

## Efecto de la savia liofilizada de *Musa acuminata* Colla "plátano de seda" sobre la respuesta inmune de *Mus musculus* BALB/c frente a *Escherichia coli* O157:H7

**Effect of lyophilized sap from *Musa acuminata* Colla on activation of peritoneal macrophages and antibody production in BALB/c mice infected with *Escherichia coli* O157:H7.**

SARAVIA CUEVA, Verónica<sup>1</sup>; LUJÁN VELÁSQUEZ, Manuela<sup>2</sup>; CHÁVEZ CASTILLO, Milciades<sup>3</sup>, BECERRA GUTIÉRREZ, Lizzie<sup>4</sup>; JIMÉNEZ CORONADO, Marianela<sup>5</sup>. CABEZA RODRIGUEZ Julio.

No fueron encontrados conflictos de interés en este artículo.

### RESUMEN

Se determinó el efecto de la savia liofilizada de *Musa acuminata* Colla "plátano de seda" sobre la activación "in vitro" de macrófagos peritoneales y la producción de anticuerpos en *Mus musculus* BALB/c infectados experimentalmente con *Escherichia coli* O157:H7. Para la activación "in vitro", los macrófagos fueron distribuidos en 03 sistemas: experimentales A y B estimulados con diferentes concentraciones de savia liofilizada de *Musa acuminata* Colla (SLM) y control estimulado con Medio Mínimo Esencial. Posteriormente, se adicionó *E. coli* O157:H7, teniendo una concentración de savia de 16,3 ug/mL en el experimental A y 8,75 ug/mL en el B. Luego se tomaron muestras para determinar el índice fagocítico y la actividad microbicida. Para la producción de anticuerpos, se utilizaron 03 grupos, dosificando a los experimentales A y B con SLM en concentraciones de 20 mg/kg y 10 mg/kg de peso respectivamente y al control con solución salina fisiológica, luego fueron infectados con *E. coli* O157:H7 y se les extrajo muestras de sangre para la **titulación de anticuerpos**. Los resultados en la activación de macrófagos indicaron que los estimulados con 8,75 ug/mL de SLM presentaron un mayor índice fagocítico que los otros. El índice microbicida y el título de anticuerpos en los grupos con SLM en ambas concentraciones fueron mayores que el control. Concluyéndose, que la savia liofilizada de *Musa acuminata* Colla favorece el aumento del índice fagocítico, la actividad microbicida y el título de anticuerpos en *Mus musculus* BALB/c infectados experimentalmente con *E. coli* O157:H7.

**Palabras clave:** *Musa acuminata*, *Escherichia coli*, *Mus musculus*, respuesta inmune.

### ABSTRACT

This study attempted to determine the effect of lyophilized sap from *Musa acuminata* Colla on "in vitro" activation of peritoneal macrophages and antibody production in BALB/c mice infected with *Escherichia coli* O157:H7. Macrophage activation was determined by phagocytic index and microbicidal activity of murine peritoneal macrophages which were distributed in three groups: experimental A and experimental B, both had different concentrations of lyophilized sap (SLM), while control group had minimal essential medium. After that, we added *E. coli* O157:H7, so the concentration of SLM was 16,3 ug/mL in experimental A and 8,75 ug/mL in experimental B. Then we took samples in order to determine the phagocytic index and microbicidal activity. Antibody production was studied in BALB/c mice randomly allocated in three groups: experimental A, experimental B and control. Experimental A and B were orally administered with SLM at 20 mg/kg and 10 mg/kg respectively, control group was administered with sterile normal saline. They were infected with *E. coli* O157:H7 and then blood samples were collected in order to determine the antibody titer. Results showed that macrophages stimulated with SLM at 8,75 ug/mL had an increasing phagocytic index compared with the others. Besides microbicidal activity and antibody titer obtained in both experimental A and B were higher than control group. As a conclusion, lyophilized sap from *Musa acuminata* Colla increases phagocytic index, microbicidal activity and antibody production in BALB/c mice infected with *Escherichia coli* O157:H7.

