



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto del extracto metanólico de la corteza de *Cyrtocarpa procera*, así como de la eupatilina y estafiatina de *Artemisia ludoviciana* sobre la ureasa de *Helicobacter pylori*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ALMANELLY AGABO MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS:

ERIKA GÓMEZ CHANG

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PROPIETARIA:	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcaba
PROPIETARIA:	Dra. Irma Romero Álvarez
PROPIETARIA TUTORA:	Dra. Erika Gómez Chang
SUPLENTE:	M. en C. José Luis Sánchez Cupil
SUPLENTE:	M. en C. César Ramiro Martínez González

LUGAR DE LA ELABORACIÓN DEL PROYECTO:

Laboratorio 2, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Edificio D, Primer piso. Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESORA DE TESIS:

Dra. Erika Gómez Chang

SUSTENTANTE:

Almanelly Agabo Martínez

AGRADECIMIENTOS

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA de la UNAM, IN217019 e IN207622. Agradezco a la DGAPA-UNAM por las becas recibidas.

Mi agradecimiento más sincero a la Dra. Irma Romero Álvarez por su enorme dedicación, guía y asistencia académica y técnica durante el desarrollo experimental.

A la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcaba por sus valiosos comentarios y por su apoyo en revisión de mi trabajo desde el comienzo.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá y a mi tía, Alicia Martínez Flores y Laura Martínez Flores, por el infinito amor y apoyo incondicional que me demuestran cada día, por alentarme a conseguir mis metas y enseñarme a no rendirme. Gracias por inspirarme a soñar en grande, por todas sus enseñanzas, sacrificios y su paciencia que jamás podré pagarles, pero si corresponderles. Gracias a ustedes soy quien soy, permítanme demostrarles que las amo de la mejor manera en que puedo hacerlo, dedicándoles todos mis logros.

A mis hermanos Miguel y Mariana y a mi primo Daniel, por ser pilares durante toda mi vida. Gracias por todos sus consejos, su comprensión y cariño. Al pequeño Iker por darme esperanza y energía, espero ser tu ejemplo y orgullo al igual que nuestros hermanos mayores lo son para mí.

Con mucho cariño a Araceli, gracias por tu apoyo desde el primer día, no pude encontrar una amiga mejor.

A Sunbae, por desvelarse conmigo y calmar mi ansiedad.

A la Dra. Irma Romero Álvarez, a quien admiro y respeto, gracias por recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio, por la confianza que depositó en mí y por ayudarme a realizar este trabajo de principio a fin. También a la Dra. Erika Gómez Chang, mis más sinceros agradecimientos por todas sus enseñanzas, por su profesionalidad y por su paciencia... sobre todo por su paciencia. Gracias por su tiempo, por el conocimiento y el apoyo que me ha brindado desde que la conozco. Para ambas, gracias por permitirme conocerlas y aprender de ustedes, las quiero.

A la Facultad de Ciencias, por ser mi espacio de formación académica y profesional y a sus profesores por todo el conocimiento y las experiencias que me brindaron a lo largo de la carrera, en especial al M. en C. Octavio Gonzáles Caballero, a quien recuerdo con mucho cariño.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por los espacios educativos, recreacionales, artísticos y deportivos que también son parte de mi formación, estoy orgullosa de formar parte de la máxima casa de estudios del país.

Finalmente quiero agradecer a cada uno de mis asesores por su tiempo y atención. Gracias Dra. Martha Lydia Macías Rubalcaba, M. en C. José Luis Sánchez Cupil y M. en C. César Ramiro Martínez González. Sus comentarios enriquecieron el presente trabajo.

¡INFINITAS GRACIAS A TODOS, SIN USTEDES ESTO NO HUBIERA SIDO
POSIBLE!

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria bacilo helicoidal, gram negativa, que coloniza el estómago humano y cuya prevalencia mundial es mayor al 50%. Esta bacteria es el agente causal de la gastritis y de la úlcera péptica y se encuentra relacionada con el desarrollo de cáncer gástrico y linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). Aunque existen tratamientos para las enfermedades ocasionadas por *H. pylori*, la erradicación de la bacteria se ha dificultado en los últimos años debido al aumento en las resistencias antibióticas, por lo cual es necesaria la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos tratamientos. Dentro de la medicina tradicional mexicana la corteza de *Cyrtocarpa procera* (chupandilla) y las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* (estafiate) han sido utilizadas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Estudios previos demostraron una buena actividad anti-*H. pylori* del extracto metanólico de la corteza de *C. procera* (CpMet), así como de los compuestos eupatilina y estafiatina de *A. ludoviciana*, indicando su potencial para utilizarse como terapia contra las enfermedades producidas por la bacteria. En este trabajo se determinó mediante el método colorimétrico de Berthelot el efecto *in vitro* de CpMet, eupatilina y estafiatina sobre la actividad de la ureasa parcialmente purificada de *Helicobacter pylori* la cual es uno de los factores de patogenicidad más importantes de la bacteria y un posible blanco farmacológico. CpMet y estafiatina inhiben la actividad de la ureasa de *H. pylori* en un 48% con 250 µg/mL y en un 41.9% con 3.9 µg/mL, respectivamente. Por otra parte, la eupatilina no tiene efecto sobre la actividad de la enzima, por lo que su mecanismo de inhibición del crecimiento de la bacteria es otro diferente a la ureasa.

Índice

Lista de abreviaturas	9
Introducción	11
1. Marco Teórico	12
1.1 <i>Helicobacter pylori</i>	12
1.1.1 Antecedentes e historia	12
1.2 Epidemiología	14
1.2.1 Transmisión e infección	14
1.2.2 Prevalencia.....	14
1.3 Generalidades	15
1.3.1 Clasificación taxonómica	15
1.3.2 Características microbiológicas	16
1.3.3 Hábitat.....	19
1.4 Factores de patogenicidad	20
1.4.1 Factores de colonización	20
1.4.2 Factores de virulencia	21
1.4.3 Factores de sobrevivencia.....	22
1.5 Patologías	23
1.6 Terapias para la erradicación de <i>H. pylori</i>	25
1.8 Plantas medicinales como alternativa o coadyuvantes de las terapias actuales utilizadas para las enfermedades producidas por <i>H. pylori</i>.....	28
1.8.1 <i>Cyrtocarpa procera</i>.....	29
1.8.2 <i>Artemisia ludoviciana</i>	32
2. Antecedentes directos.....	35
2.1 Ureasa.....	35

2.2 Extracto metanólico de <i>Cyrtocarpa procera</i> (CpMet).....	42
2.3 Eupatilina.....	43
2.4 Estafiatina	44
3. Justificación del trabajo	45
4. Hipótesis.....	46
5. Objetivo general.....	46
5.1 Objetivos particulares.....	46
6. Materiales y métodos	46
6.1 Compuestos y extracto.....	46
6.1.1 CpMet.....	46
6.1.2 Eupatilina y estafiatina	47
6.2 Cultivo de <i>H. pylori</i>	48
6.3 Identificación de <i>H. pylori</i>	48
6.3.1 Prueba de la catalasa	48
6.3.2 Prueba de la ureasa con Rojo de Fenol.....	49
6.3.3 Prueba de la oxidasa	49
6.3.4 Tinción de Gram	50
6.4 Obtención de una fracción enriquecida de la ureasa de <i>H. pylori</i>	50
6.5 Determinación de la concentración de proteína.....	51
6.6 Determinación de la actividad específica de la ureasa.....	51
6.7 Determinación del efecto de CpMet, eupatilina y estafiatina sobre la actividad de la ureasa	52
6.8 Análisis estadístico	53
7. Resultados y Discusión.....	53
7.1 Identificación de <i>H. pylori</i>	53

7.2 Determinación de la concentración de proteína y de la actividad específica de la ureasa	55
7.3 Inhibición de la actividad de la ureasa con ácido acetohidroxámico	57
7.4 Efecto de CpMet sobre la actividad de la ureasa	58
7.5 Efecto de eupatilina y estafiatina sobre la actividad de la ureasa	59
8. Conclusiones	63
9. Perspectivas	63
Referencias	64
ANEXOS	71

Lista de abreviaturas

$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	Urea
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amonio
AEU	Actividad Específica de la Ureasa
AHA	Ácido acetohidroxámico
ALI	Extracto Acuoso de <i>Artemisia ludoviciana</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BabA	Blood group antigen binding adhesin (Adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo)
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CA ₅₀	Capacidad Antioxidante Media/ Capacidad Antioxidante 50
<i>cag</i> PAI	Isla de patogenicidad <i>cag</i>
CagA	Citotoxina asociada al gen A
CL ₅₀	Concentración Letal Media/ Concentración Letal 50
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO ₂	Dióxido de Carbono
CpMet	Extracto metanólico de la corteza de <i>Cyrtocarpa procera</i>
DE ₅₀	Dosis Efectiva Media/ Dosis Efectiva 50
DL ₅₀	Dosis Letal Media/ Dosis Letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
H ₂ CO ₃	Ácido carbónico
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno

HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
IB	Instituto de Biología
IBP	Inhibidor de la Bomba de Protones
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria Media/ Concentración Inhibitoria 50
LPS	Lipopolisacáridos
MALT	Linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NaClO	Hipoclorito de Sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH ₂ Cl	Monocloramina
NH ₃	Amoniac
NH ₄ ⁺	Amonio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
Sab A	Sialic acid-binding adhesin (Adhesina de unión al ácido siálico)
SFB	Suero Fetal Bovino
TMDF	Dihidrocloruro de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UreI	Canal dependiente de pH de <i>H. pylori</i>
Vac A	Citotoxina vacuolizante de <i>H. pylori</i>
α-CA	Anhidrasa carbónica

Introducción

En 1983 los doctores J. Robin Warren y Barry J. Marshall identificaron a la bacteria *Helicobacter pylori* como el agente causal de la gastritis y de la úlcera péptica, descubrimiento que los hizo acreedores al premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2005.

Se ha propuesto que la transmisión de *H. pylori* ocurre generalmente durante la infancia, de persona a persona a través de las vías oral-oral, gastro-oral y fecal-oral. Alrededor del 20% de las personas infectadas desarrollan enfermedades como: gastritis (aguda o crónica), úlcera péptica, cáncer gástrico o linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). La prevalencia mundial de *H. pylori* es mayor al 50% y en México es del 43% en niños y entre el 70-90%, en adultos.

El desarrollo de las enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori* depende de: A) el genotipo bacteriano, B) la predisposición genética del hospedero y C) de factores ambientales. La patogenicidad de *H. pylori* depende de sus factores de colonización, virulencia y sobrevivencia, los cuales le permiten establecerse como patógeno y persistir en el estómago humano.

La erradicación de la bacteria se ha dificultado en los últimos años debido al aumento en la resistencia antibiótica, consecuencia de diversos factores, pero particularmente, debido al desapego de los pacientes a los tratamientos a causa de sus efectos secundarios y al alto costo de los mismos; lo que en consecuencia ha ocasionado una elevada tasa de recurrencia de las enfermedades y un aumento en el riesgo del desarrollo de cuadros clínicos graves.

La Organización Mundial de la Salud clasificó a *H. pylori* como una bacteria antibiótico-resistente de prioridad alta, para la cual es necesaria la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos tratamientos. En este contexto, los productos naturales obtenidos de plantas con antecedentes etnomédicos son buenos candidatos para el desarrollo de nuevos tratamientos contra *H. pylori*.

Dentro de la medicina tradicional mexicana se conocen plantas que han sido utilizadas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales como gastritis y úlcera péptica, entre otras, tal es el caso de la corteza de *Cyrtocarpa procera* (chupandilla) y de las partes aéreas

de *Artemisia ludoviciana* (estafiate). Estudios previos demostraron una buena actividad anti-*H. pylori* del extracto metanólico de la corteza de *C. procera* (CpMet), así como de los compuestos eupatilina y estafiatina de *A. ludoviciana*, indicando su potencial para utilizarse como terapia contra las enfermedades producidas por la bacteria.

En este trabajo, para continuar con el estudio de CpMet, eupatilina y estafiatina y tratar de entender su posible mecanismo antibiótico, se determinó su efecto sobre la enzima ureasa de *H. pylori*, la cual es uno de los factores de patogenicidad más importantes de la bacteria y un posible blanco farmacológico.

Mediante un ensayo colorimétrico se determinó *in vitro* la actividad de la enzima ureasa parcialmente purificada y se encontró que CpMet y estafiatina inhiben la actividad de la ureasa de *H. pylori* en un 48% con 250 µg/mL y en un 41.9% con 3.9 µg/mL, respectivamente. Estos resultados indican que parte de su mecanismo de acción podría ser mediante la inhibición de esta enzima, sin embargo, deben de tener otros blancos de acción dado que la inhibición de la ureasa es parcial. Por otra parte, la eupatilina no tiene efecto sobre la actividad de la enzima, por lo que su mecanismo de inhibición del crecimiento de la bacteria es otro diferente a la ureasa.

Este trabajo reporta por primera vez el efecto de CpMet, de la eupatilina y estafiatina sobre la ureasa de *H. pylori* y contribuye al estudio de sus mecanismos de acción sobre la bacteria.

1. Marco Teórico

1.1 *Helicobacter pylori*

1.1.1 Antecedentes e historia

Helicobacter pylori es uno de los patógenos más antiguos del ser humano, sin embargo, debido a la dificultad que implica el crecimiento de esta bacteria en un cultivo puro y a la creencia de que el estómago era un órgano estéril por su bajo pH, tomó más de un siglo

reconocer su rol en el desarrollo de patologías gastrointestinales. Cabe mencionar que más allá de la importancia clínica, el estudio de esta bacteria ha fungido como una herramienta útil en el seguimiento de las migraciones humanas desde África hacia medio Oriente, hace aproximadamente 60,000 a 150,000 años y posteriormente hacia Europa y Asia (Mégraud *et al.*, 2016).

Aunque desde 1875 algunos anatomistas alemanes describieron la presencia de bacterias en la capa de moco del estómago, no fue sino hasta finales del siglo XX cuando se puso mayor atención a la relación entre dichas bacterias y el desarrollo de gastritis, úlceras pépticas e incluso cáncer gástrico (Gustafson y Welling, 2010). En 1983 los doctores J. Robin Warren y Barry J. Marshall del Royal Perth Hospital de Australia, reportaron la presencia de bacilos helicoidales localizados mayoritariamente en la región antral del estómago de pacientes con gastritis crónica. Además, observaron que las bacterias se distribuían superficialmente en el epitelio gástrico y las asociaron con la inflamación y ulceración de este (Warren y Marshall, 1983). Un año más tarde, aislaron a *H. pylori* a partir de biopsias de pacientes con gastritis crónica y úlceras duodenales y gástricas; hecho que fue menospreciado, por lo que, en ese mismo año, con el objeto de demostrar que la bacteria era capaz de colonizar la mucosa gástrica y provocar gastritis, Marshall se autoinoculó un aislado clínico de la bacteria, obtenido de un paciente masculino de 66 años con antecedente de síntomas dispépticos. Diez días posteriores a la infección, logaron confirmar la presencia de los bacilos en las biopsias, así como la evidencia histológica de la gastritis. Con este experimento, se comprobaron los postulados de Koch y por ende la asociación de *H. pylori* como el agente causal de la gastritis (Warren y Marshall, 1984; Gustafson y Welling, 2010).

El descubrimiento de *H. pylori* y su relación con el desarrollo de gastritis y úlceras pépticas, hicieron a J. Robin Warren y Barry J. Marshall acreedores del Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2005.

1.2 Epidemiología

1.2.1 Transmisión e infección

La transmisión de la bacteria es un tema controversial, la teoría más aceptada por diversos autores es que la transmisión de *H. pylori* ocurre dentro del núcleo familiar, generalmente durante la infancia de persona a persona vías: oral-oral, gastro-oral y/o fecal-oral a través de la saliva, vómito o reflujo gástrico y heces (Kusters *et al.*, 2006; Gómez-Chang *et al.*, 2017).

Helicobacter pylori puede persistir en el huésped durante largos periodos de tiempo e incluso durante toda su vida, la infección es asintomática en la mayoría de los casos, pero aproximadamente el 20% de las personas infectadas desarrollan enfermedades gástricas importantes (Gómez-Chang *et al.* 2017).

1.2.2 Prevalencia

La prevalencia mundial de *H. pylori* es de ~50% y depende principalmente de la distribución geográfica, el nivel socioeconómico de la población, la edad y la raza, por lo que es muy variable entre países e incluso entre regiones de un mismo país (Figura 1) (Burkitt *et al.*, 2017; Hunt *et al.*, 2011).

La Organización Mundial de Gastroenterología reportó una prevalencia en México del 43% en niños y del 70-90% en adultos (WGO, 2010). Torres *et al.* (1998) reportaron una seroprevalencia del 66% en México relacionada con la edad, género, sobrepoblación, educación de baja calidad y condiciones socioeconómicas bajas.



Figura 1. Prevalencia mundial de la infección por *H. pylori* (Tomada de Burkitt *et al.*, 2017).

1.3 Generalidades

1.3.1 Clasificación taxonómica

La bacteria se clasificó inicialmente en el género *Campylobacter* (Warren y Marshall, 1984). Posteriormente, Marshall *et al.* (1984) la clasificaron como *Campylobacter pyloridis*, nombre que fue validado hasta 1985 y corregido a *Campylobacter pylori* en 1987 (International Union of Microbiological Societies, 1985; Marshall y Goodwin, 1987).

Después de varios estudios se detectaron características que diferenciaban a *C. pylori* del resto de las bacterias pertenecientes a *Campylobacter* y se determinó que la bacteria no pertenecía a ese género (Romaniuk *et al.*, 1987). Finalmente, en 1989 se creó el género *Helicobacter* y desde entonces se estableció a *Helicobacter pylori* como la especie tipo (Goodwin *et al.*, 1989).

De acuerdo con el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (On *et al.*, 2015), la clasificación actual de *H. pylori* es la siguiente:

Dominio: Bacteria
Phylum: Proteobacteria
Clase: ϵ - proteobacteria
Orden: Campylobacterales
Familia: Helicobacteraceae
Género: Helicobacter
Especie: *Helicobacter pylori*

1.3.2 Características microbiológicas

Helicobacter pylori es una bacteria bacilar, polimórfica que puede adoptar una forma helicoidal, filamentosa, curva (en forma de “V” o “U”) y cocoide, como se muestra en la Figura 2. Posee de 4 a 7 flagelos unipolares que permiten su motilidad y mide de 0.5-1 μm de ancho y de 2.5- 4 μm de largo (Goodwin y Armstrong, 1990).

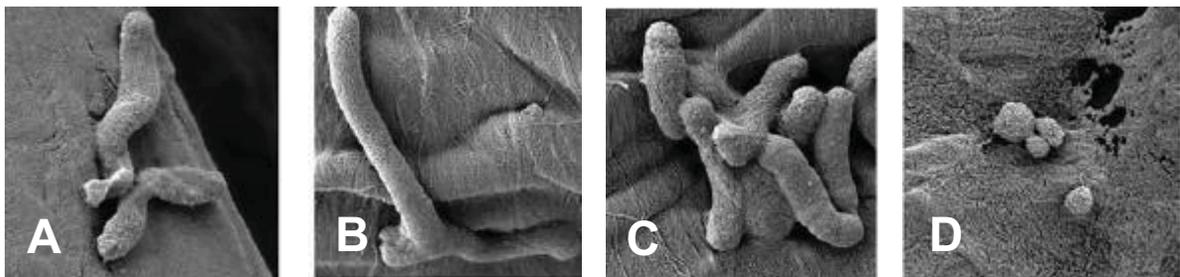


Figura 2. Morfología de *H. pylori*: A) Bacilo helicoidal, B) Bacilo filamentoso, C) Bacilo curvado, D) Cocoide. Microscopía Electrónica de Barrido (Tomadas de Krzyżek y Gościński, 2018).

De entre todas las morfologías de *H. pylori*, la bacilo-helicoidal que se aprecia en la Figura 3 se asocia con una mayor patogenicidad por presentar mayor motilidad, facilitando así la colonización exitosa del estómago (Worku *et al.*, 1999).

