PROYECTO I+D+i

PERÍODO

**2020-2021**

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN – TESIS MAESTRÍA EN BIOMEDICINA

# Efecto protector de la lactoferrina sobre células gástricas *in vitro*


APARTADO – **1 DATOS GENERALES**
APARTADO – **2 PERSONAL DEL EQUIPO**
APARTADO – **3 RESUMEN EJECUTIVO**
APARTADO – **4 METODOLOGÍA**
APARTADO – **5 RESULTADOS ESPERADOS**
APARTADO – **6 PRESUPUESTO**
APARTADO – **7 DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS**
APARTADO – **8 SOSTENIBILIDAD Y EFECTOS MULTIPLICADORES**
APARTADO – **9 BENEFICIARIOS**
APARTADO – **10 IMPACTO** AMBIENTAL
APARTADO – **11 ASPECTOS BIOÉTICOS Y SOCIALES**
APARTADO – **12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
APARTADO – **13 DECLARACIÓN FINAL**
APARTADO – **14 ANEXOS**



**Universidad Internacional SEK**
**Campus Miguel de Cervantes**
**Calle Alberto Einstein s/n**
**y 5ta. Transversal**
**Telf. 3974800 (Carcelén)**

**Instrucciones:**

La propuesta de tésis debe ser escrita de manera que el lector (tutor y evaluadores del Comité) sea capaz de evaluar los siguientes aspectos: 1) **Pertinencia** (acorde con el Programa y Líneas de investigación de la FCNAmb), 2) **Relevancia** (orientado a resolver problemas, satisfacer necesidades, o aprovechar oportunidades y/o situaciones concretas de alcance definido, 3) **Viabilidad** (alcanzables desde el punto de vista ténico, económico y de lapso de tiempo), aparte de dos caracteristicas fundamentales que son: *originalidad e inédito* en invstigación básica o aplicada y desarrollo tecnológico.

La propuesta debe ser muy concreta, utilizando lenguaje que pueda ser entendido en el nivel más básico, y que vincule claramente los outcomes (resultados esperados) con los objetivos e hipótesis a probar y con los cronogramas establecidos. El documento debe especificar los resultados que se esperan obtener dentro de la investigación.

La estructura tiene un límite de 14 páginas solo en los apartados 3 al 6 y debe cumplir con las siguientes características: letra tipo Arial de 12 puntos, espacio simple, manteniendo un margen de 2,5 cm a cada lado.

# APARTADO – 1
DATOS GENERALES

## Título del Proyecto de Investigación

| [Título del Proyecto de Investigación] |
|---|
| **Efecto protector de la lactoferrina sobre células gástricas *in vitro*** |

## Modalidad

| [Institucional - UISEK] | [Colaborativa en Red] |
|---|---|
| **PROYECTO DE DESARROLLO MAESTRIA EN BIOMEDICINA** | |

## Co-Financiamiento Institucional – UISEK

| [Semilla] | [Desarrollo] | [Estratégico] | [Innovación] |
|---|---|---|---|
| | **X** | | |

## Requiere Comité de Ética Externo

| [No] | [Sí] |
|---|---|
| **no** | |

## Requiere Permisos

| [No] | [Sí] |
|---|---|
| **no** | |

## Características

| [PROGRAMA] | [LÍNEA] | [CAMPO AMPLIO] | [CAMPO ESPECIFICO] | [DISCIPLINA] |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |

## Duración

| [Desde] | [Hasta] |
|---|---|
| **1 año** | |

## Localización Geográfica

| [Local] | [Provincial] | [Nacional] | [Regional] | [Internacional] |
|---|---|---|---|---|
| Quito | Pichincha | | | |

# APARTADO – 2
PERSONAL DEL EQUIPO

## Investigador/a Principal (Tesista Maestrante)

[Nombres y Apellidos]
Stephanie Belen Michelena Tupiza

[Cédula de Identidad]
1717419079

[Email Institucional SEK]
sbmichelena.mbme@uisek.edu.ec

[Facultad]
**Facultad de Ciencias de la Salud**

| [Título de 3° Nivel] | [N° Senescyt] |
|---|---|
| **Biomedicina** | |

| [Título de 4° Nivel] | [N° Senescyt] |
|---|---|
| | |

[Código ORCID]

[Scopus Author ID]

[RNI - Senescyt]

[Otra Afiliación]

## Tutor 1

[Nombres y Apellidos]
Lino Arisqueta

[Cédula de Identidad]
1756916456

[Email Institucional SEK]
lino.arisqueta@uisek.edu.ec

[Facultad]
**Facultad de Ciencias de la Salud**

[Categoría]

| [Título de 3° Nivel] | [N° Senescyt] |
|---|---|
| | |

| [Título de 4° Nivel] | [N° Senescyt] |
|---|---|
| | |

| [Título de Ph.D] | [N° Senescyt] |
|---|---|
| | |

[Código ORCID]

[Scopus Author ID]

[RNI - Senescyt]

| |
|---|
| [Afiliación SEK – Chile] |
| |
| [Otra Afiliación] |
| |

## Tutor 2

| | |
|---|---|
| [Nombres y Apellidos] | |
| [Cédula de Identidad] | |
| | |
| [Email] | |
| | |
| [Universidad] | |
| | |
| [Título de 3° Nivel] | [N° Senescyt] |
| | |
| [Título de 4° Nivel] | [N° Senescyt] |
| | |
| [Título de Ph.D] | [N° Senescyt] |
| | |
| [Código ORCID] | |
| | |
| [Scopus Author ID] | |
| | |
| [RNI - Senescyt] | |
| | |

## Asesor 1

| | |
|---|---|
| [Nombres y Apellidos] | |
| | |
| [Cédula de Identidad] | |
| | |
| [Email] | |
| | |
| [Universidad] | |
| | |
| [Título de 3° Nivel] | [N° Senescyt] |
| | |
| [Título de 4° Nivel] | [N° Senescyt] |
| | |
| [Título de Ph.D] | [N° Senescyt] |
| | |
| [Código ORCID] | |
| | |
| [Scopus Author ID] | |
| | |
| [RNI - Senescyt] | |
| | |

## Asistente Pregrado UISEK 1

| [Nombres y Apellidos] |
|---|
| |
| [Cédula de Identidad] |
| |
| [Email] |
| |
| [Facultad] |
| |
| [Pregrado] |
| |

| [Horas semanales de dedicación al proyecto de investigación] | [% Semanal] |
|---|---|
| | |

## Estudiante Pregrado UISEK 1

| [Nombres y Apellidos] |
|---|
| |
| [Cédula de Identidad] |
| |
| [Email] |
| |
| [Facultad] |
| |
| [Pregrado] |
| |

| [Horas semanales de dedicación al proyecto de investigación] | [% Semanal] |
|---|---|
| | |

# APARTADO – 3
RESUMEN EJECUTIVO

**Resumen estructurado y *palabras clave***

[máximo 350 palabras, 6 palabras clave].

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína presente en la leche materna con múltiples funciones, que incluyen defensa inmune contra patógenos, actividad inmunomoduladora y regulación del crecimiento celular. Durante la inflamación, los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) se reclutan en el sitio de la infección. Una vez que los PMN llegan al sitio, liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) para ayudar en la eliminación del patógeno bacteriano. Sin embargo, los radicales reactivos de oxígeno no solo son perjudiciales para las células bacterianas, sino que también dañan el tejido del huésped que en consecuencia liberan hierro férrico y ferroso. Este hierro libre genera nuevos radicales libres, perpetuando aún más el daño. En la infección de *Helicobacter pylori,* bacteria gramnegativa microaerofílica que afecta el epitelio gástrico, la incapacidad del huésped para eliminar la infección resulta en un estado inflamatorio crónico con estrés oxidativo continuo dentro del tejido que puede provocar, entre otros trastornos, el desarrollo de cáncer gástrico. Se cree que la lactoferrina juega un papel crucial en la prevención de daños por ROS al quelar el hierro liberado por el tejido herido, lo que resulta en la mitigación del estrés oxidativo en el sitio de la inflamación.

**Objetivo:** Este trabajo tiene como objetivo determinar el efecto protector de la lactoferrina frente a infección de *H. pylori* en células gástricas *in vitro.*

**Métodos:** Se emplearán las líneas celulares MKN74 (Adenocarcinoma tubular gástrico), MKN28 (Adenocarcinoma tubular gástrico) y AGS (Adenocarcinoma tubular gástrico). Se procederá a generar un modelo de daño oxidativo por $H_2O_2$ que imite el daño producido por la infección de *H. pylori* y se determinará la concentración óptima de $H_2O_2$ para los futuros ensayos. A partir de estos datos también determinaremos la concentración óptima de Lf que proteje contra el estrés oxidativo y que emplearemos en los ensayos futuros.

Para el análisis de la viabilidad se empleará microscopía y MTT; para el análisis del estrés oxidativo y la inducción de marcadores relacionados con la protección frente al mismo, se emplearán kits enzimáticos comerciales (SOD, catalasa, iNOS, GPX, GSH, etc.); y se analizará la expresión de los genes implicados mediante RT – PCR y/o western blot.

Después, se procederá a implementar el co – cultivo de células gástricas y *H. pylori*, es decir, nuestro modelo de infección, con el objetivo de determinar el efecto protector de la Lf contra esta bacteria. Para analizar el efecto protector de la Lf y el daño ocasionado por la infección se recurrirá a las pruebas descritas más arriba. Además, se determinará la curva de crecimiento bacteriano en presencia y ausencia de Lf.