**Key words:** *Musa acuminata*, *Escherichia coli*, *Mus musculus*, immune response.

<sup>1</sup>Biólogo Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. vpsc4e@hotmail.com

<sup>2</sup>Doctor en Ciencias Biológicas. Biólogo Microbiólogo. UNT. manuelitaluve@yahoo.es

<sup>3</sup>Doctor en Ciencias Biológicas. Biólogo Microbiólogo. Univ.Nacional Trujillo.revistaucvscientia@ucv.edu.pe

<sup>4</sup>Ms. C. Microbiología Clínica. Biólogo Microbiólogo. Univ. Nacional de Trujillo. lizzie\_karen@hotmail.com

<sup>5</sup>Biólogo Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. jicoma83@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

*E. coli* enterohemorrágica se caracteriza por producir diarrea y colitis hemorrágica desarrollando graves complicaciones como síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica, a través de la producción de una Shiga toxina (Stx)<sup>1</sup>. Dentro de este grupo tenemos a *E. coli* O157:H7 cuya secuencia del proceso patogénico es la siguiente: la adherencia laxa al enterocito, seguida de la adherencia íntima, la desorganización de las microvellosidades con la producción de la lesión y la posterior liberación de la verotoxina<sup>2</sup>.

Si bien *E. coli* es sensible a muchos antibióticos, no es aconsejable emplearlos de manera preventiva ya que pueden estimular la producción de la toxina<sup>3</sup>, por tal motivo surge la búsqueda de formas de prevención y tratamiento como es la fitoterapia. Entre las diferentes plantas medicinales se encuentra *Musa acuminata* Colla "plátano de seda" perteneciente a la familia de las musáceas<sup>4</sup>.

*M. acuminata* Colla presenta un látex que es de consistencia lechosa en cuyo estudio fitoquímico se ha determinado los componentes más característicos, encontrándose proteínas, gomas, mucilagos, saponinas, almidón, resinas, taninos, compuestos reductores, coumarinas, flavonoides, esteroides y triterpenoides, algunos de los cuales tienen importancia desde el punto de vista farmacológico<sup>5</sup>.

Se han realizado estudios sobre el efecto del látex del plátano en el tratamiento de diversas

enfermedades, así tenemos que tiene propiedades analgésicas y utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades respiratorias crónicas como el asma bronquial, así como también en la úlcera péptica<sup>6,7</sup>.

Otros trabajos empleando la savia acuosa de *M. acuminata* Colla mostraron una eficaz acción bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis* en *Cavia porcellus*, y la acción de la savia liofilizada de *Musa paradisiaca* contra *Trypanosoma cruzi*, lo cual resulta efectivo al disminuir el riesgo de sufrir el ataque de microorganismos y que esta mantenga sus propiedades medicinales<sup>8,9</sup>.

También se realizaron estudios con la savia liofilizada de *M. acuminata* Colla en donde se demostró que tiene mayor acción sobre la fagocitosis de *T. cruzi* en comparación con la forma acuosa<sup>10</sup>. Así mismo, se demostró que inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, observándose que los halos de inhibición dependen de los volúmenes de la savia<sup>11</sup>.

Teniendo en cuenta que la respuesta inmune tanto innata como adaptativa son las barreras que tienen que superar las bacterias, es que la presente investigación estuvo orientada a evaluar el efecto de la savia liofilizada de *Musa acuminata* Colla "plátano de seda" sobre la activación "in vitro" de macrófagos peritoneales y la producción de anticuerpos en *Mus musculus* BALB/c infectados experimentalmente con *Escherichia coli* O157:H7.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Material Biológico

- 8 gramos de savia liofilizada de *Musa acuminata* Colla "plátano de seda" recolectada a partir del pseudotallo cosechado en el distrito de Chocope, provincia de Ascope, La Libertad - Perú.
- Cultivo de *Escherichia coli* O157:H7 proporcionado por la Colección Peruana de Cultivos Tipo de la Universidad Nacional de Trujillo - Perú.
- 22 especímenes de *Mus musculus* BALB/c de 25 gramos de peso adquiridos del bioterio del Instituto Nacional de Salud, Lima - Perú.

### 2. Método

#### 2.1. Obtención de la savia liofilizada de *M. acuminata* Colla "plátano de seda"

Para la obtención de la savia, se realizó un orificio en la parte central del pseudotallo para extraer la muestra. Luego, se centrifugó, se extrajo el

sobrenadante y se filtró al vacío obteniéndose la savia en su forma acuosa<sup>11</sup>. De esta se separó 250 mL para ser tratados mediante liofilización y finalmente se realizó una suspensión del liofilizado en solución salina fisiológica estéril (SSFE) a una concentración de 250 ug/ml.

