



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

“Caracterización Química de extractos de  
Geranium sp. Que interfieren en la adherencia  
localizada de E. coli a células HEp-2”

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**Maestro en Ciencias Biológicas  
(Biología Experimental)**

P R E S E N T A

**Ezequiel Mendoza Jansch**

DIRECTOR(A) DE TESIS: (GRADO, NOMBRE COMPLETO)

MÉXICO, D.F.

Abril, 2006



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.

## **Agradecimientos**

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de la beca de Maestría de CONACYT con el número de becario 182509; beca de escritura de Tesis como parte del proyecto de CONACYT 38608 M con el título: Obtención y caracterización de compuestos con actividad antiadherente y antimicrobiana de extractos acuosos de plantas medicinales empleadas para curar la diarrea; y beca complementaria de la DGEP.

Agradezco profundamente la ayuda, tiempo, comprensión y profesionalismo de los miembros del Comité Tutorial a lo largo de la maestría:

Dr. Manuel Jiménez Estrada

Dr. Carlos A. Eslava Campos

Dra. María Cristina Pérez Amador Barrón

Agradezco el apoyo, comprensión, tiempo y amor que me dió mi familia, Almendra y Egan, a lo largo de la realización de este trabajo, ya que esto es algo que compartimos y es para nosotros. Los amo profundamente y estamos en el camino que aún no termina ...

A mis papás por su gran apoyo sin el cuál esto no sería posible, por ser un ejemplo de superación a seguir. Gracias los amo.

A mis hermanos, que aunque no nos veamos mucho siempre se les recuerda con cariño.

A mis suegros por el apoyo, tiempo y recomendaciones, se les aprecia mucho.

A todos los doctores que me ayudaron, formaron, evaluaron, dirigieron y enseñaron durante todo este proceso. Parte de los que soy ahora es gracias a ustedes.

A todos los que pude haber olvidado ...

Gracias

# Índice General

-Abreviaciones.....	1
<b>I. Resumen .....</b>	<b>2</b>
<b>-II.1.- Introducción.....</b>	<b>3</b>
-II.1.2.- Productos Naturales.....	3
-II.1.3.- Las plantas y la diarrea.....	5
-II.1.4.- El género <i>Geranium</i> .....	6
-II.1.5.- Usos y actividades de los Geranios.....	9
<b>-III.1.- Importancia de la diarrea en el mundo .....</b>	<b>11</b>
- III.1.2.- Importancia de la diarrea en México.....	11
<b>-IV.1.- <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>12</b>
-IV.1.2.- Adherencia.....	13
-IV.1.3.- <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	14
-IV.1.4.- Formación del pedestal por la adherencia de <i>E. coli</i> enteropatógena .....	15
-IV.1.5.- Importancia de <i>Escherichia coli</i> como patógeno causante de la diarrea en México.	16
<b>-V Planteamiento del problema.....</b>	<b>19</b>
<b>-VI.- Justificación.....</b>	<b>21</b>
<b>-VII.- Objetivo general.....</b>	<b>22</b>
<b>-VIII.- Objetivos específicos.....</b>	<b>22</b>
<b>-IX.- Hipótesis .....</b>	<b>22</b>
<b>-X.1.- Material y método.....</b>	<b>23</b>
-X.1.2.- Material vegetal.....	23
-X.1.3.- Obtención del extracto acuoso de manera caliente y obtención del extracto liofilizado de <i>Geranium seemanni</i> .....	23
<b>-X.2.1 Inhibición de la adherencia.....</b>	<b>23</b>

-X.2.2.- Preparación de extracto liofilizado crudo, fracciones, sub- fracciones y antimicrobianos para el ensayo adherencia .....	26
-X.2.3.- Preparación de inóculo bacteriano.....	26
-X.2.4.- Preparación de Células HEp-2 .....	27
-X.2.5.- Ensayo de adherencia.....	28
-X.2.6.- Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC).....	29
-X.2.7.- Prueba estadística t de Student.....	29
-X.2.8.- Imágenes.....	30
-X.2.9.- Prueba de cepas clínicas con el extracto crudo .....	30
<b>-X.3.1.- Obtención de fracciones y probar la actividad de inhibición de la adherencia del patrón localizado de <i>E. coli</i> a células HEp-2 .....</b>	<b>30</b>
<b>- X.4.1.- Caracterización de los compuestos activos .....</b>	<b>31</b>
<b>-XI.1.- Resultados.....</b>	<b>32</b>
-XI.1.2.- Material vegetal.....	32
-XI.1.3.- Obtención del Extracto Liofilizado .....	32
-XI.1.4.- Efecto antiadherente y antimicrobiano del extracto liofilizado crudo de <i>Geranium seemanni</i> .....	32
-XI.1.5.- Ensayos de adherencia a células HEp-2 con el extracto liofilizado crudo y cepas clínicas de EPEC con patrón localizado .....	34
-XI.1.6.- Actividad de las fracciones obtenidas sílica gel .....	34
-XI.1.7.- Separación de las fracciones activas por SEPHADEX LH 20 .....	38
-XI.1.8.- Efecto antimicrobiano y antiadherente de las sub- fracciones .....	40