**Resultados esperados:**

Se espera establecer un modelo de daño oxidativo mediante $H_2O_2$ que asemeje los daños producidos por *H. pylori in vitro*. Al evaluar el efecto protector de la Lf contra el estrés oxidativo *in vitro,* se espera que éste disminuya con el tratamiento de la Lf. Además, se espera generar un modelo de infección mediante co–cultivo de *H. pylori* y células gástricas *in vitro*. Al evaluar el efecto protector de Lf frente a la infección de *H. pylori,* se espera obtener los mismos resultados o similares que con $H_2O_2$, es decir, un efecto protector contra las consecuencias de la infección. También se espera que la Lf tenga un efecto negativo directamente sobre el crecimiento bacteriano. Finalmente, se espera también determinar lo mecanismos por los cuales la Lf redujo el daño oxidativo y la propia infección por *H. pylori.*

**Palabras clave:** *Helicobacter pylori,* lactoferrina, especies reactivas de oxigeno, daño oxidativo

## Abstract and *keywords*

[máximo 350 palabras, 6 palabras clave].

Lactoferrin (Lf) is a glycoprotein found in human milk which has multiple functions, including immune defence against pathogens, immunomodulatory activity and regulation of cell growth. During inflammation, polymorphonuclear neutrophils (PMNs) are recruited at the site of infection. Once PMNs reach the site, reactive oxygen species (ROS) is released to aid in the elimination of the bacterial pathogen. However, reactive oxygen radicals are not only harmful to bacterial cells, but also to the host tissue which as a result releases ferric and ferrous iron. This free iron generates new free radicals, further perpetuating the damage. In *Helicobacter pylori* infection, a microaerophilic gram-negative bacterium that affects the gastric epithelium, the inability of the host to eliminate the infection results in a chronic inflammatory state with continuous oxidative stress present within the tissue that can cause, among other disorders, the development of gastric cancer. It is believed that Lf plays a crucial role in preventing ROS damage by chelating iron released from injured tissue, resulting in the mitigation of oxidative stress at inflammation site.

**Objective:** We aim to determine the protective effect of lactoferrin against *H. pylori* infection in gastric cells *in vitro.*

**Methods:** The cell lines MKN74 (gastric tubular adenocarcinoma), MKN28 (gastric tubular adenocarcinoma) and AGS (gastric tubular adenocarcinoma) will be used. A model of oxidative damage by $H_2O_2$ will be generated in order to mimic the damage caused by *H. pylori* infection and the optimal concentration of $H_2O_2$ will be determined for future assays.

From these data we will also determine the optimal concentration of Lf that protects against oxidative stress.

Microscopy and MTT will be used for the viability analysis. For the analysis of oxidative stress commercial enzymatic kits (SOD, catalase, iNOS, GPX, GSH, etc.) will be used; and the expression of the genes involved will be analyzed by RT-PCR and / or western blot.

Then, we will proceed to implement the co-culture between gastric cells and *H. pylori*, being this our infection model to determine the protective effect of Lf against this bacterium. To analyze the protective effect of Lf and the damage caused by the infection, the tests described above will be used. In addition, the bacterial growth curve will be determined in the presence and absence of Lf.

**Expected results:** We expect to develop an *in vitro* model of oxidative damage by $H_2O_2$ that resembles the damage caused by *H. pylori*. When evaluating the protective effect of Lf it is expected that the oxidative stress will decrease with the treatment of Lf. Furthermore, we will generate an infection model by co-culturing *H. pylori* and gastric cells *in vitro,* expecting to obtain the same or similar results as with $H_2O_2$. Lf is also expected to have a direct negative effect on bacterial growth. Finally, we will determine the mechanisms by which Lf reduced oxidative damage and *H. pylori* growth.

**Key words:** *Helicobacter pylori,* lactoferrin, reactive oxygen species, oxidative damage

**Marco Teórico, Definiciones y Fundamentos** ***(****Marco de referencia: Definición de términos, Antecedentes, Fundamentos Teóricos)*

[Antecedentes] Máximo tres (3) páginas.

La leche materna es considerada el mejor nutriente para el niño en sus primeras etapas de vida y provee protección inmunológica contra enfermedades infecciosas, respiratorias y digestivas. Además, se le ha asociado con un riesgo menor de contraer asma, enfermedad inflamatoria intestinal, obesidad y diabetes (Doare, Holder, Bassett, & Pannaraj, 2018; Molès et al., 2018; Ojo-Okunola, Nicol, & du Toit, 2018). Asimismo, ésta no solo influye en el bienestar del infante sino también en la salud de la madre, acelerando el periodo posparto, disminuyendo el riesgo de depresión postparto, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, cáncer ovárico y de mama (Zielińska, Sobczak, & Hamułka, 2017). Sin embargo, a nivel mundial 3 de cada 5 niños no son amamantados, por lo que la Organización Mundial de la Salud tiene como objetivo dentro de las metas mundiales para el 2025 aumentar la tasa de lactancia materna exclusiva en los primeros 6 meses de vida del 38% a al menos un 50% (WHO/UNICEF, 2012).

La lactancia materna temprana inmediatamente después de que ha nacido el niño, así como, el mantenimiento de la lactancia exclusiva en meses posteriores, reduce considerablemente la morbilidad y mortalidad neonatal (Khan, Vesel, Bahl, & Martines, 2015). De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), en Ecuador la

prevalencia de lactancia materna exclusiva es del 62.1%, siendo mayor en el área rural (70.1%) en comparación al área urbana (58.4%). Además, el porcentaje de niños menores de 2 años que recibieron leche materna durante la primera hora de vida fue del 72.7% a nivel nacional (INEC, 2019).

Por esta razón, se han realizado varios estudios sobre la composición de la leche materna humana en diversas poblaciones utilizando varios métodos de recolección y almacenamiento. Algunas de estas moléculas, por ejemplo, la lactoferrina, están siendo investigadas como nuevos agentes terapéuticos, sin embargo, los mecanismos detrás de su función aun no son claros (Gopalakrishna & Hand, 2020; Kleist & Knoop, 2020; Trybek et al., 2016). La lactoferrina (Lf) fue identificada en leche bovina por primera vez en 1939 (Sorensen & Sorensen, 1940) y luego aislada de leche materna en 1960 (Johanson, 1960)**.** Esta glicoproteína tiene aproximadamente 78kDa y contiene 691 amino ácidos (Rosa, Cutone, Lepanto, Paesano, & Valenti, 2017) . Se cree que Lf actúa principalmente a través de la interacción con receptores de las células diana. Se han detectado receptores en varios tejidos y células, como por ejemplo CD14, LRP1, INTELECTIN-1, TLR-4, CXCR4. Además, la Lf también se une al heparan sulfato, un proteoglicano que se encuentran en la matriz extracelular. Todos estos receptores se expresan a diferentes niveles en los diferentes tejidos y células (Kell, Heyden, & Pretorius, 2020).

Por otro lado, las funciones antibacterianas de la lactoferrina han sido corroboradas por pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* (Zarzosa-Moreno et al., 2020). La literatura sugiere que existen varios mecanismos que contribuyen a las funciones antimicrobianas de la lactoferrina. El primer mecanismo es un efecto bacteriostático relacionado con la alta afinidad de unión al hierro de la proteína que priva a las bacterias que requieren hierro de este nutriente esencial para el crecimiento (Rosa et al., 2017). Se han observado efectos antimicrobianos dependientes del hierro de la Lf humana y bovina contra varios patógenos, incluidos *S. mutans, V. cholerae* y *P. aeruginosa*, donde se descubrió que la quelación del hierro por Lf estimula una forma de motilidad celular que inhibe la formación de biopelículas por estas bacterias (Acosta-Smith et al., 2017; Allison et al., 2015).

Con respecto al segundo mecanismo, éste se debe a una función bactericida de la Lf que actúa directamente contra algunas bacterias gram-negativas y gram-positivas que no puede atribuirse a una simple privación de hierro. De acuerdo con Drago-Serrano et al. (2011), la Lf permeabiliza las bacterias gram-negativas a través de una interacción con LPS de la superficie bacteriana. La estructura de la Lf humana tiene una región en el dominio que permite su unión con LPS. Se cree que la Lf desestabiliza la membrana bacteriana aumentando su permeabilidad permitiendo así el ingreso de sustancias antibacterianas hidrofóbicas. Adicionalmente, la Lf neutraliza TLR-4 y sus vías de señalización debido a que estas vías activadas en exceso resultan en una sobreexpresión de factores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF). Por estas razones, se cree que la Lf reduce la inflamación y actúa desestabilizando bacterias gram negativas que están implicadas en sepsis, disfunción de varios órganos e invasión bacteriana (Drago-Serrano, De La Garza-Amaya, Luna, & Campos-Rodríguez, 2012)

Por otro lado, en los últimos años se ha acumulado evidencia que respalda el papel de la lactoferrina en la regulación de la inmunidad del huésped, tanto dependiente como

independiente de la quelación del hierro. Durante la inflamación, los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) se reclutan en el sitio de la infección. Una vez que los PMN llegan al sitio, liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) para ayudar en la eliminación del patógeno bacteriano. Sin embargo, los radicales reactivos de oxígeno no solo son perjudiciales para las células bacterianas, sino que también dañan el tejido del huésped. Una consecuencia del daño celular es la liberación de hierro férrico y ferroso. El hierro libre puede entonces participar en la reacción de Haber-Weiss para generar nuevos radicales libres, perpetuando aún más el daño. La lactoferrina juega un papel crucial en la prevención de daños adicionales al quelar el hierro liberado por el tejido herido, lo que resulta en la mitigación del estrés oxidativo en el sitio de la inflamación (Lu et al., 2020).