#### 2.2. Preparación del Inóculo de *E. coli* O157:H7:

El cultivo de *E. coli* O157:H7 se sembró en Agar: McConkey, Triple Azúcar Hierro, Lisina Hierro, Citrato y Urea. Para diferenciarlo de otras *E. coli* se sembró en Agar McConkey Sorbitol, observándose colonias no fermentadoras de sorbitol. La confirmación serológica se realizó con antiseros monoclonales para el antígeno O157. Luego, se realizó el cultivo puro y la suspensión en SSFE, estandarizándose a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  células/mL.

### 2.3. Evaluación del efecto de la savia liofilizada de *M. acuminata* Colla sobre la activación "in vitro" de macrófagos peritoneales de *M. musculus* BALB/c enfrentados a *E. coli* O157:H7:

#### 2.3.1. Aislamiento y estandarización de macrófagos peritoneales:

Para ello se utilizaron 10 ejemplares de *M. musculus* BALB/c, inoculándoles por vía intraperitoneal Medio Mínimo Esencial (MEM). Posteriormente se les abrió el abdomen y se extrajo el exudado peritoneal, realizándose la estandarización de macrófagos a una concentración de  $4 \times 10^6$  células/mL<sup>10</sup>.

#### 2.3.2. Evaluación de la activación "in vitro" de macrófagos peritoneales:

Se trabajó con 3 sistemas de evaluación de la siguiente manera:

- **Sistema Experimental A:** 1 mL de macrófagos + 150 uL de savia.
- **Sistema Experimental B:** 1 mL de macrófagos + 75 uL de savia.
- **Sistema Control:** 1 mL de macrófagos + 150 uL de MEM.

Posteriormente, los sistemas se incubaron a 37°C por 1 hora. Después, se agregó 1 mL de *E. coli* O157:H7, obteniéndose una concentración final de savia de 16,3 ug/mL en el experimental A y de 8,75 ug/mL en el B y se incubaron nuevamente a 37°C durante 1 hora.

#### 2.3.2.1. Determinación del índice fagocítico:

A los 60 minutos, se tomaron muestras y se realizaron frotises que fueron coloreados con Giemsa. Las láminas luego fueron observadas hasta contar 100 macrófagos. El índice fagocítico se expresó en porcentaje (%), indicando el número de macrófagos que habían fagocitado<sup>10</sup>.

#### 2.3.2.2. Determinación de la actividad microbicida:

Se tomaron muestras de 0,5 mL a los 0, 30 y 60 minutos, luego se les agregó 1,5 mL de SSFE y se centrifugó a 3500 rpm. Posteriormente, se realizaron diluciones del sobrenadante y sedimento, y se sembraron en

placas con TSA<sup>12</sup>. Se incubaron a 37°C durante 24 horas y se realizó el recuento de UFC/mL.

### 2.4. Evaluación del efecto de la savia liofilizada de *M. acuminata* Colla sobre la producción de anticuerpos en *M. musculus* BALB/c infectados experimentalmente con *E. coli* O157:H7:

#### 2.4.1. Dosificación de savia liofilizada de *M. acuminata* Colla:

La dosificación se realizó vía oral diariamente durante una semana, de la siguiente manera:

- **Grupo Experimental A:** 2 mL de savia (20 mg/kg de peso).
- **Grupo Experimental B:** 1 mL de savia (10 mg/kg de peso).
- **Grupo Control:** dosificados con 2 mL de SSFE.

#### 2.4.2. Infección con *E. coli* O157:H7:

Al 8º día, fueron infectados por vía oral con 0,2 mL de *E. coli* O157:H7 a una concentración de  $3 \times 10^8$  células/mL.