-XI.1.9.- Semi- purificación de compuestos con actividad antiadherente .....	45
-XI.1.10.- Identificación de compuestos mayoritarios de fracciones activas.....	56
-XI.1.11.- Caracterización del ácido shikimico en fracciones activas y ácido shikimico puro .....	57
-XI.1.12.- Efecto de la sacarosa y el ácido shikimico puro .....	68
<b>-XII.- Análisis de Resultados.....</b>	<b>70</b>
<b>-XIII.- Conclusión.....</b>	<b>74</b>
<b>-XIV. 1.1.- Apéndice 1 Trabajos realizados con miembros del género <i>Geranium</i> .....</b>	<b>76</b>
<b>-XIV.1.2.- Apéndice 2 Generalidades de <i>E. coli</i> y EPEC .....</b>	<b>80</b>
<b>-XIV.1.3.- Apéndice 3 Fotos de adherencia de EPEC a células HEp-2 .....</b>	<b>87</b>
<b>-XIV.1.4.- Apéndice 4 Medios .....</b>	<b>90</b>
<b>-XIV.1.5.- Apéndice 5 Soluciones y lavado de material .....</b>	<b>92</b>
<b>-XIV.1.6.- Apéndice 6 Condiciones del HPLC .....</b>	<b>93</b>
<b>-XV.- Referencias .....</b>	<b>93</b>

## Índice de Cuadros

- <b>Cuadro 1.</b> Trabajos realizados con miembros del género <i>Geranium</i> , actividades descritas y compuestos aislados .....	<b>10</b>
- <b>Cuadro 2.</b> UFC de las bacterias crecidas con y sin extracto crudo de <i>Geranium seemanni</i> .....	<b>34</b>
- <b>Cuadro 3.</b> Fracciones obtenidas de la columna de sílica gel y sistemas de elución .....	<b>35</b>
- <b>Cuadro 4.</b> Sub- Fracciones de la Fracción 3 obtenidas de la columna de SEPHADEX LH 20 eluída con etanol .....	<b>38</b>
- <b>Cuadro 5.</b> Sub- Fracciones de la Fracción 4 obtenidas de la columna de SEPHADEX LH 20 eluída con etanol .....	<b>39</b>
- <b>Cuadro 6.</b> Sub- Fracciones de la Fracción 4 obtenidas de la columna de SEPHADEX LH 20 eluída con etanol .....	<b>39</b>
- <b>Cuadro 7.</b> Señales del espectro de hidrógeno para el ácido shikimico puro y obtenido de <i>G. seemanni</i> donde se muestran los desplazamientos químicos, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento .....	<b>57</b>
- <b>Cuadro 8.</b> Señales del espectro de RMN 300 MHz de <sup>13</sup> C comparando el ácido shikimico puro y el obtenido en las fracciones de <i>Geranium seemanni</i> .....	<b>58</b>