Adicionalmente, se ha demostrado en estudios *in vitro* que la lactoferrina puede actuar como un quimioatrayente para las células inmunes, no solo los PMN sino también las células presentadoras de antígenos (APC), como los monocitos y las células dentríticas, para las cuales también juega un papel en la activación y maduración (Legrand, 2012). El aumento del reclutamiento y la activación de APC por lactoferrina, por lo tanto, hacen de la proteína un vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa (de la Rosa, Yang, Tewary, Varadhachary, & Oppenheim, 2008). Además, muchos estudios *in vitro* sugieren que la lactoferrina es un modulador de las respuestas humorales y mediadas por células al promover la maduración, la diferenciación y la activación de los linfocitos T y B (Legrand, 2012) pero una mejor resistencia del huésped contra las infecciones ha sido también observada en modelos *in vivo* en los que utilizan lactoferrina. Aunque los mecanismos no se conocen bien, una de las teorías es que los efectos beneficiosos se deben a las interacciones de la lactoferrina con el tejido linfoide asociado al intestino directamente, muy probablemente a través de interacciones mediadas por receptores que abarcan los efectos de la lactoferrina en la homeostasis de la microbiota. Por otro lado, se ha reportado transcitosis de lactoferrina intacta en lactantes prematuros o recién nacidos e incluso en ratones adultos (Legrand, 2016). Cualquiera que sea el mecanismo, la lactoferrina puede influir en las respuestas inmunitarias sistémicas mediante la modulación de la expresión de citocinas (Legrand, 2012). La principal modulación por la lactoferrina de citocinas clave como IL-4, IL-2, IL-12 o interferón-γ, es la capacidad de la lactoferrina para afectar el equilibrio Th1 / Th2, orientando así las respuestas Th hacia respuestas anti-inflamatorias o pro-inflamatorias (Fischer, Debbabi, Dubarry, Boyaka, & Tomé, 2006)

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria gramnegativa helicoidal, microaerófila, y flagelada que infecta el revestimiento epitelial del estómago. La prevalencia de la infección varía según el área geográfica, la edad, la etnia y el nivel socioeconómico siendo ésta mayor en los países en desarrollo (85%-95%) en comparación con países desarrollados (30%-50%). La infección por *H. pylori* es afecta a una gran parte de la población mundial, sin embargo, esta es frecuentemente subdiagnositcada debido a los síntomas leves que se pueden presentar (Fischbach & Malfertheiner, 2018). La transmisión de la infección se produce principalmente por vía oral-fecal a través de agua y alimentos contaminados pero también puede darse por transmisión oral-oral (Mladenova & Durazzo, 2018).

El tratamiento de esta infección tiene como objetivo controlar la sintomatología y la recuperación de la mucosa dañada por la bacteria. Sin embargo, el éxito del tratamiento es un desafío mundial debido a la creciente prevalencia de resistencia a los antibióticos

(Lanas & Chan, 2017). La terapia triple estándar con inhibidores de la bomba de protones, claritromicina (500 mg) y amoxicilina (1 g) dos veces al día durante 7 días se utiliza como primera línea para erradicar *H. pylori. T*ambién tenemos la terapia cuádruple, en la que además se administra bismuto (120 mg) al régimen.
Por otro lado, el desarrollo de vacunas es una alternativa prometedora que se enfoca en la profilaxis y / o el tratamiento de la infección. Sin embargo, su desarrollo ha sido un gran desafío en el campo de *H. pylori*, ya que muchos estudios no han tenido éxito en modelos experimentales (Safavi, Sabourian, & Foroumadi, 2016).

**Problema de Investigación (***Descripción, formulación y preguntas accesorias***)**

[Problema de Investigación] Máximo dos (2) páginas.

La infección por *H. pylori* es la principal causa de gastritis crónica y úlcera péptica. Para el 2015 existían 4.4 billones de individuos afectados en el mundo (Hooi et al., 2017). Además, la infección por esta bacteria está involucrada en el desarrollo de adenocarcinoma gástrico distal y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica. Aproximadamente 80% -85% de personas con *H.pylori* desarrollan gastritis leve, el 10-15% desarrollan gastritis antral que se asocia con el desarrollo de ulceración duodenal y del 1% -2% desarrollan gastritis asociada con la aparición de adenocarcinoma gástrico, úlceras gástricas, atrofia gástrica y metaplasia intestinal (Aguilar Martínez, 2003). Aproximadamente el 89% de todos los cánceres gástricos se atribuyen a la infección por *H. pylori*. El cáncer gástrico ocupa el sexto lugar en incidencia y el segundo lugar en mortalidad según las estadísticas mundiales de cáncer de 2018 (Bray et al., 2018). Por otro lado, la infección por *H. pylori* se ha asociado con varias enfermedades extradigestivas como la anemia ferropénica y el purpura trombocitopénica idiopática (Tsay & Hsu, 2018).

La incapacidad del huésped para eliminar la infección da como resultado un estado inflamatorio crónico con estrés oxidativo continuo dentro del tejido. Las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno producidas por las células inmunes y epiteliales dañan las células huésped y pueden provocar daños en el ADN. *H. pylori* ha evolucionado para inducir esta respuesta dañina al mismo tiempo que obstaculiza los esfuerzos del huésped para matar las bacterias (Butcher, den Hartog, Ernst, & Crowe, 2017).
La Organización Mundial de la Salud ha descrito a *H. pylori* como carcinógeno de clase 1, peor de todos, para el carcinoma gástrico (IARC, 2016). Además, se ha reconocido que ésta infección también está asociada con un mayor riesgo de gastritis crónica, enfermedad ulcerosa péptica gástrica y duodenal y linfoma tisular linfoide asociado a la mucosa gástrica (Megahed et al., 2017). Entre ellos, los sangrados que se presentan en la ulcera péptica siguen siendo mortales a pesar de los avances existentes relacionados terapias endoscópicas y farmacológicas. El tratamiento normalmente implica la erradicación de bacterias, sin embargo, este tipo de tratamiento solo tiene una tasa de efectividad <80% (Yuan et al., 2015). Adicionalmente, la relación de *H. pylori* con el desarrollo de los diferentes fenotipos gástricos con diferentes resultados clínicos no se conoce

completamente, pero se cree que la interacción entre los factores de virulencia bacteriana como CagA, ureasa, VacA y babA2, factores ambientales, condiciones socioeconómicas, nutrición y factores genéticos del huésped juegan un papel importante (Gravina et al., 2018). Por tanto, es una cuestión de cierta urgencia desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la atención al paciente (Lanas & Chan, 2017)

La lactoferrina. (Lf), proteína globular de la familia de las transferrinas en un componente de la leche materna que ha sido estudiada por sus beneficios en la protección gastrointestinal. Ciccaglione reportó que la lactoferrina *in vitro* inhibió el crecimiento del 50% de cepas de *H. pylori* y expresó un efecto bactericida del 50% con 40mg/ml (Ciccaglione et al., 2019). Sin embargo, los mecanismos moleculares detrás de su función aun no son claras. Algunos investigadores indican que funciona secuestrando hierro y así controlando bacterias patógenas que necesitarían hierro para crecer. Además, a la Lf se le ha otorgado actividades inmunomodulatorias (Trybek et al., 2016). Por otro lado, Lf es capaz de bloquear la transcripción de NF-KB, que a su vez induce la liberación de citoquinas proinflamatorias y TFNα, disminuye el estrés oxidativo y controla la respuesta inflamatoria excesiva (Queiroz, Assis, & da Costa, 2013).

En vista de los antecedentes comentados previamente, en el presente estudio se pretende analizar el efecto protector de la lactoferrina frente a un daño oxidativo con el fin de recrear *in vitro* lo que sucede en células gástricas con una infección por *H. pylori*

**Justificación de Investigación (***Importancia, significado***)**

[Justificación de Investigación] Máximo dos (2) páginas.

Los radicales libres tienen un papel muy importante en el origen de la vida y están involucrados en muchas actividades bioquímicas de las células, como la transducción de señales, la transcripción de genes y la regulación de la actividad de la guanilato ciclasa soluble. (Uttara, Singh, Zamboni, & Mahajan, 2009)

Sin embargo, la sobreproducción de radicales libres puede causar daño oxidativo a biomoléculas como lípidos, proteínas y al ADN, lo que eventualmente conduce a muchas enfermedades crónicas como aterosclerosis, cáncer, diabetes, artritis reumatoide, lesión por reperfusión posisquémica, infarto de miocardio, enfermedades cardiovasculares, inflamación crónica, accidente cerebrovascular y choque séptico, envejecimiento y otras enfermedades degenerativas en humanos (Sharma, Gupta, & Sharma, 2018)

Este proyecto está enfocado en la infección por *H. pylori* que incluye úlceras gástricas y duodenales y que afecta a más de 4 millones de personas cada año implicando altos costos para el sistema de salud pública (Pérez, Taléns-Visconti, Rius-Pérez, Finamor, & Sastre, 2017). Actualmente, los dos principales factores etiológicos de las úlceras pépticas son la infección por *H. pylori* y el uso excesivo de antiinflamatorios no esteroideos (Vakil, 2020).