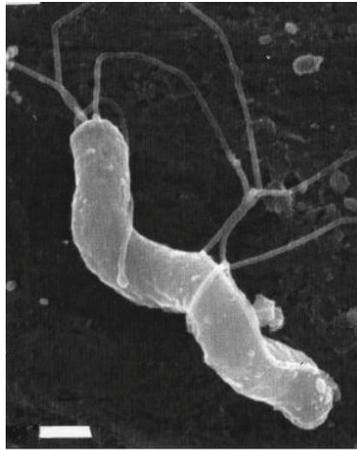


Figura 3. Morfología bacilo-helicoidal de *Helicobacter pylori* con vista de los flagelos unipolares. Microscopía Electrónica de Barrido, barra = 0.05 μm (Tomada de O'Toole y Clyne, 2001)

La pared celular de *H. pylori* se compone de una membrana interna y una membrana externa separadas por el periplasma, el cual mide aproximadamente 30 nm de grosor. En la membrana externa los lípidos están unidos a polisacáridos formando la capa de lipopolisacáridos (LPS) (Figura 4). Los LPS de *H. pylori* son importantes para la sobrevivencia de la bacteria y su estructura consiste en un antígeno O, un oligosacárido central y un lípido A (O'Toole y Clyne, 2001).

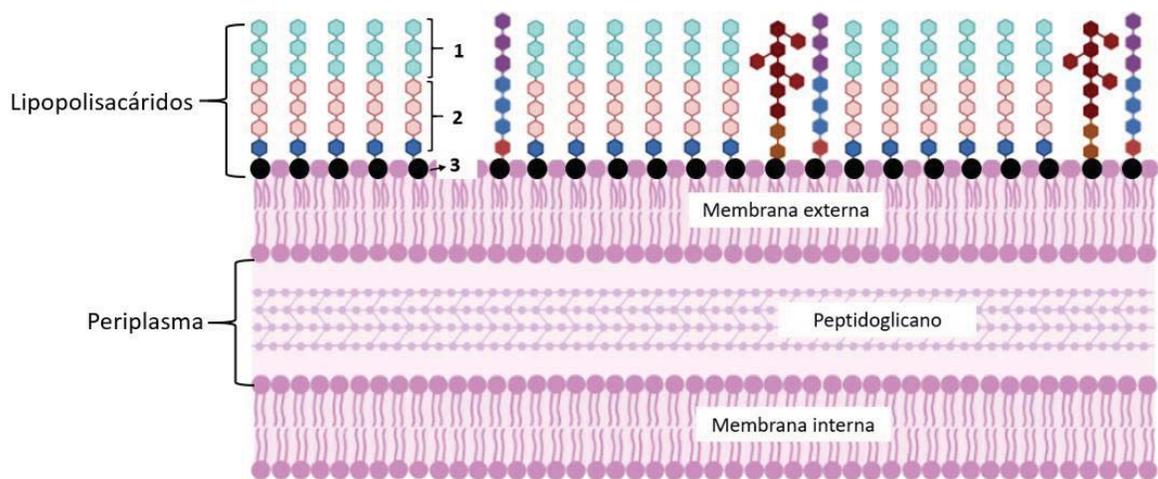


Figura 4. Pared celular de *H. pylori* con énfasis en la capa de lipopolisacáridos: 1) antígeno O, 2) oligosacárido central y 3) lípido A. Creado con BioRender.com

En condiciones de cultivo *H. pylori* es una bacteria nutricionalmente fastidiosa, el medio de cultivo, sólido o líquido, requiere la adición de sangre de caballo u oveja del 7 al 10% y en medios libres de sangre se utilizan suero fetal bovino (10%) o ciclodextrinas como suplementos (Andersen y Wadström, 2001). El medio de cultivo comúnmente utilizado para *H. pylori* es el medio Brucella, aunque también se ha reportado el cultivo de la bacteria en Agar Columbia, Agar Sangre, Agar Infusión Cerebro-Corazón, Agar Casman, medio Mueller-Hinton, medio Wilkins-Chalgren y medio *H. pylori* (Bayona, 2013).

Helicobacter pylori es una bacteria neutrófila de crecimiento lento, en medio sólido el cultivo tarda de 3 a 10 días en crecer y formar una capa translúcida sobre el medio de cultivo, no se recomienda el uso de un medio líquido para el crecimiento primario de la bacteria principalmente por la alta formación de formas cocoides, además se recomienda el uso de medios selectivos con antibióticos incluyendo vancomicina, trimetoprima, polimixina B y anfotericina B para reducir el riesgo de contaminación con otros organismos y así favorecer el cultivo de *H. pylori* (Andersen y Wadström, 2001; On *et al.*, 2015).

La incubación de *H. pylori* requiere bajas concentraciones de oxígeno debido a que es una bacteria microaerofílica. La atmosfera adecuada para el cultivo de *H. pylori* considera las siguientes condiciones: 2-5% de oxígeno (O₂), 5-10% dióxido de carbono (CO₂) y 0-10% de hidrógeno (H₂) a una temperatura de 37°C. La incubación de la bacteria puede realizarse en jarras con kits de generación de gas o en incubadoras de CO₂, es importante tener en cuenta que la morfología microscópica de *H. pylori* varía en función de las condiciones de cultivo (Andersen y Wadström, 2001).

Los cultivos de la bacteria pueden almacenarse por varios años congelados a -80°C o en nitrógeno líquido utilizando agentes crioprotectores como el glicerol (10%) o el dimetilsulfóxido (DMSO) (On *et al.*, 2015).

Las pruebas bioquímicas para la identificación de *H. pylori* son las pruebas de la catalasa, ureasa y oxidasa, para las cuales *H. pylori* es positiva (Goodwin y Armstrong, 1990). Otro método de identificación de la bacteria es la tinción diferencial de Gram, esta tinción permite identificar a *H. pylori* como una bacteria gramnegativa y facilita la observación microscópica de la morfología de la bacteria (Smith y Hussey, 2005).

1.3.3 Hábitat

Helicobacter coloniza la mucosa del estómago humano y se localiza predominantemente en la región del antro (Figura 5), aunque también puede encontrarse en la región fúndica y del cuerpo. El 80-90% de las bacterias se distribuyen en la capa de moco que recubre al epitelio, alrededor del 10% se encuentran adheridas a las células epiteliales y aunque *H. pylori* no se considera un patógeno intracelular, se ha reportado su presencia dentro de algunas células epiteliales (Amieva *et al.*, 2002).

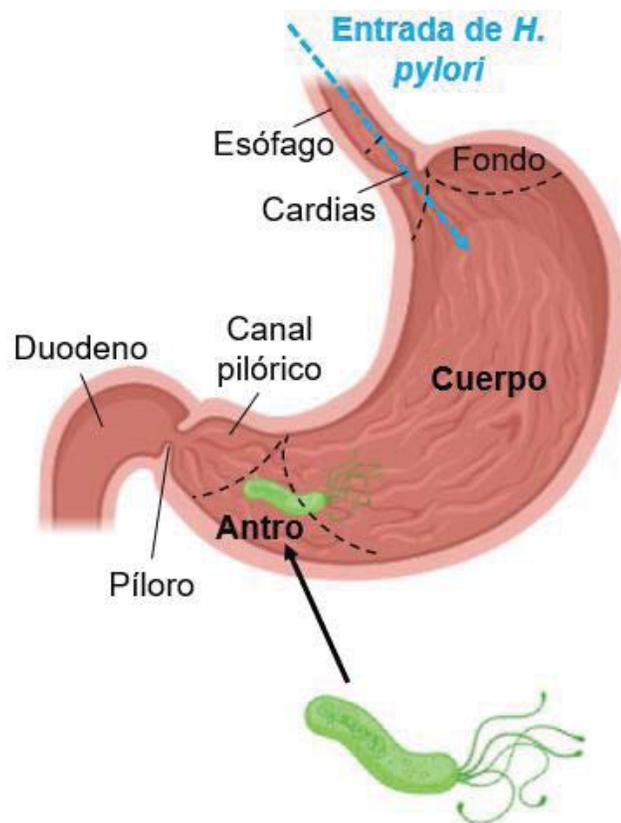


Figura 5. Localización de *H. pylori* en el estómago. Creado con BioRender.com

1.4 Factores de patogenicidad

Los diversos elementos de patogenicidad con los que cuenta *H. pylori* permiten que la bacteria sobreviva, colonice y provoque el desarrollo de enfermedades gastrointestinales. En este contexto, para su estudio podemos dividirlos en factores de: A) Colonización, B) Virulencia y C) Supervivencia (Figura 6).

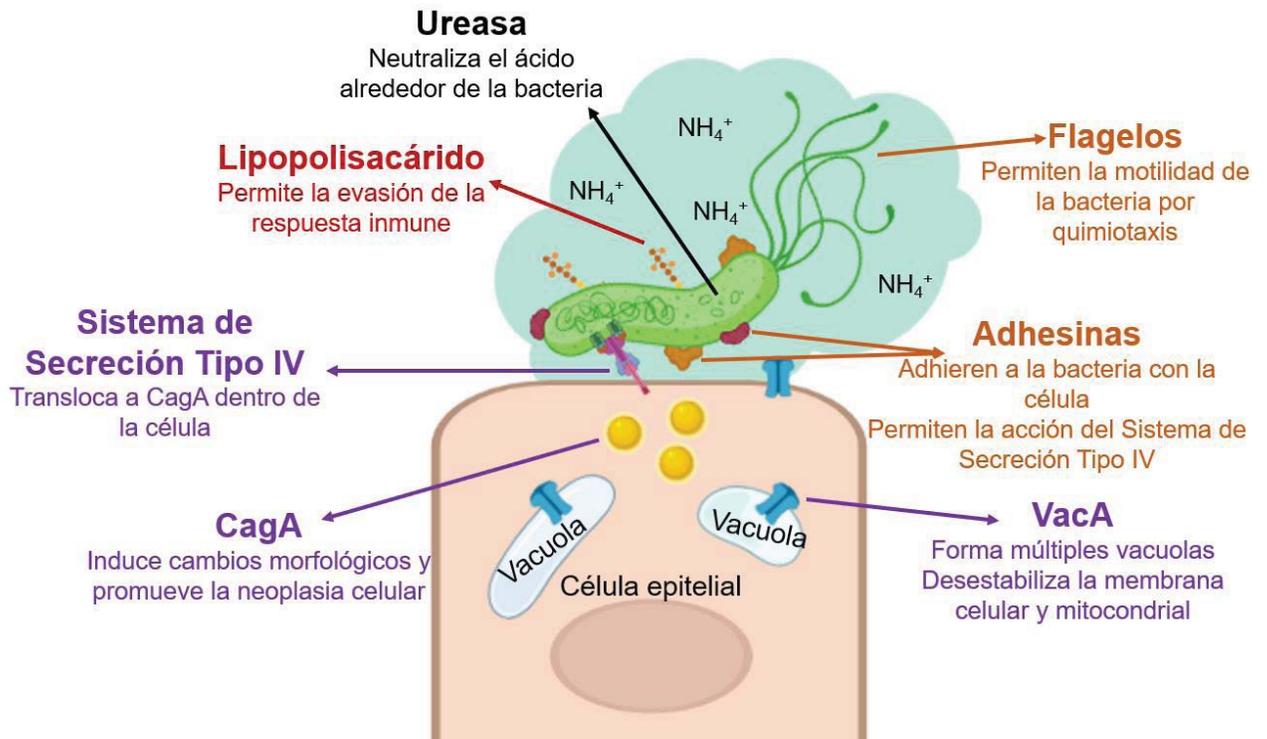


Figura 6. Principales factores de patogenicidad de *H. pylori*. Factores de colonización (anaranjado), factores de virulencia (violeta), factores de supervivencia (rojo). La ureasa (negro) es un factor de colonización, virulencia y supervivencia. Creado con BioRender.com

1.4.1 Factores de colonización

Entre los factores que promueven la colonización exitosa del estómago por *H. pylori*, destacan los flagelos, la ureasa y algunas adhesinas, los cuales, en conjunto, son fundamentales para el establecimiento de la infección y para el desarrollo de las enfermedades gastrointestinales (Kim, 2016; Sachs *et al.*, 2005; Matsuo *et al.*, 2017).

Después de la transmisión, el desplazamiento de *H. pylori* hasta alcanzar a las células epiteliales gástricas es posible gracias a sus flagelos, los cuales le proporcionan la motilidad mediante quimiotaxis dirigida por urea, bicarbonato, pH, zinc, níquel, agrinina, glutamina, histidina y otros aminoácidos (Kim, 2016).

Por otra parte, la ureasa de la bacteria es esencial para una colonización exitosa, ya que la actividad de esta enzima le permite crear un nicho neutro a su alrededor, lo que la protege del ambiente ácido estomacal (Sachs *et al.*, 2005).

Una vez que la bacteria logra atravesar el moco gástrico que recubre al epitelio, se une a las células epiteliales utilizando diversas proteínas localizadas en su membrana externa, conocidas como adhesinas, las cuales interactúan con distintos receptores de membrana de las células epiteliales. Entre las adhesinas más estudiadas de *H. pylori* destacan la adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo (BabA) y la adhesina de unión al ácido siálico (SabA), las cuales reconocen antígenos de superficie fucosilados (Lewis B) y sialilados (Lewis X), respectivamente, localizados en la membrana de las células epiteliales (Matsuo *et al.*, 2017).

1.4.2 Factores de virulencia

Los factores de virulencia son los responsables del daño que la bacteria ocasiona en la mucosa gástrica y en buena parte, de la evolución clínica de la enfermedad. Los factores de virulencia de *H. pylori* más estudiados son; la citotoxina vacuolizante (VacA) y la citotoxina asociada al gen A (CagA) (Cover y Blanke, 2005; Hatakeyama, 2017).

VacA es una toxina multifuncional cuya acción principal es la formación de vacuolas. *H. pylori* libera a VacA en forma de monómeros que se oligomerizan en la membrana de las células epiteliales y forman un canal selectivo de aniones, el cual, al ingresar a la célula del hospedero por endocitosis, provoca la acumulación de bases débiles al interior del endosoma lo que en consecuencia induce la entrada de agua por ósmosis, dando así lugar a la formación de vacuolas. Una vez dentro de la célula, VacA puede unirse también a la membrana mitocondrial, iniciando señales que conducen a la muerte celular. La actividad citotóxica de VacA puede ser distinta entre las cepas de *H. pylori* dependiendo del estado

en el que se encuentren los alelos en las regiones señal, intermedia y media del gen *vacA*, a partir del cual se sintetiza la toxina (Cover y Blanke, 2005).

Por otro lado, CagA se sintetiza a partir del gen *cagA* presente en la isla de patogenicidad *cag* (*cag* PAI). La isla se compone de ~30 genes y al menos 18 de ellos sintetizan proteínas que conforman el sistema de secreción tipo IV a través del cual *H. pylori* inyecta a CagA en las células epiteliales. Dentro de la célula, CagA interactúa con diversas moléculas de señalización, promoviendo cambios morfológicos y la transformación neoplásica de las células epiteliales. Las cepas de *H. pylori* se clasifican en CagA positivas si tienen *cag* PAI o CagA negativas, cuando no la tienen. La infección con una cepa de *H. pylori* CagA positiva aumenta el desarrollo de cáncer gástrico, razón por la cual, estas cepas son consideradas más virulentas (Hatakeyama, 2017).

La ureasa de *H. pylori* también tiene un papel importante como factor de virulencia pues se ha demostrado que activa el sistema inmune del hospedero, estimulando la expresión de citocinas pro-inflamatorias (Harris *et al.*, 1996), tiene efectos citotóxicos (Mégraud *et al.*, 1992) y genotóxicos en las células del epitelio gástrico (Suzuki *et al.*, 1997), su actividad altera la viscoelasticidad de las mucinas (Celli *et al.*, 2009) y promueve la angiogénesis (Olivera-Severo *et al.*, 2017).

Otros factores de virulencia incluyen a proteínas que también alteran las respuestas celulares del hospedero y las vías de señalización, por ejemplo: la proteína activadora de neutrófilos, las proteínas de choque térmico, las fosfolipasas, la arginasa, la catalasa y la superóxido dismutasa (Baj *et al.*, 2020).

1.4.3 Factores de sobrevivencia

La estructura de los LPS de la membrana externa de *H. pylori* es similar a la de los antígenos O de las células epiteliales de la mucosa gástrica del hospedero, este fenotipo estructural permite que la bacteria evada la respuesta inmune del hospedero mediante un efecto de “mimetización” (Baj *et al.*, 2020).

La ureasa de *H. pylori* también es un factor de sobrevivencia importante ya que promueve el reajuste del potencial de membrana y del pH periplásmico y citosólico de la bacteria permitiéndole colonizar, sobrevivir y persistir en el estómago (Sachs *et al.*, 2005).

Entre otros factores relevantes para la sobrevivencia de la bacteria se incluyen a las enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa, las cuales protegen a la bacteria de las especies reactivas de oxígeno (Baj *et al.*, 2020).

1.5 Patologías

Las enfermedades gastrointestinales relacionadas con la infección por *H. pylori* son: gastritis, úlcera péptica, linfoma tipo MALT y cáncer gástrico (Kusters *et al.*, 2006; Gravina *et al.*, 2018). En 1994 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer catalogó a *H. pylori* como un agente carcinógeno tipo I.

La historia natural de la infección por *H. pylori* comienza con gastritis aguda que puede evolucionar a gastritis crónica con tres posibles patrones de distribución: 1) gastritis de predominio antral, 2) pangastritis, o 3) gastritis atrófica de predominio corporal (Figura 7). El patrón de distribución de la gastritis, el grado de la inflamación y la cantidad de la secreción del ácido estomacal determinan el resultado de otras enfermedades como úlceras, linfoma tipo MALT y cáncer gástrico (Gómez-Chang *et al.*, 2017).

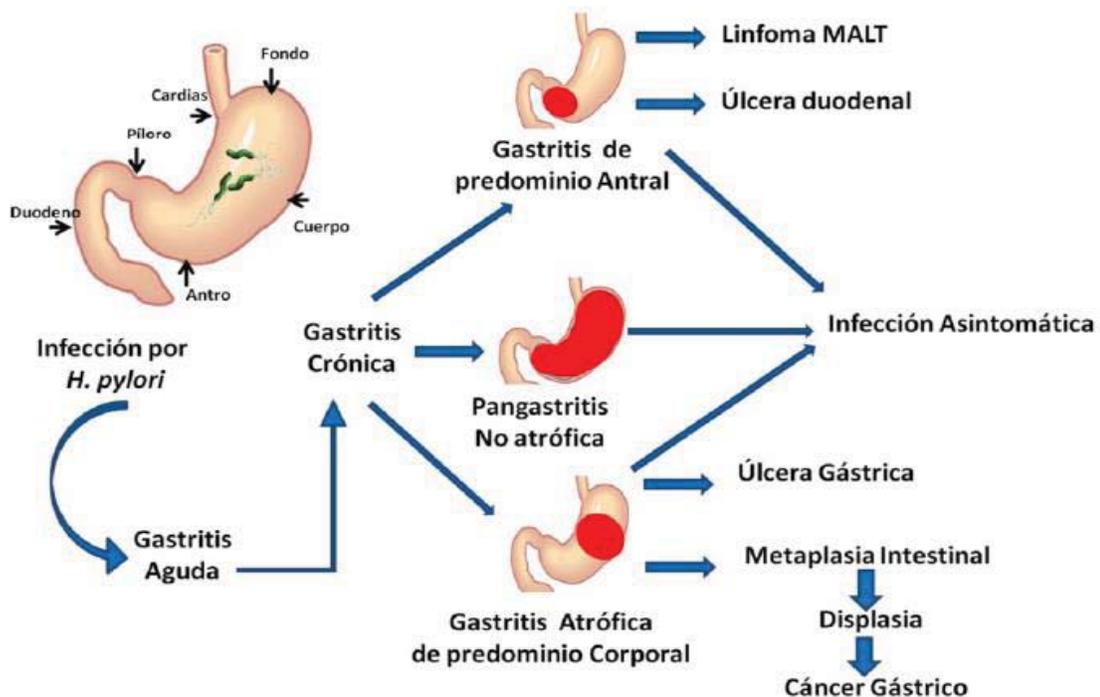


Figura 7. Historia natural de la infección por *H. pylori*. En rojo se muestra la localización anatómica de la inflamación (Tomado de Gómez-Chang *et al.*, 2017).