## Índice de Figuras

-Figura 1. <i>G. seemanii</i> .....	8
-Figura 2. Acercamiento de una Célula HEp-2 en la que se observa una colonia de bacterias de EPEC tomado con un microscopio óptico .....	15
-Figura 3. Foto de una colonia Localizada tomada de Clearly <i>et al.</i> , 2004 .....	15
-Figura 4. Preparación de ensayo de adherencia .....	24
-Figura 5. Ensayo de adherencia .....	25
-Figura 6. Disposición de células HEp-2, Bacterias de <i>E. coli</i> y concentración de extracto .....	27
- Figura 7. Pozos de los cuáles se tomo una muestra de 10µL para hacer el conteo de UFC para observar un posible efecto antimicrobiano .....	28
-Figura 8. Inhibición de la adherencia del extracto crudo de <i>G. seemanni</i> sobre EPEC.....	33
-Figura 9. Inhibición de la adherencia de EPEC por fracciones de <i>Geranium seemanni</i> .....	36
-Figura 10. Efecto antimicrobiano de las fracciones de <i>Geranium seemanni</i> .....	37
-Figura 11. Inhibición de la adherencia de EPEC a Células HEp-2 por las subfracciones de la Fracción 3 de <i>G. seemanni</i> .....	40
-Figura 12. Efecto antimicrobiano de las subfracciones de la Fracción 3 de <i>G. seemanni</i> .....	41
-Figura 13. Porcentaje de inhibición de la adherencia de <i>E. coli</i> a células HEp-2 por las subfracciones de la Fracción 4 de <i>G. seemanni</i> .....	42
-Figura 14. Efecto antimicrobiano de las subfracciones de la Fracción 4 de <i>G. seemanni</i> .....	43
-Figura 15. Porcentaje de inhibición de la adherencia de EPEC a células HEp-2 por subfracciones de la Fracción.....	44
-Figura 16. Efecto antimicrobiano de las subfracciones de la Fracción 6 de <i>G. seemanni</i> .....	45
-Figura 17. ERMN <sup>1</sup> H de la F3S4.....	47

-Figura 18. ERMN <sup>1</sup> H de la F4S3 .....	47
-Figura 19. ERMN <sup>1</sup> H de la III F3S4.....	48
-Figura 20. Cromatograma de HPLC de la IIIF3S4 .....	48
-Figura 21. ERMN HETCOR IIIF3S4.....	49
-Figura 22. Espectro de UV de la IIIF3S4.....	49
-Figura 23. Inhibición de la adherencia de EPEC a células HEp-2 por fracciones de F3S4, F4S3 y F3S8.....	51
-Figura 24. ERMN <sup>1</sup> H de la F3S8.....	51
-Figura 25. ERMN <sup>1</sup> H de la AF3S8.....	52
-Figura 26. ERMN <sup>1</sup> H de la BF3S8.....	52
-Figura 27. ERMN <sup>1</sup> H de la CF3S8.....	53
-Figura 28. ERMN <sup>1</sup> H de la GF3S8.....	54
-Figura 29. ERMN <sup>13</sup> C de la GF3S8.....	55
-Figura 30. Masas de la fracción GF3S8.....	55
-Figura 31. Efecto antimicrobiano de las fracciones de F3S4, F4S3 y F3S8 sobre EPEC .....	56
-Figura 32. Estructura del ácido shikimico o (3R, 4S, 5R) –(-) 3, 4, 5 –trihydroxy – 1-ciclohexanecarboxilic acid .....	58
-Figura 33. ERMN <sup>1</sup> H del ácido shikimico .....	59
-Figura 34. ERMN <sup>1</sup> H del ácido shikimico (ampliación 2 a 5 ppm) .....	59
-Figura 35. ERMN <sup>13</sup> C del ácido shikimico .....	60
-Figura 36. ERMN DEPT del ácido shikimico .....	60
-Figura 37. ERMN HETCOR del ácido shikimico .....	61
-Figura 38. Espectro de Masas ESI del Extracto liofilizado crudo de <i>G. seemanni</i> .....	63
-Figura 39. Cromatograma de HPLC del ácido shikimico.....	63
-Figura 40. Espectro de HPLC-MS del ácido shikimico .....	64

-Figura 41. Espectro de Masas del primer compuesto obtenido por HPLC-MS del ácido shikimico.....	64
- Figura 42. Cromatograma de HPLC de la fracción IIIF3S4 .....	65
- Figura 43. Espectro HPLC-MS de la fracción IIIF3S4 .....	65
-Figura 44. Espectro de Masas del compuesto 1 obtenido por HPLC-MS de la fracción IIIF3S4	66
-Figura 45. Placa cromatográfica de azúcares eluída con un sistema metanol: acetato de etilo (2: 8).....	68
-Figura 46. Inhibición de la adherencia de EPEC a células HEp-2 por el ácido shikimico y sacarosa puros.....	69
-Figura 47. Efecto antimicrobiano del ácido shikimico y la Sacrosa sobre EPEC .....	70
<b>Apéndice 3</b>	
-Figura 1. Primer Control de adherencia de EPEC .....	87
-Figura 2. Segundo control de adherencia de EPEC .....	87
-Figura 3. Efecto del control de extracto total (10 mg/mL) sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2 .....	87
-Figura 4. Efecto del Chloramphenicol (4 µg/mL) sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2 .....	87
-Figura 5. Efecto de la Ciprofloxacina (0.01 µg / mL) sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2 .....	87
-Figura 6. Efecto de la fracción IIIF3S4 sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2 .....	87
-Figura 7. Efecto de la fracción AF3S8 sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2 .....	88
-Figura 8. Efecto de la fracción BF3S8 sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2 .....	88
-Figura 9. Efecto de la fracción CF3S8 sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2 .....	88
-Figura 10. Efecto de la fracción GF3S8 sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2 .....	88
-Figura 11. Efecto del ácido shikimico (1mg/mL) sobre la adherencia de EPEC .....	88