Adicionalmente, el régimen terapéutico actual para erradicar *H. pylori* utiliza inhibidores de

la bomba de protones en combinación con varios antibióticos, como claritromicina, amoxicilina y metronidazol. Aunque este régimen tiene una tasa de erradicación prometedora, hasta un 35% de los pacientes no responden a este tratamiento (Leung & Graham, 2002). Se han utilizado terapias basadas en flurazolidona y rifabutina. Sin embargo, las limitaciones y la intolerancia a estos fármacos hacen que esta opción terapéutica sea menos favorable. El tratamiento basado en antibióticos como ciprofloxacina, fluoroquinolona y estreptomicina han llegado a erradicar la bacteria hasta el 80%; sin embargo, ninguno ha logrado una tasa de erradicación del 90 al 95% (Yuan et al., 2015).

El uso indiscriminado de azitromicina y eritromicina en el tratamiento de infecciones respiratorias y la resistencia cruzada entre antibióticos macrólidos pueden ser responsables del aumento de la resistencia microbiana a la claritromicina que resultan en regímenes terapéuticos más prolongados y poco exitosos (Malfertheiner et al., 2017). Debido a que la propagación de bacterias resistentes a los antibióticos representa una amenaza sustancial para la morbilidad y la mortalidad en todo el mundo y sus implicaciones para la salud pública y la sociedad, la Organización Mundial de la Salud ha clasificado a *H. pylori* resistente a claritromicina como alta prioridad en la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos (Tacconelli et al., 2018).

Siendo esta una enfermedad que afecta a la mitad de la población mundial, la erradicación de *H. pylori* sigue siendo un prioridad para la prevención de cáncer gástrico y de las complicaciones que presenta una ulcera péptica. La capacidad de *H. pylori* para ejercer un mayor efecto patogénico depende también de la respuesta inmune del huésped, la etnia, el nivel socioeconómico, la edad y el área geográfica (Sukri, Hanafiah, Mohamad Zin, & Kosai, 2020). Por esta razón, es de gran interés involucrar estas variables en trabajos futuros, ya que su mecanismo sigue sin estar claro.

La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína multifuncional importante presente en la leche de mamíferos, lágrimas, saliva, líquido cefalorraquídeo y otros fluidos de secreción. Es la principal proteína de unión al hierro en el suero de la leche humana, con una mayor concentración en calostro (rango 6–7 g / L) en comparación con la leche madura (rango 2 g / L). Los efectos protectores de la lactoferrina varían desde la comunicación entre huéspedes y patógenos, incluidas bacterias, virus, hongos y parásitos, hasta la promoción de propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, inmunomoduladoras y proliferativas (Liu et al., 2019)

Como ha sido mencionado previamente, no existen tratamientos eficaces para infecciones por *H. pylori* que causan gastritis crónica, ulceras pépticas, linfomas tipo MALT e incluso cáncer gástrico. Por esta razón la Organización Mundial de la Salud en 1994 clasifica a esta bacteria como cancerígeno tipo I (OMS, 1994) la cual fue ratificada en el 2010. En los países en desarrollo como Ecuador, la infección por *H. pylori* resulta un problema de salud pública debido a su elevada prevalencia que se ha visto agravado por el desarrollo de resistencia antibiótica por este microorganismo. Esto ha sido un factor clave en el fracaso de la erradicación y recurrencia de la patología (Hunt et al., 2010).
Por esta razón, es necesario el desarrollo de tratamientos alternativos eficaces y sobre todo de bajo costo para tratar esta bacteria.

**Hipótesis General de Investigación** *(hipótesis específicas, razonamiento y afirmación que da respuesta al problema y a las preguntas de investigación)*

[Hipótesis de Investigación]

La lactoferrina es una proteína abundante en la leche materna. Ésta también se expresa predominantemente en los epitelios superficiales y se secreta en el medio mucoso, siendo producida a niveles elevados en los conductos nasales, traqueales y en las secreciones gástricas, genitales y oftálmicas. Estas secreciones contienen una variedad de péptidos y proteínas antimicrobianas y antiinflamatorias de amplio rango que protegen contra microorganismo patogénicos.

Por esta razón, proponemos que la Lactoferrina recombinante humana tiene un efecto protector frente a *H. pylori* y frente a las consecuencias negativas de la misma, entre otros mecanismos mediante la reducción del daño oxidativo provocado por la infección.

**Objetivo/s de Investigación** (*general y específicos*)

[Objetivo/s de Investigación]

**General:**

Determinar el efecto protector de la lactoferrina frente a infección de *H. pylori* en células gástricas *in vitro*

**Específicos:**

- Establecer un modelo de daño oxidativo mediante $H_2O_2$ que asemeje los daños producidos por *H. pylori in vitro*
- Evaluar el efecto protector de la Lf contra el estrés oxidativo *in vitro*
- Generar un modelo de infección mediante co – cultivo de *H. pylori* y células gástricas *in vitro*
- Evaluar el efecto protector de Lf frente a la infección de *H. pylori* y frente a las consecuencias del mismo
- Analizar los mecanismos subyacentes a los efectos observados

# APARTADO – 4
# METODOLOGÍA

**Área de Estudio-Materiales-Métodos** (*incluye métodos de campo, laboratorio estadísticos, bioinformáticos, deben asociarse con los objetivos)*
[Material - Métodos] Máximo una (1) página.

## 1. CULTIVO CELULAR

### 1.1. Condiciones de cultivo

Se utilizarán células gástricas MKN74, MKN28 y AGS en medio RPMI 1640 con 4mM l-glutamina suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) y 100 mg/mL penicilina y estreptomicina, al 5% de $CO_2$ y 37 ºC. El medio deberá ser cambiado cada dos o tres días.
Cuando las células estén 90% confluentes, se hará un lavado con PBS y se utilizara tripsina EDTA al 0.25% para subcultivar en nuevas placas. (ATCC, 2021)

### 1.2. Daño celular

#### 1.2.1. Modelo de daño oxidativo por $H_2O_2$

Se evaluarán concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno, $H_2O_2$, y el efecto protector de la Lf contra el estrés oxidativo generado. De esta manera, se modelará el daño oxidativo que provoca la infección por *H. pylori*. Además de concentraciones crecientes, se evaluarán dos tiempos de exposición: 24 h y 120 h.
El estrés oxidativo será inducido por la exposición al $H_2O_2$ en el medio de cultivo. Se administrarán concentraciones crecientes de $H_2O_2$ (100 µM, 500 µM y 1 mM) para inducir daño celular y se evaluará lo siguiente: viabilidad por MTT y inducción de marcadores de estrés oxidativo como iNOS, CAT, GPX-1, GSH y SOD (Han, Xia, Xiang, Huang, & Zhang, 2017)**.** Se espera obtener una curva de dosis respuesta y se escogerá una concentración adecuada de $H_2O_2$ para evaluar el efecto protector de la Lf. Para ello, se cultivarán las células a la concentración seleccionada de $H_2O_2$ con Lf y sin ella (habrá que probar varias concentraciones de Lf desde 0,01 g/L – 1 g/L), volviendo a determinar la viabilidad celular y los marcadores de estrés oxidativo como se indica más arriba. Se espera que la Lf reduzca el estrés oxidativo y aumente la viabilidad en comparación con los controles. Además, se obtendrá la concentración de Lf a emplear en los estudios subsiguientes.

#### 1.2.2. Infección por *H. pylori in vitro*

Se cultivarán cepas de *H. pylori* en placas de agar con suero de caballo al 10% en condiciones microaerofílicas a 37 ºC durante 48 h. Para la infección, las bacterias se recolectarán en PBS (pH 7,4) y se agregarán a las células huésped en multiplicidades de infección (MOI) de 50 durante 3, 6, 16, 24, 48, 72 y 96 h. De nuevo se evaluará la viabilidad de las células gástricas por MTT y la inducción de enzimas marcadores de estrés oxidativo. El control lo constituirán células cultivadas con PBS (Machado et al., 2009).

No solo se evaluará el efecto protector de Lf contra los daños provocados por la infección, sino

que también se evaluará el efecto de Lf sobre la infección en sí misma. Para ello se generarán curvas de crecimiento de *H. pylori* solo en medio líquido (OD 600 nm) en ausencia y presencia de Lf, y se tratará de evaluar la proliferación bacteriana en los co–cultivos de *H. pylori* – células gástricas mediante microscopía con tinsión de HEMA 3 (Whitmore *et al,* 2017)

La evaluación del efecto protector contra el daño producido por la infección, una vez establecidas las condiciones del co - cultivo de *H. pylori*, se realizará evaluando el efecto protector de Lf a la concentración óptima obtenida de los ensayos con (apartado 1.2.1 de metodología). De nuevo, se espera que Lf reduzca el estrés oxidativo, la infección por *H. pylori* y aumente la viabilidad de las células gástricas. Los controles los constituirán células cultivas con PBS en lugar de Lf. La evaluación se realizará del mismo modo que en los ensayos con $H_2O_2$ (MTT, kits enzimático comerciales y RT – PCR, microscopía, etc.).

### 1.3. Tratamiento con lactoferrina

Se administrará lactoferrina recombinante humana a concentraciones de 0,01g/L, 0,1 g/L y 1 g/L para determinar el efecto protector frente al daño oxidativo mediante $H_2O_2$. Para la suplementación de la Lf a los cultivos se analizarán dos protocolos distintos partiendo de una disolución stock de 20 g/l de Lf disuelta en $H_2O$d estéril.