El desarrollo de las enfermedades antes mencionadas parece depender de tres factores: A) el genotipo bacteriano, B) la susceptibilidad genética del hospedero y C) de factores ambientales. Se ha descrito que aproximadamente el 80% de las personas infectadas con *H. pylori* desarrollan gastritis, del 10 al 15% úlceras pépticas, del 1 al 2% cáncer gástrico y <1% desarrolla linfoma tipo MALT (Kusters *et al.*, 2006; Gravina *et al.*, 2018).

En México, las úlceras, la gastritis y la duodenitis comprenden el quinto lugar como causa de enfermedad a nivel nacional de acuerdo con el anuario de morbilidad de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de salud (2020). Considerando que *H. pylori* es el principal agente etológico de la gastritis y de las úlceras y que estas patologías son una causa importante de morbilidad en el país, la infección por *H. pylori* es un problema de salud pública.

Por otra parte, se ha reportado una relación de la infección por *H. pylori* con enfermedades extragástricas como la púrpura trombocitopénica idiopática y la anemia por deficiencia de hierro idiopática (Gravina *et al.*, 2018).

1.6 Terapias para la erradicación de *H. pylori*

Las terapias actuales para erradicar a *H. pylori* utilizan antibióticos como la claritromicina, amoxicilina, metronidazol, tetraciclina, levofloxacino y rifabutina en dosis variables según el esquema terapéutico indicado (Tabla 1). Otros medicamentos con actividad anti-*H. pylori* utilizados en las terapias son la furazolidona, las sales de bismuto y medicamentos que suprimen la secreción ácida como los inhibidores de la bomba de protones (IBP) y los bloqueadores de los receptores de histamina (Gómez-Chang *et al.*, 2017).

Tabla 1. Terapias de erradicación de *H. pylori*

Terapia	Fármacos	Posología	Duración (días)
Tratamiento de primera línea			
Triple estándar	IBP	Dosis estándar b.i.d	
	Claritromicina	500 mg b.i.d	14
	Amoxicilina o	1000 mg b.i.d o	
	Metronidazol	500 mg b.i.d	
Tratamiento de segunda línea			
Cuádruple con bismuto	IBP	Dosis estándar b.i.d	
	Bismuto	Dosis estándar q.i.d	10-14
	Tetraciclina	500 mg q.i.d	
	Metronidazol	500 mg q.i.d	
Concomitante	IBP	Dosis estándar b.i.d	
	Claritromicina	500 mg b.i.d	10
	Amoxicilina	1000 mg b.i.d	
	Metronidazol	500 mg b.i.d	

Otras terapias con bismuto incluyen IBP, tetraciclina y furazolidona o levofloxacino.

IBP: Inhibidor de la bomba de protones; b.i.d: del latín *bis in die* (2 veces al día); q.i.d: del latín *quater in die* (4 veces al día) (modificado de Gómez-Chang *et al.*, 2017)

Tabla 1. Terapias de erradicación de *H. pylori* (Continuación)

Terapia	Fármacos	Posología	Duración (días)
Tratamiento de tercera línea			
Secuencial	IBP	Días	Dosis estándar b.i.d
	Amoxicilina	1-5	1000 mg b.i.d
	IBP	Días	Dosis estándar b.i.d
	Clarithromicina	6-10	500 mg b.i..d o
	Levofloxacino		250 mg b.i.d
	Metronidazol		500 mg b.i.d
			10
Híbrida	IBP	Días	Dosis estándar b.i.d
	Amoxicilina	1-7	1000 mg b.i.d
	IBP	Días	Dosis estándar b.i.d
	Amoxicilina	8-14	1000 mg b.i.d
	Clarithromicina		500 mg b.i.d
	Metronidazol		500 mg b.i.d
			14
Rescate	IBP		Dosis estándar b.i.d
	Levofloxacino		500 mg b.i.d
	Amoxicilina		1000 mg b.i.d
			10
Triple basada en Rifabutina	IBP		Dosis estándar b.i.d
	Rifabutina		250 mg b.i.d
	Amoxicilina		1000 mg b.i.d
			14

Otras terapias con bismuto incluyen IBP, tetraciclina y furazolidona o levofloxacino.

IBP: Inhibidor de la bomba de protones; b.i.d: del latín *bis in die* (2 veces al día); q.i.d: del latín *quater in die* (4 veces al día) (modificado de Gómez-Chang *et al.*, 2017)

Las terapias de erradicación se recomiendan exclusivamente en pacientes con las siguientes situaciones clínicas: 1) úlcera péptica (gástrica o duodenal), activa o no, con o sin complicaciones asociadas, 2) gastritis atrófica y metaplasia intestinal, 3) linfoma gástrico tipo B (MALT), 4) después de una resección gástrica parcial por cáncer, 5) familiares en

primer grado de personas que han tenido cáncer gástrico y tienen *H. pylori*, 6) uso crónico de inhibidores de la bomba de protones y 7) uso crónico de antiinflamatorios no esteroideos en pacientes con antecedentes de úlcera péptica, con o sin complicaciones y factores de riesgo asociados (Abdo-Francis *et al.*, 2007)

De acuerdo con el IV Consenso Mexicano sobre *H. pylori*, en México se recomienda iniciar con una terapia de segunda línea para la erradicación de la bacteria, estos tratamientos comprenden las terapias cuádruples: con bismuto o concomitante (sin bismuto) con una duración de 14 días (ver Tabla 1). Cuando no se consigue la erradicación de *H. pylori* después del primer régimen de tratamiento lo ideal sería evaluar la resistencia antimicrobiana e iniciar un tratamiento basado en la susceptibilidad de la bacteria, sin embargo, de no contar con la disponibilidad para su evaluación, se propone utilizar uno de los siguientes esquemas: 1) Terapia cuádruple con bismuto por 14 días si el tratamiento previo fue concomitante, 2) Terapia de rescate con levofloxacino (ver Tabla 1) o 3) Terapia concomitante por 10 a 14 días si el tratamiento fue cuádruple con bismuto (Bosques-Padilla *et al.*, 2018).

La resistencia antibiótica de *H. pylori* es variable en las diversas regiones geográficas, incluso dentro de un mismo país, pero también lo es temporalmente. El estudio de las resistencias locales a los antibióticos de manera actualizada jugará un papel clave en la determinación del régimen de tratamiento adecuado en una población determinada y también brindará la oportunidad de adaptar la terapia a pacientes individuales. Particularmente, en México los porcentajes de resistencia antibiótica de *H. pylori* a metronidazol, amoxicilina y claritromicina son del 59%, 3% y 12%, respectivamente (Camargo *et al.*, 2014).

La revisión de las terapias de erradicación actuales ha permitido visualizar sus problemáticas, lo cual es relevante para proponer soluciones.

1.7 Problemática con las terapias actuales para la erradicación de *H. pylori*

Pese a que actualmente existen terapias para la erradicación de *H. pylori* como las que se muestran en la Tabla 1, el éxito de estas es cada vez menor. Un factor crucial que determina

el fracaso de las terapias es el desapego de los pacientes a los tratamientos, lo que ocurre por los efectos secundarios y adversos (como dolor epigástrico y abdominal, alteración del gusto, náuseas, vómito, dolor de cabeza y diarrea) relacionados al uso de antibióticos en los esquemas de erradicación y por los altos costos de estos (Hafeez *et al.*, 2021; Vakil y Mégraud, 2007).

Otro factor estrechamente relacionado con el desapego de los pacientes a los tratamientos e implicado en el fracaso de las terapias es el aumento en la resistencia antibiótica de la bacteria, la cual a su vez es un factor implicado en el fracaso de las terapias y en la recurrencia de la infección (Vakil y Mégraud, 2007; Hunt *et al.*, 2011).

Cabe destacar que actualmente no hay vacunas desarrolladas contra *H. pylori* ni otros procedimientos que incidan en la prevención de la infección, más que las medidas básicas de higiene. Por lo cual, la búsqueda de alternativas para la profilaxis y tratamientos de erradicación es una necesidad.

1.8 Plantas medicinales como alternativa o coadyuvantes de las terapias actuales utilizadas para las enfermedades producidas por *H. pylori*.

Las plantas medicinales se han utilizado durante muchos años para el tratamiento de múltiples enfermedades, actualmente son parte de la medicina tradicional y su valor terapéutico ha sido reconocido por la organización mundial de la salud (OMS) (WHO, 2013).

En el año 2013 se publicó la Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023, cuya finalidad es el desarrollo de políticas dinámicas y la aplicación de planes de acción para reforzar el uso de la medicina tradicional en el mantenimiento de la salud de las personas (WHO, 2013). Tomando en cuenta que la medicina tradicional esta próxima a los hogares, que es accesible y asequible, y que además forma parte de la cultura en países como México. Lograr la calidad, seguridad y eficacia comprobada de estas medicinas contribuirá a asegurar el acceso de una gran parte de la población a la atención de la salud.

Con el propósito de promover lo anterior, la OMS respalda proyectos de investigación clínica sobre la seguridad y eficacia en materia de la medicina tradicional y aboga sobre su uso racional fomentando su utilización basada en pruebas científicas (WHO, 2013). De este modo se ha promovido el estudio de productos naturales que forman parte de la medicina tradicional para su uso en enfermedades crónicas como la gastritis. Por ejemplo, existen diversos reportes en la literatura sobre el uso de productos naturales con potencial gastroprotector y bactericida que son importantes para el desarrollo de trabajos como el presente.

En el 2007, Castillo-Juárez y Romero recopilaron información de 327 plantas de uso medicinal y comestible con actividad anti *H. pylori*. Dos años más tarde Castillo-Juárez *et al.* (2009) evaluaron la actividad anti-*H. pylori* de 53 plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para tratar enfermedades gástricas. Dos de las plantas evaluadas que presentaron buena actividad anti-*H. pylori* fueron *Cyrtocarpa procera* Kunth y *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* (Willd. Ex Spreng.) D. D. Keck, y dado que el presente trabajo de Tesis se aboca a dichas especies, profundizaremos más en ellas.

1.8.1 *Cyrtocarpa procera*

Cyrtocarpa procera (Figura 8A) es un árbol dioico de 5-8 m de altura, el tronco es robusto con corteza color gris-rojiza, no exfoliante y la copa es extendida y ancha. Las hojas son pubescentes, imparipinnadas, deciduas y miden 3-3.5 cm de largo. Florece entre marzo y mayo, las flores son pequeñas, crecen en panículas y tienen color blanco. El fruto es una drupa amarilla en su madurez, de ~2 cm de largo que es comestible (Mitchel y Daly, 1991; Medina-Lemos y Fonseca, 2009).

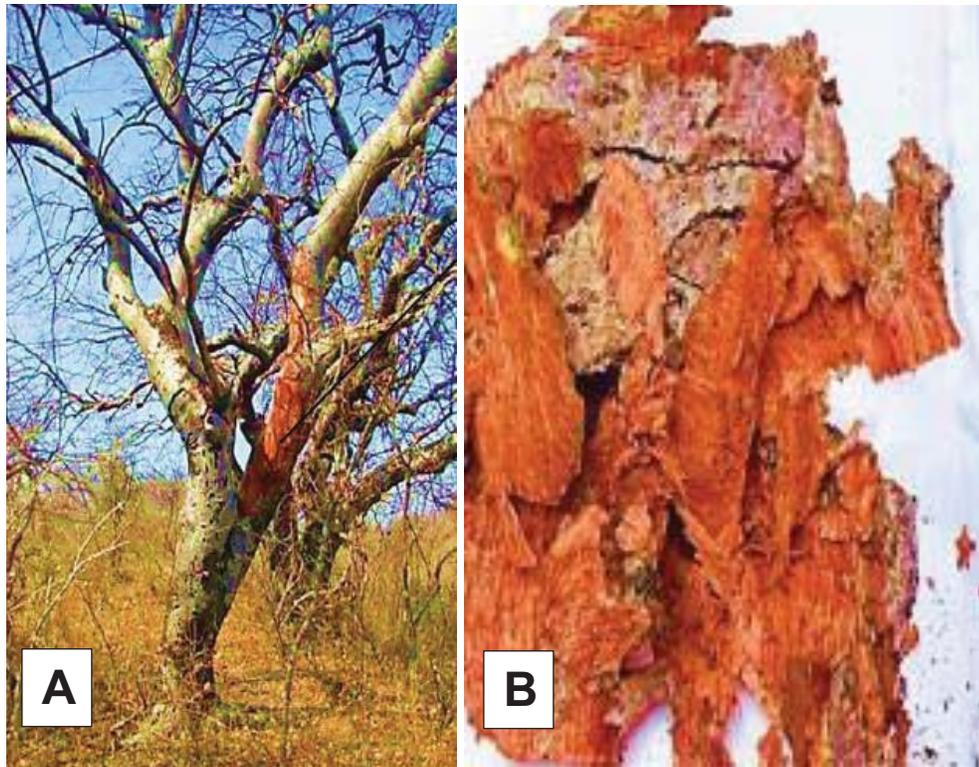


Figura 8. A) *Cyrtocarpa procera*, imagen tomada por Fonseca, Romero y Escobedo-Hinojosa en la recolección de marzo 2010. B) Corteza de *C. procera* (Tomadas de Escobedo, 2013).

El árbol crece en altitudes de 500 a 1350 msnm asociado a bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios, bosques mesófilos de montaña y bosques de pino-encino (Medina-Lemos y Fonseca, 2009). Es un árbol endémico de México y se distribuye ampliamente en los estados de Baja California Sur, Chiapas, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Tamaulipas y Zacatecas (Villaseñor, 2016). Se le conoce comúnmente como chupandilla (Puebla), baricoca, copalcocote, copalcojote, chucumpum (Guerrero), machocote, maxocote, palo de chupandia (Oaxaca) y coco de cerro (Alto Balsas) (Abundiz *et al.*, 2004).

Esta especie no está considerada en peligro de extinción de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010.

La clasificación taxonómica de *C. procera* de acuerdo con la base de datos del Jardín Botánico de Missouri (Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/50145943>) se presenta a continuación:

Reino: Plantae
Phylum: Equisetophyta
Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Orden: Sapindales
Familia: Anacardiaceae
Género: *Cyrtocarpa*
Especie: *Cyrtocarpa procera*

Usos etnomédicos: La corteza de *C. procera* se consume a manera de infusión o decocción como agua de uso para tratar enfermedades de la piel, dolor de dientes y malestares estomacales como diarrea, gastritis, úlcera péptica y disentería (Rodríguez-López *et al.*, 2006; Argueta *et al.*, 1994). También se consume en combinación con biznaga (*Ferocactus latispinus*) y cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) para enfermedades del riñón (Canales *et al.*, 2005). El fruto de *C. procera* se administra vía oral o cutánea para tratar la fiebre, disentería y diarrea y también se ha reportado el uso de la semilla para tratar la lepra (Argueta *et al.*, 1994).

Fitoquímica: Existen pocos estudios al respecto. Rodríguez-López *et al.* (2006) aislaron e identificaron el esteroide β -sitosterol, el α -pentadecilbenzeno y una mezcla de ácidos grasos a partir de los extractos de hexano y diclorometano de la corteza de *C. procera*. En el 2011, Rosas-Acevedo *et al.* aislaron el triterpeno pentacíclico β -amirina a partir del extracto hexánico de la corteza de *C. procera* y en el 2020 Rodríguez-Canales *et al.* identificaron flavonoides como la crisina, naringenina, kaempferol y catequina a partir del extracto metanólico de la corteza de *C. procera*.

Actividad antimicrobiana: En el 2009 Castillo *et al.* determinaron la actividad anti-*H. pylori* de los extractos acuoso y metanólico de la corteza de *C. procera*. Por otra parte, Martínez-Elizalde *et al.* (2015) estudiaron la actividad antibacteriana de diferentes extractos del fruto de *C. procera* contra *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* y *Yersinia enterocolitica*.

Actividad farmacológica: Rodríguez-López *et al.* (2003) reportaron baja actividad espasmolítica del extracto cloroformo: metanólico (1:1) de *C. procera* en un modelo de contracción de íleon de rata. Rosas-Acevedo *et al.* (2011) reportaron actividad antiulcerogénica de los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol a partir de corteza normal y regenerada de *C. procera* en un modelo de ulceración aguda inducida por etanol en ratas. Escobedo-Hinojosa *et al.* (2012) identificaron el potencial antiulcerogénico y antiedematogénico de los extractos de hexano, diclorometano, diclorometano:metanol (1:1), metanol y acuoso de la corteza de *C. procera*.

Toxicidad: Rodríguez-López *et al.* (2006) Identificaron una toxicidad significativa de los extractos de hexano ($CL_{50}=0.21 \mu\text{g/mL}$), diclorometano ($CL_{50}=2.31 \mu\text{g/mL}$) y acetona ($CL_{50}=22.75 \mu\text{g/mL}$) de la corteza de *C. procera* en un modelo *in vivo* con *Artemia salina*. Escobedo-Hinojosa *et al.* (2012) demostraron que los extractos de hexano, diclorometano, diclorometano:metanol (1:1), metanol y acuoso de la corteza de *C. procera* no presentan toxicidad aguda *in vivo*.

1.8.2 *Artemisia ludoviciana*

Artemisia ludoviciana subsp. mexicana (Willd. Ex Spreng.) D. D. Keck (Figura 9) es una hierba aromática, perenne, de 1 a 1.5 m de alto con una base rizomatosa un poco leñosa con muchos tallos. Las hojas son sésiles, de hasta 15 cm de largo y de 1 a 10 mm de ancho, indivisas y generalmente lanceoladas, con coloración verde oscuro en el haz y blanca en el envés, a veces agrupadas en la axila de la base. Florece entre septiembre y noviembre, las flores crecen en panículas de 20 a 50 cm de altura y son color paja. Su fruto es un aquenio color café claro en forma de clavo de ~1 mm de largo (Heike, 2009).

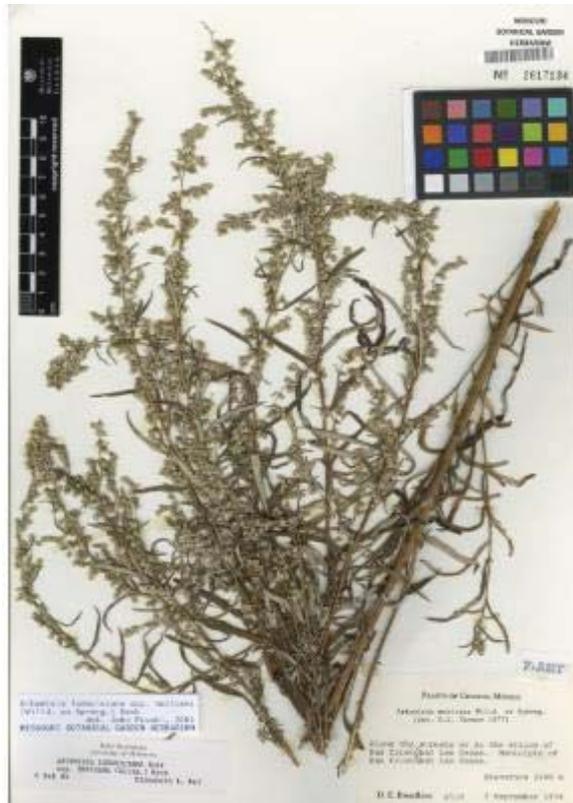


Figura 9. *Artemisia ludoviciana* (Tomada del Jardín botánico de Missouri (Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/2700146>)

Artemisia ludoviciana es una especie nativa de México, Estados Unidos y Guatemala, crece en ambientes ruderales, en claros de bosques y matorrales. Se distribuye ampliamente en todos los estados del país (Villaseñor, 2016). Esta planta es considerada una maleza, pero también es cultivada por sus propiedades medicinales (Heike, 2009).

