitó durante 1 minuto (vortex) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante, se mezcló con 200 µL de cloroformo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 12,000 rpm y al sobrenadante obtenido se le añadió 200 µL de una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó

una vez más a 12,000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante, se mezcló con 800 µL de etanol absoluto a -20°C y se dejó precipitar durante 24 horas a la misma temperatura. Se centrifugó durante 30 minutos a 12,000 rpm, se decantó la solución y se adicionó 500 µL de etanol absoluto a -20°C. Se centrifugó de nuevo a 12,000 rpm durante 10 minutos, se decantó y se dejó secar la muestra. El pellet obtenido fue resuspendido en 20 µL de agua libre de nucleasas.

6.11. Síntesis de ADNc.

Para realizar la síntesis de ADNc se realizó una mezcla para cada uno de los genes evaluados. La mezcla contenía 2 µL de la muestra de ARN, 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos (Forward y Reverse) correspondiente a cada gen (Tabla 3), 8 µL de agua libre de nucleasas, 4 µL de búfer de reacción, 1 µL del enzima RiboLock, 2 µL de nucleótidos trifosfatados (DNTP's) y 1 µL del enzima Revert Aid RT. La mezcla se incubó primero a 42°C durante 1 hora y posteriormente a 70°C durante 5 minutos. Los genes evaluados fueron *hsp60*, *sigma80*, *ureA*, y *vacA*.

6.12. Análisis de la expresión génica de los genes de virulencia de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 mediante qRT-PCR.

Para realizar el análisis de la expresión génica se extrajo ARN de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 cultivada en condiciones normales en medio brucella agar 10% SFB y en concentraciones 1 y 3% de miel de *Melipona beecheii*. Con el ARN obtenido de las 3 distintas condiciones se procedió a realizar la síntesis de ADNc siguiendo el mismo protocolo anterior pero empleando oligonucleótidos poli-dT. Se evaluaron los genes de virulencia *ureA* y *vacA*, y los genes housekeeping *hsp60* y *sigma80*. El análisis de la expresión génica se llevó a cabo en un termociclador StepOne Real Time PCR (Applied Biosystem, Perkin-Elmer, Foster City, Ca, USA) con la capacidad para placas de 48 pozos. El ADNc obtenido y los oligonucleótidos fueron diluidos con agua libre de nucleasas a una concentración de 1:125 y 1:5 respectivamente. En cada uno de los pozos se cargó un equivalente a 7 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos (Forward y Reverse), 10 µL de IQ SYBER Green Super Mix y 7 µL de ADNc. Cada una de las reacciones se preparó por cuadruplicado.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Activación de la cepa *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

Con el objetivo de determinar el medio más adecuado para el crecimiento de la bacteria, la activación de la cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 se realizó en 3 medios distintos preparados de manera sólida y líquida; 2 de ellos, Brucella 10% SFB y Trypticasa de soya 5% sangre, fueron propuestos por la hoja técnica de activación de la ATCC, el tercero, Mueller Hinton, se eligió por ser el medio recomendado por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana (Schwalbe *et al.* 2007).

En medio Mueller Hinton preparado como sólido y líquido no se presentó crecimiento, esto probablemente se deba a que no se utilizó ningún nutriente de enriquecimiento que pudiera ser necesario para el crecimiento del microorganismo ya que existen reportes en donde se ha empleado éste medio suplementado con 5-10% de sangre de cordero o de caballo para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de algunos antibióticos (Hartzen, 1997; Piccolomini, 1997). En los medios líquidos Brucella 10% SFB y Trypticasa de soya 5% sangre no se obtuvo crecimiento a diferencia de los medios sólidos en donde se observaron algunas colonias (Figura 2). La ausencia de crecimiento en medios líquidos se puede atribuir a la falta de agitación durante el periodo de incubación que pudiera mejorar la distribución de la atmósfera debido a que se ha reportado crecimiento de esta bacteria en medios líquidos en donde se ha implementado agitación (Baltrus, 2006; Geis *et al.*, 1993). Se observaron colonias circulares, traslúcidas, brillantes y cremosas, correspondiente a la morfología macroscópica descrita en la hoja técnica de activación de la ATCC. En el análisis microscópico se obtuvieron pequeños bacilos curvos y móviles (Figura 3). El crecimiento fue más abundante en el medio BA 10% SFB y la visualización de las colonias era más clara en contraste con el medio TSA 5% sangre, por tal motivo, se determinó que el medio más adecuado para el cultivo y las pruebas antimicrobianas contra *Helicobacter pylori* ATCC 49503 fue BA 10% SFB (Figura 2).

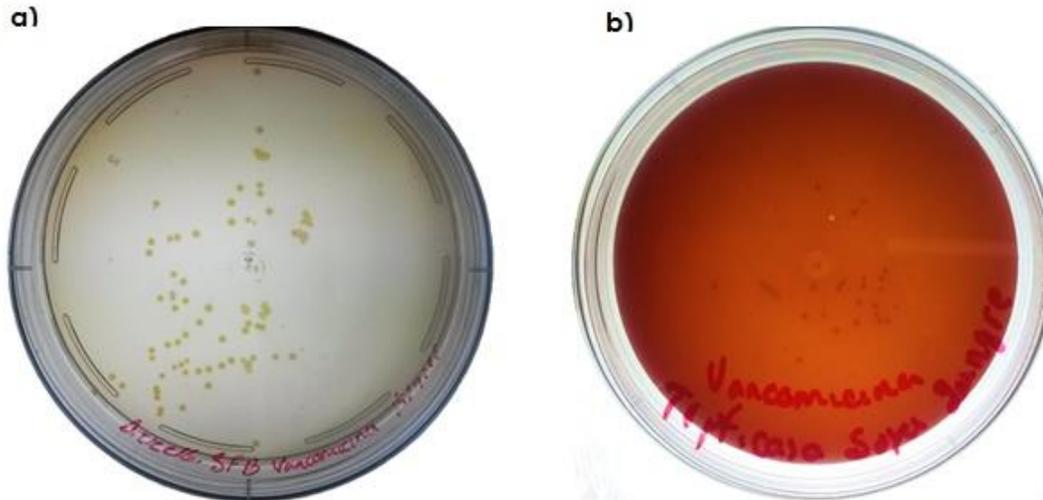


Figura 2: Activación de la cepa *Helicobacter pylori*: a) Colonias en medio BA 10 % SFB, b) Colonias en medio TSA 5 % sangre.

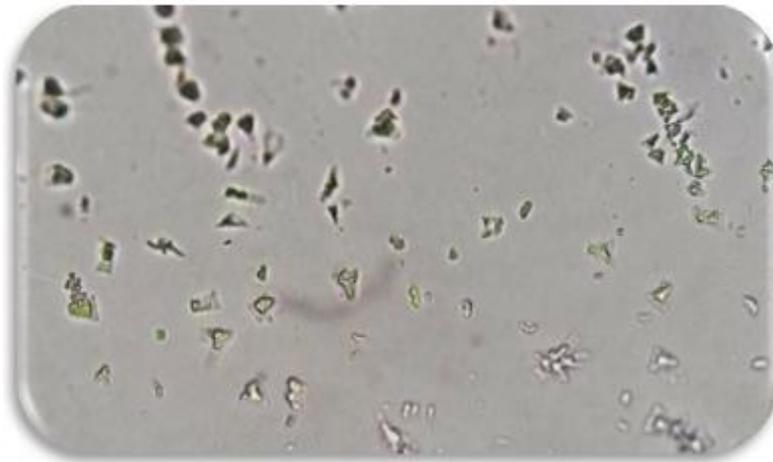


Figura 3: Morfología microscópica de *Helicobacter pylori*. Pequeños bacilos curvos observados con un objetivo de 100X.

7.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* contra *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

La miel de *Melipona beecheii* fue capaz de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 a concentraciones de 10, 20 y 30% (Figura 4). A una concentración de 5 %, la miel se observó una disminución en el número de colonias con respecto al control (Figura 5). Éste comportamiento ya había sido observado por Ndip *et al.* (2007) quienes

reportaron inhibición de *Helicobacter pylori* con 4 tipos de mieles comerciales (Mountain, Capillano, Manuka y Eco) de distintas regiones (Camerún, Australia, Nueva Zelanda y Kenia) a partir de una concentración de 10 %. De la misma manera, Manyi-Loh *et al.* (2010) reportaron actividad antimicrobiana de mieles de distintas floraciones de Sudáfrica a partir de concentraciones de 10 % contra *Helicobacter pylori*. En 1994, Somal *et al.* Reportaron una actividad antimicrobiana con mieles de Manuka a partir de una concentración de 20%. Las mieles evaluadas en ambos trabajos son procedentes de la especie *Apis mellifera*, hasta el momento no existen reportes de la miel de *Melipona beecheii* contra este microorganismo.

La actividad antimicrobiana de la miel se atribuye principalmente a su osmolaridad, a su alto contenido de peróxido de hidrógeno y a su acidez, sin embargo, la osmolaridad de la miel se ve reducida cuando esta es diluida a un 10 %, además, *Helicobacter pylori* cuenta con catalasa que le permiten descomponer el peróxido de hidrógeno y con ureasa que le permite sobrevivir en medios ácidos, de tal manera que estas propiedades no pueden ser las causantes de su efecto inhibitorio contra éste microorganismo. Se sabe que dentro de la composición de la miel se encuentran distintos compuestos bioactivos entre ellos compuestos fenólicos, flavonoides así como distintos péptidos y proteínas que contribuyen a dicha actividad que en este caso, podrían estar implicadas en la inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* y podrían ser evaluados en un futuro.