- El primer protocolo para la suplementación de Lf se realizará tal y como describen Aly et al. (2017) basado en un protocolo de 1992. Brevemente, la Lf recombinante humana se disuelve en agua destilada al 5%, pH a 3.0. Se añadirá pepsina a una concentración final del 3% (w/w) y se realizará la hidrólisis a 37 °C por 4 horas. Esta reacción es terminada al calentar a 80 °C por 15 minutos y ajustar el pH a 7.0 con NaOH. El precipitado que se forma será removido por centrifugación a 15.000 g x 30 minutos y el sobrenadante se recolectará (Aly, López-Nicolás, Darwish, Ros-Berruezo, & Frontela-Saseta, 2017; Bellamy et al., 1992), y se empleará para los tratamientos con Lf.

- En el segundo protocolo, el stock de Lf recombinante humana es disuelta en el medio de cultivo en las concentraciones deseadas sin necesidad de hidrolisis (Zhao et al., 2019).

## 2. ENSAYOS DE VIABILIDAD, MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

### 2.1. Ensayo de viabilidad mediante MTT

Se basa en la conversión de MTT en cristales de formazán mediante deshidrogenasas mitocondriales. Solo las células viables son capaces de reazilar esta reducción. Las células en cultivo se sembrarán en placas de 96 pocillos a una densidad de $5x10^3$ células por pocillo. Luego de 24 h de incubación, serán tratadas con $H_2O_2$ por 4h o infectadas con *H.pylori* MOI de 50 por 24 y 96 h en presencia o ausencia de Lf. Luego se añadirán 10 ul de una solución de MTT (4mg/mL). Después de 4 h de incubación a 37 ° C, se retirará el medio de cultivo y el formazán producido se solubilizará en 100 ul de DMSO. La absorbancia se medirá a 490 nm usando un lector de microplacas (SigmaAldrich, 2021). Como se ha indicado más arriba, a mayor viabiliad, mayor OD a 490 nm.

### 2.2. Determinación de marcadores de estrés oxidativo (GSH, SOD, GPX, iNOS, catalasa, etc.)

Los ensayos enzimáticos para GSH, SOD y CAT y otros marcadores, se realizarán utilizando kits comerciales (Abcam) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recolectarán alrededor de $2\times10^6$ células. Se lisarán en una solución fría de 0,1M Tris/HCL pH de 7,4 con tritón al 0.5%, 5 mM β-ME, 0,1mg/ml PMSF. Luego se centrifugará a 14.000g x 5 minutos a 4 °C, se recolectará el sobrenadante y se transferirá a un tubo nuevo. Estos sobrenadantes serán la muestra en la que se realizarán los ensayos colorimétricos Se cargarán los estándares, muestras y controles en duplicado y se leerán en lector de microplacas. En algunos casos se medirá la actividad enzimática (SOD, catalasa, etc.) y en otros la concentración de compuestos que, como GSH, tienen efectco protector contra estrés oxidativo.

### 2.3. Análisis de expresión genética mediante RT-PCR y western blot

Además de la actividad de ciertos enzimas marcadores se analizará la expresión de los mismos, así como de cualquier otro gen relacionado con los mecanismos protectores de Lf.

#### 2.3.1. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN se empleará el reactivo comercial Trizol siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se recogerán mínimo $10^6$ células, se añadirá 1ml de Trizol y se incubará a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego se añadirán 0,25 ml de cloroformo, se agitará vigorosamente durante 15 s y se incubará durante 2-3 min a temperatura ambiente. Tras una centrifugación a 12000 x g durante 5 min se recogerá la fase superior acuosa que contiene el RNA. Se añadirá isopropanol en proporción isovolumétrica y se incubará durante 10 min a temperatura ambiente. El RNA se sedimentará mediante una centrifugación a 12000 x g durante 10 min. El pellet se lavará dos veces con etanol 70% a -20 ºC centrifugándolo a la misma velocidad durante 5 min. Los restos de etanol se dejarán evaporar a temperatura ambiente y el RNA se disolverá en agua DEPC (ThermoFisher, 2020).

#### 2.3.2. Cuantificación de RNA y análisis de su integridad

Las cuantificaciones se realizarán con un espectrofotómetro Nanodrop midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm (Thermo Scientific, 2016).
Cada vez que las muestras de RNA se descongelen se comprobará que su integridad no se haya sido afectada mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa. Para ello, 1 µg de RNA se mezclará con tampón de carga y se realizará una electroforesis rápida en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE con sybr green. Se comprobará que las bandas sean nítidas.

#### 2.3.3. Retrotranscripción de RNA y cuantificación de especies de cDNA mediante RT-qPCR

Para eliminar el DNA que pudiera contener, la muestra se tratará con DNasa. Se empleará el kit comercial “DNase I, Amplification Grade” (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En un volumen final de 10 µl se mezclan 2,5 µg de RNA y 1 µl de DNase I (1 U/µl) disuelto en agua DEPC. Se incubará la muestra durante 15 min a temperatura ambiente y se añadirá 1 µl de EDTA 25 mM para detener la reacción. Esta mezcla se incubará durante 10 min a 65 ºC para inactivar la DNasa (Invitrogen, 2002).
Para la retrotranscripción del RNA se empleará el kit comercial “SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR” según las instrucciones del fabricante. En un volumen final de 10

µl se mezclarán 1,8 µg de RNA libre de DNA , 1 µl de una disolución de cebador ("*random hexanucleotide*", 50 ng/µl) y 1 µl de una mezcla de dNTP 10 mM. Tras incubar la muestra 5 min a 65 ºC se le añadirá una solución de 2 µl de tampón (10X), 4 µl de $MgCl_2$ (25 mM), 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNaseOUT y 1 µl SuperScript III RT. La mezcla se mantendrá 10 min a 25 ºC y 50 min a 50 ºC y para finalizar la retrotranscripción se incubará durante 5 min a 85 ºC (Invitrogen, 2015).

La mezcla de reacción de la RT-qPCR consistirá en 12,5 µl del reactivo "SYBER Green PCR Master Mix", 2 µl de producto de retrotranscripción, 0,25 µl de oligonucliótidos *forward* y *reverse* (10 µM) de acuerdo a la tabla 1 y $H_2O$ estéril hasta 25 µl de volumen total. Las mezclas se mantendrán a 50 ºC durante 2 min y después a 95 ºC durante 10 min y se someterán a los ciclos de RT-qPCR (40 ciclos de amplificación). En cada ciclo las muestras se mantendrán a 95 ºC durante 15 s para separar las hebras de DNA, y después a 60 ºC por 1 min para la hibridación de los oligonucleótidos y la elongación (Thermo Scientific, 2011).

Tabla 1. Lista de las secuencias de primers (Liu et al., 2019)

| Genes | Secuencia Forward | Secuencia Reverse |
|---|---|---|
| CAT | GGTAACTGGGACCTTGTGGG | GCCATTCATGTGCCGATGTC |
| GPX-1 | AGTGCGAGGTGAATGGTGAG | TCGATGTCGATGGTGCGAAA |
| SOD | AGGGCGTCATTCACTTCGAG | CCTCTCTTCATCCGCTGGAC |
| iNOS | CCAACCTGCAGGTCTTCGATG | GTCGATGCACAACTGGGTGAAC |

La especificidad de la PCR se evaluará en función de la Tm de los productos obtenida a partir de curvas de disociación que proporciona el aparato de RT - PCR.

### 2.4. Análisis de la expresión genética mediante Western Blot

#### 2.4.1 Electroforesis SDS-PAGE

Para desnaturalizar las proteínas de las muestras, los lisados celulares se mezclarán con tampón de desnaturalización y se incubarán a 100 ºC durante 5 min. La electroforesis se desarrollará en condiciones desnaturalizantes y reductoras, en un gel homogéneo de policacrilamida 9% (acrilamida/bisacrilamida en proporción 30:0,8; Tris-HCl 260 mM pH 8,8, SDS 0,1% (p/v), PSA 0,035% (p/v), TEMED 0,1 (v/v)), a una tensión de 200 V, en tampón de electroforesis y en vertical.

#### 2.4.2 Electrotransferencia

Las proteínas separadas mediante electroforesis se transferirán a membranas de PVDF en una cámara de electrotransferencia semiseca. El gel se incubará durante 10 min en tampón de electroforesis diluido a la mitad (disolución A) junto a tres trozos de papel de cromatografía (3MM CHR, Whatman). Por otro lado, la membrana de PVDF se mantendrá en metanol durante 1 min y luego se incubará junto a otros tres papeles de cromatografía en una disolución A que contenga metanol al 10% (v/v) (disolución B) durante 10 min. En la superficie anódica de la cámara de electrotransferencia se preparará el siguiente montaje: los papeles empapados en disolución B, encima la membrana de PVDF, después el gel y encima del mismo los papeles empapados en la disolución A. La transferencia será de 1 h a un amperaje constante (1,5 $mA/cm^2$ de gel) (Biorad, 2010).