Comúnmente se le conoce como estafiate, istafiate, ajenjo, ajenjo del país, incienso, incienso verde, altamiza, artemisia, azumate de Puebla, cola de zorrillo, encencio de mata verde, epazote de castilla, estomiate, hierba maestra y hierba maistra, *ambfe* [otomí] o *istafiatl* (Estado de México), *iztauhyatl* (Hidalgo, Puebla y Michoacán), *kamaistra* [popoloca] (Puebla), *osomiate* (Quintana Roo), *xun* (Veracruz), *tsakam ten huitz, ten ts'ojol* [tenek] (San Luis Potosí) y *ros'sabl'i* [rarámuri] (Chihuahua) (Argueta *et al.*, 1994).

La clasificación taxonómica de *A. ludoviciana* según el Jardín botánico de Missouri (Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/2700146>) es la siguiente:

Reino: Plantae
Phylum: Equisetophyta
Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Orden: Asterales
Familia: Asteraceae
Género: Artemisia
Especie: *Artemisia ludoviciana*

Usos tradicionales. Las partes aéreas se consumen crudas, en decocciones e infusiones o en combinación con otras plantas para el tratamiento de múltiples malestares estomacales como retortijones, dolor e inflamación, para tratar infecciones, como aperitivo, contra el vómito, para problemas menstruales (cólicos), disentería, diarrea, contra parásitos, como abortivo, etc. Se administra como supositorio para la falta de apetito, sustos, palidez o excremento verde. Se recomienda el uso cutáneo de extractos alcohólicos en caso de reumatismo, frialdad, dolor o inflamación. También se recomienda inhalar a la planta para tratar males respiratorios como anginas, bronquitis, catarro, resfrío, tos y tosferina. En México es frecuentemente aceptada y prescrita por profesionales de atención primaria de la salud para tratar enfermedades digestivas, hepáticas y biliares (Argueta *et al.*, 1994; Alonso-Castro *et al.*, 2017; Palacios-Espinosa *et al.*, 2021).

Estudios Fitoquímicos. Se han identificado y aislado más de 70 compuestos de *A. ludoviciana* (Mata *et al.*, 2019), entre ellos destacan la presencia de flavonoides: eupatilina, jaceosidina y 5-hidroxi-3',4',6,6-tetrametoxiflavona (Ruíz-Cancino *et al.*, 1993; Balderas, 2006); y lactonas sesquiterpénicas: estafiatina, ludovicina A y B, santonina, yomogina, α -epoxiludalbina, tulipinolida, douglanina, crisartemina B, artemorina, santamarina, aglanina, armefolina, ridentina y armexifolina (Lee y Geissman, 1970; Mata *et al.*, 1984; Ruíz-Cancino *et al.*, 1993; Balderas, 2006).

Actividad farmacológica: Utilizando las partes aéreas de la planta se han descrito actividades como antidiarreica (Zavala-Sánchez *et al.*, 2002) y vasorelajante sin efecto espasmolítico (Estrada-Soto *et al.*, 2012), así como acciones antinociceptivas,

antiinflamatorias y antihiperalgésicas (Anaya-Eugenio *et al.*, 2016; Rivero-Cruz *et al.*, 2017), además se ha demostrado su potencial como agente hipoglucemiante y antihiperglucemiante (Anaya-Eugenio *et al.*, 2014). Palacios-Espinosa *et al.* (2021) determinaron el potencial antiinflamatorio y la actividad gastroprotectora del extracto acuoso de *A. ludoviciana* y de cuatro fracciones primarias del mismo, por administración cutánea y oral en un modelo murino y mediante un modelo de úlcera aguda inducida con etanol absoluto en ratón, respectivamente.

Actividad antimicrobiana: Se ha reportado la actividad antibacteriana y antiprotozoaria de *A. ludoviciana* (Castillo-Juarez *et al.*, 2009; Alanís *et al.*, 2005; Calzada *et al.*, 2006). Castillo-Juárez *et al.* (2009) reportaron la actividad anti-*H. pylori* del extracto acuoso de las partes aéreas de *A. ludoviciana* (CMI=125 µg/mL).

Toxicidad: Se ha reportado que el aceite esencial, el extracto de diclorometano-metanol y el extracto acuoso de las partes aéreas de *A. ludoviciana* no tienen toxicidad aguda por el método de Lorke (DL₅₀> 5g/kg) (Anaya-Eugenio *et al.*, 2014; Palacios-Espinosa *et al.*, 2021).

2. Antecedentes directos

2.1 Ureasa

2.1.1 Generalidades

La ureasa de *H. pylori* es un factor de patogenicidad de alta importancia que incide en la colonización, virulencia y sobrevivencia de la bacteria. La función principal de la ureasa es catalizar la hidrólisis de la urea, los productos finales de la reacción son la formación de ácido carbónico (H₂CO₃) y amoníaco (NH₃) (Figura 10).

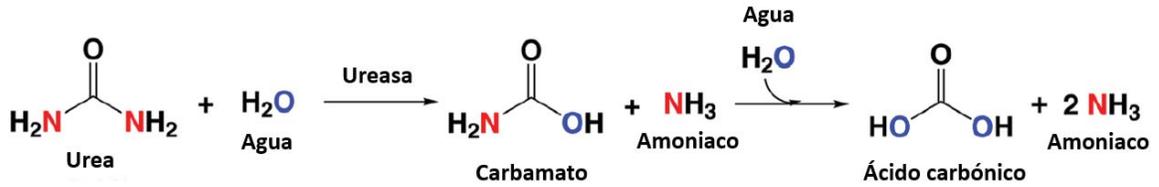


Figura 10. Hidrólisis de la urea por la ureasa (Modificado de Svane *et al.*, 2020).

La ureasa se sintetiza a partir de un clúster de 7 genes: los genes *ureA* y *ureB* codifican para las subunidades estructurales α y β , el gen *ureI* codifica para el canal de urea dependiente de pH UreI y los genes *ureE-ureH* codifican proteínas accesorias involucradas en el ensamblaje y captura de Ni^{2+} , que es el cofactor de la ureasa (Volland *et al.*, 2002).

Las subunidades α (61.7 kDa) y β (26.5 kDa) forman un complejo heterotrimérico $(\alpha\beta)_3$ (Figura 11A) y a su vez, cuatro de estos complejos se ensamblan formando la estructura cuaternaria de la ureasa, un dodecámero (Figura 11B) (Ha *et al.*, 2001).

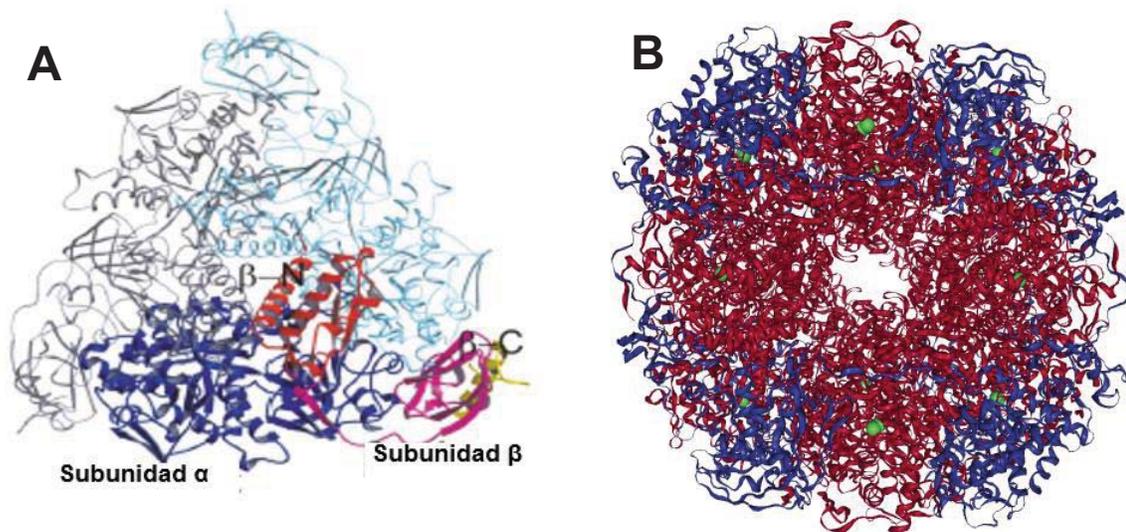


Figura 11. Estructura de la ureasa. A) Heterotrimero de la ureasa (Modificado de Ha *et al.*, 2001).

B) Dodecámero de la ureasa: subunidades α (rojo), subunidades β (azul) y Ni^{2+} (verde) (Protein Data Bank).

La ureasa de *H. pylori* presenta un dominio u hoja móvil (flap) que comprende los residuos $\alpha 313-$ $\alpha 346$ y que actúa como una puerta de entrada del sustrato para que llegue al sitio activo de la ureasa donde se localizan los iones Ni^{2+} unidos en un puente por un ion hidroxilo. La hoja móvil presenta al menos dos conformaciones observadas (Figura 12), la

conformación abierta permite el acceso del sustrato al sitio activo y una vez que el sustrato se ha unido al sitio activo la hoja se cierra abriéndose nuevamente cuando la hidrólisis de la urea ha terminado, liberando así los productos de la reacción (Xao *et al.*, 2012).

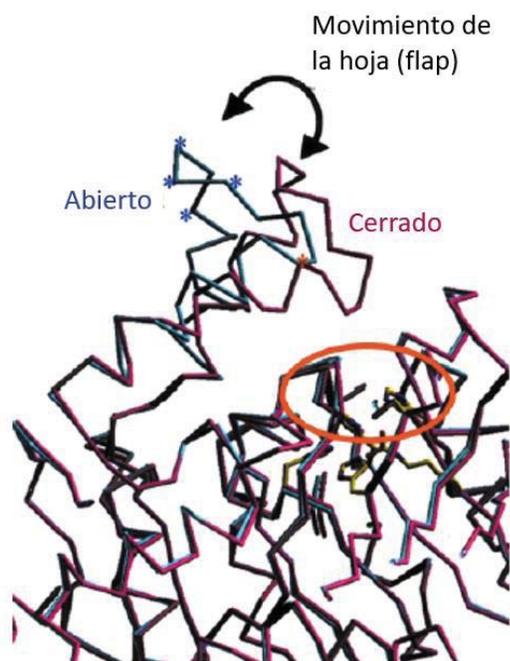


Figura 12. Sitio activo de la ureasa (círculo rojo) y hoja móvil o flap en superposición abierta (azul) y cerrada (magenta) (Modificado de Ha *et al.*, 2001).

El mecanismo propuesto de la hidrólisis de la urea por la ureasa es un tema controversial, en el primer mecanismo propuesto se asume que, en el sitio activo de la ureasa (Figura 13), el átomo de oxígeno de la urea se une a uno de los 2 iones níquel de la ureasa, al $\text{Ni}^{2+}(1)$ que es más electrofílico, esta unión es a través del residuo His-221 provocando que el grupo carbonilo de la urea se vuelva más electrofílico y por lo tanto sea susceptible a un ataque nucleofílico. Después, la urea reemplaza a las moléculas de agua del sitio activo de la ureasa (W1-W3) y se une al segundo ion de $\text{Ni}^{2+}(2)$ a través del nitrógeno de uno de sus grupos amino por medio de un enlace bidentado y facilitando el ataque nucleofílico del agua al grupo carbonilo de la urea, formando así un intermediario tetraédrico a partir del cual se liberan el NH_3 y el carbamato (Krajewska, 2009). El segundo mecanismo propone que el ataque nucleofílico ocurre por una molécula que actúa como un ácido general y proporciona protones a las moléculas de NH_3 liberadas, se sugiere que la acción de “ácido

general” puede llevarse a cabo por el hidróxido “puente” (WB) o por el residuo His-320 que se ubica en la hoja móvil del sitio activo (Krajewska, 2009). Otra idea sobre el mecanismo de la hidrólisis de la urea propone el enlace monodentado de la urea al $Ni^{2+}(1)$ mientras el $Ni^{2+}(2)$ libera la molécula de agua responsable del ataque nucleofílico al carbonilo de la urea (Krajewska, 2009).

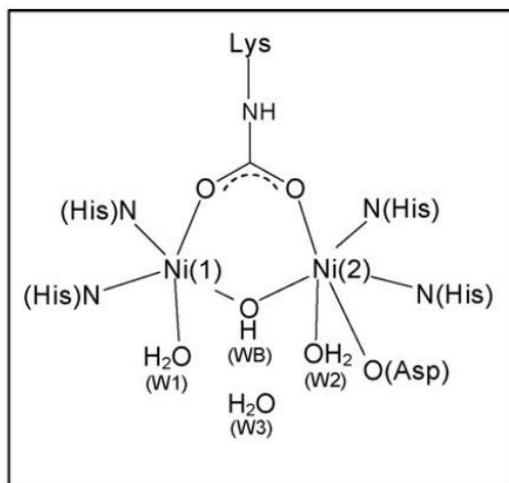


Figura 13. Sitio activo de la ureasa nativa (Krajewska, 2009).

La ureasa es muy abundante, representa del 10-15% de las proteínas sintetizadas por la bacteria (Ha *et al.*, 2001), el pH óptimo de la ureasa de *H. pylori* es de 8, tiene un punto isoeléctrico de 5.9 y presenta la mayor afinidad por su sustrato [$K_m=0.2-0.8$ mM] en comparación con otras ureasas microbianas lo que le permite un buen aprovechamiento de la urea disponible en el estómago (1.7-3.4 mM) (Krajewska, 2009; Dunn *et al.*, 1990; Ha *et al.*, 2001).

La ureasa se localiza en el citosol de *H. pylori*, cuando el pH del medio externo es neutro la ureasa se distribuye concéntricamente en el citoplasma de la bacteria, sin embargo, cuando el pH externo es ácido la enzima se redistribuye hacia la periferia del citosol cerca del canal UreI en la membrana interna de *H. pylori*. Esta redistribución de la ureasa está relacionada con su actividad hidrolítica que permite que el periplasma y el medio alrededor de la superficie de la bacteria se neutralicen por la formación de NH_3 y CO_2 (Hong *et al.*, 2003). En este mecanismo de aclimatación ácida de *H. pylori* están involucradas dos proteínas además de la ureasa, la primera es el canal Ure I, este canal permanece cerrado cuando el

pH externo es neutro y se abre en pH ácido regulando el paso de la urea hacia el citoplasma, dónde se encuentra la ureasa; la segunda proteína involucrada es la anhidrasa carbónica (α -CA) cuya reacción genera H^+ y HCO_3^- a partir de CO_2 en presencia de H_2O , que amortigua el ácido ayudando al mantenimiento del pH periplásmico (Sachs, 2005) (Figura 14).

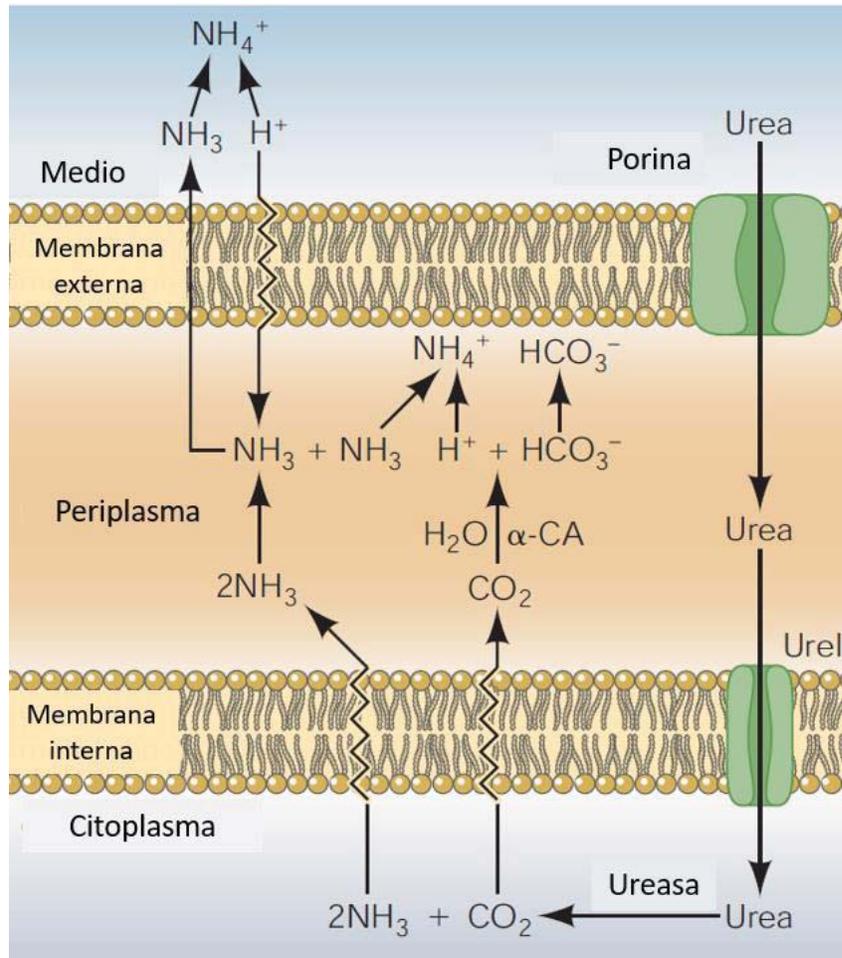


Figura 14. Modelo de la aclimatación ácida de *H. pylori* (Modificado de Sachs, 2005)

La ureasa también se ha encontrado adherida en la superficie externa de *H. pylori* en bajas cantidades y se ha detectado su presencia en el sobrenadante de un cultivo líquido de *H. pylori*, lo que indica la presencia de la ureasa fuera de la bacteria (Ha *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2003; Ruíz, 2020). La explicación más factible acerca de estas localizaciones de la ureasa es que proviene de las proteínas liberadas por bacterias lisadas (Ha *et al.*, 2001).

2.1.2 La ureasa como factor de patogenicidad

La ureasa de *H. pylori* es esencial para la colonización del estómago, las cepas mutantes sin el gen *ureA* o con baja actividad de esta enzima no logran colonizar el epitelio gástrico y tampoco inducen alguna enfermedad según experimentos realizados en animales de laboratorio (Wirth *et al.*, 1988; Eaton *et al.*, 1991; Schoep *et al.*, 2010).

El mecanismo de aclimatación ácida de *H. pylori* es único entre todos los microorganismos neutrófilos, por la acción de la ureasa, que es la principal responsable de este mecanismo, *H. pylori* mantiene el pH citoplásmico y periplásmico y el potencial de membrana en niveles compatibles para sobrevivir y crecer en el ambiente ácido estomacal (Sachs *et al.*, 2005).

La reología de la capa de moco que recubre la mucosa gástrica es dependiente del pH, en pH ácido el moco se presenta como una capa de gel mientras que en pH neutro es una solución viscosa que facilita el movimiento de la bacteria. El incremento del pH alrededor de *H. pylori*, consecuencia de la actividad de la ureasa, altera la viscoelasticidad de las mucinas adyacentes que conforman el moco gástrico, alterando su reología y promoviendo una colonización exitosa al facilitar el movimiento de la bacteria (Celli *et al.*, 2009).

La actividad de la ureasa también es importante en el metabolismo del nitrógeno de *H. pylori*, se ha demostrado que el nitrógeno ureico disponible en el amonio resultante de la hidrólisis de la urea puede ser utilizado para la síntesis de aminoácidos como glutamato, glutamina, fenilalanina, aspartato y alanina (De Reuse y Skouloubris, 2001).

Como factor de virulencia se ha demostrado que la ureasa activa a los monocitos estimulando la expresión de citocinas proinflamatorias (Harris *et al.*, 1996), induce la agregación plaquetaria (Wassermann *et al.*, 2010), estimula la producción de óxido nítrico a partir de macrófagos, contribuyendo a la lesión tisular (Gobert *et al.*, 2002) e induce la quimotaxis de neutrófilos y la producción de especies reactivas de oxígeno a partir de ellos (Uberti *et al.*, 2013).

La ureasa también es responsable de la pérdida de las uniones intercelulares del epitelio gástrico mediante un proceso asociado a la fosforilación de la cadherina-VE y a la

dispersión de la membrana celular, lo que en consecuencia desestabiliza la unión epitelial e incrementa la permeabilidad paracelular (De Jesús *et al.*, 2019).