<b>-Figura 12.</b> Efecto del ácido shikimico (0.01 mg/mL) sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2 .....	<b>88</b>
<b>-Figura 13.</b> Efecto del ácido shikimico (0.0001 mg/mL) sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2 .....	<b>89</b>
<b>-Figura 14.</b> Efecto de la sacarosa sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2 .....	<b>89</b>
<b>-Figura 15.</b> Efecto del ácido shikimico con sacarosa sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2 .....	<b>89</b>
<b>-Figura 16.</b> Control celular con ácido shikimico (1mg/mL) .....	<b>89</b>
<b>-Figura 17.</b> Control celular .....	<b>89</b>

## Abreviaciones

A/E	Efecto de adherencia y borrado
MEM	Medio Mínimo Esencial de Eagle
	PBS Buffer de Fosfatos
	SFB Suero Fetal de Bovino
	HSV Herpes Simplex virus
	TNF Factor de necrosis tumoral
	TSA Soya Tripsina Agar
	UFC Unidades Formadoras de Colonias
	EPEC <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena
	<i>Bfp</i> Fimbria o pili característica de EPEC
Esp	Proteína secretada por <i>Escherichia coli</i>
	LEE Locus de borrado de enterocitos
	EAF Factor de adherencia entérica
	<i>Tir</i> Receptor de intimina translocado
	Per Regulador codificado en plásmido
	ARP Proteína relaciona a Actina
	CPF Cromatografía en Placa Fina
	RMN Resonancia Magnética Nuclear
ERMN	Espectros de Resonancia Magnética Nuclear
	UV Ultra violeta
	IR Infra Rojo
	MS Espectrometría de Masas
	HPLC Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPLC-MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
	N-WASP Proteína Neural del síndrome Winston - Aldrich
	OMS Organización Mundial de la Salud

## I.- Resumen

*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es uno de los agentes causales de la diarrea severa en niños menores de cinco años. La adherencia localizada al epitelio del intestino, es uno de los primeros eventos que realiza la bacteria para colonizar el tracto digestivo. El fenómeno de la adherencia resulta en la lesión de attaching / effacing (a/e) en el cuál hay un borrado de las microvellosidades de las células epiteliales del intestino delgado.

Tradicionalmente se han utilizado diferentes plantas para combatir enfermedades como la diarrea, el Geranio o Pata de León (*Geranium seemanni*) determinado por Lucio Lozada Pérez, es una de las más comunes y su uso se remonta a la época prehispánica. El objetivo del presente trabajo fué caracterizar del extracto liofilizado de *G. seemanni* compuestos con actividad de inhibición de la adherencia sobre cepas de referencia de EPEC a células HEp-2. Para tratar de identificar el o los compuestos compuestos que interfieren en la adherencia de EPEC, se fraccionó el extracto liofilizado por medio de columnas de sílica gel y SEPHADEX LH20 de manera biodirigida evaluando que los mismos no presentaran efecto antimicrobiano. Se utilizaron métodos fisicoquímicos para caracterizar el o los compuestos involucrados en el efecto de inhibición de la adherencia de EPEC.

El extracto liofilizado y algunas fracciones presentaron un efecto de inhibición de la adherencia de una cepa de referencia de EPEC a células HEp-2. También se observó que el extracto liofilizado de *G. seemanni* tuvo un efecto de inhibición de la autoagregación bacteriana en 5 cepas clínicas. Se caracterizó como compuesto mayoritario de fracciones activas el ácido shikimico, aunque el compuesto puro adquirido en Sigma-Aldrich no tuvo actividad.