La composición tanto del contenido de peróxido de hidrógeno, osmolaridad, acidez, así como de los otro componentes de la miel está determinada por la especie de abeja que lleva a cabo la recolección, por su origen geográfico, por el tipo de floración de la cual provenga así como del tiempo de almacenamiento y fermentación que esta pueda tener; esa puede ser una razón por la cual las mieles presentan distintos valores de actividades antimicrobianas y susceptibilidades contra distintos patógenos.

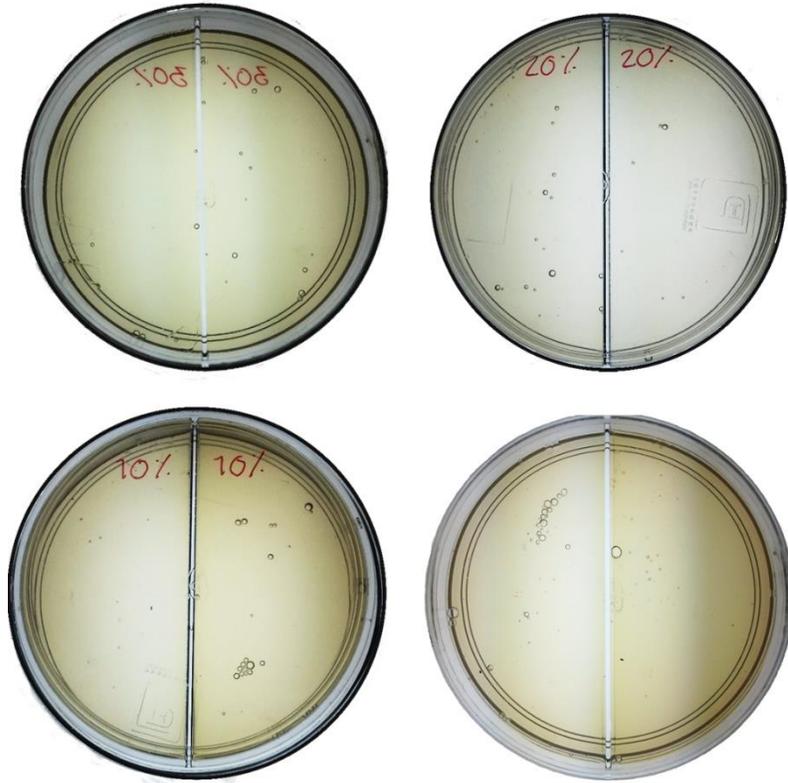


Figura 4: Actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona beecheii* contra *Helicobacter pylori* ATCC 49503 realizada en medio BA 10 % SFB con concentraciones de **a)** 30 %, **b)** 20 %, **c)** 10 % y **d)** 5 % de miel.

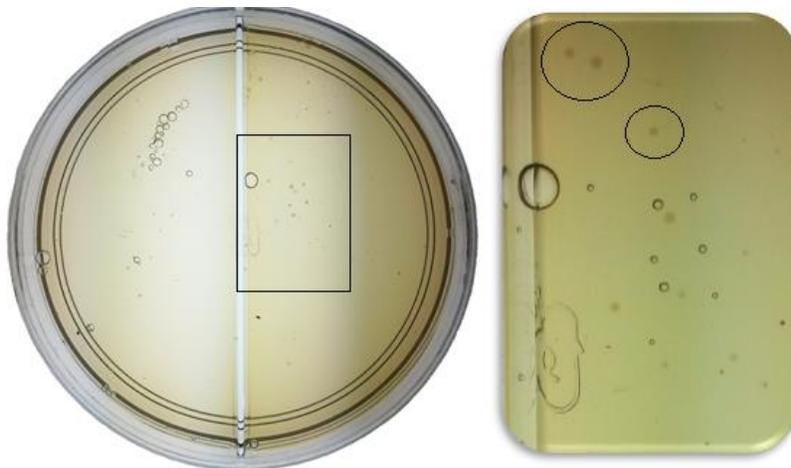


Figura 5: Crecimiento de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 en medio BA 10 % SFB con 5 % de miel.

7.3. Evaluación del efecto de la miel de *Melipona beecheii* en la actividad de ureasa de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

La miel de *Melipona beecheii* fue capaz de inhibir completamente la actividad de la enzima ureasa de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 a partir de una concentración de 2%; a una concentración de 1% dicha actividad fue reducida en contraste con el control (Figura 6). Aunque no fue posible observar la presencia de colonias en ninguna de las cajas, se tiene la teoría de que la bacteria pudo ser lisada dando como resultado la liberación de la ureasa intracelular, misma que fue inhibida por efecto de la miel.

La miel es una mezcla compleja que consta de diversos componentes, entre ellos se encuentran algunos péptidos y proteínas así como compuestos fenólicos. Estos componentes poseen distintos mecanismos de acción que van desde la degradación y la desestabilización de la membrana celular hasta la interacción directa con el ADN del microorganismo así como la inhibición de su síntesis. La ausencia de colonias puede deberse a que posiblemente la miel se encuentre inhibiendo el crecimiento de la bacteria por las causas mencionadas anteriormente y por ende no se presente actividad enzimática. A pesar de que en la evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel se reportó crecimiento empleando una concentración de 5%, es importante destacar que los medios utilizados en ambos experimentos son de distinta composición: para la determinación de la actividad antimicrobiana de la miel se empleó medio Brucella agar suplementado con 10% de suero fetal bovino a diferencia del medio de urea empleado para la evaluación del efecto de la miel sobre la actividad de la enzima ureasa de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 que no contenía ningún suplemento; por lo cual puede variar la susceptibilidad de la bacteria y se puede retardar su crecimiento. Otro factor puede ser el tiempo de incubación ya que en algunos reportes se han empleado periodos de 7 días.

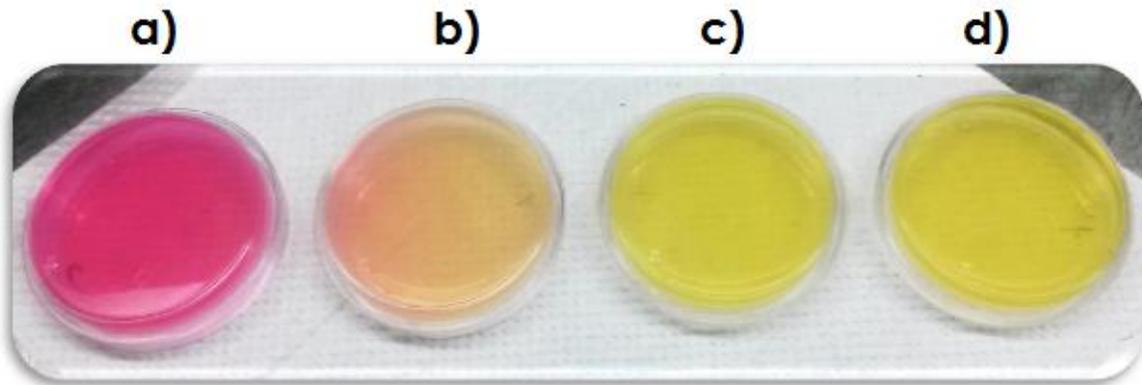


Figura 6: Efecto de miel de *Melipona beecheii* sobre la actividad de ureasa de *Helicobacter pylori* ATCC 49503. **a)** Control, **b)** 1%, **c)** 2% y **d)** 3% de miel.

La ureasa de *Helicobacter pylori* se puede encontrar tanto en el citoplasma (intracelular) como en la superficie de la bacteria como resultado de la lisis celular. La enzima que se expresa en el citoplasma se regula por efecto del pH del medio, cuando el pH desciende por debajo de valores de 6.5, una proteína denominada Urel forma poros o canales en la membrana que permite la migración de moléculas de urea hacia el interior de la célula para que sean degradadas por la enzima presente en el citoplasma, cuando el pH del medio se aproxima a lo neutro, los canales se cierran reduciéndose de esta manera la actividad de la enzima citoplasmática. La enzima que se encuentra en la superficie de la bacteria es proveniente de la lisis celular, la ureasa que queda libre tras la muerte de otras bacterias se adhiere a la membrana de las células vivas, esta enzima (Marcus y Scott, 2001) posee un pH óptimo entre 7.5 y 8.5 y es disfuncional a un pH menor a 4.5. *Helicobacter pylori* es un microorganismo neutrófilo, es decir, se desarrolla en ambientes neutros, sin embargo, es capaz de subsistir en medios ácidos gracias a la actividad de la ureasa, pero cuando los valores de pH del medio aumentan (> 8.2), su crecimiento se ve afectado. Los medios preparados tenían una cantidad de sustrato fija, de manera que al ser degradado es posible que el pH del medio se haya incrementado inhibiendo tanto el crecimiento del microorganismo como a la actividad de la enzima extracelular.

La ureasa para ser catalíticamente activa, requiere de la presencia de níquel es su sitio activo, los iones de níquel son introducidos en el interior de la célula por efecto de una

proteína denominada NixA y ensamblados en la molécula con ayuda de las proteínas accesorias UreE, UreF, UreG y UreH. Es posible que la miel o alguno de sus componentes actúen como un agente quelante que secuestre los iones níquel, que interactúen con la proteína NixA o con las proteínas accesorias, disminuyendo de esta manera la disponibilidad de iones en la bacteria, afectando su ensamblaje y alterando la actividad catalítica de la enzima.