Mégraud *et al.* (1992) reportaron los efectos citotóxicos de la formación de amoníaco por acción de la ureasa, demostrando que las cepas mutantes de *H. pylori* que no poseen esta enzima no alteran la viabilidad celular en células HEP2 infectadas con la bacteria en un medio rico en urea (10 mM). Es importante señalar que el amoníaco, producto de la hidrólisis de la urea, es un agente tóxico por sí mismo y está involucrado en la alteración de la síntesis de ácidos nucleicos, en el incremento de la masa celular de la mucosa intestinal y en el riesgo de infecciones virales. Los efectos tóxicos del amoníaco también incluyen la disminución del potencial eléctrico transepitelial, el decremento del flujo sanguíneo en la mucosa gástrica, la disminución en el consumo de oxígeno de las células y el aumento de la infiltración de células inflamatorias en la mucosa (Mégraud *et al.*, 1992).

En relación con los efectos tóxicos de la ureasa, Suzuki *et al.* (1997) reportaron efectos genotóxicos en células Kato III por acción de la monocloramina (NH_2Cl). En condiciones fisiológicas, NH_2Cl es un producto derivado de la interacción de la ureasa con los leucocitos que se infiltran en la mucosa gástrica durante la infección por *H. pylori*. Los resultados de este estudio sugieren que la ureasa está involucrada en la carcinogénesis de la mucosa gástrica asociada con la infección de la bacteria.

Olivera-Severo *et al.* (2017) reportaron el potencial de la ureasa de *H. pylori* para promover la angiogénesis en modelos *in vitro* e *in vivo*, tomando en cuenta que la angiogénesis es esencial para el crecimiento de tumores, para la invasión y diseminación metastásica y que es necesaria para proveer de nutrientes y oxígeno a las células, los autores concluyeron que la ureasa podría estar involucrada en la progresión del cáncer gástrico.

Por los antecedentes señalados anteriormente es claro que la ureasa de *H. pylori* representa un blanco terapéutico importante para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan prevenir y tratar las enfermedades producidas por la infección de la bacteria. Para lograr lo anterior y considerando que los productos naturales son buenos candidatos como alternativas o coadyuvantes en las terapias de erradicación, es necesario continuar,

particularmente, con el estudio de aquellos con actividad anti-*H. pylori* como CpMet y eupatilina y estafiatina.

2.2 Extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* (CpMet)

El extracto metanólico es el más estudiado de la especie *C. procera* y del que se conocen varias de sus propiedades relacionadas con el tracto digestivo, algunos de los estudios se presentan a continuación:

Estudios microbiológicos: Canales *et al.* (2005) demostraron la actividad antibacterial del extracto metanólico de la corteza de *C. procera* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Basillus subtilis*, *Vibrio cholerae* y *Shigella boydii*. Escobedo-Hinojosa *et al.* (2012) reportaron una buena actividad anti-*H. pylori in vitro* (CMI= 62.5 µg/mL) por el método de dilución en cultivo líquido.

Estudios farmacológicos: Rosas-Acevedo *et al.* (2011) reportaron una actividad antiulcerogénica de los extractos metanólicos de la corteza normal (DE₅₀ de 45.54 mg/kg) y regenerada (DE₅₀ 36.68 mg/kg) de *C. procera* en un modelo de ulceración aguda en rata.

Un año más tarde, Escobedo-Hinojosa *et al.* (2012) determinaron su actividad gastroprotectora en ratón (DE₅₀= 0.53 mg/kg), el análisis histopatológico mostró que la integridad de la mucosa gástrica se preserva casi por completo cuando se trata con CpMet. En el mismo trabajo, CpMet no presentó actividad anti-edematogénica en un modelo de edema inducido por 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato en oreja de ratón (DE₅₀>1 g/mL).

En 2018, Escobedo-Hinojosa *et al.* demostraron la actividad resolutoria de úlcera (62.65%) administrando CpMet (300 mg/kg dos veces al día, 20 días) en un modelo de ulceración inducido por etanol en ratones.

Rodríguez-Canales *et al.* (2020) reportaron la actividad antioxidante (CA₅₀ = 34.44 µg/mL) del extracto metanólico de *C. procera in vitro* utilizando el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo. También reportaron los efectos benéficos del mismo extracto sobre la colitis ulcerativa inducida por dextran sulfato de sodio en ratones, atribuyendo estos efectos a su actividad antiinflamatoria y antioxidante.

Toxicología: Al igual que Escobedo-Hinojosa *et al.* (2012), Rodríguez-Canales *et al.* (2020) confirmaron que CpMet no muestra toxicidad aguda de acuerdo con lo establecido por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos ($DL_{50} > 2000$ mg/kg).

En 2018 Escobedo-Hinojosa *et al.* descartaron la toxicidad sub-aguda de CpMet, en un modelo murino administrando dosis de hasta 1000 mg/kg diariamente durante 20 días, en este estudio los animales no presentaron alteraciones secundarias a la aplicación prolongada del extracto.

Los antecedentes anteriores demuestran el potencial del extracto CpMet como un producto natural cuyo estudio es importante para el desarrollo de nuevas estrategias de control, prevención y tratamiento de las infecciones con *H. pylori*.

2.3 Eupatilina

La eupatilina ($C_{18}H_{16}O_7$) es una flavona (Figura 15) que se encuentra (aunque no exclusivamente) en plantas del género *Artemisia*. Varios estudios han reportado propiedades farmacológicas como anticancerígeno, antioxidante, antiinflamatorio, gastroprotector, antialérgico, neuroprotector y cardioprotector (Choi *et al.*, 2009; Palacios-Espinosa *et al.*, 2021)

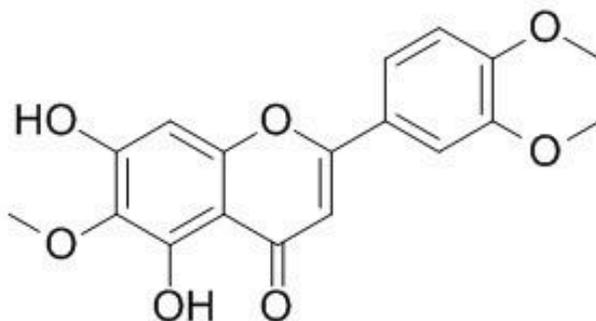


Figura 15. Estructura química de la eupatilina.

En Corea de Sur la eupatilina es uno de los ingredientes activos del medicamento Stillen®, el cual es usado en el tratamiento de úlceras gástricas y actualmente se propone su uso para tratar cáncer gástrico debido a sus propiedades apoptóticas (Choi *et al.*, 2009). En México, sin embargo, no se ha establecido el uso de eupatilina en ningún esquema terapéutico para el tratamiento de enfermedades gástricas. Además, tampoco se había evaluado el efecto de la eupatilina sobre el principal agente causal de la gastritis, úlcera péptica y cáncer gástrico, la bacteria *H. pylori*.

Palacios-Espinosa *et al.* (2021) aislaron a la eupatilina a partir de un fraccionamiento biodirigido de la infusión de las partes aéreas de *A. ludoviciana*. En este trabajo reportaron la actividad bacteriostática y bactericida (CMI y CMB de 31.2 µg/mL) del compuesto contra *H. pylori*, demostrando así su potencial para la erradicación de la bacteria.

2.4 Estafiatina

La estafiatina (C₁₅H₁₈O₁₃) es una lactona sesquiterpénica (Figura 16) presente en especies de la familia Asteraceae. Actualmente pocos estudios se han realizado sobre la actividad de la estafiatina, entre ellos se reportan efectos antihipertensivos y propiedades inmunoterapéuticas (Palacios-Espinosa *et al.*, 2021).

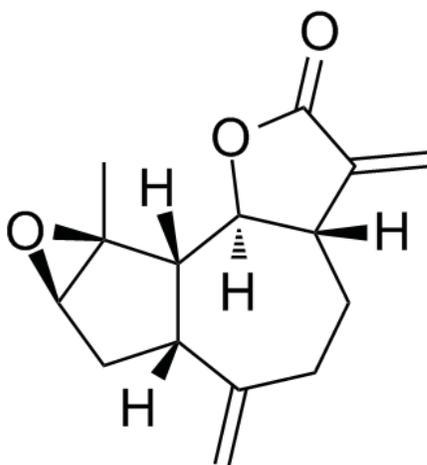


Figura 16. Estructura química de la estafiatina.

Schepetkin *et al.* (2018) reportaron que la estafiatina participa en la inhibición de procesos inflamatorios en células Jurkat. Además, reportaron que la estafiatina no presentó efectos citotóxicos en linfocitos aislados de sangre humana ni en las células Jurkat después de 30 min a concentraciones $<50 \mu\text{M}$ ($<12.3 \mu\text{g/mL}$).

Palacios-Espinosa *et al.* (2021) aislaron e identificaron a la estafiatina a partir del extracto acuoso de *A. ludoviciana* y reportaron su efectividad contra *H. pylori* con valores de CMI y CMB = $15.62 \mu\text{g/mL}$.

Tomando en cuenta los antecedentes que se acaban de mencionar se decidió investigar el posible mecanismo de acción de CpMet, de la eupatilina y de la estafiatina sobre *H. pylori* probando su efecto sobre la ureasa, que es un factor de patogenicidad importante para la bacteria.

3. Justificación del trabajo

Helicobacter pylori es un patógeno antibiótico-resistente de prioridad alta para el cual es necesaria la búsqueda de alternativas a los tratamientos actuales (Tacconelli *et al.*, 2018).

La ureasa de *H. pylori* es un factor de patogenicidad crucial para la bacteria y representa un blanco importante para el desarrollo de estrategias terapéuticas que ayuden a incidir en la patogenicidad de la bacteria

El extracto metanólico de la corteza de *Cyrtocarpa procera* (CpMet) y los compuestos eupatilina y estafiatina de *Artemisia ludoviciana* presentan actividad anti-*H. pylori* y otras propiedades gastroprotectoras y antiinflamatorias (Cortés, 2012; Borja, 2013; Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2012), por lo que es necesario continuar con su estudio para investigar sus mecanismos de acción.

4. Hipótesis

Debido a su actividad anti-*Helicobacter pylori*, el extracto CpMet, así como los compuestos eupatilina y estafiatina tendrán efecto inhibitorio sobre la actividad de la ureasa de la bacteria.

5. Objetivo general

Determinar el efecto de CpMet, eupatilina y estafiatina sobre la actividad de la ureasa de *Helicobacter pylori in vitro* para establecer si esta enzima es su blanco de acción, utilizando el método colorimétrico de Berthelot.

5.1 Objetivos particulares

- a. Establecer el cultivo de *Helicobacter pylori*.
- b. Identificar a *Helicobacter pylori* mediante pruebas bioquímicas y por tinción diferencial de Gram.
- c. Obtener una preparación enriquecida de la ureasa a partir de un cultivo de *Helicobacter pylori*.
- d. Evaluar individualmente el efecto *in vitro* de CpMet, eupatilina y estafiatina sobre la actividad de la ureasa mediante el método colorimétrico de Berthelot.

6. Materiales y métodos

6.1 Compuestos y extracto

El extracto y los compuestos utilizados en esta Tesis fueron obtenidos en el Laboratorio 2 del Depto. de Bioquímica de la Fac. de Medicina, UNAM previamente a la realización de este trabajo. A continuación, se describirá brevemente la manera en que fueron obtenidos.

6.1.1 CpMet

La corteza de *C. procera* se colectó en marzo del 2010 en la localidad Higuierón, Jojutla, Morelos (18°37'12.5''N, 99°10'33.7''O), la identificación de la corteza fue realizada por la

Mtra. Rosa María Fonseca de la Fac. de Ciencias (UNAM) y dos especímenes (con números de *voucher* 125630 y 125636) fueron depositados en el Herbario de la Fac. de Ciencias de la UNAM.

El extracto metanólico (CpMet) se obtuvo a partir de una maceración exhaustiva con metanol (1:10 p/v) de la corteza seca y molida. El macerado fue filtrado para quitar los residuos vegetales. El disolvente se eliminó por evaporación a presión reducida y se obtuvo un rendimiento del 28.7% en peso seco. El extracto se almacenó en oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso (Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2012).

6.1.2 Eupatilina y estafiatina

Las partes aéreas frescas de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* (Wild. Ex Spreng.) D.D. Keck se obtuvieron en el Mercado de Sonora, Alcaldía Venustiano Carranza, CDMX. La identificación de la planta fue realizada por la Mtra. Edelmira Linares y el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología (IB) de la UNAM. Se resguardó un ejemplar de referencia en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU) del Jardín Botánico (IB) de la UNAM, No. de registro 1259898.

Los compuestos se obtuvieron a partir de una infusión (ALI) de las partes aéreas de la planta seca y molida.

Se realizaron particiones líquido-líquido de ALI utilizando diferentes solventes y se obtuvieron 4 fracciones: ALI-1 (diclorometano), ALI-2 (acetato de etilo), ALI-3 (*n*-butanol) y ALI-4 (residuo). A partir del fraccionamiento biodirigido de ALI-1 y de ALI-2 se obtuvieron la estafiatina y la eupatilina, respectivamente (Palacios-Espinosa *et al.*, 2021).

Dado que la eupatilina puede conseguirse comercialmente, para los experimentos realizados en la presente tesis se utilizó una eupatilina con $\geq 98\%$ de pureza, marca Cayman Chemical.

6.2 Cultivo de *H. pylori*

Se utilizó la cepa ATCC 43504 de *H. pylori*. La bacteria se cultivó en placas de Agar-Casman suplementada con 5% de sangre desfibrinada de carnero, vancomicina (10 mg/l), anfotericina (2 mg/l), polimixina (2.5 mg/l) y trimetoprima (5 mg/l). Se incubaron a 37°C en condiciones microaerófilas (10% CO₂, 5% O₂) en una incubadora Nuair TS autoflow. A las 24 h se colectaron en medio de cosecha que contiene caldo Brucella (DIFCO) adicionado con 10% de glicerol, 10% de suero fetal bovino (SFB) Gibco BRL y vancomicina (10 mg/l) e inmediatamente fueron almacenadas a -70°C en viales con peso conocido hasta su uso. A cada lote de bacterias que se generó de esta manera se le realizaron las pruebas de identificación.

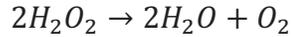
Cultivo líquido de *H. pylori* para la obtención de la ureasa. Se descongeló un vial de bacterias a temperatura ambiente. Las bacterias se resuspendieron evitando la formación de burbujas hasta que se observó una mezcla homogénea y se sembraron en medio Mueller-Hinton Broth adicionado con β-ciclodextrina (2 g/l), vancomicina (10 mg/l), trimetoprima (5 mg/l), anfotericina (2 mg/l) y polimixina (2.5 mg/l). El cultivo de *H. pylori* se incubó a 37°C en condiciones microaerófilas y agitación constante (150 rpm) durante 20 h hasta que llegó a una Absorbancia_{600nm} 0.6-0.8 que corresponde a la fase logarítmica de crecimiento e inmediatamente fue utilizado para la preparación de la ureasa (Uribe, 2017).

6.3 Identificación de *H. pylori*

Se realizó a través de las pruebas bioquímicas que la identifican (catalasa, ureasa y oxidasa positivas), tinción de Gram (negativa) y por su morfología al microscopio óptico (bacilos espirales y curvados).

6.3.1 Prueba de la catalasa

Fundamento: La catalasa es una proteína citosólica y periplásmica de *H. pylori* que actúa en respuesta al estrés oxidativo, su principal función es proteger a la bacteria de los efectos dañinos del peróxido de hidrógeno (H₂O₂), esta enzima es la responsable de la dismutación del H₂O₂ en H₂O y O₂ de acuerdo con la siguiente reacción (Baj *et al.*, 2020).



Procedimiento: Para realizar la prueba, en un portaobjetos se colocaron 15 µl de peróxido de hidrógeno (Agua oxigenada comercial marca RAB) y sobre de ella una pequeña asada o una gota (10 µl aprox.) del cultivo de *H. pylori*. La prueba se considera positiva si se observa efervescencia inmediata en la muestra, resultado de la liberación de oxígeno por la acción de la catalasa de la bacteria.

6.3.2 Prueba de la ureasa con Rojo de Fenol

Fundamento: Esta prueba determina la capacidad de un organismo de hidrolizar la urea [(NH₂)₂CO] formando una molécula de dióxido de carbono (CO₂) y dos moléculas de amoníaco (NH₃) por acción de la enzima ureasa. La ureasa es una proteína citosólica de *H. pylori*, esta enzima le permite mantener su potencial de membrana y es responsable de la aclimatación ácida al neutralizar el medio alrededor de la bacteria, lo que le permite sobrevivir en medios ácidos (Sachs, 2005).

En esta prueba se utiliza el indicador de pH rojo de fenol cuya coloración varía dependiendo la acidez del medio. En un pH por debajo de 6.8 es de color amarillo y de color rojo-rosa por encima de 8.4. Por acción de la ureasa el medio se vuelve alcalino por la liberación de amonio, por lo tanto, la prueba se considera positiva si se observa una coloración roja-rosa (Mobley *et al.*, 1995).

Procedimiento: Para realizar la prueba, en un portaobjetos se colocó una gota de solución de urea 6 M (pH 7.0) con rojo de fenol 0.05% a la cual se le añade una muestra de cultivo de *H. pylori*. La prueba se considera positiva si se observa un viraje, inmediato o hasta los 15 s, de la solución a una coloración roja-rosa, poniéndose de manifiesto la actividad ureasa.

6.3.3 Prueba de la oxidasa

Fundamento: la prueba de la oxidasa es un método colorimétrico para detectar la actividad de las oxidasas de *H. pylori* utilizando dihidrocloruro de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMDF), este mediador redox actúa como donador de electrones para la oxidasa, es incoloro en su estado reducido y de color morado oscuro en su estado oxidado.

Las oxidasas son enzimas reducen O₂ en agua (H₂O) y son importantes para la respiración celular de la bacteria (Fisher Scientific, 2022).

Procedimiento: Para realizar la prueba se colocó una pequeña cantidad de bacterias sobre una placa de TMDF (Dry Slide Oxidase, DIFCO). La prueba se considera positiva si se observa inmediatamente una coloración morada en la zona donde se aplicó la muestra, resultado de la oxidación del TMDF por acción de las oxidasas de *H. pylori*.

6.3.4 Tinción de Gram

Fundamento o Principio: La tinción diferencial de Gram es un método de identificación en el cual las bacterias se dividen en grampositivas y gramnegativas según la composición estructural de su pared celular. En la tinción de Gram se utilizan dos colorantes básicos: cristal violeta y safranina, el primero tiñe de color morado a las bacterias grampositivas y el segundo en color rosa a las gramnegativas (Smith y Hussey, 2005).

Procedimiento: Para la tinción de Gram se preparó un frotis con una muestra del cultivo de *H. pylori*, las bacterias se tiñeron con cristal violeta, el cual penetra a través de la pared celular y se une a los grupos cargados negativamente de las células y las tiñe de color violeta; después se añadió Lugol, que forma un complejo con el cristal violeta actuando como mordiente. Posteriormente, se colocó una mezcla de alcohol-acetona como agente decolorante que degrada la envoltura lipídica y la delgada pared de peptidoglicano de las bacterias gramnegativas y lava el complejo violeta-lugol de las células. Finalmente, se añadió safranina que es el segundo colorante utilizado en la técnica para teñir de color rosa-rojo a las bacterias gramnegativas que habían sido decoloradas (Smith y Hussey, 2005). La coloración de *H. pylori* después de la tinción diferencial de Gram se observó al microscopio óptico de campo claro a una resolución de 100x con aceite de inmersión.

6.4 Obtención de una fracción enriquecida de la ureasa de *H. pylori*

Para obtener a la enzima, se partió de un cultivo fresco de *H. pylori* crecido en medio líquido Mueller-Hinton en la fase logarítmica de crecimiento (en las condiciones que se especificaron en la sección 6.2) Para obtener a las bacterias, el cultivo se centrifugó a 5,000

rpm durante 4 min a temperatura ambiente y el precipitado se lavó dos veces con Buffer Salino de Fosfatos (PBS), pH 7.4 por centrifugación a 5,000 rpm durante 4 min a temperatura ambiente. Las bacterias se suspendieron en 4 mL de PBS y 100 µl de Coctel de inhibidores de proteasas (Roche®) a 4°C sin hacer burbujas hasta conseguir una mezcla homogénea y se rompieron en un Sonicador Branson 250, a 40 W, en tres intervalos de 30 seg (con un tiempo de descanso de 30 seg entre cada uno de ellos). El lisado se centrifugó a 13,500 rpm por 10 min a 4°C y el sobrenadante se usó como la fracción enriquecida de ureasa. La enzima se almacenó en alícuotas a 4°C hasta su uso (Uribe, 2017).