## **II.1.- Introducción**

### **II.2.- Productos naturales**

Buscar poderes curativos en las plantas es una práctica muy antigua. Personas de todos los continentes por cientos, si no es que por miles de años, han bebido infusiones de plantas endémicas que datan de épocas prehistóricas. Hay evidencias de que los Neandertales que vivieron 60, 000 años atrás, usaron plantas como la hollyhock que es usada actualmente en Irak, lo cuál indica que estas plantas siguen siendo utilizadas en la etnomedicina en todo el mundo (Marjorie, 1999). Nuestro país no es la excepción ya que existe una gran tradición en el uso de plantas como remedios medicinales debido a la gran diversidad cultural y es considerado el tercer país después de Brasil y Colombia con mayor diversidad biológica (Bye *et al.*, 1995).

Por miles de años la medicina y los productos naturales han estado muy unidos a través del uso del conocimiento tradicional y pociones naturales. Estudios clínicos, farmacológicos y químicos de éstos derivados predominantemente de plantas, han sido las bases de medicamentos como aspirina, digitoxina, morfina, quinina y pilocarpina. El descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1928, su re- aislamiento y estudios clínicos por Chain, Florey y colaboradores en los 40s y la comercialización de penicilinas sintéticas revolucionaron la investigación de nuevos fármacos de origen natural (Butler, 2004).

Los productos naturales son una fuente de diferentes estructuras con diferentes actividades biológicas y perfiles farmacológicos deseables. Históricamente los productos naturales han sido fuente de nuevas drogas o fármacos. Como ejemplo el 60% de los fármacos contra cáncer y 75% de los fármacos contra enfermedades infecciosas se derivan de productos naturales (Boldi, 2004).

La utilidad de los productos naturales como fuente de nuevas estructuras, pero no necesariamente la última entidad farmacológica, sigue en vigencia y en buena forma. Los productos naturales, o productos derivados de productos naturales, siguen jugando un papel importante como fármacos y como estructuras guía para el desarrollo de moléculas sintéticas. Cerca del 50% de los fármacos introducidos al mercado durante los

últimos 20 años son derivados directa o indirectamente de pequeñas bio-moléculas. En el área antimicrobiana, la gran mayoría, 78%, de las nuevas entidades químicas son naturales o derivadas de productos naturales (Vuorela *et al.*, 2004). En un estudio realizado por Newman *et al.*, 2003 se evaluó de donde vienen los fármacos que se utilizan para combatir las enfermedades humanas que salieron de 1981 a 2002 se comprobó que los productos naturales juegan un papel muy significativo en el descubrimiento de nuevos fármacos y su desarrollo. Mucho de la naturaleza sigue siendo desconocido, particularmente los ambientes marinos y microbianos, los cuáles van a aportar nuevos compuestos bioactivos (Newman *et al.*, 2003). El porcentaje de fármacos derivados de productos naturales en el año 2000 fue de 40% y permaneció relativamente constante durante el 2001 con 24% y 2002 con 26%. Por lo tanto, a parte de ser una nueva fuente de fármacos, los fármacos derivados de productos naturales también significan ganancias para las compañías. Ha habido una introducción constante de nuevos productos naturales y derivados a los EU., Europa y Japón del 2001 al 2003. Se lanzaron un total de 15 fármacos (uno en el 2000, cuatro en el 2001, 5 en el 2002 y 5 en el 2003) los cuáles incluyeron nuevos tipos de fármacos como antimalaria y contra el Alzheimer (galantamine). Habían 15 productos naturales o derivados que se encontraban en la fase III clínica o registro para el 31 de diciembre del 2003 (Butler, 2004).

En el futuro los productos naturales seguirán siendo una fuente importante de sustancias activas, moléculas modelo para el descubrimiento y validación de blancos farmacológicos. Se necesita una aproximación multidisciplinaria en el descubrimiento de nuevos fármacos, que abarque la generación de una diversidad molecular de nuevos productos naturales, combinada con metodologías de síntesis combinatoria, para aumentar la productividad en el descubrimiento de fármacos y su desarrollo (Vuorela *et al.*, 2004).

Encontrar nuevos fármacos es una tarea compleja y persecución interdisciplinaria de química, farmacología y ciencias médicas, que ha beneficiado a la humanidad por más de 100 años. Recientemente ha habido un aumento en el interés de la investigación de los productos naturales debido a la falla de metodologías alternativas de descubrimiento de fármacos para producir compuesto que sirvan como guía en áreas



terapéuticas como inmunosupresión, anti- infecciosos y enfermedades metabólicas. Para que los productos naturales sigan siendo competitivos como alternativa para descubrir nuevos fármacos, la investigación de los productos naturales debe de mejorar la velocidad de pruebas biológicas, aislamiento y procesos de elucidación de estructuras (Butler, 2004).