En un estudio realizado por Lin *et al.* (2005) se demostró que los extractos fenólicos obtenidos de orégano y arándanos fueron capaces de reducir la actividad de ureasa de *Helicobacter pylori*. Dentro de los componentes fenólicos presentes en los extractos se encontraban el ácido cafeico, ácido cinámico, ácido clorogénico, ácido felúrico, ácido hidroxibenzoico y el ácido elágico que también están presentes en la miel. Matongo (2014) tras aislar la enzima ureasa de dos cepas de *Helicobacter pylori* reportó una reducción de su actividad hasta en un 51% empleando extractos con éter dietílico de miel de Manuka y hasta un 48% empleando un extracto con cloroformo de una miel multifloral denominada pure honey.

Los genes que codifican la enzima ureasa se ubican en dos operones diferentes, el operón *ureAB*, que contiene los genes *ureA* y *ureB* que codifican para las subunidades estructurales de la enzima, y el operón *ureEFGHI*, que contiene los genes *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH* que codifican para las proteínas accesorias que ayudan a la inserción del níquel, y *ureI* que codifica para la proteína que permite la entrada de urea al citoplasma. Cada uno de éstos operones posee un promotor, *pureA* y *pureI* respectivamente (Scott, 2002). Es posible que alguno de los componentes de la miel se una a uno o ambos promotores bloqueando el paso a la enzima ARN polimerasa, evitando de esta manera la transcripción de estos genes.

7.4. Extracción, cuantificación y determinación del perfil proteico de la miel de *Melipona beecheii*.

La extracción de los componentes proteicos y la determinación de su perfil se llevó a cabo con el objetivo de verificar la integridad de las proteínas y validar la autenticidad de la

miel de *Melipona beecheii*, así como evaluar su actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*. Se obtuvo una concentración final de 7.5 mg de proteína, se visualizaron 7 bandas con pesos moleculares que oscilan entre 11.6 y 95 kDa, en donde la banda más abundante fue de 25 kDa. Estos datos coinciden con el perfil reportado por Ramón-Sierra *et al.* (2015).

Las bandas presentes en el gel pueden indicar la presencia de distintos péptidos o proteínas que coincidan con el mismo peso molecular o bien subunidades de proteínas ya que el experimento se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes. De acuerdo con los valores obtenidos se puede hipotetizar que algunas de las proteínas presentes en la miel de *Melipona beecheii* podrían corresponder a las Major Royal Jelly Proteins reportadas para la miel de la especie de *Apis mellifera* las cuales poseen pesos moleculares que oscilan entre 49 y 87 kDa.

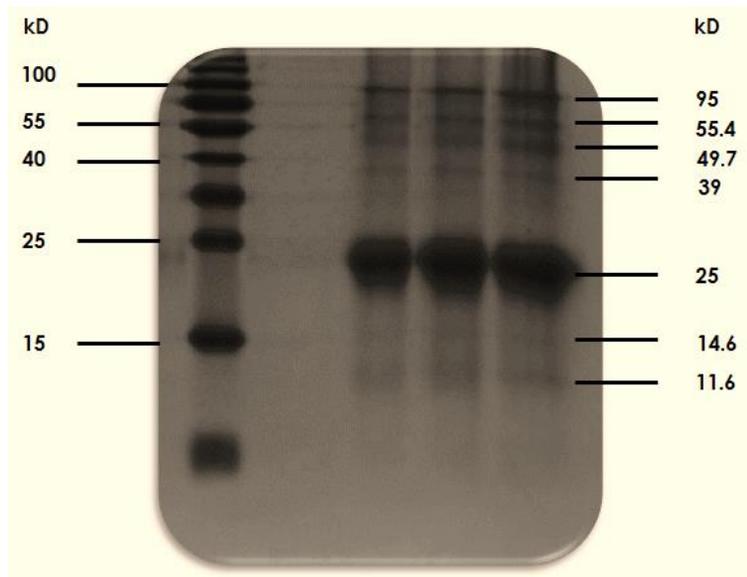


Figura 7: Electroforesis de los componentes proteicos de la miel de *Melipona beecheii* en un gel de acrilamida al 12 % teñido con plata.

7.5. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii* sobre *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

El extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii* mostró actividad antimicrobiana a 400, 500 y 600 µg de proteína total, presentando un halo de inhibición de 10, 11 y 13 mm respectivamente (Figura 8).

Muchos organismos utilizan péptidos como parte de sus sistemas de defensa contra la invasión de microorganismos, un ejemplo es la odorranaína-HP que ha sido aislada de las secreciones de la piel de la especie *Odorrana grahami*. Chen *et al.* (2007) reportaron que una concentración de 20 µg/ml de este péptido es capaz de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*. Otro péptido que ha mostrado actividad antimicrobiana contra éste patógeno es el TP4 extraído de tilapias. Este péptido pertenece al grupo de las piscidinas que se expresan de manera general en los mastocitos de los peces. Narayana *et al.* (2015). Demostraron que el TP4 interactúa con la membrana del microorganismo formando micelas provocando la pérdida de la integridad de la misma y por ende la muerte celular y que, además, es capaz de reducir la carga bacteriana de *Helicobacter pylori* en el tejido estomacal de ratones infectados y de suprimir la expresión de algunas citoquinas involucradas en la persistencia de la bacteria y en la inflamación gástrica.

Rigano *et al.* (2012) sintetizaron un péptido de la familia de las defensinas del tomate denominado SolyC. Éste péptido mostró actividad antimicrobiana contra distintas cepas de *Helicobacter pylori* con concentraciones entre 10 y 15 µg/ml. Las defensinas son una clase de péptidos de la respuesta inmune innata que se conserva entre plantas, vertebrados e invertebrados. En los invertebrados, como las abejas melíferas, se han detectado como respuesta inmune algunos péptidos con actividad antimicrobiana como la hymenoptaecina, abaecina, defensina-1 y apidaecina. Estos péptidos han sido capaces de inhibir el crecimiento de patógenos Gram negativos, Gram positivos así como hongos y levaduras. En la miel también ha sido reportados proteínas con actividad antimicrobiana como las Major Royal Jelly Proteins. Los péptidos antimicrobianos son generalmente de naturaleza catiónica, capaces de dañar la integridad de membrana de los

microorganismos y de inhibir sus procesos metabólicos tales como la síntesis de la pared celular, de ADN, ARN y proteínas e incluso la división celular (Narayana *et al.* 2015).

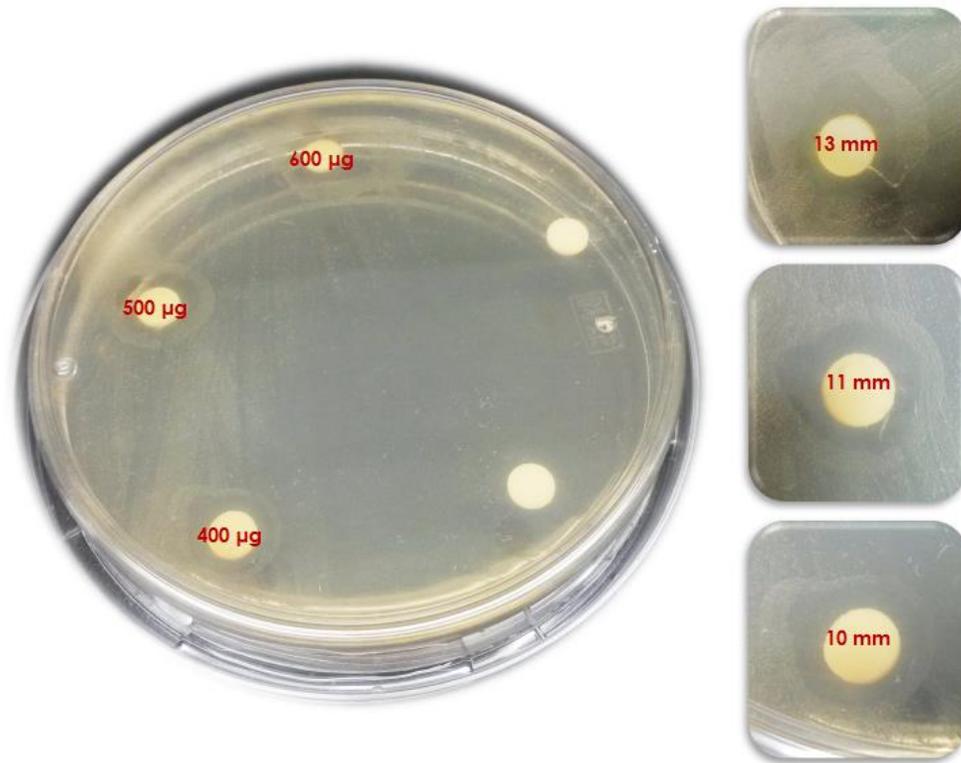


Figura 8: Actividad antimicrobiana del extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii* contra *Helicobacter pylori*.