6.5 Determinación de la concentración de proteína

La determinación de la concentración de proteína de la fracción de la ureasa se realizó según el método de Bradford (Bradford, 1976), el cual se basa en la formación de un complejo entre la forma más aniónica del azul brillante de Coomassie G-250 y los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas. La concentración de proteína se evaluó midiendo la $A_{595\text{ nm}}$ de las muestras usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Para cada fracción enriquecida de la ureasa, se determinó la proteína por triplicado.

6.6 Determinación de la actividad específica de la ureasa

La actividad específica de la ureasa se determinó por medio de un método espectrofotométrico, el cual consiste en la cuantificación del amonio (NH_4^+) liberado por la hidrólisis de la urea mediante la reacción de Berthelot con algunas modificaciones (Weatherburn, 1967). En presencia de NH_4^+ e hipoclorito de sodio (NaClO) en medio básico se produce la oxidación del fenol, formando indofenol que es un compuesto de color azul intenso. Debido a lo anterior, según la concentración de NH_4^+ en el medio se observa una coloración que varía desde un verde pálido en medios con poca concentración de NH_4^+ hasta un azul intenso en medios con una concentración mayor.

Para llevar a cabo la cuantificación se utilizó una curva patrón de NH_4^+ a concentraciones finales de 0, 2.5, 5, 7.5, 10 y 15 µg/mL utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El medio de reacción estándar contiene 20 μl urea (5 mM), 100 μl de ureasa (1-3 μg) y PBS pH 7.4 suficiente para un volumen final de 150 μl y se incubó durante el tiempo correspondiente a 37°C. Finalmente, para terminar la reacción enzimática e iniciar la reacción colorimétrica se añadieron 50 μl de la solución A (Fenol 354 mM) y 100 μl de solución B (NaOH 345 mM/ NaClO 176 mM), después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente se leyó la $A_{600\text{ nm}}$ (Weatherburn, 1967). Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado, la cantidad de ureasa y el tiempo de incubación se especifican en cada experimento.

6.7 Determinación del efecto de CpMet, eupatilina y estafiatina sobre la actividad de la ureasa

Las pruebas de inhibición de la actividad de la ureasa se realizaron en placas de 96 pozos. En los ensayos para determinar el efecto de CpMet, el medio de reacción contenía, 10 μl DMSO para el control del 100% de la actividad o 10 μl de la solución de CpMet. En las pruebas con los compuestos, se agregaron 5 μl de DMSO o 5 μl de eupatilina o estafiatina. A continuación, se añadió, en todos los casos, 3 μg de proteína de ureasa en un volumen final de 150 μl en PBS 1x. Se preincubó por 5 min para permitir la interacción de las muestras con la ureasa. La reacción se inició añadiendo el sustrato urea (5 mM, concentración final) y se incubó 10 min a 37°C. Para terminar la reacción enzimática e iniciar la reacción colorimétrica se añadieron 50 μl de la solución A y 100 μl de solución B y se leyó la $A_{600\text{ nm}}$ después de 5 min (Weatherburn, 1967).

Se usó DMSO para disolver al extracto y a los compuestos, también para preparar las diluciones a usar en el experimento. Las concentraciones finales para el extracto fueron de 15.62, 31.25, 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g/mL}$, y para los compuestos fueron de 3.9, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5 y 125 $\mu\text{g/mL}$. El porcentaje de inhibición se calculó con respecto a la actividad sin inhibidor. En total se realizaron 9 bioensayos con CpMet, 7 con eupatilina y 3 con estafiatina, cada uno de ellos por cuadruplicado. Como control positivo se utilizó ácido acetohidroxámico (AHA) a las concentraciones finales de 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$.

6.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos para la determinación de la actividad de la ureasa y para las pruebas de inhibición se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis considerando $P < 0.05$ como estadístico significativo. Para determinar los grupos con diferencias significativas se utilizó la prueba *post hoc* de Nemenyi. Ambas pruebas se realizaron en Microsoft Excel 365 con el complemento Real Statistics.

Para el cálculo de las IC_{50} primero se graficó el \log_{10} de la concentración de AHA y CpMet contra su porcentaje de inhibición de la ureasa correspondiente, al linealizar se obtuvo la ecuación de la recta que permitió calcular la IC_{50} de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\log IC_{50} = X = \frac{50 + b}{m}$$

$$IC_{50} = 10^X$$

Donde m es la pendiente y b es la intersección con el eje y. Los cálculos y las gráficas que se presentan en esta Tesis se realizaron en Microsoft Excel 365.

7. Resultados y Discusión

7.1 Identificación de *H. pylori*

Es muy importante en cualquier laboratorio de investigación el corroborar rutinariamente que se está trabajando con la bacteria deseada. En este caso, la identificación se llevó a cabo a través de pruebas bioquímicas, mediante la tinción de Gram y finalmente por la observación de la morfología característica de las bacterias al microscopio óptico.

En la Figura 17 se muestran las pruebas bioquímicas de identificación de *H. pylori* realizadas a partir de cultivos frescos de la bacteria. Como ya se mencionó *H. pylori* es catalasa, ureasa y oxidasa positiva.

La catalasa es una enzima antioxidante que dismuta al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2). La catalasa de *H. pylori* libera O_2 que se observó como una efervescencia (Figura 17A).

La ureasa hidroliza a la urea, liberando amoníaco (NH_3) y dióxido de carbono (CO_2). La prueba se consideró positiva al observar un color rosa que indicó la alcalinización del medio por la formación de amonio (NH_4^+) (Figura 17B).

La citocromo C oxidasa es la última enzima de la cadena de transporte de electrones, esta enzima recibe electrones del citocromo C y los transfiere a una molécula de oxígeno (O_2), reduciéndola a dos moléculas de agua (H_2O). De acuerdo con el fundamento de la técnica de identificación empleada, esta se consideró positiva al observar una coloración morada en el sitio dónde se colocó la muestra del cultivo de *H. pylori* en la placa de TMDF (Figura 17C).

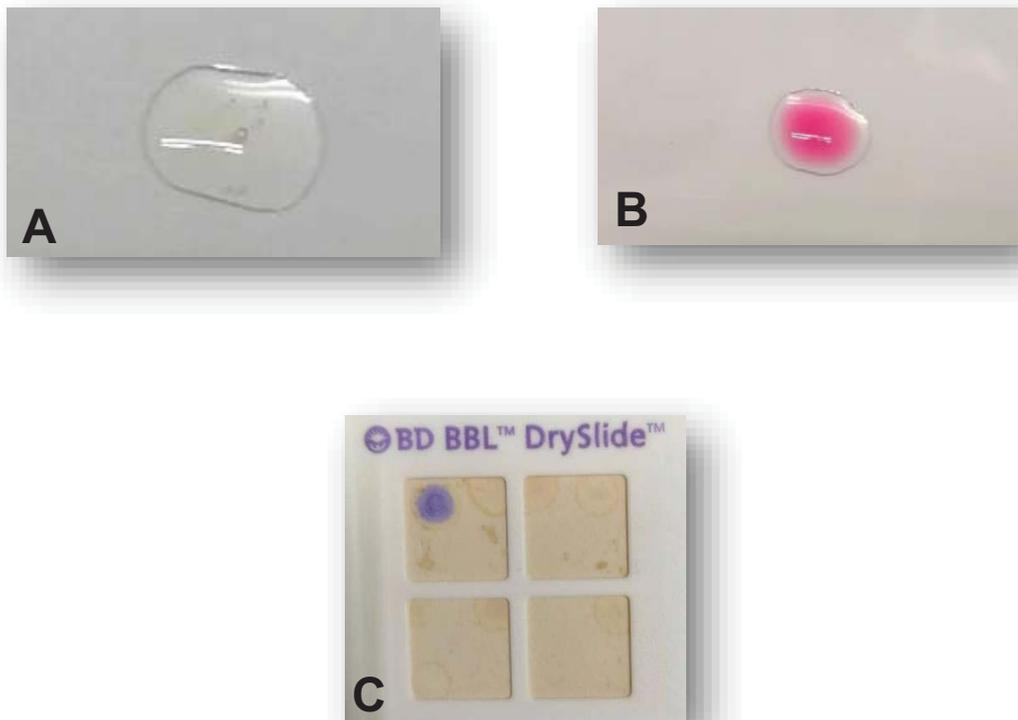


Figura 17. A, prueba de catalasa positiva. B, prueba de ureasa positiva. C, prueba de oxidasa positiva.

Después de las pruebas bioquímicas de identificación de *H. pylori* se realizó la tinción diferencial de Gram, la coloración rosa-rojo de las bacterias que se observan en la Figura 18 comprueba que *H. pylori* es una bacteria gramnegativa, en esta figura se pueden apreciar además las formas bacilares y curvadas en forma de “V” y “U” clásicas de un cultivo fresco de *H. pylori*.

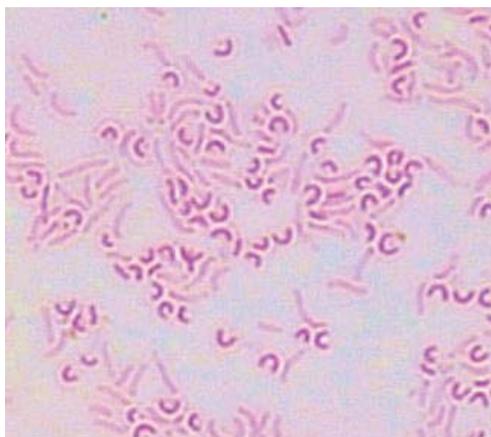


Figura 18. Tinción Gram de *H. pylori*. La coloración rosa-rojo dada por la safranina indica que la bacteria es gramnegativa. Se observan la morfología bacilar y curva en forma de “V” y “U” de la bacteria. Microscopio óptico de campo claro 100x.

7.2 Determinación de la concentración de proteína y de la actividad específica de la ureasa

La determinación de la concentración de proteína se realizó siempre al obtenerse la muestra enriquecida de la ureasa de *H. pylori* (sección 6.4). En el **ANEXO 1** se presenta una de las curvas patrón de BSA realizadas como parte de este trabajo. Esta curva es crítica para la cuantificación y demuestra la proporcionalidad que existe entre los valores de absorbancia de la muestra y su concentración.

Por otra parte, la actividad específica de la ureasa se determinó por la cuantificación de amonio utilizando el ensayo colorimétrico de Berthelot. La validación de la linealidad de la metodología se realizó con una curva patrón de amonio (sección 6.6) que se muestra en el

ANEXO 2 y que nos permitió definir el intervalo de trabajo tanto de absorbancia como de concentración.

Estandarizar la actividad de la ureasa es esencial para la reproducibilidad de los experimentos, por ello, con el objetivo de determinar la cantidad de ureasa y el tiempo de incubación óptimos para realizar los experimentos posteriores de inhibición de la enzima se variaron estos parámetros manteniendo la temperatura a 37°C (que es la óptima para la enzima) y se calculó la Actividad Específica de la Ureasa (AEU). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Pruebas de Actividad Específica de la Ureasa

Tratamiento	A	B	C	D	E
Ureasa (µg)	1		2	3	4
Tiempo de incubación (min)					
	17	20	20	10	10
Actividad Específica (AE) (U/µg)	20.5 ± 4.5*	10.54 ± 2	17.6 ± 2.6*	23.2 ± 7*	19.7 ± 2.6*

(U): Unidad de actividad enzimática, es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de sustrato en un minuto. (AE): Actividad Específica, es el número de unidades de enzima por µg de proteína (U/µg prot). La actividad enzimática específica que se presenta es el promedio de al menos 3 determinaciones por cuatruplicado. En negritas la mejor actividad encontrada. (*) Existen diferencias significativas entre estos grupos ($P < 0.05$).

De acuerdo con las pruebas estadísticas (Kruskall-Wallis $P < 0.05$), no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos A y B, pero si las hay cuando se compara el tratamiento A con los tratamientos C, D y E, lo que indica que al incubar 1µg de ureasa durante 17 o 20 min la AEU es la misma, pero que es distinta cuando se incuban cantidades mayores de la ureasa en un tiempo igual o menor (20 y 10 min).

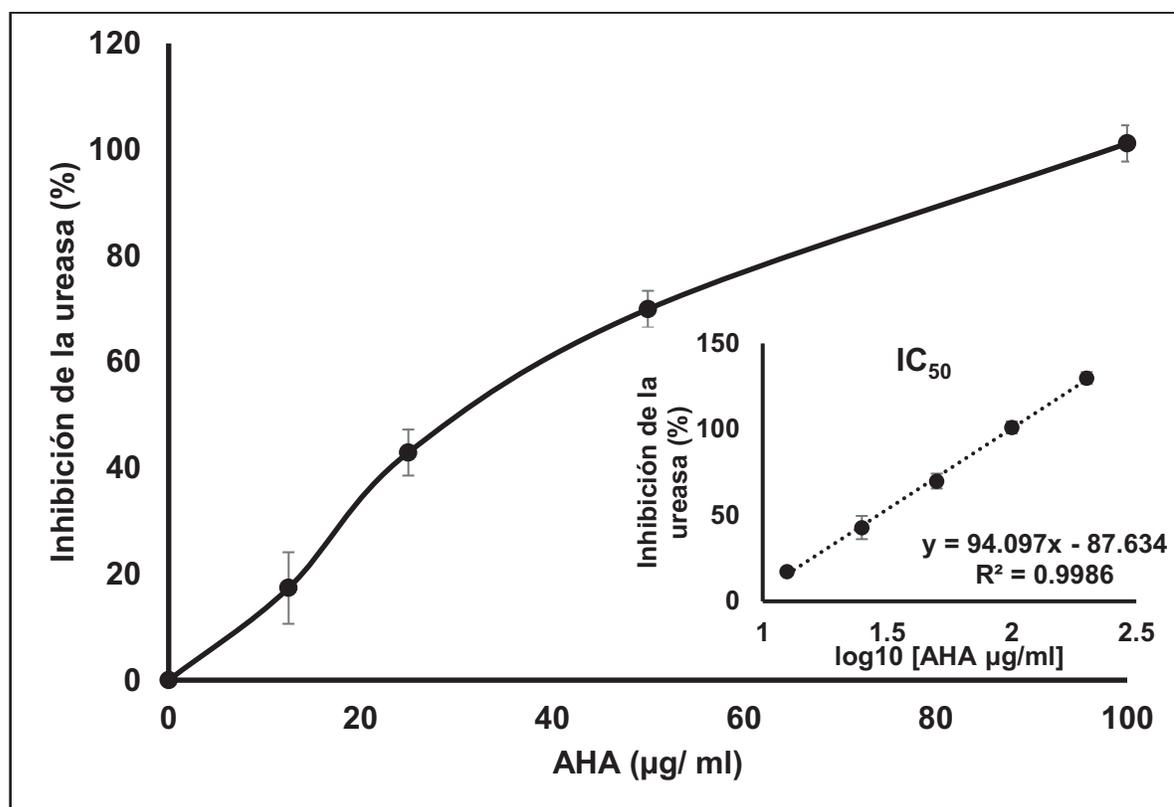
Tomando en cuenta los resultados obtenidos que se muestran en la Tabla 2, se decidió utilizar las condiciones del tratamiento D (3 µg de ureasa con 10 min de incubación a 37°C) para realizar las pruebas de inhibición de la ureasa, ya que en estas condiciones se encontró

la mejor AEU, además, el tiempo de incubación es menor en comparación con los empleados en los tratamientos B y C (con AEU estadísticamente iguales a D).

Cabe señalar que la AEU se determinó después de cada extracción de la fracción enriquecida de la ureasa de *H. pylori* (sección 6.4) y los valores fueron siempre similares. Así mismo, los valores de actividad enzimática encontrados para esta muestra de ureasa son similares a los previamente reportados (Uribe, 2017).

7.3 Inhibición de la actividad de la ureasa con ácido acetohidroxámico

En este trabajo se utilizó AHA para validar el ensayo de inhibición de la actividad de la ureasa y como control positivo. AHA es un inhibidor competitivo de la ureasa y en los experimentos realizados se logró el 100% de la inhibición de la enzima con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la IC_{50} obtenida fue de 29 $\mu\text{g}/\text{mL} = 0.38 \text{ mM}$ (Gráfica 1).

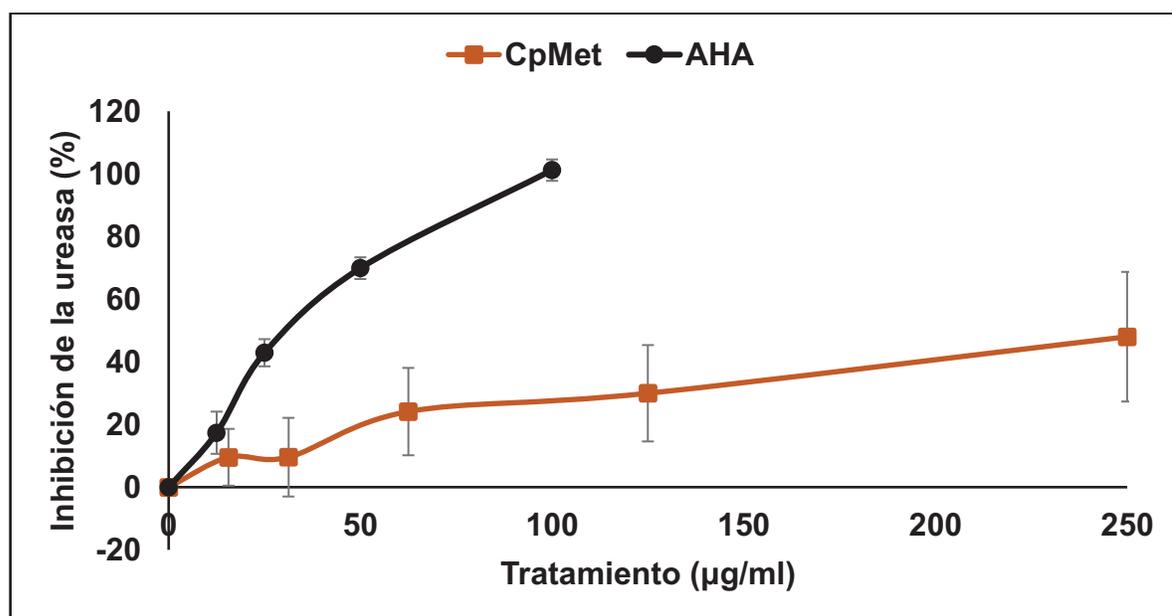


Gráfica 1. Efecto de AHA sobre la actividad de la ureasa. Cada punto representa la media de 3 experimentos. En el recuadro derecho se muestra la determinación de la IC_{50} .

La IC₅₀ obtenida en el experimento se encuentra en el orden de magnitud reportado en otros trabajos [Espinosa-Rivero *et al.*, 2015 (IC₅₀= 11.7 µg/mL = 0.15 mM); Uribe, 2017 (IC₅₀ =20.03 µg/mL = 0.27 mM)].

7.4 Efecto de CpMet sobre la actividad de la ureasa

CpMet presentó una inhibición dosis-dependiente de la ureasa, la inhibición máxima de la enzima obtenida con CpMet fue del 48% con 250 µg/mL (Gráfica 2). Al comparar la inhibición obtenida con CpMet y la del control positivo AHA, se aprecia que es menor (AHA, 100% con 100 µg/mL). A pesar de no haber logrado el 100% de inhibición de la ureasa con CpMet y de que la pendiente de la gráfica es baja, se hizo el ejercicio de calcular la IC₅₀ de CpMet (ANEXO 3) para hacer una comparación contra la IC₅₀ de AHA. La IC₅₀ calculada para CpMet es de 390.8 µg/mL, al menos 13 veces mayor a la IC₅₀ del control (29 µg/mL).