### 2.4.3 Inmunodetección

Tras la transferencia la membrana se bloqueará en TBS-T con BSA al 5% (p/v) durante 2 h con balanceo. A continuación se incubará durante toda la noche a 4 ºC con el anticuerpo primario (CAT, GPX-1,SOD, iNOS, etc.) diluído en tampón TBS-T con BSA al 1% (p/v) según las recomendaciones del fabricante, con balanceo. Posteriormente se lavará 3 veces durante 15 min con TBS-T con BSA al 1%. Después se incubará la membrana con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa en TBS-T con BSA 1% durante 1 h a temperatura ambiente y con balanceo. Finalmente se harán otros 3 lavados como los anteriormente descritos y se mantendrá la membrana en TBS-T hasta su revelado

### 2.4.4 Revelado y cuantificación

La membrana se cubrirá con el reactivo de luminol ECL (*"Enhanced chemiluminiscence"*, GE Healthcare) y se incubará durante al menos 1 min. Finalmente, la membrana se pondrá en contacto con una película (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) protegida por una lámina transparente durante el tiempo requerido y esta se revelará y fijará con los líquidos de fotografía (AGFA). La cuantificación se realizará empleando un densitómetro (Bio-Rad GS-800) y software Quantity One" (Bio-Rad) (Mruk & Cheng, 2011).

## 2.5. Microscopía

Para evaluar el crecimiento bacteriano, los cambios morfológicos producidos por el estrés oxidativo, evaluación de apoptosis, etc., se empleará microscopía óptica convencional (tinciones como HEMA-3), y de contraste de fases que permite ver células sin necesidad de teñirlas y por tanto en una situación más cercana a la realidad. También se empleará microscopia fluorescente convencional empleando, por ejemplo, la tinción diferencial naranja de acridina / bromuro de etidio. Esta tinción permite diferenciar células viables y no viables, así como identificar células en apoptosis temprana y tardía, y células necróticas.

## 3. Análisis estadístico

Los resultados que se obtendrán en los experimentos se expresan como media aritmética ± error estándar (SE). Para analizar la significancia estadística de las diferencias observadas se realizarán distintos test en función de los grupos de resultados que se comparen

Para la comparación entre dos grupos se realizará el test de la t de Student. Para la comparación de más de un grupo se realizará un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido de un post - test de Dunnet.

En estos test estadísticos, se considerará que las diferencias serán estadísticamente significativas cuando la probabilidad de la hipótesis nula (P) ser de 0,05 o menor. Para el análisis estadístico se empleará el programa informático *GraphPad Prism* (EEUU).

# APARTADO – 5
RESULTADOS ESPERADOS

## Resultados Esperados

[Resultados Esperados] Máximo una (1) página.

- Se espera establecer un modelo de daño oxidativo mediante $H_2O_2$ que asemeje los daños producidos por *H. pylori in vitro*

- Al evaluar el efecto protector de la Lf contra el estrés oxidativo *in vitro,* se espera que el daño oxidativo disminuya con el tratamiento de la Lf

- Se espera generar un modelo de infección mediante co – cultivo de *H. pylori* y células gástricas *in vitro*

- Al evaluar el efecto protector de Lf frente a la infección de *H. pylori,* se espera obtener los mismos resultados que con $H_2O_2$ (disminuya el daño oxidativo). También se espera que disminuya la proliferación bacteriana y la infección consiguiente

- Se espera determinar lo mecanismos por los cuales la Lf redujo el daño oxidativo en las células gástricas así como los mecanismos que redujeron la proliferación bacteriana y la infección en sí misma.

**Participación de partes interesadas** *Incluya una lista de las principales partes interesadas (Stakeholders) que estarán involucradas en el diseño y en la implementación del proyecto. Asimismo, detalle el plan que utilizará para lograr que las partes interesadas (Stakeholders) se comprometan en la ejecución de las actividades del proyecto.*

[Stakeholders, otras instituciones colaboradoras] Máximo una (1) página.

En el presenta proyecto participarán dos instituciones educativas de Ecuador:

- Universidad internacional SEK
- Escuela politécnica del Ejercito (ESPE)

Ambas instituciones colaborarán con instalaciones, fungibles y no fungibles, y experticia, y la SEK correrá con los gastos de la mayoría de reactivos.

# APARTADO – 6
PRESUPUESTO

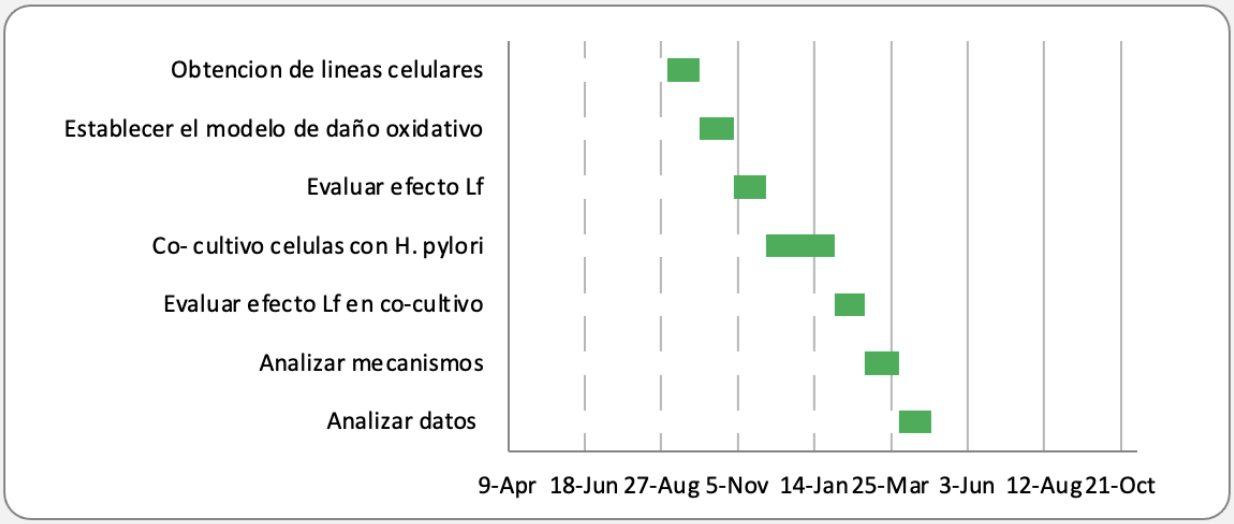
## Presupuesto Detallado y Cronograma
[Presupuesto Detallado y Cronograma]

Presupuesto

El presupuesto aproximado a utilizar en el presente proyecto se detalla en la siguiente tabla:

| ITEM | CANTIDAD | V.UNITARIO | TOTAL |
|---|---|---|---|
| Etanol absoluto | 1 | 121 | 121,25 |
| Kit extraccion de ARN | 2 | 435 | 870 |
| Master mix | 2 | 145 | 290 |
| Nuclease free water | 2 | 26 | 52 |
| Primers F | 3 | 66 | 198 |
| Primers R | 3 | 66 | 198 |
| Puntas con filtro 10-100 | 4 | 87 | 348 |
| Puntas con filtro 100-1000 | 4 | 91 | 364 |
| Puntas con filtro 1-10 | 4 | 89 | 356 |
| Placas para PCR | 1 | 126 | 126 |
| Sellos placas pcr | 1 | 9 | 9 |
| Tubos 1.5ml | 2 | 18 | 36 |
| Tubos 0.2ml | 1 | 100 | 100 |
| Medio de cultivo RPMI | 2 | 100 | 200 |
| Flask t25 | 1 | 30 | 30 |
| Flask t75 | 1 | 30 | 30 |
| Tubos 15ml | 2 | 59 | 118 |
| Tubos de 50ml | 2 | 50 | 100 |
| Azul de tripan | 1 | 60 | 60 |
| Scrachers | 2 | 20 | 40 |
| Filtros de 0.2mm | 2 | 35 | 70 |
| jeringaa de 50ml | 2 | 40 | 80 |
| Puntas de 50ml | 5 | 30 | 150 |
| Puntas de 25ml | 5 | 30 | 150 |
| Puntas de 10ml | 5 | 30 | 150 |
| **TOTAL** | | | 4246,25 |

El cronograma a seguir en el presente proyecto se detalla a continuación:



# APARTADO – 7
# DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

## Patentes

| [Título] |
|---|
| |
| [Resumen] |
| |

## Producción Científica en prospección, Indexación Scopus, WoS, DOAJ

| [Artículo Científico 1] | [Base de Datos 1] |
|---|---|
| Efecto protector de LF en células gastricas *in vitro* | Scopus |
| [Artículo Científico 2] | [Base de Datos 2] |
| Desarrollo de modelo de daño oxidativo con $H_2O2$ y efeto protector de la Lf | Scopus |
| [Artículo Científico 3] | [Base de Datos 3] |
| | |

## Producción Regional en prospección (ejem, Indexación tipo Latindex)

| [Artículo Regional 1] | [Base de Datos 1] |
|---|---|
| | |
| [Artículo Regional 2] | [Base de Datos 2] |
| | |
| [Artículo Regional 3] | [Base de Datos 3] |
| | |

## Congresos y otros

| [Congreso 1] |
|---|
| Congreso internacional |
| [Congreso 2] |
| |
| |

# APARTADO – 8
SOSTENIBILIDAD, EFECTOS MULTIPLICADORES, Y VINCULACIÓN CON LA SOCIEDAD/COMUNIDAD

## Sostenibilidad posible de este estudio

[Sostenibilidad] Máximo una (1) página.

El factor que mas condiciona la sostenibilidad del estudio es el factor de infraestructura y de gestión. Para la realización del presente estudio dentro de la Universidad Internacional SEK no se requiere de obras de infraestructura y además todos los equipos, fungibles y no fungibles necesarios existen en los laboratorios de la misma universidad. Los reactivos se comprarán a partir del presupuesto de investigación otorgado al Dr. Lino Arisqueta. Además, tanto el investigador principal como la maestrante, poseen la experiencia necesaria para la realización de un proyecto de estas características. Por lo tanto, la factibilidad del proyecto no está en duda.