7.6. Extracción de ADN de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

La extracción de ADN se realizó con el propósito de obtener ADN cromosómico de la bacteria para validar la presencia de los genes housekeeping y de virulencia de interés de estudio mediante los oligonucleótidos diseñados. El protocolo establecido permitió extraer ADN exitosamente. Se visualizaron dos bandas definidas e íntegras de alto peso molecular, que muestran que el ADN no estaba degradado. No se observó la presencia de otras moléculas de menor peso molecular, lo que demuestra que el ADN se encontraba limpio (Figura 9).

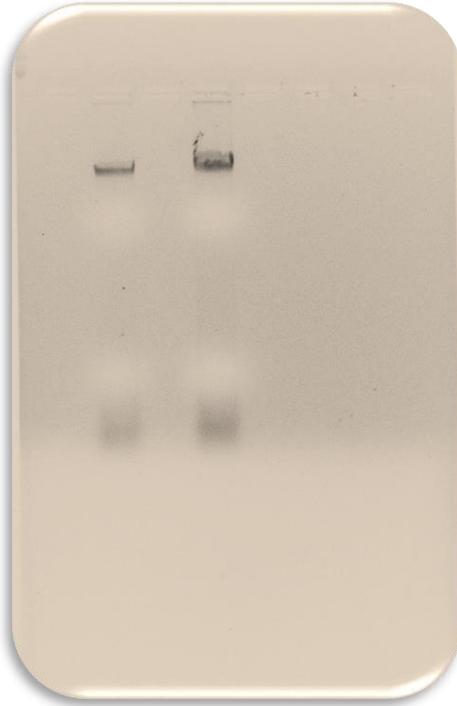


Figura 9: Electroforesis de ADN cromosómico de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 en un gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio.

7.7. Extracción de ARN de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

La extracción de ARN se realizó con el propósito de verificar la expresión de los ARN mensajeros de los genes Housekeeping y de virulencia de interés de estudio así como validar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados. Se observaron dos bandas nítidas e íntegras que indican que el ARN no estaba degradado. No se observó la presencia de moléculas de mayor peso molecular lo que muestra que la muestra no se encontraba contaminada (Figura 10).

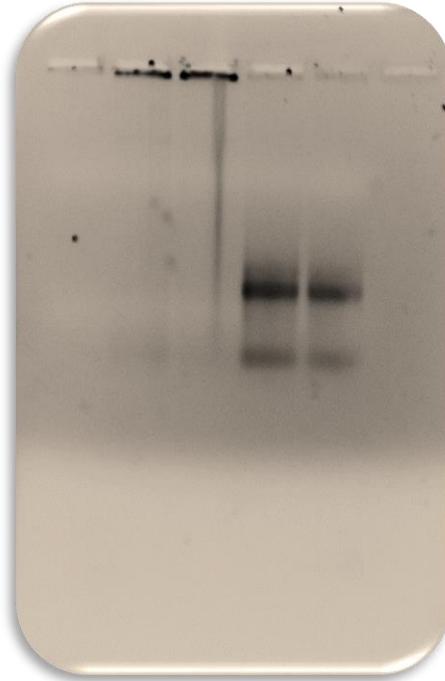


Figura 10: Electroforesis de ARN de *Helicobacter pylori* en un gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio.

7.8. Detección de la presencia de los genes de interés de estudio de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

Con el objetivo de validar la presencia de los genes housekeeping y de virulencia de interés de estudio en el ADN cromosómico de *Helicobacter pylori* ATCC 49503, se llevó a cabo una PCR empleando los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los genes a evaluar con tamaños de 600 pb para amplificaciones de mayor tamaño en ADN y de 100 pb que serían empleados en la realización de qRT-PCR la cual requiere de fragmentos más pequeños para una adecuada amplificación (Tabla 4).

Todos los oligonucleótidos amplificaron en un gradiente de temperatura de 45-65°C, se observó la presencia de una sola banda en cada una de las muestras, lo que indica que los oligonucleótidos son específicos para cada gen y por el contrario no observó amplificación en el control (Figura 11, 12, 13 y 14). A excepción del oligonucleótido diseñado para el gen *sigma80* con un tamaño de amplificación de 600 pb en donde se observaron dos bandas lo que indica una inespecificidad (Figura 12).

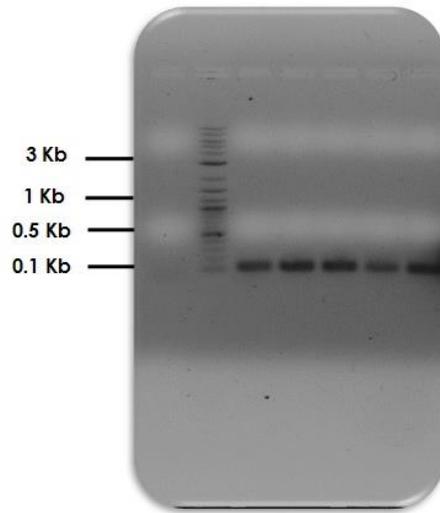


Figura 11: Amplificación del gen *hsp60* empleando un oligonucleótido de 100 pb en un gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio.

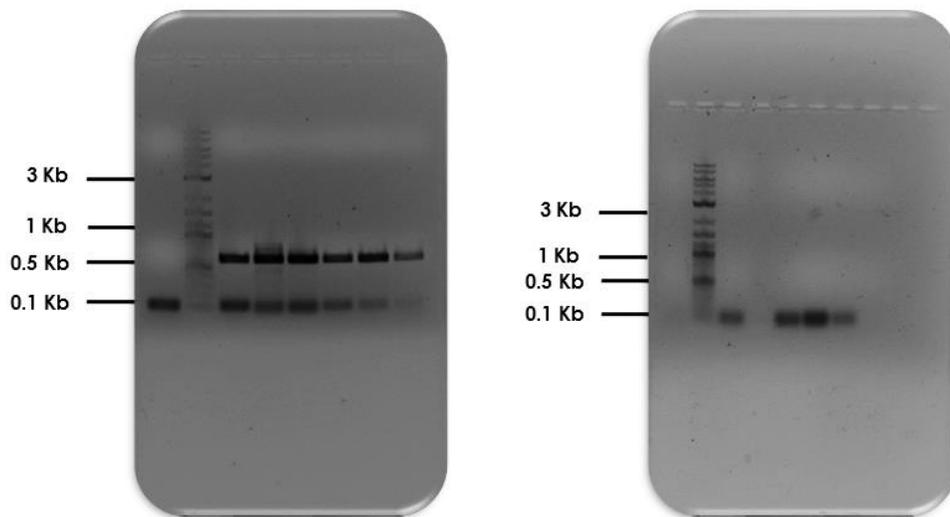


Figura 12: Amplificación del gen *sigma80* empleando un oligonucleótido de **a)** 600 pb y **b)** 100 pb; en un gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio.

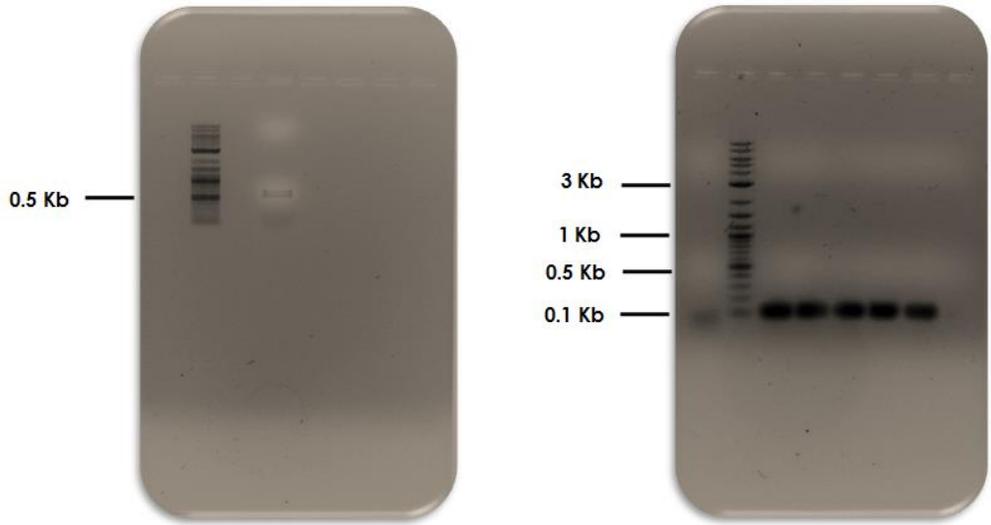


Figura 13: Amplificación del gen *vacA* empleando oligonucleótidos de **a)** 600 pb y **b)** 100 pb; en un gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio.

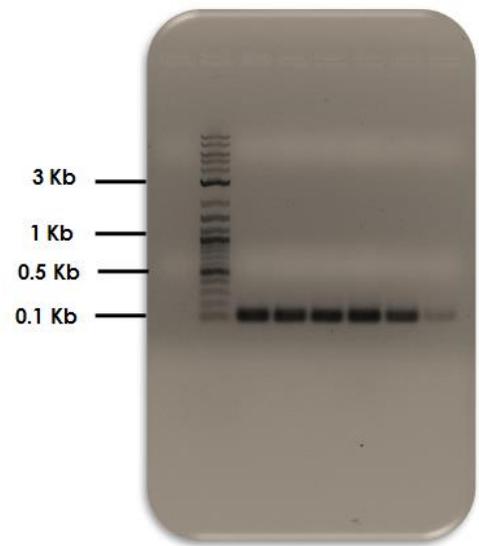


Figura 14: Amplificación del gen *ureA* empleando oligonucleótidos de 100 pb en un gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio.