### **II.1.3.- Las plantas y la diarrea**

En la herbolaria tradicional se considera a la diarrea una enfermedad principalmente “fría”. Por esta razón los remedios tomados para tratar la diarrea son plantas o mezclas que contrarrestan el tipo de enfermedad, en este caso son plantas “calientes”. Por ejemplo, un inventario de las plantas vendidas en el mercado de Sonora revela el uso principal de 5 plantas “calientes”, y el uso de otras plantas suplementarias que se añaden para proveer el balance correcto dependiendo del tipo de diarrea (disentería, con moco, líquida, etc.). Algunas de las plantas reportadas en este trabajo son: *Artemisia mexicana* (estafiate), *Waltheria americana* (tapacola), *Teloxys graveolens* (epazote de zorrillo), *Tagetes erecta* (flor de cempasúchil), *Hintonia latiflora* (quina), *Satureja oxacana* (menta verde), *Hedeoma piperitum* (tabaquillo), *Tecoma stans* (tronadora), *Buddleia scordioides* (hierba de perro), *Matricaria recutita* (manzanilla), *Peumus boldus* (boldo), *Krameria secundiflora* (clameria), *Agastache mexicana* (toronjil), *Heterotheca inuloides* (árnica) y *Equisetum myriochaetum* (cola de caballo). Otras plantas comúnmente usadas en la medicina tradicional son: *Byrsonima crassifolia* (nanche), *Larrea tridentata* (gobernadora), *Geranium mexicanum* o *seemanni* (Geranio) y *Psidium guajava* (Guayaba) (Bye *et al.*, 1995).

Se estima que de las 25,000 especies de plantas vasculares, 5,000 son o han sido usadas como remedios medicinales y, de éstas, 1,024 son empleadas para curar enfermedades del aparato digestivo. Su uso en la mayoría de los casos es empírico, por lo que en ocasiones no se sabe si su resultado es satisfactorio. En los

últimos años, se ha venido incrementando el estudio científico de las plantas, con el propósito de conocer sus principios activos y el mecanismo de acción de los mismos (Argueta, 1994).

#### **II.1.4.- El género *Geranium***

En la actualidad no hay estudios ni se tienen datos farmacológicos de *G. seemanni*, esto podrá deberse a un mal uso de *G. mexicanum* en el valle de México por los problemas taxonómicos que se acarrearán desde los estudios de Hans y Knuth en 1907 o que no se haya estudiado la especie. Por lo anterior se hizo una investigación enfocada en el género *Geranium*.

Pertenece a la familia Geraniáceas, es un género de 300 especies y está representado en México y Centro América por 43 especies. Su distribución está confinada a las zonas templadas y zonas frías montañosas del mundo. En México y Centro América, el género *Geranium* ocurre en las zonas templadas de pino – encino o zonas alpinas de las cordilleras. Todas, excepto tres de las 43 especies, son endémicas de México. Estas tres especies son *Geranium atropurpureum*, *Geranium wislizeni* y *Geranium carolinianum*, que crecen principalmente al sureste de los Estados Unidos, siendo la última especie de gran distribución. Por mucho, la gran mayoría son locales en su distribución, teniendo representantes de regiones. De las 43 especies, 11 son conocidas sólo por su localidad y otras once procedentes de diferentes estados. De las especies sobrantes, algunas presentan una distribución a lo largo de México o Centro América, y el resto son abundantes en ciertas áreas como la Sierra Madre del noreste de los estados de Durango, Chihuahua, Sinaloa y Sonora (Moore, 1943).

Su taxonomía presenta una serie de problemas que se han ido acarreando desde hace mucho tiempo. Históricamente los únicos taxónomos que se interesaron en las especies de *Geranium* de México y Centro América fueron trabajos realizados por Hanks y Small (1907) y, los trabajos de Knuth (1912). Ambos