#### 2.4.3. Determinación del título de anticuerpos:

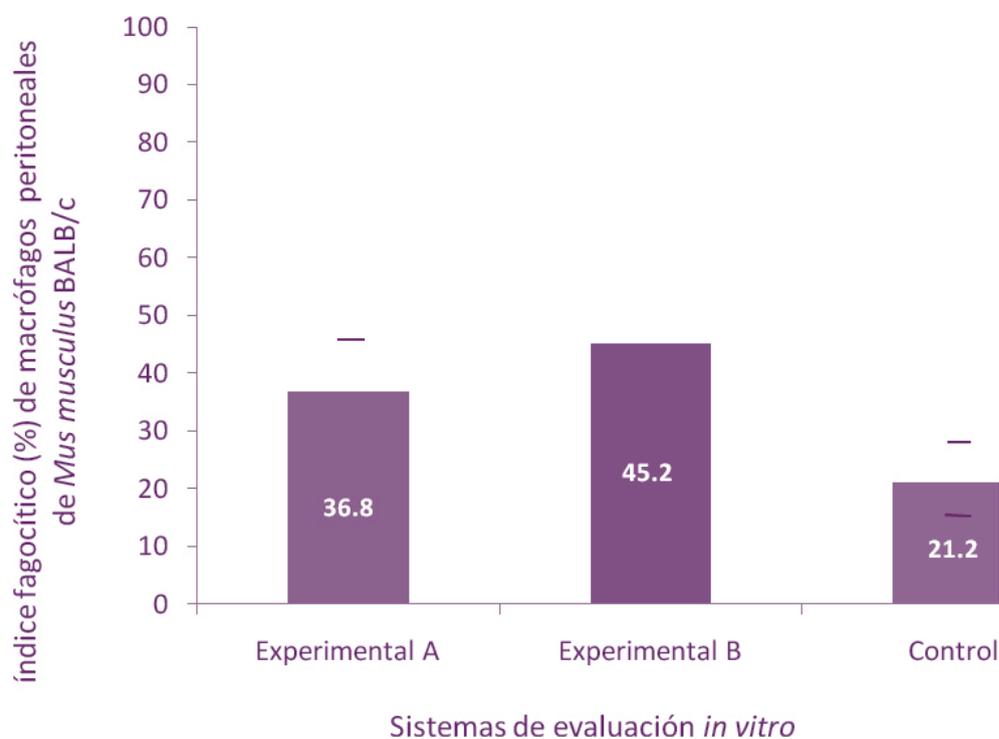
Para ello, se les extrajo sangre a los 7, 14, 21 y 28 días post-infección, se obtuvo el suero y se realizó la microtitulación de anticuerpos<sup>13</sup>.

### 2.5. Análisis estadístico:

Los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas de Análisis de Varianza y Fisher LSD, empleando el paquete estadístico Biostat v.2009.

## RESULTADOS

**Figura 1. Índice fagocítico de macrófagos peritoneales de *Mus musculus* BALB/c inoculados con *Escherichia coli* O157:H7 en los sistemas experimentales tratados con diferentes concentraciones de savia liofilizada de *Musa acuminata* Colla: A (16,3 ug/mL) y B (8,75 ug/mL) y sistema control con medio mínimo esencial.**