7.9. Detección de la presencia del mensajero a partir de ADNc.

Se detectó la presencia de los ARNm de cada uno de los genes evaluados, los oligonucleótidos resultaron ser específicos ya que una sola banda se amplificó en cada una de las temperaturas evaluadas. Estos resultados pueden ser observados en las figuras 15 y 16.

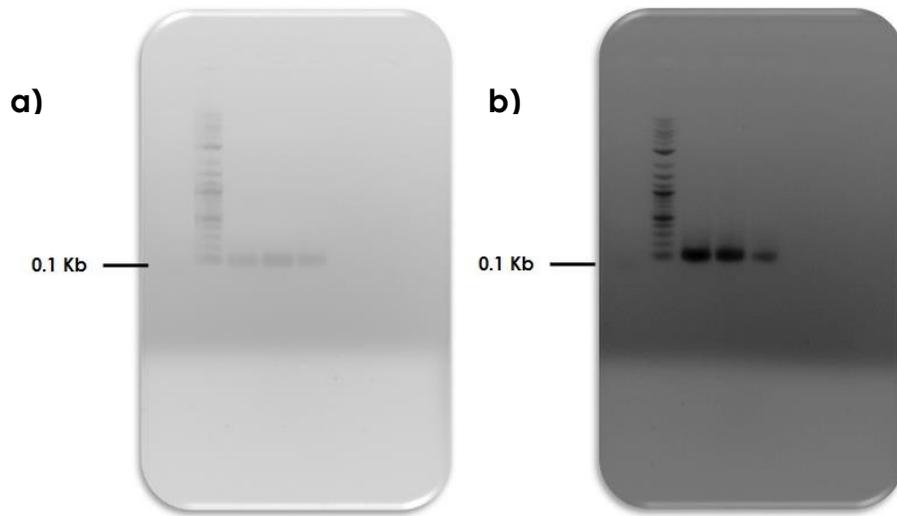


Figura 15: Amplificación de ADNc para el gen **a)** *hp60* y **b)** *sigma80* en un gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio.

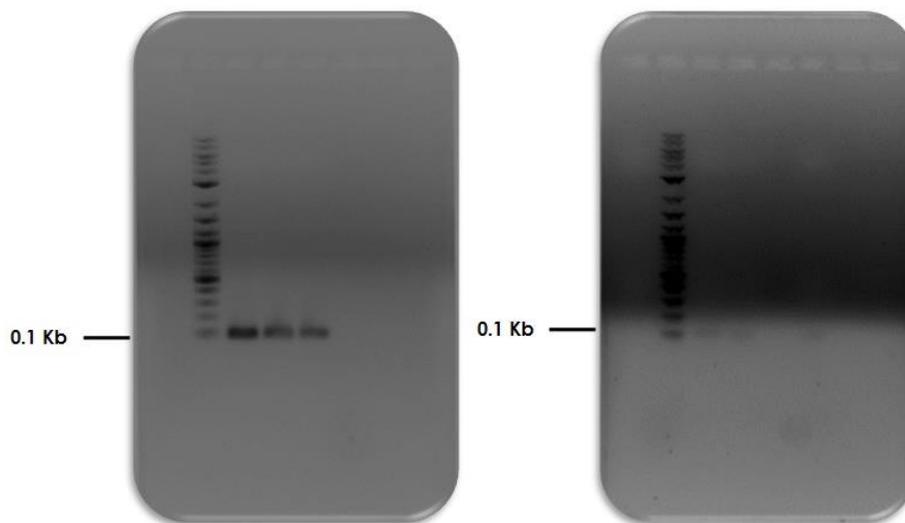


Figura 16: Amplificación de ADNc para en gen **a)** *ureA* y **b)** *vacA* en un gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio.

7.10. Análisis de la expresión génica de los genes de virulencia de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

Para realizar el análisis de la expresión génica se realizó primeramente una curva melt con el objetivo de validar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados. Como resultado se obtuvo un solo pico de amplificación para cada uno de los genes evaluados tanto en el control como en cada uno de los tratamientos, lo que indica que son específicos y que pueden ser utilizados en el experimento para la cuantificación de los amplicones respectivos (Figura 17).

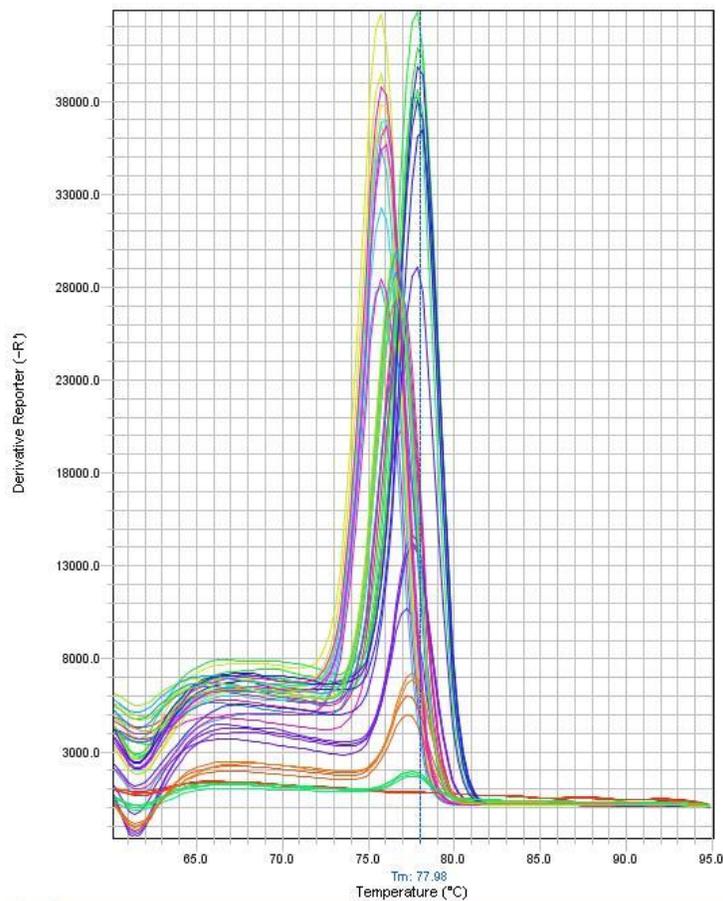


Figura 17: Culva melt para validar la especificidad de los oligonucleótidos.

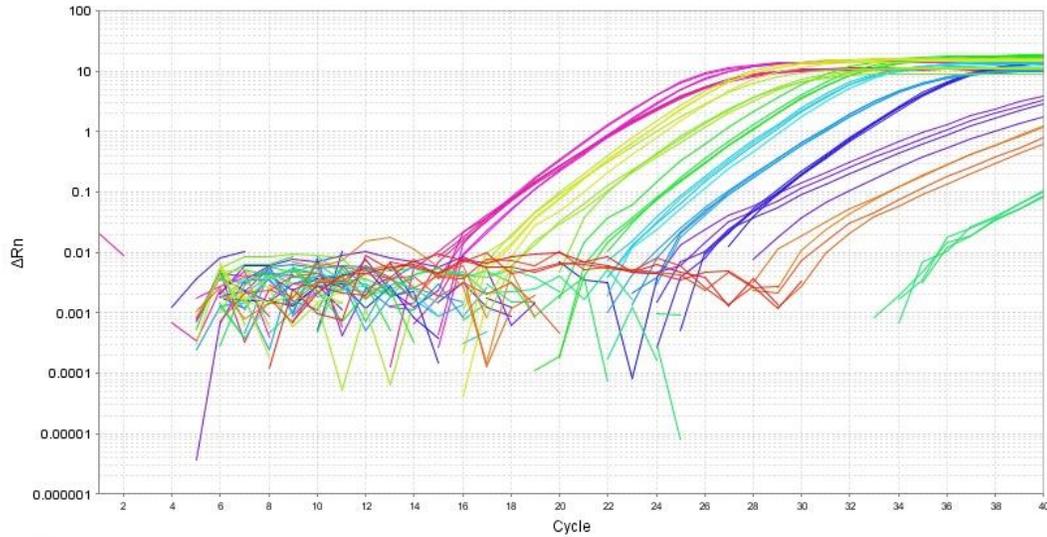


Figura 18: Amplificación de los genes con los distintos tratamientos de miel.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis empleando el método $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ y los resultados obtenidos se muestran en las tablas 4, 5, 6, 7 y 8.

Tabla 4: Cálculos del análisis de la expresión del gen *ureA* en condiciones control empleando el método $2^{-(\Delta\Delta CT)}$.

		CONTROL				
		<i>sigma80</i>	<i>Urea</i>	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-(\Delta\Delta CT)}$
		24.97	27.15	2.18	0.07	0.9526
		24.93	26.93	2	-0.11	1.0792
		24.66	26.81	2.15	0.04	0.9726
PROMEDIO		24.8533	26.9633	2.11	0	1
DESV. EST		0.1686	0.1724	0.0964	0.0964	0.0680

Tabla 5: Cálculos del análisis de la expresión del gen *ureA* en tratamiento de 1% de miel empleando el método $2^{-(\Delta\Delta CT)}$.