Gráfica 2. Efecto de CpMet sobre la actividad de la ureasa en comparación con la inhibición por AHA. Cada punto representa la media de 3 experimentos para AHA y 9 experimentos para CpMet.

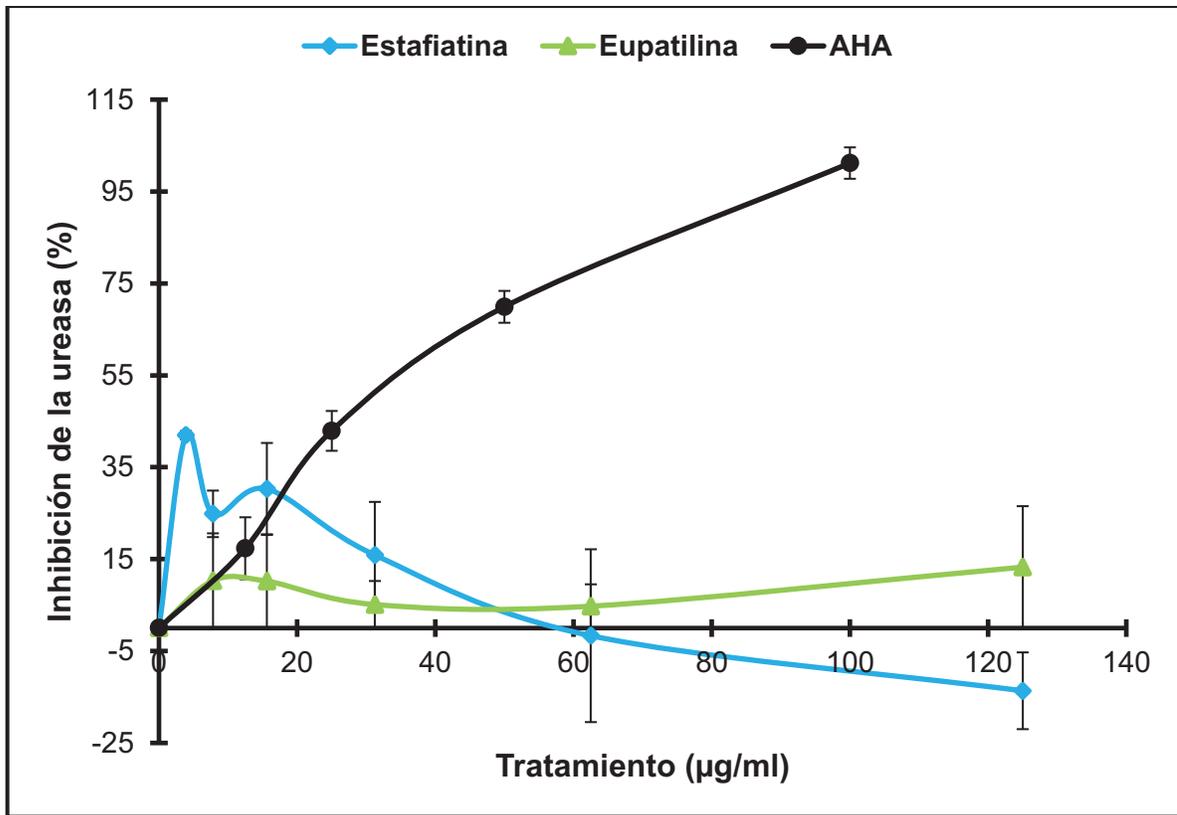
La ureasa de *H. pylori* es la más activa de todas las ureasas microbianas y es una proteína mayoritaria de la bacteria, por ello una inhibición en la actividad de esta enzima menor al 50% difícilmente podría tener un efecto atenuante en la infección.

Ruíz (2020) demostró que en condiciones adversas, como en presencia de un compuesto antibiótico, *H. pylori* sintetiza una mayor cantidad de ureasa. Además, una mayor síntesis de la ureasa significaría un aumento del potencial de virulencia de *H. pylori* tomando en cuenta que esta enzima por sí misma tiene efectos proinflamatorios, citotóxicos, genotóxicos y presumiblemente carcinogénicos (Harris *et al.*, 1996; Mégraud *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 1997; Olivera-Severo *et al.*, 2017). Estos hechos nos hacen cuestionar la importancia de la inhibición de la ureasa por CpMet.

Sin embargo, de acuerdo con lo reportado previamente, el extracto CpMet tiene una buena actividad anti-*H. pylori* (CMI= 62.5 µg/mL), también un buen rendimiento de extracción a partir de la corteza (13.2%) y posee propiedades gastroprotectoras y resolutorias de la úlcera (Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2012; 2018). Esto nos indica que los diferentes componentes del extracto CpMet, actúan simultáneamente sobre más de un factor de patogenicidad de *H. pylori* y sobre la mucosa gástrica del huésped para lograr su acción farmacológica sobre las enfermedades producidas por la infección por *H. pylori*; de tal manera que la inhibición parcial de la ureasa que se demuestra en este trabajo sería uno más de los efectos de éste polifarmacológico extracto. Así que es importante continuar con su estudio para dilucidar completamente sus efectos.

7.5 Efecto de eupatilina y estafiatina sobre la actividad de la ureasa

No se encontraron diferencias significativas entre la actividad de la ureasa sin tratamiento y la actividad de la ureasa en presencia de eupatilina (Kruskall-Wallis $P < 0.05$), lo anterior sugiere que este compuesto no interacciona de ninguna forma con la ureasa (Gráfica 3).



Gráfica 3. Efecto de eupatilina y estafiatina sobre la actividad de la ureasa comparados con la inhibición de AHA (control positivo). Cada punto representa la media de 3 experimentos para AHA, 7 experimentos para eupatilina y 3 experimentos para estafiatina.

En el caso de la estafiatina, la inhibición máxima de la actividad de la ureasa fue del 41.9% con 3.9 µg/mL y aunque en la Gráfica 3 también se aprecia una aparente inhibición de la enzima con 7.8, 15.6 y 31.2 µg/mL, estos valores no fueron estadísticamente distintos a cero de acuerdo con las pruebas realizadas (Kruskall-Wallis $P < 0.05$). Los porcentajes de inhibición negativos con 62.5 y 125 µg/mL podrían indicar la activación de la ureasa en lugar de su inhibición de acuerdo con la tendencia que presenta la pendiente de la gráfica, sin embargo, a estas concentraciones los valores tampoco fueron significativos (Kruskall-Wallis $P < 0.05$).

Aunque la eupatilina no afecta la actividad de la ureasa y la actividad de la estafiatina sobre la ureasa no es totalmente clara aún, de acuerdo con lo reportado por Palacios-Espinosa *et al.* (2021) ambos compuestos tienen actividades anti-*H. pylori* muy buenas [Eupatilina: actividad bacteriostática y bactericida (CMI y CMB = 31.2 µg/mL) y Estafiatina: CMI y CMB = 15.6 µg/mL), razón por la cual, al igual que con CpMet, se recomienda continuar

con el estudio y dilucidar sus mecanismos de acción sobre la bacteria. En otros trabajos se han reportado compuestos con actividad anti-*H. pylori* que no presentaron efectos sobre la actividad de la ureasa (Egas *et al.*, 2018), pero si sobre otros factores de colonización (Nava, 2020).

Cabe mencionar que la eupatilina presenta además propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias, neuroprotectoras, antialérgicas y cardioprotectoras (Palacios-Espinosa *et al.*, 2021). Respecto a las propiedades de la estafiatina, Schepetkin *et al.* (2018) reportaron la actividad antiinflamatoria del compuesto en células Jurkat.

Tomando en cuenta lo anterior, ambos compuestos continúan siendo potenciales candidatos para el desarrollo de nuevas terapias contra *H. pylori*, los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la necesidad de continuar con el estudio de las propiedades gastroprotectoras y de los mecanismos de acción anti-*H. pylori* de ambos compuestos, particularmente de la estafiatina, pues se sabe poco de esta lactona sesquiterpénica.

Si bien ninguna de las muestras probadas en este trabajo logró inhibir a la ureasa completamente (y en el caso de la eupatilina no se encontró inhibición) es importante subrayar la importancia de haber estudiado su efecto sobre esta enzima. La ureasa de *H. pylori* representa aproximadamente el 10% del material proteico sintetizado por la bacteria y es muy importante para el metabolismo y patogenicidad de la bacteria. Entre sus principales papeles están ser la principal responsable del sistema de aclimatación ácida que permite el reajuste del potencial de membrana y del pH periplásmico y citosólico de la bacteria a niveles fisiológicamente óptimos para colonizar y sobrevivir exitosamente en el estómago (Sachs *et al.*, 2005). Además, la ureasa es un factor de virulencia involucrado en la activación del sistema inmune del hospedero (Harris *et al.*, 1996), esta enzima también altera la viscoelasticidad de las mucinas del epitelio gástrico (Celli *et al.*, 2009), promueve la angiogénesis (Olivera-Severo *et al.*, 2017), desestabiliza al epitelio gástrico (De Jesús *et al.*, 2019) y tiene efectos citotóxicos y genotóxicos que ya se han mencionado anteriormente (Mégraud *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 1997).

Por otro lado, se ha demostrado que las cepas de *H. pylori* mutantes con actividad deficiente de la ureasa no son capaces de colonizar exitosamente el epitelio gástrico.

Considerando todas estas evidencias, la inhibición de esta enzima representa un blanco terapéutico importante para el tratamiento de las enfermedades asociadas con la infección de la bacteria y, por lo tanto, se justifica plenamente la búsqueda de inhibidores de la ureasa (Schoep *et al.*, 2010).

De acuerdo con Svane *et al.* (2020), actualmente se ha comprobado el efecto de al menos 71 moléculas capaces de inhibir a la ureasa, de los cuales solo 30 compuestos tienen porcentajes de inhibición mayores al 25% y han mostrado problemas asociados como toxicidad y baja estabilidad en pH ácido. Por ejemplo, el AHA es uno de los inhibidores de la ureasa más estudiados y es ampliamente utilizado en las pruebas de inhibición de la ureasa como control positivo ya que inhibe al 100% la actividad de la enzima, no obstante, además de su baja estabilidad, se ha demostrado que la administración de este compuesto presenta efectos secundarios teratogénicos, psiconeurológicos y síntomas músculo-tegmentarios por lo cual se ha descartado su uso clínico (Modolo *et al.*, 2015; Cunha *et al.*, 2021).

Tomando en cuenta que la ureasa es una proteína mayoritaria y muy activa de *H. pylori*, las probabilidades de que se logre un efecto atenuante en las enfermedades gástricas con una inhibición de la ureasa menor al 50% (como es el caso de la inhibición ejercida por algunas de las muestras estudiadas en este trabajo), son escasas. Sin embargo, no se descarta continuar con su estudio, ya que han mostrado su efectividad antibiótica contra *H. pylori* y resulta importante investigar si su mecanismo de acción pueda ser sobre otros factores de patogenicidad de la bacteria y puedan actuar como alternativas o coadyuvantes en las terapias de erradicación, recordemos que *H. pylori* es un patógeno antibiótico-resistente que infecta al 50% de la población mundial y que las enfermedades ocasionadas por esta bacteria representan un problema de salud pública, además de considerarse como un carcinógeno tipo I.

8. Conclusiones

Se estableció el cultivo de *H. pylori* y se identificó positivamente mediante pruebas bioquímicas y mediante la tinción diferencial de Gram (negativa). Lo cual permitió la obtención de una fracción de ureasa que se usó como fuente de la enzima para la realización de las pruebas de inhibición de la actividad de la ureasa *in vitro* con tres tratamientos por separado: CpMet, eupatilina y estafiatina.

Se determinó por primera vez el efecto de CpMet, eupatilina y estafiatina sobre la ureasa de *H. pylori*. CpMet inhibió la actividad de la ureasa en un 48% con 250 µg/mL. La estafiatina inhibió la actividad enzimática un 41.9% con 3.9 µg/mL y la eupatilina no inhibió la actividad de la ureasa.

Este trabajo contribuyó para dilucidar los mecanismos de acción anti-*H. pylori* de CpMet, eupatilina y estafiatina.

9. Perspectivas

Considerando que CpMet, eupatilina y estafiatina tienen una buena actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *H. pylori*, es importante conocer su mecanismo de acción, mediante la evaluación del efecto de estas muestras sobre otros factores de patogenicidad de *H. pylori*, como su acción sobre la adherencia, sobre las toxinas Cag A y Vac A; así como sobre procesos y enzimas clave de su metabolismo.

Referencias

1. **Abdo-Francis**, J. M. y Uscanga-Domínguez, L. (2007). III Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México* 72(3), 136-153.
2. **Abundiz**, L. A. M., Barajas-Morales, J. y Tenorio, P. (2004). Anatomía de maderas de México. Árboles y arbustos del matorral xerófilo de Tehuacán, Puebla. *Instituto de Biología*. UNAM. México. 21.
3. **Alanís**, A.D., Calzada, F., Cervantes, J.A., Torres, J. y Ceballos GM. (2005). Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2),153-157.
4. **Alonso-Castro**, A. J., Domínguez, F., Maldonado-Miranda, J. J., Castillo-Pérez, L. J., Carranza-Álvarez, C., Solano, E., Isiordia-Espinoza, M. A., Del Carmen Juárez-Vázquez, M., Zapata-Morales, J. R., Argueta-Fuertes, M. A., Ruiz-Padilla, A. J., Solorio-Alvarado, C. R., Rangel-Velázquez, J. E., Ortiz-Andrade, R., González-Sánchez, I., Cruz-Jiménez, G., y Orozco-Castellanos, L. M. (2017). Use of medicinal plants by health professionals in Mexico. *Journal of ethnopharmacology*, 198, 81–86.
5. **Amieva**, M. R., Salama, N. R., Tompkins, L. S. y Falkow, S. (2002). *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cellular microbiology*, 4(10), 677–690.
6. **Anaya-Eugenio**, G. D., Rivero-Cruz, I., Bye, R., Linares, E. y Mata, R. (2016). Antinociceptive activity of the essential oil from *Artemisia ludoviciana*. *Journal of ethnopharmacology*, 179, 403–411.
7. **Anaya-Eugenio**, G. D., Rivero-Cruz, I., Rivera-Chávez, J. y Mata, R. (2014). Hypoglycemic properties of some preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt. *Journal of ethnopharmacology*, 155(1), 416–425.
8. **Andersen**, L.P y Wadström, T. Basic Bacteriology and Culture. En: Mobley, HLT, Mendz, GL y Hazell, SL. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001. Chapter 4.
9. **Argueta**, A. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. México: *Instituto Nacional Indigenista*. 1,2. 628-630.
10. **Baj**, J., Forma, A., Sitarz, M., Portincasa, P., Garruti, G., Krasowska, D. y Maciejewski, R. (2020). *Helicobacter pylori* Virulence Factors-Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment. *Cells*, 10(1), 27.
11. **Balderas**, J. L. (2006). Fitoquímica comparativa de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* y evaluaciones biológicas preliminares. *Maestría*. UNAM.
12. **Bayona**, R. M. A. (2013). Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. *Revista colombiana de Gastroenterología*, 28(2), 94-99.
13. **Borja** Ramírez, E. B. (2013). Compuestos anti-*Helicobacter pylori* y gastroprotectores de la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*. *Licenciatura*. UNAM.
14. **Bosques-Padilla**, F. J., Remes-Troche, J. M., González-Huezo, M. S., Pérez-Pérez, G., Torres-López, J., Abdo-Francis, J. M., Bielsa-Fernandez, M. V., Camargo, M. C., Esquivel-Ayanegui, F., Garza-González, E., Hernández-Guerrero, A. I., Herrera-Goepfert, R., Huerta-Iga, F. M., Leal-Herrera, Y., López-Colombo, A., Ortiz-Olvera, N. X., Riquelme-Pérez, A., Sampieri, C.L., Uscanga-Domínguez, L. F. y Velarde-Ruiz Velasco, J. A. (2018). IV consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México*, 83(3), 325-341.
15. **Bradford**, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
16. **Burkitt**, M. D., Duckworth, C. A., Williams, J. M. y Pritchard, D. M. (2017). *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from *in vivo* and *ex vivo* models. *Disease models and mechanisms*, 10(2), 89-104.
17. **Calzada**, F., Yépez-Mulia, L. y Aguilar, A. (2006). *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of ethnopharmacology*, 108(3), 367–370.

18. **Camargo**, M. C., García, A., Riquelme, A., Otero, W., Camargo, C. A., Hernandez-García, T., Candia, R., Bruce, M. G. y Rabkin, C. S. (2014). The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America. *The American journal of gastroenterology*, 109(4), 485–495.
19. **Canales**, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A. y Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3), 429-439.
20. **Castillo-Juárez**, I. y Romero, I. (2007). Plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*: una revisión. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 80, 35-61.
21. **Castillo-Juárez**, I., González, V., Jaime-Aguilar, R., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. y Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 402–405.
22. **Celli**, J. P., Turner, B. S., Afdhal, N. H., Keates, S., Ghiran I., Kelly, C. P., Ewoldt, R. H., McKinley, G. H., So, P., Erramilli, S. y Bansil, R. (2009). *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34), 14321-14326.
23. **Choi**, E. J., Oh, H. M., Wee, H., Choi, C. S., Choi, S. C., Kim, K. H., Han, W. C., Oh, T. Y., Kim, S. H. y Jun, C. D. (2009). Eupatilin exhibits a novel anti-tumor activity through the induction of cell cycle arrest and differentiation of gastric carcinoma AGS cells. *Differentiation; research in biological diversity*, 77(4), 412-423.
24. **Cortés Alencaster**, A. (2012). Estudio del efecto anti-*Helicobacter pylori* del extracto acuoso de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*. *Licenciatura*. UNAM.
25. **Cover**, T. L. y Blanke, S. R. (2005). *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature reviews. Microbiology*, 3(4), 320–332.
26. **Cunha**, E.S., Chen, X., Sanz-Gaitero, M., Mills, D. J. y Luecke, H. (2021). Cryo-EM structure of *Helicobacter pylori* urease with an inhibitor in the active site at 2.0 Å resolution. *Nature Communications*, 12(230).
27. **De Reuse**, H. y Skouloubris S. Metabolismo del nitrógeno. En: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editores. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001. Capítulo 11.
28. **Dunn**, B. E., Campbell, G. P., Perez-Perez, G. I. y Blaser, M. J. (1990). Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(16), 9464-9469.
29. **Eaton**, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R. y Krakowka, S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infection and immunity*, 59(7), 2470–2475.
30. **Egas**, V., Salazar-Cervantes, G., Romero, I., Méndez-Cuesta, C. A., Rodríguez-Chávez, J. L. y Delgado, G. (2018). Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Heterothea inuloides* (Mexican arnica). *Fitoterapia*, 127, 314–321.
31. **Escobedo**, W. I. (2013) Estudio del potencial anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotector y antiinflamatorio de *Cyrtocarpa procera*. *Doctorado*. UNAM.
32. **Escobedo-Hinojosa**, W. I., Díaz del Carpio, J., Palacios-Espinoza, J. F. y Romero, I. (2012). Contribution to the ethnopharmacological and anti-*Helicobacter pylori* knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 363-371.
33. **Escobedo-Hinojosa**, W. I., Gómez-Chang, E., García-Martínez, K., Guerrero, R., Cardoso-Taketa, A. y Romero, I. (2018). Gastroprotective mechanism and ulcer resolution effect of *Cyrtocarpa procera* methanolic extract on ethanol-induced gastric injury. *Hindawi, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-12.
34. **Espinosa-Rivero**, J.P., Rendón-Huerta, E., Romero I. (2015). Inhibition of *Helicobacter pylori* growth and its colonization factors by *Parthenium hysterophorus* extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 174, 253–260.