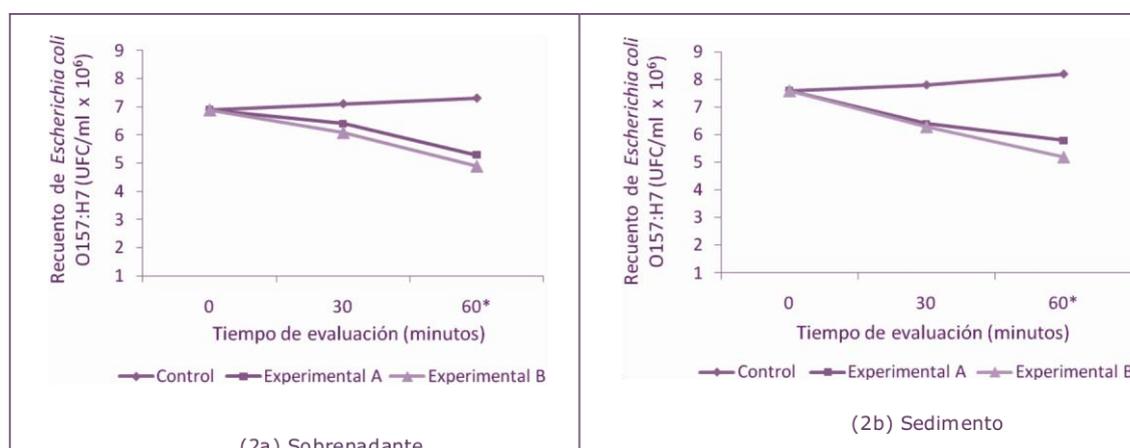
\*  $P < 0,05$ . d.f =2

Experimental A - Control;  $P = 0,0002$

Experimental B - Control;  $P = 0,0001$

Experimental A - Experimental B;  $P = 0,0004$

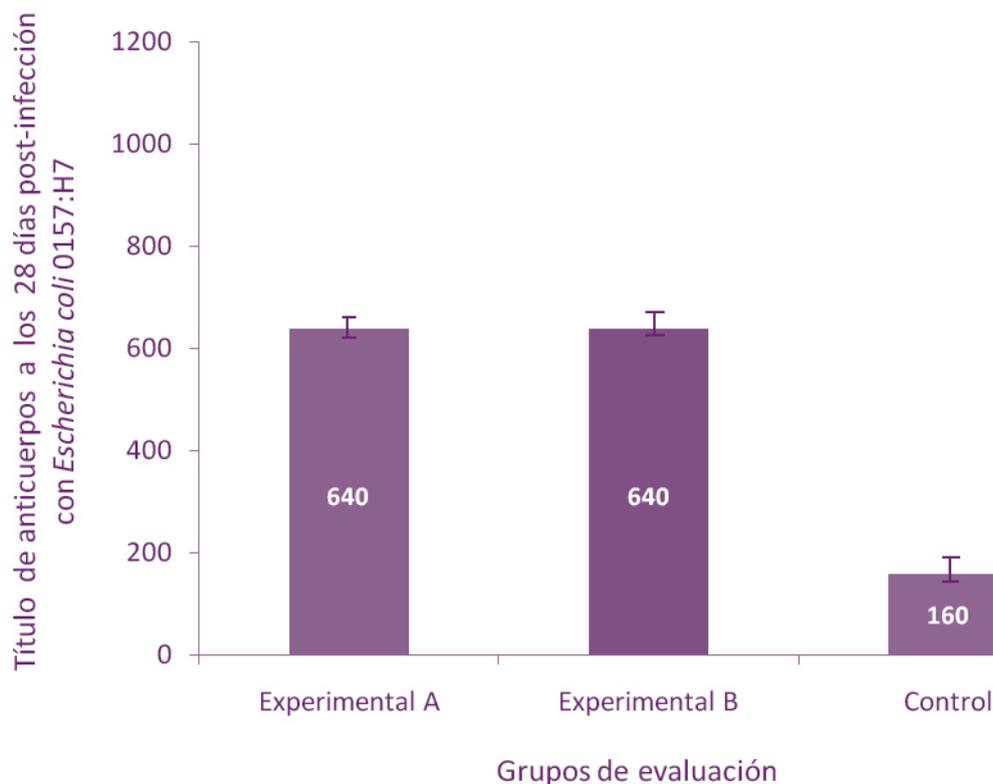
**Figura 2. Índice microbicida "in vitro" de macrófagos peritoneales en (2a) sobrenadante y (2b) sedimento de los sistemas experimentales tratados con diferentes concentraciones de savia liofilizada de *Musa acuminata* Colla: A (16,3 ug/mL) y B (8,75 ug/mL) y sistema control con medio mínimo esencial inoculados con *Escherichia coli* O157:H7 y evaluados durante 60 minutos.**



(2a) \*  $P < 0,05$ . d.f =2 Experimental A - Control:  $P = 0,0002$ ; Experimental B - Control:  $P = 0,0001$ ; Experimental A - Experimental B:  $P = 0,1004$ .

(2b) \*  $P < 0,05$ . d.f =2 Experimental A - Control:  $P = 0,0013$ ; Experimental B - Control:  $P = 0,0003$ ; Experimental A - Experimental B:  $P = 0,2988$ .