TRATAMIENTO 1% DE MIEL					
	<i>sigma80</i>	<i>Urea</i>	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-(\Delta\Delta CT)}$
	30.06	32.37	2.31	0.2	0.8705
	29.92	32.22	2.3	0.19	0.8766
	29.85	32.2	2.35	0.24	0.8467
PROMEDIO	29.9433	32.2633	2.32	0.21	0.8645
DESV. EST	0.1069	0.0929	0.0264	0.0264	0.0157

Tabla 6: Cálculos del análisis de la expresión del gen *ureA* en tratamiento de 3% de miel empleando el método $2^{-(\Delta\Delta CT)}$.

TRATAMIENTO 3% DE MIEL					
	<i>sigma80</i>	<i>Urea</i>	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-(\Delta\Delta CT)}$
	23.48	23.85	0.37	-1.74	3.3403
	22.98	23.8	0.82	-1.29	2.4452
	22.91	23.76	0.85	-1.26	2.3949
PROMEDIO	23.1233	23.8033	0.68	-1.43	2.6944
DESV. EST	0.3108	0.0450	0.2688	0.2688	0.5318

Tabla 7: Cálculos del análisis de la expresión del gen *vacA* en condiciones control empleando el método $2^{-(\Delta\Delta CT)}$.

CONTROL					
	<i>sigma80</i>	<i>Vaca</i>	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-(\Delta\Delta CT)}$
	24.97	29.93	4.96	-0.0233	1.0163
	24.93	29.93	5	0.0166	0.9885
	24.66	29.65	4.99	0.0066	0.9953
PROMEDIO	24.8533	29.8366	4.9833	0	1
DESV. EST	0.1686	0.1616	0.0208	0.0208	0.0144

Tabla 8: Cálculos del análisis de la expresión del gen *vacA* en tratamiento de 1% de miel empleando el método $2^{-(\Delta\Delta CT)}$.

TRATAMIENTO 1% DE MIEL					
	<i>sigma80</i>	<i>Vaca</i>	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-(\Delta\Delta CT)}$
	30.06	34.75	4.69	-0.2933	1.2254
	29.92	34.64	4.72	-0.2633	1.2002
	29.85	34.61	4.76	-0.2233	1.1674
PROMEDIO	29.9433	34.6666	4.7233	-0.26	1.1974
DESV. EST	0.1069	0.0737	0.0351	0.0351	0.0291

La miel de *Melipona beecheii* redujo la expresión génica del gen *ureA* a un valor de 0.8645 empleando una concentración de miel de 1%, sin embargo, se observó también que una concentración de 3% de miel aumentó la expresión génica a un valor de 2.6944 de ese mismo gen (Figura 19).

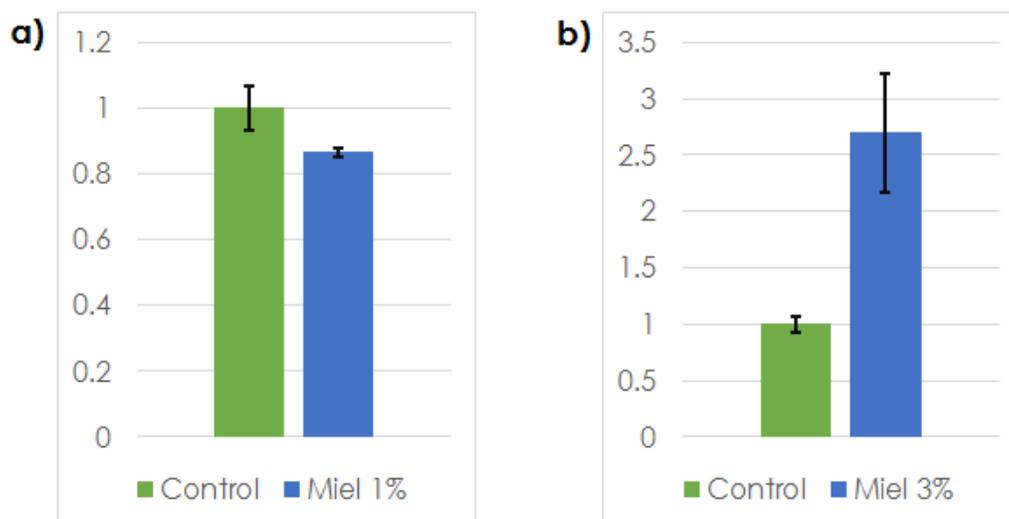


Figura 19: Análisis de la expresión génica del gen *ureA* en tratamiento de **a)** 1% y **b)** 3% de miel de *Melipona beecheii* empleando como referencia el gen housekeeping *sigma80*.

La enzima ureasa se expresa en el citoplasma de la bacteria, cuando los valores de pH del medio descienden de 6.5, la proteína Urel se encarga de formar canales en la membrana que permiten la entrada de urea para que sea hidrolizada en interior de la bacteria. Esto indica una regulación mediada por el pH extracelular. Teóricamente, el pH del medio de urea es de 6.8 ± 2 , de tal manera que la proteína Urel no podría formar canales evitándose la migración de urea hacía el interior de la bacteria y la actividad de la enzima.

Las bacterias al estar sometidas a estrés tienden producir algunas proteínas o a sobre producir otras como mecanismo de defensa. En experimentos anteriores se observó que una concentración de 5% de miel redujo el crecimiento de *Helicobacter pylori* ATCC 49503, esto indica que los componentes de la miel afectan de alguna manera el desarrollo del microorganismo. Es posible que concentración de 3% de miel genere un ambiente de estrés para la bacteria y en respuesta a ello aumente la expresión de algunos de sus genes como mecanismo de defensa y adaptación.

Merrel *et al.* (2003) reportaron que la exposición de *Helicobacter pylori* en un medio ácido aumenta la expresión de sus genes, entre ellos la expresión de la ureasa. La miel posee valores de pH relativamente bajo, al aumentar de 1% a 3% la concentración de miel podría descender el pH del medio generando de esta manera una sobre expresión de este gen. A pesar de que el análisis indica un aumento en la expresión del gen *ureA* que codifica para la enzima ureasa, esto no significa que haya una mayor cantidad de proteína o que la proteína sea funcional.

Una concentración de miel de 1% aumentó la expresión del gen *vacA* que codifica para la citotoxina de vacuolización a un valor de 1.1974 (Figura 20). Se puede observar que una concentración de 1% de miel tuvo un efecto contrario en la expresión de los genes *ureA* y *vacA*. Mientras *ureA* se reduce, *vacA* se incrementa. Este efecto es posible ya que las rutas de cada uno de los genes son diferentes y los múltiples componentes de la miel pueden actuar de distinta manera en cada una de ellas. Es decir, algunas moléculas pueden actuar como activadores permitiendo un mejor acoplamiento o un reconocimiento

más rápido de la enzima polimerasa por el promotor, lo que lleva a un aumento en la transcripción, o pueden actuar como un represor, bloqueando la unión o dificultando el reconocimiento de la enzima por el promotor provocando una transcripción más lenta o la ausencia total de la misma (Watson *et al.*, 2008). Allan *et al.* (2001) reportaron un incremento en la expresión de 11 genes de *Helicobacter pylori* y una disminución en la expresión de 7 genes por efecto de un valor de pH de 4.0 en comparación con un valor de pH de 7.0. De la misma manera Ang *et al.* (2001) reportaron un incremento en la expresión de algunos genes de *Helicobacter pylori* y una disminución en otros tras exponer a la bacteria en condiciones de pH 5.5.

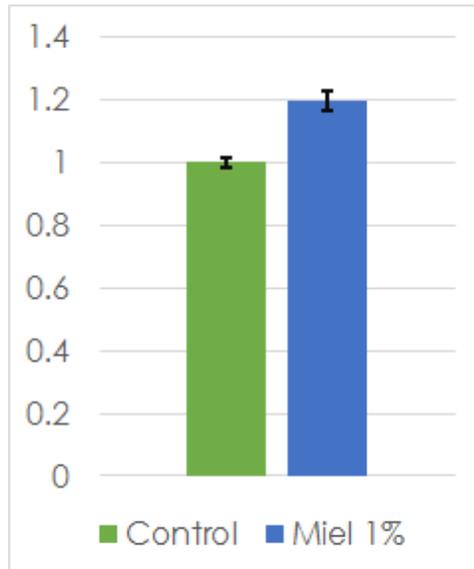


Figura 20: Análisis de la expresión génica del gen *vacA* en tratamiento de 1% de miel de *Melipona beecheii* empleando como referencia el gen housekeeping *sigma80*.

Muchos de los genes de los microorganismos se inducen en respuesta a los factores del medio ambiente en el que se encuentran, como mecanismo de supervivencia, adaptación y colonización. La acidez es una de las principales condiciones de estrés a las que se enfrentan las bacterias. *Helicobacter pylori* es un microorganismo que tiene condiciones óptimas de crecimiento a pH neutro, sin embargo, en su tránsito por el estómago humano debe soportar distintas variaciones de pH que van desde zonas con pH extremadamente

ácido (1.4 aproximadamente) hasta zonas con pH moderadamente ácido (4.5-6) siendo esta última su sitio principal de colonización. Estas variaciones de pH pueden provocar cambios en la expresión de los genes de virulencia de *Helicobacter pylori* para asegurar su persistencia y su colonización exitosa. La miel de las abejas sin aguijón posee un pH que oscila entre 2.6 y 3.3. Una dilución de miel en medio puede generar variaciones en el pH que generen un ambiente de estrés para el microorganismo y que conlleven a un aumento en la expresión de sus genes de virulencia.