Además de los artículos planificados a partir de los resultados, este proyecto servirá para formar futuros tesistas de la Facultad de Salud y de Ing. Biotecnología aplicando el modelo de daño por estrés oxidativo a otros casos donde éste sea relevante: otras infecciones, inflamación crónica, cáncer etc. Por último, las células empleadas en este proyecto engrosarán el listado de líneas celulares disponibles en la UISEK permitiendo su aplicación en otros proyectos. De particular interés resulta su empleo para complementar el proyecto del Dr. Arisqueta y testar los extractos de B. caapi en estas líneas celulares.

En el aspecto medioambiental, no existe ningún conflicto para desarrollar el presente estudio ya que el proyecto no manejará ningún tipo de residuos infecciosos ni químicos peligrosos. Sin embargo, todos los reactivos que se usen durante el proyecto serán tratados previo a ser descartados a través de un gestor de desechos.

Otro factor que determina la sostenibilidad del proyecto es la gestión financiera. Esta puede ser reforzada con capacitaciones al público y aplicaciones a convocatorias de financiamiento para proyectos de investigaciones y así obtener los fondos necesarios para la realización y futura continuación de este proyecto. Esto tiene que cubrir los costos de reactivos, personal y equipos necesario para llevar a cabo las diferentes actividades dentro del proyecto.

En relación a la aplicabilidad del proyecto, este puede ser aplicado en individuos que padezcan una infección por *H. pylori.* Debido a que la prevalencia de esta patología incrementa cada vez más, y esta no cuenta con un tratamiento especifico único para tratarlo, se necesitan tratamientos alternativos que resulten en la disminución de los efectos de la misma, como es la producción de especies reactivas de oxigeno. Además, este estudio podría promover la lactancia debido a los beneficios que tiene la lactoferrina, proteína que se encuentra en la leche materna, apoyando así a la meta que tiene la Organización Mundial de la Salud para el 2025 que es aumentar la lactancia materna a un 50% globalmente.

### Efectos Multiplicadores en la sociedad y/o en el ámbito científico y/o en salud

[Efectos Multiplicadores] Máximo una (1) página.

Este proyecto es de interés en el ámbito científico y en salud dado que sus resultados influenciarán en las guías de tratamientos que se dan a los pacientes con *H.pylori. A*demás, debido a la prevalencia de esta patología, este proyecto tendrá un impacto importante en el Sistema Nacional de Salud Pública ayudando en la mejora de vigilancia epidemiológica.

Adicionalmente, los resultados del proyecto se darán a conocer por medio de artículos científicos, poster y conferencias con el fin de contribuir a la comunidad científica y académica.

## APARTADO – 9
BENEFICIARIOS

### Beneficiarios

| [Usuarios] | [Productos] |
|---|---|
| Pacientes con infección por *H. pylori* | Tratamiento alternativo y/o complementario para pacientes con H.*pylori* utilizando lactoferrina recombinante humana |
| [Beneficiarios Inmediatos] | [Productos] |
| Público en general ya que promueve la lactancia materna | Aumento de la tasa de lactancia materna hasta los 6 meses y hasta los 12 |
| [Beneficiarios Mediatos] | [Productos] |
| Comunidad investigadora de Ecuador y la región | Presentación del proyecto como aporte la comunidad científica y académica que tienen su campo de estudio en relación al *h.pylori* |

## APARTADO – 10
IMPACTO AMBIENTAL

**Permiso Ambiental** (de ser necesario o No Aplica N/A)

| [No] | [Sí] |
|---|---|
| No | |

[Detallar] Máximo una (1) página.

N/A

## APARTADO – X
ASPECTOS BIOÉTICOS Y SOCIALES

[Detallar] Máximo una (1) página.

N/A

# APARTADO – X
# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## Referencias Citadas formato APA

[Referencias Citadas]


Abcam. (2019). ab65354 Superoxide Dismutase Activity Assay kit (Colorimetric), *65354*(September), 19.

Acosta-Smith, E., Viveros-Jiménez, K., Canizalez-Román, A., Reyes-Lopez, M., Bolscher, J. G. M., Nazmi, K., … Leon-Sicairos, N. (2017). Bovine Lactoferrin and Lactoferrin-Derived Peptides Inhibit the Growth of Vibrio cholerae and Other Vibrio species. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2633. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02633

Aguilar Martínez, L. C. (2003). Tipos de gastritis y su tratamiento. *Offarm*, *22*(8), 57–64. Retrieved from file:///0212047X/0000002200000008/v0_201305170827/13051491/v0_201305170828/es/main.assets ER

Allison, L. M., Walker, L. A., Sanders, B. J., Yang, Z., Eckert, G., & Gregory, R. L. (2015). Effect of Human Milk and its Components on Streptococcus Mutans Biofilm Formation. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *39*(3), 255–261. https://doi.org/10.17796/1053-4628-39.3.255

Aly, E., López-Nicolás, R., Darwish, A. A., Ros-Berruezo, G., & Frontela-Saseta, C. (2017). In vitro effectiveness of recombinant human lactoferrin and its hydrolysate in alleviating LPS-induced inflammatory response. *Food Research International*, *118*(July), 101–107. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.029

ATCC. (2021). AGS.

Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., & Tomita, M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, *1121*(1–2), 130–136. https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90346-F

Biorad. (2010). Immun-Blot® PVDF Membrane for Protein Blotting Instruction Manual.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

Butcher, L. D., den Hartog, G., Ernst, P. B., & Crowe, S. E. (2017). Oxidative Stress Resulting From Helicobacter pylori Infection Contributes to Gastric Carcinogenesis. *Cmgh*, *3*(3), 316–322. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.02.002

Ciccaglione, A. F., Di Giulio, M., Di Lodovico, S., Di Campli, E., Cellini, L., & Marzio, L. (2019). Bovine lactoferrin enhances the efficacy of levofloxacin-based triple therapy as first-line treatment of Helicobacter pylori infection: an in vitro and in vivo study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(4), 1069–1077. https://doi.org/10.1093/jac/dky510

de la Rosa, G., Yang, D., Tewary, P., Varadhachary, A., & Oppenheim, J. J. (2008). Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(10), 6868–6876. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6868

Doare, K. Le, Holder, B., Bassett, A., & Pannaraj, P. S. (2018). Mother's Milk: A purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity. *Frontiers in Immunology*, *9*(FEB). https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00361

Drago-Serrano, M. E., De La Garza-Amaya, M., Luna, J. S., & Campos-Rodríguez, R. (2012). Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *International Immunopharmacology*, *12*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.11.002

Fischbach, W., & Malfertheiner, P. (2018). Helicobacter Pylori Infection. *Deutsches Arzteblatt International*, *115*(25), 429–436. https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0429

Fischer, R., Debbabi, H., Dubarry, M., Boyaka, P., & Tomé, D. (2006). Regulation of physiological and pathological Th1 and Th2 responses by lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, *84*(3), 303–311. https://doi.org/10.1139/o06-058

Gopalakrishna, K. P., & Hand, T. W. (2020). Influence of maternal milk on the neonatal intestinal microbiome. *Nutrients*, *12*(3). https://doi.org/10.3390/nu12030823

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

Han, L., Xia, X., Xiang, X., Huang, F., & Zhang, Z. (2017). Protective effects of canolol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in AGS cells. *RSC Advances*, *7*(68), 42826–42832. https://doi.org/10.1039/c7ra08524a

Hooi, J. K. Y., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M. Y., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., … Ng, S. C. (2017). Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, *153*(2), 420–429. https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022

Hunt, R. H., Xiao, S. D., Megraud, F., Leon Barua, F., Bazzoli, F., Van der Merwe, S., … Cohen, H. (2010). Helicobacter pylori en los países en desarrollo. Organización Mundial de Gastroenterología. *Guías Prácticas de La WGO*, 3–5. Retrieved from http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/helicobacter_pylori_en_los_paises_desarrollo.pdf

IARC. (2016). Agents Classified, (026148), 1–36.

INEC. (2019). Boletín Técnico: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2018. *Ensanut 2019*, 1–20. Retrieved from https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_Sociales/ENSANUT/ENSANUT_2018/Boletin ENSANUT 28_12.pdf

Invitrogen. (2002). *Deoxyribonuclease I , Amplification Grade*.

Invitrogen. (2015). *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR*.

Johanson, B. (1960). Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chemica Scandinavica*, *14*(2), 510–512.