**Figura 3. Título de anticuerpos producidos en *Mus musculus* BALB/c de los grupos experimentales tratados con diferentes concentraciones de savia liofilizada de *Musa acuminata* Colla: A (20 mg/kg) y B (10 mg/kg) y grupo control con solución salina fisiológica a los 28 días post-infección con *Escherichia coli* 0157:H7.**



\*  $P < 0,05$ . d.f=2

Experimental A - Control;  $P = 0,0001$

Experimental B - Control;  $P = 0,0001$

## DISCUSIÓN

El efecto de la savia liofilizada de *M. acuminata* Colla sobre la activación "in vitro" de macrófagos peritoneales se determinó en base al índice fagocítico, observándose que el sistema experimental B que contenía macrófagos estimulados con 8,75  $\mu\text{g/mL}$  de savia tuvo un mayor índice fagocítico (45,2%), en comparación con el experimental A estimulado con 16,3  $\mu\text{g/mL}$  (36,8%) y el control (21,2%) (Figura 1).

Al comparar los sistemas experimentales con el control se encontró diferencia significativa ( $P < 0,05$ ), por lo que podemos decir que la savia tiene efecto inmunopotenciador; esto podría explicarse ya que incrementa la adherencia a través de mecanismos similares a los que ejercen las proteínas séricas que se unen a receptores presentes en las membranas celulares; así mismo, se considera de que ciertas moléculas de la savia promueven la síntesis de proteínas de membrana de los fagocitos lo que se traduciría a la superficie de la matriz extracelular<sup>14,15</sup>.

Al comparar los sistemas experimental A y experimental B se encontró diferencia significativa

( $P < 0,05$ ). El hecho de que este efecto inductor sea mayor (45,2%) a menor concentración de la savia, sugiere de que a mayor concentración exista impedimento estérico entre las moléculas componentes de la savia<sup>15</sup>.

Un estímulo activador no siempre concluye con una destrucción antigénica efectiva, ya que una misma sustancia puede ejercer efectos estimuladores y supresores sobre diferentes aspectos de la activación de macrófagos<sup>15</sup>, es por ello que se evaluó la actividad microbicida de la savia de *M. acuminata* Colla, observándose que los recuentos de *E. coli* O157:H7 en los sistemas experimentales A y B fueron menores que en el sistema control, existiendo diferencia significativa ( $P < 0,05$ ), lo que indica que la savia establece un estado de activación metabólica que permite duplicar la efectividad funcional de las células control, a través de la acción directa de los compuestos musáceos sobre los fagocitos peritoneales<sup>10,11,16</sup>.

Los resultados obtenidos evidencian que la savia produce un incremento en la capacidad de la

maquinaria celular para destruir bacterias, esta acción posiblemente se base: primero, en el establecimiento de interacciones ligando-receptor entre las moléculas de la savia y los receptores de la célula; y segundo, en que las moléculas de la savia son ingeridas rápidamente; por lo que la respuesta dependerá del número de receptores ocupados y la velocidad de asociación<sup>15,16</sup>.

Al comparar los recuentos de *E. coli* O157:H7 en el sistema experimental A se observó que eran mayores que en el experimental B (Figura 02a y 02b), indicándonos que la acción bactericida es inversa a la concentración de la savia de *M. acuminata* Colla. Esta efectividad de los macrófagos coincide con otras investigaciones en donde evaluaron la acción de la savia de *M. paradisiaca* sobre *Mycobacterium tuberculosis*, observándose que al disminuir la concentración, el desarrollo bacteriano decrecía<sup>17</sup>.

Así mismo, se observó que los títulos de anticuerpos a los 28 días en los grupos

experimentales A y B (640) dosificados con la savia fueron mayores que los del grupo control (160) (Figura 3), existiendo diferencia significativa ( $P < 0,05$ ). Esto podría explicarse ya que la savia tiene la capacidad de incrementar la expresión antigénica en la superficie celular del macrófago como consecuencia de la liberación de interferón  $\gamma$  que permite la mayor expresión del complejo mayor de histocompatibilidad<sup>12</sup>.

Al no encontrarse diferencia entre los títulos de anticuerpo de los grupos experimentales A y B, se sugiere realizar investigaciones incorporando periodos de dosificación prolongados, para reforzar la existencia de tiempos efectivos en los que se verifique una máxima actividad; así mismo emplear diferentes concentraciones de savia, ya que se comprobó que las concentraciones más altas no son sinónimo de mayor actividad, con dosis elevadas del producto vegetal, los receptores celulares se saturan y la actividad se dificulta.