8. CONCLUSIONES.

- La miel de *Melipona beecheii* muestra actividad antimicrobiana contra el patógeno *Helicobacter pylori* ATCC 49503 y es capaz de inhibir su crecimiento a partir de una concentración de 10%.
- La actividad de ureasa de *Helicobacter pylori* ATCC 49503 se redujo empleando una concentración de 1% de miel mientras que a partir de una concentración de 2% se inhibió completamente su actividad.
- El extracto proteico de la miel de *Melipona beecheii* presentó actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori* ATCC 49503 en una concentración de 400 µg.
- La miel de *Melipona beecheii* afecta la expresión de los genes de virulencia *ureA* y *vacA* de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.

9. PERSPECTIVAS.

Para continuar y complementar este trabajo se sugiere:

- Implementar agitación para el crecimiento en medios líquidos que permita una mejor distribución de la atmósfera microaerófila y el desarrollo del microorganismo para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de la miel y sus componentes fenólicos y proteicos.
- Evaluar el efecto de otros componentes minoritarios de la miel de *Melipona beecheii* tales como los componentes fenólicos sobre el crecimiento y la expresión de genes de virulencia de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.
- Identificar los componentes proteicos de la miel de *Melipona beecheii*.
- Determinar el mecanismo de acción de la miel de *Melipona beecheii* y sus componentes sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori* ATCC 49503.
- Determinar la cantidad de proteína de VacA y UreA presente en la bacteria después del tratamiento con miel.

BIBLIOGRAFÍA

- Akada, J. K., Shirai, M., Takeuchi, H., Tsuada, M. y Nakazawa, T. (2000). Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. *Molecular Microbiology*. 36(5): 1071-1084 pp
- Alarcón, T., Domingo, D. y López-Brea, M. (1999). Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 12(1): 19-26 pp.
- Allan, E., Clayton, C. L., McLaren, A., Wallace, D. M. y Wren, B. W. (2001). Characterization of the low-pH responses of *Helicobacter pylori* using genomic DNA arrays. *Microbiology*. 147: 2285-2292 pp.
- Al-Nahari, A. A. M., Almasaudi, S. B., Abd El-Ghany, El S. M., Barbour, E., Al Jaouni, S. K. y Harakeh, S. (2015). Antimicrobial activities of Saudi honeys against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22(5): 525-525 pp.
- Ang, S., Lee, C-Z., Peck, K., Sindici, M., Matrubutham, U., Gleeson, M. A. y Wang, J-T. (2001). Acid-induced gene expression in *Helicobacter pylori*: study in genomic scale by microarray. *Infection and Immunity*. 69(3): 1679-1686 pp.
- Baltrus, D. A. y Guillemin, K. (2006). Multiple phases of competence occur during the *Helicobacter pylori* growth cycle. *Microbiology Letters*. 255(1): 148-155 pp.
- Bik, E. M., Eckburg, P. B., Gill, S. R., Nelson, K. E., Purdom, E. A., Francois, F., Pérez-Pérez, G., Blaser, M. J. y Relman, D. A. (2006). Molecular analysis of the microbiota in the human stomach. *PNAS*. 103(3): 732-737 pp.
- Bizerra, F. C., Da Silva, P. I. y Hayashi, M. A. F. (2012). Exploring the antibacterial properties of honey and its potential. *Frontiers in Microbiology*.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254 pp.
- Bucekova, M. y Majtan, J. (2016). The MRJP1 honey glycoprotein does not contribute to the overall antibacterial activity of natural honey. *European Food Research and Technology*. 242: 625-629 pp.
- Brudzynki, K. y Sjaarda, C. (2015). Honey glycoproteins containing antimicrobial peptides, jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1, are responsible of the cell wall lytic and bactericidal activities of honey. *PLoS ONE*. 10(4).

- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. y Temps, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal*. 8(8): 2387-2391 pp.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. y Temps, P. (1993). Functional and chemical characterization of *Hymenoptaecin*, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee *Apis mellifera*. *The Journal of Biological Chemistry*. 268(10): 7044-7054 pp.
- Chen, L., Li, Y., Li, J., Xu, X., Lai, R. y Zou, Q. (2007). An antimicrobial peptide with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Peptides*. 28(8): 1527-1531 pp.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162(1): 156-159 pp.
- Christensen, W. B. Urea decomposition as means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *Journal of Bacteriology*. 52(4): 461-466 pp.
- Codex Alimentarius (2001). Appendix II Draft revised standard of honey. Sesión 24. 19 pp.
- Dannon, S. J. y Lee, A. (2001). Other Gastric *Helicobacters* and Spiral Organisms. En Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L. Editores. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington DC. ASM press; 2001. Capítulo 44.
- De Boer, W. A. y Tytgat, G. N. J. (2000). Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *British Medical Journal*. 320(7226): 31-34 pp.
- Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R., y Krakowka, S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infection and Immunity*, 59(7): 2470–2475.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A. y Wahab, M. S. A. (2012). Honey - A novel antidiabetic agent. *International Journal of Biological Science*. 8(6): 913-934 pp.
- Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G. y Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*. 46(12): 3774-3779 pp.
- Estrada, H., Gamboa, M. del M., Chavez, C., y Arias, M. L. (2005). Evaluation of the antimicrobial action of honey against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*,

Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus niger*. Evaluation of its microbiological charge. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 55(2): 167-171 pp.

Eteraf-Oskouei, T. y Najafi, M. (2013). Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. *Iranian Journal of Basic Medical Science*. 16(6): 731-742 pp.

Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T. y Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in rojal jelly purification and determination of the primary structure of royalisin. *The Journal of Biological Chemistry*. 265(19): 11333-11337 pp.

Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Leyer, H. y Opferkuch, W. (1993). Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 38: 371-377 pp.

Guiharmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L. da S., Silva-Pereira, I. y Kyaw, C. M. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*. 4: 353.

Hartzen, S. H., Andersen, L. P., Colding, H., Arpi, M., Kristiansen, J., Justesen, T., Espersen, F., Fridmodt-Møller, N. y Bonnevie, O. (1997). Antimicrobial susceptibility of 230 *Helicobacter pylori* strains: importance of medium, inoculum, and incubation time. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41(12): 2634-2639 pp.

Hatakeyama, M. (2004). Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nature Reviews*. 4: 688-694.

Hurtado, A., Owen, R. J. y Desai, M. (1994). Flagellin gene profiling of *Helicobacter pylori* infecting symptomatic and asymptomatic individuals. *Research in Microbiology*. 145(8): 585-594 pp.

Janulaitytė-Günther, Günther, T., Pavilonis, A. y Kupcinskis, L. (2003). What Bizzozero never could imagine-*Helicobacter pylori* today and tomorrow. *Medicina*. 39(6): 542-549 pp.

Kalali, B., Mejías-Luque, R., Javaheri, A. y Gerhard, M. (2014). *Helicobacter pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Mediators of Inflammation*. 2014: 426309.

Kao, C-Y., Sheu, B-S. y Wu, J-J. (2016). *Helicobacter pylori* infection: an overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal*. 39(1): 14-23 pp.

- Kostrzynska, M., Betts, J. D., Austin, J. W. y Trust, T. R. (1991). Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *Journal of Bacteriology*. 173(3): 937-346 pp.
- Kumar, M. S., Singh, A. J. A. R. y Alagumuthu, G. (2012). Traditional beekeeping of stingless bee (*Trigona spp*) by Kani tribes of Western Ghats, Tamil Nadu, India. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 11(2): 342-345 pp.
- Kusters Johannes G., M. van Vliet Arnoud H. y Kuipers Ernest J. (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 19(3), 449-490 pp.
- Lawal, T. O., Olorunnipa, T. A. y Adeniyi, D. A. (2014). Susceptibility testing and bactericidal activities of *Theobroma cacao* Linn. (cocoa) on *Helicobacter pylori* in an *in vitro* study. *Journal of Herbal Medicine*. 4(4): 201-207 pp.
- Leunk, R. D., Jhonson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G. y Morgan, D. R. (1988). Citotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 26(2): 93-99 pp.
- Li, W-F., Ma, G-X. y Zhou, X-X. (2006). Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure-function relationships and mode of action. *Peptides*. 27(9): 2350-2359 pp.
- Lin, Y. T., Kwon, Y. I., Labbe, R. G. y Shetty, K. (2005). Inhibition of *Helicobacter pylori* and associated urease by oregano and cranberry phytochemical synergies. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(12): 8558-8564 pp.
- Majtanova, N., Cernak, M. y Majtan, J. (2016). Honey: a natural remedy for eye diseases. *Forshende Komplementämedizin*. 23(6): 364-369 pp.
- Mandal, M. D. y Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 1(2): 154-160 pp.
- Manyi-Loh, C. E., Clarke, A. M., Munzhelele, T., Green, E., Mkwetshana, N. F. y Ndip, R. N. (2010). Selected South African honeys and their extracts possess *In vitro* Anti-*Helicobacter pylori* activity. *Archives of Medical Research*. 45(5): 324-331 pp.
- Marcus, E. A. y Scott, D. R. (2001). Cell lysis is responsible for the appearance of extracellular urease in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 6(2): 93-99 pp.
- Martínez-Carrillo, D. N., Atrisco-Morales, J., Hernández-Pando, R., Reyes-Navarrete, S., Betacounrt-Linares, R., Cruz-del Carmen, I., Illades-Aguilar, B., Román-Román, A. y Fernández-Tilapa, G. (2014). *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotype and interferón

gamma expression in patients with chronic gastritis and gastric cancer. *Revista de Gastroenterología de México*. 79(4): 220-228 pp.