35. **Estrada-Soto, S.**, Sánchez-Recillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R. y Ibarra-Barajas, M. (2012). Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. *Journal of ethnopharmacology*, 139(2), 513–518.
36. **Fisher Scientific.** BD BBL™ DrySlide™ Oxidase. Consultado el 09 de mayo del 2022 recuperado de <https://www.fishersci.es/shop/products/bd-dryslide-reagent-slides/4/11792984?searchHijack=true&searchTerm=bd-dryslide-reagent-slides/4&searchType=Rapid&matchedCatNo=11792984>.
37. **Gobert, A. P.**, Mersey, B. D., Cheng, Y., Blumberg, D. R., Newton, J. C. y Wilson, K. T. (2002). Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(12), 6002–6006.
38. **Gómez-Chang, E.**, Escobedo-Hinojosa, W. y Romero Álvarez, I. (2017). Tratamiento de la úlcera péptica asociada a *Helicobacter pylori*. Una perspectiva desde los productos naturales. Memoria del 44º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM. *Mensaje Bioquímico*, 41, 9-20.
39. **Goodwin, C. S.** y Armstrong, J. A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9(1), 1-13.
40. **Goodwin, C. S.**, Armstrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McConnell, W. y Harper, W. E. S. (1989). *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Internal Journal of Systematic Bacteriology*, 39(4), 397-405.
41. **Gravina, A. G.**, Zagari, R. M., De Musis, C., Romano, L., Loguercio, C., y Romano, M. (2018). *Helicobacter pylori* and extragastric diseases: A review. *World journal of gastroenterology*, 24(29), 3204–3221.
42. **Gustafson, J.** y Welling, D. (2010). "No acid, no ulcer"--100 years later: a review of the history of peptic ulcer disease. *Journal of the American College of Surgeons*, 210(1), 110–116.
43. **Ha, N. C.**, Oh, S. T., Sung, J. Y., Cha, K. A., Lee, M. H. y Oh, B. H. (2001). Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature structural biology*, 8(6), 505–509.
44. **Hafeez, M.**, Qureshi, Z. A., Khattak, A. L., Saeed, F., Asghar, A., Azam, K., y Khan, M. A. (2021). *Helicobacter Pylori* Eradication Therapy: Still a Challenge. *Cureus*, 13(5), e14872.
45. **Harris, P. R.**, Mobley, H. L., Perez-Perez, G. I., Blaser, M. J. y Smith, P. D. (1996). *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology*, 111(2), 419-425.
46. **Hatakeyama, M.** (2017). Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 93(4), 196–219.
47. **Heike, V.** (2009). Malezas de México. *Artemisia ludoviciana* Nutt. Consultado el 09 junio del 2020 recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisia-ludoviciana/fichas/ficha.htm>.
48. **Hong, W.**, Sano, K., Morimatsu, S., Scott, D. R., Weeks, D. L., Sachs, G., Goto, T., Mohan, S., Harada, F., Nakajima, N. y Nakano, T. (2003). Medium pH-dependent redistribution of the urease of *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*, 52(3), 211–216.
49. **Hunt, R. H.**, Xiao, S. D., Mégraud, F., Leon-Barua, R., Bazzoli, F., van der Merwe, S., Vaz Coelho, L. G., Fock, M., Fedail, S., Cohen, H., Malfertheiner, P., Vakil, N., Hamid, S., Goh, K. L., Wong, B. C., Krabshuis, J., Le Mair, A. y World Gastroenterology Organization. (2011). *Helicobacter pylori* in developing countries. *Journal of gastrointestinal and liver diseases*, 20(3), 299–304.
50. **International Agency for Research on Cancer.** (1994). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 61, 1-241.

51. **International Union of Microbiological Societies.** (1985). Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 17. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(2), 223-225.
52. **Kim, N.** (2016). *Helicobacter pylori*. Springer. E-book. 25.
53. **Krajewska, B.** (2009). Ureasas I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59 (1–3), 9-21.
54. **Krzyżek, P.** y Gościński, G. (2018). Morphology of *Helicobacter pylori* as a result of peptidoglycan and cytoskeleton rearrangements. *Gastroenterology Review*, 13(3), 182- 195.
55. **Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M.** y Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews Rev.*, 19(3), 449-490.
56. **Lee, K. H.** y Geissman, T. A. (1970). Sesquiterpene lactone of *Artemisia* constituents of *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*. *Phytochemistry*, 9, 403-408.
57. **Marshall, B. J.** y Goodwin, C.S. (1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(1), 68.
58. **Marshall, B. J., Royce, H., Annear, D. I., Goodwin, C. S., Pearman, J. W., Warren, J. R.** y Armstrong, J. A. (1984). Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Letters*, 25, 83-88.
59. **Mata, R., Delgado, G.** y Romo del Vivar, A. (1984). Sesquiterpene lactones of *Artemisia mexicana* var. *Angustifolia*. *Phytochemistry*, 23, 1665-1668.
60. **Mata, R., Figueroa, M., Navarrete, A.,** y Rivero-Cruz, I. (2019). Chemistry and Biology of Selected Mexican Medicinal Plants. *Progress in the chemistry of organic natural products*, 108, 1–142.
61. **Matsuo, Y., Kido, Y.** y Yamaoka, Y. (2017). *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. *Toxins*, 9(3), 101 pp.
62. **Medina-Lemos, R.** y Fonseca, R. M. (2009). Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 71. Anacardiaceae. *S y G editores*. México. 12-15.
63. **Mégraud, F., Lehours, P.** y Vale, F. F. (2016). The history of *Helicobacter pylori*: from phylogeography to paleomicrobiology. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(11), 922–927.
64. **Mégraud, F., Neman-Simha, V.** y Brüggmann, D. (1992). Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter pylori* urease on human epithelial cells. *Infection and immunity*, 60(5), 1858–1863.
65. **Missouri Botanical Garden.** (2020). *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* (Willd. Ex Spreng.) D. D. Keck. Consultado el 09 junio del 2020 recuperado de <http://www.tropicos.org/Name/2700146>.
66. **Missouri Botanical Garden.** (2020). *Cyrtocarpa procera* Kunth. Consultado el 09 junio del 2020 recuperado de <http://www.tropicos.org/Name/50145943>.
67. **Mitchell, J. D.** y Daly, D. C. (1991). *Cyrtocarpa* Kunth (Anacardiaceae) in South America. Missouri Botanical Garden Press. Consultado el 02 de junio del 2020 recuperado de <https://www.jstor.org/stable/2399604>.
68. **Mobley, H. L., Island, M. D.,** y Hausinger, R. P. (1995). *Molecular biology of microbial ureases*. *Microbiological Reviews.*, 59(3), 451-480.
69. **Modolo, L. V., de Souza, A. X., Horta, L. P., Araujo D. P.** y de Fátima, A. (2015). An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*, 6, 35-44.
70. **Nava Barrios, L. A.** (2020). Determinación del efecto de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol y 7-hidroxi-cadalenol aislados de *Heterotheca inuloides* sobre la adherencia de *Helicobacter pylori* a células AGS. *Licenciatura*. UPAEP.
71. **NOM-059-SEMARNAT-2010.** (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial*. Segunda sección. 1- 78.

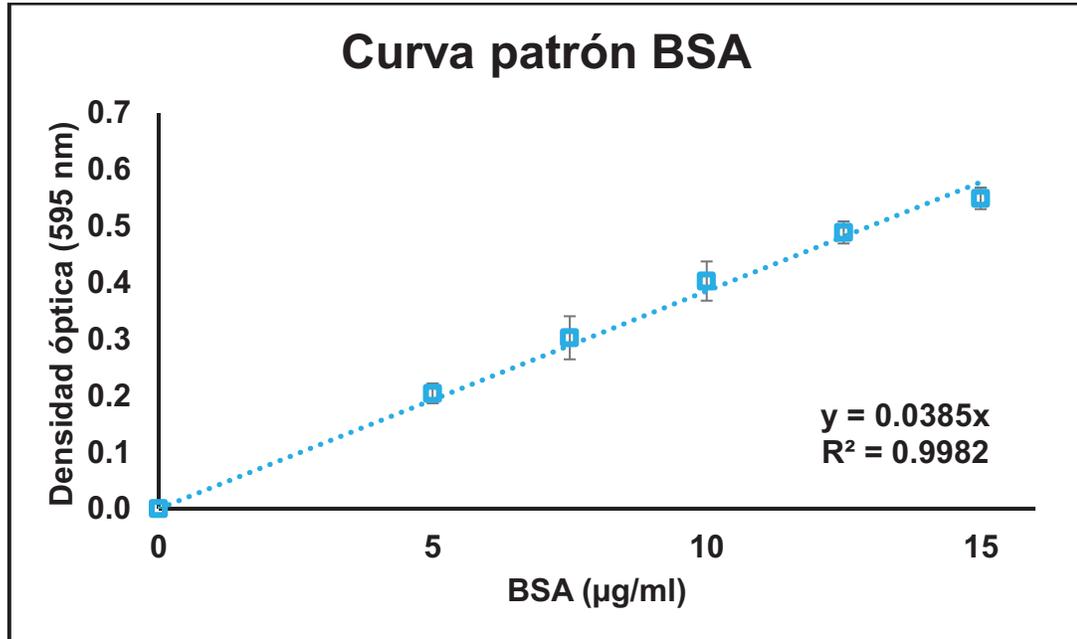
72. **Olivera-Severo**, D., Uberti, A. F., Marques, M. S., Pinto, M. T., Gomez-Lazaro, M., Figueiredo, C., Leite, M. y Carlini, C. R. (2017). A new role for *Helicobacter pylori* urease: contributions to angiogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 8(1883), 1-11.
73. **On**, S. L. W., Lee, A., O'Rourke, J. L., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Fox, J. G. y Vandamme, P. (2015). Helicobacter. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-1. Online ©. 2015 Bergey's Manual Trust. Published by John Wiley & Sons, Inc., <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm01073>.
74. **O'Toole**, P.W y Clyne M. Cell Envelope. En: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001. Chapter 7.
75. **Palacios-Espinosa**, J. F., Núñez-Aragón, P. N., Gómez-Chang, E., Linares, E., Bye, R., y Romero, I. (2021). Anti-*Helicobacter pylori* Activity of *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* and Two of Its Bioactive Components, Estafiatin and Eupatilin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(12), 3654.
76. **Protein Data Bank**. PDB 1E9Z. Imagen: Crystal structure of *Helicobacter pylori* Urease. Ha N-C. Oh S-T., Sung J.Y., Cha K.A., Lee M. H. y Oh B-H. 2001. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature Structural Biology*, 8(6), 505-509. DOI: [10.2210/pdb1E9Z/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1E9Z/pdb)
77. **Rivero-Cruz**, I., Anaya-Eugenio, G.D., Pérez-Vásquez, A., Martínez, A.L. y Mata, R. (2017). Quantitative Analysis and Pharmacological Effects of *Artemisia ludoviciana* Aqueous Extract and Compounds. *Natural Product Communications*, 12, 1531-1534.
78. **Rodríguez-Canales**, M., Martínez-Galero, E., Nava-Torres, A. D., Sanchez-Torres, L. E., Garduño-Siciliano, L., Canales-Martinez, M. M., Terrazas, L. I. y Rodriguez-Monroy, M. A. (2020). Anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanolic extract of *Cyrtocarpa procera* bark reduces the severity of ulcerative colitis in a chemically induced colitis model. *Mediators of inflammation*. 5062506.
79. **Rodríguez-López**, V., Aguirre-Crespo, F., Salazar, L. y Estrada-Soto, S. (2006). Identification of fatty acid esters and hydrocarbon derivates from *Cyrtocarpa procera* by GC-MS. *Natural Products Research*, 20, 1-7.
80. **Rodríguez-López**, V., Salazar, L. y Estrada, S. (2003). Spasmolytic activity of several extracts obtained from some Mexican medicinal plants. *Fitoterapia*, 74, 725-728.
81. **Romaniuk**, P. J., Zoltowska, B., Trust, T. J., Lane, D. J., Olsen, G. J., Pace, N. R. y Stahl D. A. (1987). *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *Journal of Bacteriology*, 169(5), 2137-2141.
82. **Rosas-Acevedo**, H., Terrazas, T., González-Trujano, M. E., Guzmán, Y. y Soto-Hernández, M. (2011). Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphyterigium adstringens* both assayed on the experimental gastric injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 67-73.
83. **Ruíz Miranda**, J. A. (2020). Análisis electroforético de los cambios en la expresión proteica de *Helicobacter pylori* en presencia de ácido anacárdico 6 pentadecil salicílico. *Licenciatura*. UNAM.
84. **Ruíz-Cancino**, A., Cano, E. A. y Delgado, G. (1993). Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. *Mexicana*. *Phytochemistry*, 33, 51113-51115.
85. **Sachs**, G., Weeks, D. L., Wen, Y., Marcus, E. A., Scott, D. R. y Melchers, K. (2005). Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology*, 20, 429- 438.
86. **Sánchez-Viesca** y F., Romo, J. (1963). Estafiatin, a new sesquiterpene lactone isolated from *Artemisia mexicana* (Wild). *Tetrahedron*, 19, 1285-1291.
87. **Schepetkin**, I. A., Kirpotina, L. N., Mitchell, P. T., Kishkentaeva, A. S., Shaimerdenova, Z. R., Atazhanova, G. A., Adekenov, S. M. y Quinn, M. T. (2018). The natural sesquiterpene lactones arglabin, grosheimin, agracin, parthenolide, and estafiatin inhibit T cell receptor (TCR) activation. *Phytochemistry*, 146, 36-46.
88. **Schoep**, T. D., Fulurija, A., Good, F., Lu, W., Himbeck, R. P., Schwan, C., Choi, S. S., Berg, D. E., Mittl, P. R., Benghezal, M. y Marshall, B. J. (2010). Surface properties of *Helicobacter pylori* urease complex are essential for persistence. *PloS one*, 5(11), e1504.

89. **Secretaría de Salud.** (2020). 20 principales causas de enfermedad nacional. *Anuario de morbilidad 1984-2020*. Consultado el 01 de febrero del 2022.
90. **Smith, A. C.** y **Hussey, M. A.** (2005). Gram stain protocols. In American Society for Microbiology-ASM Conference for Undergraduate Educators (Vol. 2005).
91. **Soto Molina, H., Sandoval, A. E. C., Azamar Alonso, A., Reyes García, J. G. Laisequilla, F. D. V. y Azamar Alonso, A.** (2016). Análisis coste-efectividad del triple esquema para erradicación de *Helicobacter pylori* como profilaxis al desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico en México. *Pharmaco Economics Spanish Research Articles*, 13, 9–15.
92. **Suzuki, H., Mori, M., Suzuki, M., Sakurai, K., Miura, S. e Ishii, H.** (1997). Extensive DNA damage induced by monochloramine in gastric cells. *Cancer letters*, 115(2), 243-248.
93. **Svane, S., Sigurdarson, J.J., Finkenwirth, F., Eitinger, T. y Karring, H.** (2020). Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. *Scientific Reports* 10(8503).
94. **Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N. y WHO Pathogens Priority List Working Group.** (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.
95. **Torres, J., Camorlinga-Ponce, M., Pérez-Pérez, G., Madrazo-De la Garza, A., Dehesa, M., González-Valencia, G. y Muñoz, O.** (2001). Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *Journal of clinical microbiology*, 39(7), 2677-2680.
96. **Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gomez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Conyer, R. y Muñoz, O.** (1998). A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *The Journal of infectious diseases*, 178(4), 1089-1094.
97. **Uberti, A. F., Olivera-Severo, D., Wassermann, G. E., Scopel-Guerra, A., Moraes, J. A., Barcellos-de-Souza, P., Barja-Fidalgo, C., y Carlini, C. R.** (2013). Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 69, 240–249.
98. **Uribe Estanislao, G. V.** (2017). Efecto de extractos de tres especies de quelites sobre la actividad de la enzima ureasa de *Helicobacter pylori*. *Licenciatura*. UNAM.
99. **Vakil, N. y Mégraud, F.** (2007). Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 133(3), 985-1001.
100. **Villaseñor, J. L.** (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559-902.
101. **Voland, P., Weeks, D. L., Marcus, E. A., Prinz, C., Sachs, G. y Scott, D.** (2003). Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 284(1), G96–G106.
102. **Warren, J. R. y Marshall, B. J.** (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis (letter). *Lancet*, 1, 1273-1275.
103. **Warren, J. R. y Marshall, B. J.** (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1, 1311-1315.
104. **Wassermann, G. E., Olivera-Severo, D., Uberti, A. F. y Carlini, C. R.** (2010). *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(7), 2025–2034.
105. **Weatherburn, M. W.** 1967. Phenol-hipoclorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39, 971-974.
106. **WGO.** (2010). Guías Prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología: *Helicobacter pylori* en los países de desarrollo. *Gastroenterología Latinoamericana*, 21(2), 165-181.
107. **WHO.** (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. 2014-2023. 76.

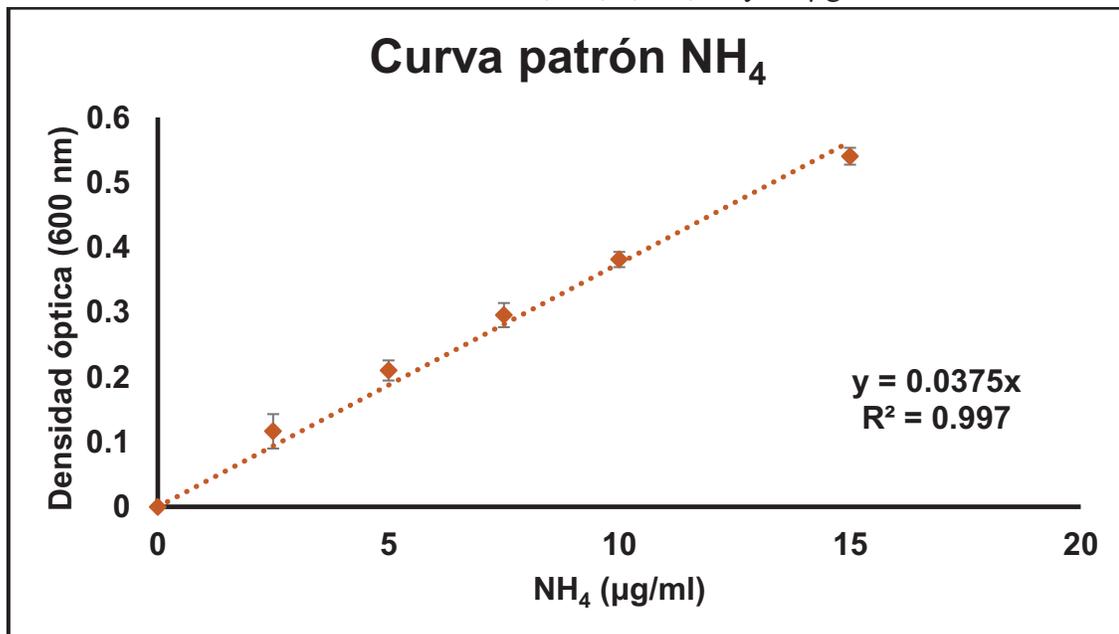
108. **Wirth**, H. P., Beins, M. H., Yang, M., Tham, K. T. y Blaser, M. J. (1998). Experimental infection of Mongolian gerbils with wild-type and mutant *Helicobacter pylori* strains. *Infection and immunity*, 66(10), 4856–4866.
109. **Worku**, M. L., Sidebotham, R. L., Walker, M. M., Keshavarz, T. y Karim, Q.N. (1999). The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology. *Microbiology*, 145, 2803-2811.
110. **Xiao**, Z. P., Wang, X. D., Peng, Z. Y., Huang, S., Yang, P., Li, Q. S., Zhou, L. H., Hu, X. J., Wu, L. J., Zhou, Y., y Zhu, H. L. (2012). Molecular docking, kinetics study, and structure-activity relationship analysis of quercetin and its analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(42), 10572–10577.
111. **Zavala-Sánchez**, M. A., Pérez-Gutiérrez, S., Pérez-González, C., Sánchez-Saldivar, D. y Arias-García L. (2002) Antidiarrhoeal Activity of Nonanal, an Aldehyde Isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharmaceutical Biology*, 40(4), 263-268.

ANEXOS

ANEXO 1. Curva patrón de BSA utilizada para la determinación de proteína de la fracción enriquecida de ureasa. Las concentraciones de BSA utilizadas fueron: 0, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 $\mu\text{g/mL}$.



ANEXO 2. Curva de NH_4 utilizada para determinar la actividad de la ureasa. Las concentraciones de NH_4 utilizadas fueron: 0, 2.5, 5, 7.5, 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$.



ANEXO 3. Grafica para el cálculo de la IC₅₀ para CpMet.