trabajos son insatisfactorios para las especies de México y Centro América. Hanks y Small aparentemente no consultaron todos los materiales de los herbarios de América, por lo que muchas de las descripciones no corresponden a las de los especímenes tipo y los nombres están frecuentemente mal puestos. Hay numerosos errores en la guía taxonómica, así como contradicciones y las descripciones no son coherentes. Knuth, por otro lado, como es costumbre de los autores del “*Das Pflanzenreich*”, baso su estudio en ejemplares del herbario Europeo, negando las colecciones del continente Americano. Esto dio como resultado una interpretación inadecuada de las especies mexicanas. También incluyó gran parte del trabajo de Hanks y Small, sin hacer correcciones o comentarios, lo que contribuyó en la preservación de los errores que hasta entonces se habían cometido. Sin embargo, es el trabajo de Knuth y Reiche, en el *Das Pflanzenreich*, el que presenta una mejor descripción del género y fija las bases taxonómicas para las especies más representativas. En este trabajo se agrupan 250 especies en 30 secciones divididas por la duración, hábito, rizoma, follaje, tamaño de flores, tipo de inflorescencia y distribución geográfica. En 5 de estas secciones se pueden agrupar las especies de México y Guatemala que le eran conocidas, estas secciones son: *Sylvatica*, *Caespitosa*, *Incanoidea*, *Striata* y *Mexicana*. En cuanto a las especies mexicanas se encuentra una gran discordancia en cuanto a lo dispuesto por Knuth (1931). Los caracteres taxonómicos más importantes son el tipo de inflorescencia, hábito, división de las hojas, pubescencia, tamaño, vernación y pubescencia de los pétalos y tamaño del fruto (Moore, 1943).

Las características generales de *G. seemanni* es que son hierbas, raramente arbustos, que habitan de preferencia en lugares templados. Las hojas son alternas u opuestas, pecíolos con estipulas laterales; flores hermafroditas, actinomorfas, persistentes; corola de 5 pétalos; estambres en 2 series, a veces a la mitad de ellos estaminoides; gineceo con hojas modificadas, con 5 cavidades; el fruto se deshace en 5 frutitos parciales que durante la floración se encuentran soldados al eje floral que es alargado; flores perfectas de cinco pétalos de color rosa pálido a lila (**Fig. 1**). Se ha descrito que *G. seemanni* es de corta vida y que crece

en diferentes épocas del año, después de un período vegetativo. En el valle de México esta familia se encuentra representada por los géneros: *Geranium* y *Erodium*.



**Figura 1. *G. seemannii***

Detalle de flor y fruto del ejemplar colectado el 5 de agosto  
Del 2004 en el Km 28- 30 de la carretera a Oaxtepec

Por lo atractivo de sus flores y follaje los geranios también se cultivan con fines ornamentales. El nombre geranio deriva de la raíz griega *geranos*, que significa grulla, refiriéndose a la peculiar forma de los frutos que semejan el pico de esa ave, que es común de todos los geranios.

La familia se distribuye en casi todo Europa, Asia y el norte de África, de donde es originaria, y es un componente de casi todo el bosque ya que crece en una gran variedad de suelos. Es una especie bastante adaptable, que se introdujo como ornamental y que se ha extendido en muchas regiones de Norteamérica, hasta convertirse en una hierba invasiva y perjudicial, como en la zona costera Británica (Quijano, 2003).

## II.1.5.- Usos y actividades de los Geranios

La mayoría de los geranios se usan de forma tradicional para combatir las diarreas. Este género de plantas ha empezado a estudiarse recientemente y ha demostrado tener compuestos de interés farmacológico. Entre las actividades que se le atribuyen al género *Geranium* encontramos: astringentes, hemostáticas, diuréticas y cicatrizantes, contra las diarreas ligeras, dolor de muelas, hemorragias nasales, inflamación de las articulaciones, heridas y ulceraciones dérmicas y bucales, conjuntivitis, estomatitis, aftas bucales, faringitis, amigdalitis, dermatitis, eritemas, prurito, vulvovaginitis, tiene propiedades analgésicas y antisépticas (Quijano, 2003), purgante y remedio contra el dolor de los riñones (Calzada *et. al.*, 1999), tienen actividad antiinflamatoria, antiviral (Serkedjieva, 1998, 1999; Ivanova *et al.* 2005), antibacteriana (Stermitz, 2003), inhibitoria de enzimas (Kobayashi *et al.*, 2003), antioxidante y propiedades de atrapar radicales (Maldonado *et al.*, 2005); diarrea y disentería (Calzada *et. al.*, 2005) y anticancerígena (Okabe *et al.*, 2001).

En el **Cuadro 1** se resumen los trabajos que se han realizado con miembros del género *Geranium* en el mundo, así como los diferentes efectos o actividades que se estudiaron. En algunos casos se muestra los compuestos a los que se les atribuye las diferentes actividades. También se menciona que tipo de trabajo se realizó. Para una mejor descripción de cada uno de los trabajos realizados por cada uno de los autores estos se describen de manera resumida en el **Apéndice 1**.