Matongo, F. y Nwodo, U. U. (2014). *In vitro* assessment of *Helicobacter pylori* ureases inhibition by honey factions. *Archives of Medical Research*. 45(7); 540-546 pp.

Mendieta, C. J. R. (2002). Comparación de la composición química de la miel de tres especies (*Apis mellifera*, *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii*) de El Paraíso, Honduras. Tesis de Ingeniería en agroindustria.

Merrel, D. S., Goodrich, M. L., Otto, G., Tompkins, L. S y Falkow, S. (2003). pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. 71(6): 3529-3539 pp.

Michener, C. D. (2000). The bees of the world. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland.

Mobley, H. L. T. (1996). The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 10(1): 57-64 pp.

Mobley, H. L. T. (2001). Urease. En Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L. Editores. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington DC. ASM press; 2001. Capítulo 16.

Moniruzzaman, M., An, C. Y., Rao, P. V., Hawlader, M. N. I., Azlan, S. A. B. M., Sulaiman, S. A. y Gan, S. H. (2014). Identification of phenolic acids and flavonoids in monofloral honey from Bangladesh by high performance liquid chromatography: determination of antioxidant capacity. *BioMed Research International*. 2014: 737490.

Moo-Huchin, V. M., González-Aguilar, G. A., Lira-Mass, J. D., Pérez-Pacheco, E., Estrada-León, R., Moo-Huchin, M. I. y Sauri-Duch, E. (2015). Physicochemical properties of *Melipona beecheii* honey of Yucatan Peninsula. *Journal of Food Research*. 4(5).

Moo-Huchin, V. M., Sauri-Duch, E., Ortiz-Vázquez, E., Cuevas-Glory, L., Moo-Huchin, M. y Lira-Maas, J. Composition of stingless bee honey: the need for quality control. In: Stingless bee's honey from Yucatán. Ortiz, E. L. O., Ruíz, J. C. R., Ortiz, D. I. M. y Sierra, J. M. R., Eds. New York: Nova Science Publisher, Inc; 2016.

Muñoz, O., Copaja, S. Speisky, H., Peña, R. C. y Montenegro, G. (2007). Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Química Nova*. 30(4): 848-851 pp.

Nakashima, S., Kakugawa, T., Yura, H., Tomonaga, M., Harada, T., Hara, A., Nakano, M., Yamasaki, E., Sakamoto, N., Ishimatsu, Y., Isomoto, H., Gochuico, B. R., Suffredini, A. F., Mukae, H., Kurazono, H., Hirayama, T., Moss, J. y Kohno, S. (2015). Identification of *Helicobacter pylori* VacA in human lung and its effects on lung cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 460(3): 721-726 pp.

Narayana, J. L., Huang, H-N., Wu, C-J. y Chen, J-Y. (2015). Efficacy of the antimicrobial peptide TP4 against *Helicobacter pylori* infection: *in vitro* membrane perturbation via micellization and *in vivo* suppression of host immune responses in a mouse model. *Oncotarget*. 6(15): 12936-12954 pp.

Ndip, R. N., Takang, A. E. M., Echakachi, C. M., Malongue, A., Akoachere, J-F. T. K., Ndip, L. M., y Luma, H. M. (2007). *In vitro* antimicrobial activity of selected honeys on clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *African Health Sciences*. 7(4): 228-232 pp.

NORMA MEXICANA. 1997. NMX-F-036-1997-NORMEX. "Alimentos-Miel-Especificaciones y Métodos de Prueba". México, D.F

Olaitan, P. B., Adeleke, O. E. y Ola, L. O. (2007). Honey: a reservoir of microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Science*. 7(3): 159-165 pp.

Oleastro, M. y Ménard, A. (2013). The role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in adherence and pathogenesis. *Biology*. 2(3): 110-1134 pp.

Olivares, D. y Gisbert, J. P. (2006). Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Revista española de enfermedades digestivas*. (98(5): 374-396 pp.

Otteman, K. M. y Lowenthal, A. C. (2002). *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infection and Immunity*. 70(4): 1984-1990 pp.

Palframan, A. L., Kwok, T. y Gabriel, K. (2012). Vacuolating cototoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2: 92.

Patel, A., Shah, N. y Prajapati, J. B. (2014). Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection: a brief review. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 47(5): 429-437 pp.

Piccolomini, R., Di Bonaventura, G., Catamo, G., Carbone, F. y Neri, M. (1997). Comparative evaluation of E test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(7): 1842-1846 pp.

Quezada-Euan, J. J. G. (2005). Biología y uso de las abejas sin aguijón de la península de Yucatán, México (*Hymenoptera: Meliponini*). Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

Rahnamaeian, M., Cytrynska, M., Zdybicka-Barabas, A., Dobszlaff, K., Wiesner, J., Twyman, R. M., Zuchner, T., Sadd, B. M., Regoes, R. R., Schmid-Hempel, P. y Vilsinskas, A. (2015). Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. *Proceedings of The Royal Society B*. 282(1806); 20150293.

Rigano, M. M., Romanelli, A., Fulgione, A., Nocerino, N., D'Agostino, N., Avitabile, C., Frusciante, L., Barone, A., Capuano, F. y Capparelli, R. (2012). A novel synthetic peptide from a tomato defensin exhibit antibacterial activities against *Helicobacter pylori*. *Journal of Peptide Science*. 18(12): 755-762 pp.

Romanelli, A., Moggio, L., Montella, M. C., Campiglia, P., Lannaccone, M., Capuano, F., Pedone, C. y Capparelli, R. (2011). Peptides from Royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. *Journal of Peptide Science*. 17(5): 348-352 pp.

Schwalbe, R., Steele M. L. y Goodwin, A. (2007). Antimicrobial susceptibility testing protocols. Editorial CRC Press Taylor y Francis group. Estados Unidos. Schmitzová, J., Klaudivy, J., Albert, S., Schöder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Júdová, J. y Simúth, J. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Liife Sciences*. 54(9): 1020-1030 pp.

Shenoy, V. P., Ballal, M., Shivananda, P. G. y Bairy, I. (2012). Honey as an antimicrobial agent against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infected wounds. *Journal of Global Infectious Diseases*. 4(2): 102-105 pp.

Sierra, F., Forero, J. D. y Rey, M. (2014). Ideal treatment of *Helicobacter pylori*: a systematic review. *Revista de Gastroenterología de México*. 79(1): 28-49 pp.

- Solnick, J. V. y Vandamme, P. Taxonomy of *Helicobacter* genus. In: *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L. Eds. Washintong, D. C. ASM press. (2001).
- Somal, N, Coley, K. E., Molan, P. C. y Hancock, B. M. (1994). Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of Manuka honey. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 87: 9-12 pp.
- Spohn, G. y Scarlato, V. Motility, chemotaxis and flagella. In: *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L. Eds. Washintong, D. C. ASM press. (2001).
- Stephens, J. M., Greenwood, D. R., Fearnley, L., Bong, J., Schlothauer, R. C. y Loomes, K. M. (2015). Honey production and compositional parameters. *Processing and Impact on Active Components in Food*. 675-680 pp.
- Suerbaum, S. (1995). The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. *Trends in Microbiology*. 3(5): 168-170 pp.
- Suerbaum, S. y Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *The New England Journal of Medicine*. 347(15): 1175-1186 pp.
- Suescún, L. y Vit, P. (2008). Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. *Fuerza Farmacéutica*. 12(1): 6-15 pp.
- Trujillo, E., Martínez, T. y Bravo, M. M. (2014). Genotipificación de de los factores de virulencia *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* en individuos de dos regiones de Colombia con riesgo opuesto de cáncer gástrico. *Biomédica*. 34(4): 567-573 pp.
- Tsuada, M., Karita, M., Morshed, M. G., Okita, K. y Nakazawa, T. (1994). A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infection and Immunity*. 62(8): 3586-3589 pp.
- Van Doorn, L. J., Figueiredo, C., Rossau, R., Jannes, G., Van Asbroeck, M., Sousa, J. C., Carneiro, F. y Quint, W. G. V. (1998). Typing of *Helicobacter pylori vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(5): 1271-1276 pp.

- Vit, P., Medina, M. y Enríquez, M. E. (2004). Quality standards for medicinal uses of *Meliponinae* honey in Guatemala, México y Venezuela. *Bee World*. 85(1): 2-5 pp.
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. del C. A. y Romero, A. C. (2014) Extracción y purificación de ADN. En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Romero, A. C, Díaz, A. S., Aguilar, B. R. y Munice, M. G. R. México. SEMARNAT, INECC, UNAM-I.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. (2008). Biología molecular del gen. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Wen, S. y Moss. S. F. (2009). *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogénesis. *Cancer Letters*. 282(1): 1-8 pp.
- Whadan, H. A. L. (1998). Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*. 26(1): 26-31 pp.
- Yamazaki, S., Kato, S., Matsukura, M., Ohtani, M., Ito, Y., Suto, H., Yamazaki, Y., Yamakawa, A., Tokudome, S., Higashi, H., Hatakeyama, M. y Azuma T. (2005). Identification of *Helicobacter pylori* and de *cagA* genotype in gastrics biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool. *Immunology and Medical Microbiology*. 44(3): 261-268 pp.