Kell, D. B., Heyden, E. L., & Pretorius, E. (2020). The Biology of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein That Can Help Defend Against Viruses and Bacteria. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1221. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01221

Khan, J., Vesel, L., Bahl, R., & Martines, J. C. (2015). Timing of Breastfeeding Initiation and Exclusivity of Breastfeeding During the First Month of Life: Effects on Neonatal Mortality and Morbidity—A Systematic Review and Meta-analysis. *Maternal and Child Health Journal*, *19*(3), 468–479. https://doi.org/10.1007/s10995-014-1526-8

Kleist, S. A., & Knoop, K. A. (2020). Understanding the elements of maternal protection from systemic bacterial infections during early life. *Nutrients*, *12*(4). https://doi.org/10.3390/nu12041045

Lanas, A., & Chan, F. K. L. (2017). Peptic ulcer disease. *The Lancet*, *390*(10094), 613–624. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32404-7

Legrand, D. (2012). Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, *90*(3), 252–268. https://doi.org/10.1139/o11-056

Legrand, D. (2016). Overview of Lactoferrin as a Natural Immune Modulator. *Journal of Pediatrics*, *173*, S10–S15. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.071

Leung, W. K., & Graham, D. Y. (2002). Rescue therapy for Helicobacter pylori. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, *5*(2), 133–138. https://doi.org/10.1007/s11938-002-0060-8

Liu, J., Li, B., Lee, C., Zhu, H., Zheng, S., & Pierro, A. (2019). Protective effects of lactoferrin on injured intestinal epithelial cells. *Journal of Pediatric Surgery*, *54*(12), 2509–2513. https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2019.08.046

Lu, J., Francis, J., Doster, R. S., Haley, K. P., Craft, K. M., Moore, R. E., … Gaddy, J. A. (2020). Lactoferrin: A Critical Mediator of Both Host Immune Response and Antimicrobial Activity in Response to Streptococcal Infections. *ACS Infectious Diseases*, *6*(7), 1615–1623. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00050

Machado, A. M. D., Figueiredo, C., Touati, E., Máximo, V., Sousa, S., Michel, V., … Rasmussen, L. J. (2009). Helicobacter pylori infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clinical Cancer Research*, *15*(9), 2995–3002. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2686

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A. T., … El-Omar, E. M. (2017). Management of Helicobacter pylori infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*, *66*(1), 6–30. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288

Megahed, F., El-Assal, M., Dabour, A., Samy, R., Rizk, M., & Al Adhm, S. (2017). Lactoferrin as an added therapy in the treatment of Helicobacter pylori. *Benha Medical Journal*, *34*(2), 119. https://doi.org/10.4103/bmfj.bmfj_25_17

Mladenova, I., & Durazzo, M. (2018). Transmission of Helicobacter pylori. *Minerva Gastroenterol Dietol*, (64), 251–254. https://doi.org/10.23736/S1121-421X.18.02480-7

Molès, J. P., Tuaillon, E., Kankasa, C., Bedin, A. S., Nagot, N., Marchant, A., … Van de Perre, P. (2018). Breastmilk cell trafficking induces microchimerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatric Allergy and Immunology*, *29*(2), 133–143. https://doi.org/10.1111/pai.12841

Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2011). Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis*, *1*(2), 121–122.

https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16606
Ojo-Okunola, A., Nicol, M., & du Toit, E. (2018). Human breast milk bacteriome in health and disease. *Nutrients*, *10*(11), 1–13. https://doi.org/10.3390/nu10111643
OMS. (1994). Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, *61*, 1–241. Retrieved from https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7715068
Pérez, S., Taléns-Visconti, R., Rius-Pérez, S., Finamor, I., & Sastre, J. (2017). Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free Radical Biology and Medicine*, *104*, 75–103. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.048
Queiroz, V. A. de O., Assis, A. M. O., & da Costa, H. R. (2013). Protective effect of human lactoferrin in the gastrointestinal tract. *Revista Paulista de Pediatria*, *31*(1), 90–95. https://doi.org/10.1590/S0103-05822013000100015
Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M. S., Paesano, R., & Valenti, P. (2017). Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9), 1985. https://doi.org/10.3390/ijms18091985
Safavi, M., Sabourian, R., & Foroumadi, A. (2016). Treatment of Helicobacter pylori infection: Current and future insights. *World Journal of Clinical Cases*, *4*(1), 5–19. https://doi.org/10.12998/wjcc.v4.i1.5
Sharma, G. N., Gupta, G., & Sharma, P. (2018). A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. *Eukaryotic Gene Expression*, *28*(2), 139–154.
SigmaAldrich. (2021). *MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation*.
Sorensen, M., & Sorensen, S. P. L. (1940). The proteins in whey. *Compte Rendu Des Travaux Du Laboratoire de Carlsberg, Ser. Chim.*, *23*(7), 55–99.
Sukri, A., Hanafiah, A., Mohamad Zin, N., & Kosai, N. R. (2020). Epidemiology and role of Helicobacter pylori virulence factors in gastric cancer carcinogenesis. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, *128*(2), 150–161. https://doi.org/10.1111/apm.13034
Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., … Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, *18*(3), 318–327. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3
Thermo Scientific. (2011). *SYBR® Green PCR Master Mix and SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit*.
Thermo Scientific. (2016). *NanoDrop One - Guía de usuario*. Retrieved from http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-SPANISH.pdf
ThermoFisher. (2020). *TRIzol ™ Reagent*. Retrieved from https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf
Trybek, G., Metlerski, M., Szumilas, K., Aniko-Włodarczyk, M., Preuss, O., Grocholewicz, K., & Wiszniewska4, B. (2016). THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF LACTOFERRIN. *Central European Journal of Sport Sciences and Medicine*, *15*(December), 27–35. https://doi.org/10.18276/cej.2016.3-03
Tsay, F.-W., & Hsu, P.-I. (2018). H. pylori infection and extra-gastroduodenal diseases. *Journal of Biomedical Science*, *25*(1), 65. https://doi.org/10.1186/s12929-018-0469-6
Uttara, B., Singh, A. V, Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, *7*(1), 65–74. https://doi.org/10.2174/157015909787602823
Vakil, N. (2020). Enfermedad ulcerosa péptica. *Manual MSD*.
Whitmore, L. C., Weems, M. N., & Allen, L. H. (2017). Cutting Edge: *Helicobacter pylori* Induces Nuclear Hypersegmentation and Subtype Differentiation of Human Neutrophils In Vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *198*(5), 1793–1797. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601292
WHO/UNICEF. (2012). Global Nutrion Target 2025.Breastfeeding Policy Brief.WHO/MNH/NHD 14.7, 8.
Yuan, Y., Wu, Q., Cheng, G., Liu, X., Liu, S., Luo, J., … Ma, L. (2015). Recombinant human lactoferrin enhances the efficacy of triple therapy in mice infected with Helicobacter pylori. *International Journal of Molecular Medicine*, *36*(2), 363–368. https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2251
Zarzosa-Moreno, D., Avalos-Gómez, C., Ramírez-Texcalco, L. S., Torres-López, E., Ramírez-Mondragón, R., Hernández-Ramírez, J. O., … de la Garza, M. (2020). Lactoferrin and Its Derived Peptides: An Alternative for Combating Virulence Mechanisms Developed by Pathogens. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(24). https://doi.org/10.3390/molecules25245763
Zhao, X., Xu, X.-X., Liu, Y., Xi, E.-Z., An, J.-J., Tabys, D., & Liu, N. (2019). The In Vitro Protective Role of Bovine Lactoferrin on Intestinal Epithelial Barrier. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(1), 148. https://doi.org/10.3390/molecules24010148
Zielińska, M. A., Sobczak, A., & Hamułka, J. (2017). Breastfeeding knowledge and exclusive breastfeeding of infants in

first six months of life. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, *68*(1), 51–59.

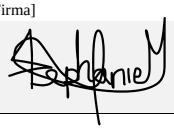
# APARTADO – X
## DECLARACIÓN FINAL

El presente programa, no causa perjuicio al ambiente, es de autoría propia o compartida con los asesores y no transgrede norma ética alguna. Igualmente se responsabiliza a los autores del presente proyecto por las posibles sanciones civiles o penales a las que tuviese lugar, en caso que un tercero alegue la titularidad de los derechos intelectuales del proyecto a ejecutarse; se deslinda a la Universidad Internacional SEK de cualquier responsabilidad en el evento que esto ocurriese

**Los abajo firmantes declaramos bajo juramento que el proyecto descrito en este documento no ha sido presentado a otra institución nacional o internacional salvo su cofinanciamiento, no causa perjuicio al ambiente, es de nuestra autoría y no transgrede norma ética alguna.**

**Igualmente nos responsabilizamos por las posibles sanciones civiles o penales a las que tuviese lugar, en caso que un tercero alegue la titularidad de los derechos intelectuales del proyecto a ejecutarse; se deslinda a la Universidad Internacional SEK de cualquier responsabilidad en el evento que esto ocurriese.**

| [Lugar] | [Fecha] |
|---|---|
| Quito | 04/10/2021 |

| [Nombres y Apellidos - Investigador/a Principal, Tesista] | [Nombres y Apellidos – Tutor 1] |
|---|---|
| Stephanie Belen Michelena Tupiza | Lino Arisqueta Herranz |
| [Cédula de Identidad] | [Cédula de Identidad] |
| 1717419079 | |
| [Firma] | [Firma] |
|  | |

| [Nombres y Apellidos – Tutor 2] |
|---|
| |
| [Cédula de Identidad] |
| |
| [Firma] |
| |

## Firman en conocimiento y aprobación de la propuesta de tesis, Comité Académico

| [Nombres y Apellidos - Decano/a] | [Nombres y Apellidos – Coordinador Maestría ] |
|---|---|
| | |
| [Cédula de Identidad] | [Cédula de Identidad] |
| | |
| [Firma] | [Firma] |
| | |

| [Nombres y Apellidos – Profesor DTT] | [Nombres y Apellidos – Profesor Maestría ] |
|---|---|
| | |
| [Cédula de Identidad] | [Cédula de Identidad] |
| | |
| [Firma] | [Firma] |
| | |

## **APARTADO – 14**
ANEXOS

Se incluirán las hojas de vida del (los) Tutor (es), así como, aquellos documentos complementarios pertinentes.