## CONCLUSIONES

La savia liofilizada de *Musa acuminata* Colla "plátano de seda" a la concentración de 8,75  $\mu\text{g/mL}$  presenta una mayor efectividad en el aumento del índice fagocítico de macrófagos peritoneales de *Mus musculus* BALB/c infectados con *Escherichia coli* O157:H7.

La savia liofilizada de *M. acuminata* Colla

"plátano de seda" aumenta la actividad microbicida de macrófagos peritoneales de *M. musculus* BALB/c infectados con *E. coli* O157:H7.

La savia liofilizada de *M. acuminata* Colla "plátano de seda" incrementa el título de anticuerpos en *M. musculus* BALB/c infectados experimentalmente con *E. coli* O157:H7.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Elliott E, Robins R, O'Loughlin E, Bennett V, Bourke J, Henning P, et al. Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. *Arch Dis Child* 2001; 85(2): 125-31.
- Blanco JE, Blanco M, Alonso M, Mora A, Dahbi G, Coira M et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verotoxin) - producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo (Spain) from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol* 2001; 42(1): 311-9.
- Wolff M. Consecuencias adversas inesperadas durante el uso de antimicrobianos: Cuando el tratamiento puede ser peligroso para la salud. *Rev Chil Infectol* 2002; 19 Supl (1), 56-61.
- Kuklinsky C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona: Omega; 2000.
- Mostacero J, Mejía F, Gamarra O. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Trujillo: Editora Normas Legales; 2002.
- Silva H, García A. Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana. Iquitos: Instituto de Medicina Tradicional del Instituto Peruano de Seguridad Social; 1995.
- Suvarna P, Pramod L, Anagha M. To study analgesic activity of stem of *Musa sapientum* Linn. *Journal of Pharmacy Research* 2009; 2(9): 1381-2.
- Nieto J, Ortiz S. Tuberculosis Pulmonar: Tratamientos con la savia de *Musa acuminata* (plátano) versus los antibióticos en *Cavia porcellus*. Lima: CONCYTEC; 2005.
- Saez G, Albado E, Alvarado D, La Torre M. Efecto in vitro e in vivo del látex de *Musa paradisiaca* sobre *Trypanosoma cruzi*. *Wiñay Yachay* 2002; 6(1): 47-55.
- Jiménez M. Efecto in vitro de la savia de *Musa acuminata* Colla sobre la fagocitosis de *Trypanosoma cruzi* por macrófagos peritoneales de *Mus musculus* BALB/c. Tesis para optar el Título de Biólogo-Microbiólogo. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2009.
- Madalengoitia H. Efecto in vitro de la savia de *Musa acuminata* Colla sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis para optar el Grado de Maestro en Ciencias. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2007.
- Luján M, Becerra L, Chávez M, Otiniano N, Benites S. Efecto del extracto acuoso del gel de Aloe vera "sábila" sobre la fagocitosis por macrófagos de *Mus musculus* BALB/c y la producción de anticuerpos por *Oryctolagus cuniculus*. *Rev Med Vallejana* 2008; 5(1): 7-15.
- Garibay A. Manual de Prácticas de Inmunología. México: Unison; 2006.

14. Terrazas K. Efectos biológicos de la Musa paradisiaca sobre el sistema inmunitario: establecimiento de sistemas de cultivo celular primario y activación, proliferación y funcionalidad celular. Tesis el Grado de Licenciatura en Bioquímica. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés; 1993.
15. Terrazas G, Sanchez L, Carvajal R. Estudios in vitro sobre la actividad inmunomoduladora de la savia de Musa paradisiaca (sMp). Biofarbo 1997; 6(5):73-79.
16. Gómez P. Actividad inmunomoduladora de la savia de Musa paradisiaca. Establecimiento de un monitor biológico en la respuesta inmune experimental. Tesis para optar el Grado de Licenciatura en Bioquímica. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés; 1992.
17. Gómez P, Terrazas K, Sánchez L, Carbajal R. Estudios de las plantas medicamentosas locales en la modificación de la respuesta inmune: efecto inmunomodulador de la savia de Musa spp. Biofarbo 1993; 2(2):5-10.

**Recibido:** 17 marzo 2011 | **Aceptado:** 01 julio 2011