<b>Cuadro 1. Trabajos realizados con miembros del género <i>Geranium</i>, actividades descritas y compuestos aislados</b>					
<b>Autor</b>	<b>Especie de <i>Geranium</i> estudiada</b>	<b>Originaria</b>	<b>Tipo de Trabajo</b>	<b>Actividad Probada</b>	<b>Compuestos aislados</b>
Quijano, 2003	<i>G. robertianum</i>	Europea	Fitoquímico	Analgésica y antiséptica	Monoterpenos y 13 Flavonoides
Calzada <i>et al.</i> , 1999	<i>G. niveum</i>	México	Etnobotánico y Fitoquímico	Actividad contra <i>G. lamblia</i> y <i>E. histolytica</i>	Proantocianidinas llamadas Geraninas A y B
Maldonado <i>et al.</i> , 2005			Fitoquímico	Antioxidante	Geraninas A y D
Alanís <i>et al.</i> , 2005	<i>G. mexicanum</i>	México	Fitoquímico	Contra la Diarrea y disentería ocasionada por <i>G. lamblia</i> y <i>E. histolytica</i>	(-)- epicatechina
Calzada <i>et al.</i> , 2005			Fitoquímico		Geraninas
Serkedjieva, 1998	<i>G. sanguineum</i>	Bulgaria	Fitoquímico	Contra Influenza A y B	Compuestos Polifenólicos
Serkedjieva, 1999				Contra HSV-1 y HSV-2	Taninos
Ivanova <i>et al.</i> , 2005				Estimulación del sistema inmune	Complejo polifenólico
Ivancheva, 2000			Taxonómico	Flavonoides	
Okabe <i>et al.</i> , 2001	<i>G. thunbergii</i>	Japón	Fitoquímico	Actividad anticancerígena por inhibición de TNF $\alpha$	Geraninas
Stermitz, 2003	<i>G. caespitosum</i>		Fitoquímico	Actimicrobiana	
Akdemir, 2001	<i>G. prantense</i>	Turquía	Fitoquímico	Antioxidante	Flavonoides
Kobayashi <i>et al.</i> , 2003		Mongolia	Fitoquímico	Actividad contra $\alpha$ -amilasa	Extractos metanólicos
Mendoza, 2003	<i>G. seemanni</i>	México	Fitoquímico	Actividad antiadherente	Extractos acuosos

### **III.1.- Importancia de la diarrea en el mundo**

Las enfermedades diarreicas continúan siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños de todo el mundo, siendo según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la segunda causa de muerte infantil, después de las infecciones respiratorias. De acuerdo a la OMS al año mueren 1.3 millones de niños, lo que representa 12% del total de muertes de niños menores de 5 años en los países en desarrollo. Por otro lado, aunado a lo anterior, las diarreas son la principal causa de desnutrición en niños menores.

Una revisión reciente, realizada con la intención de estimar globalmente el problema de las enfermedades diarreicas, mostró que en niños menores de cinco años la media de la incidencia del padecimiento es de 2.2 a 3 episodios anuales por niño. Según los cálculos de población de 1990, la morbi-mortalidad anual en Asia, África y Latinoamérica se estimó entre 774 y 1000 millones de episodios y de 1.5 a 5.1 millones de muertes, lo cuál equivale a que ocurren aproximadamente de 1400 a 1900 episodios diarreicos y de tres a diez muertes por minuto (Velázquez *et al.*, 2001).

#### **III.1.2.- Importancia de la diarrea en México**

En México la diarrea es la cuarta causa de muerte en los menores de un año y la segunda en los que tienen de uno a cuatro años de edad (IMSS, 2002). Diversas encuestas realizadas en nuestro país han estimado una frecuencia anual de dos a cuatro episodios diarreicos por niño en las áreas urbanas y de cuatro a nueve en las rurales. La mortalidad anual por diarrea por cada 100,000 niños menores de cinco años fue de 212.3 en 1984 y disminuyó a 60.4 en 1993. Posteriormente, al inicio de la epidemia de cólera en México, en 1991, ha habido una disminución de 15% en la notificación del problema, lo cuál se relaciona con las medidas tomadas para el control de la epidemia (Velázquez *et al.*, 2001).

#### **IV.1.- *Escherichia coli***

La colonización del intestino humano por *E. coli* se inicia en las primeras horas de vida, estableciéndose una relación benéfica ya que la bacteria obtiene nutrientes y un nicho estable y, por otro lado, sintetiza vitaminas K y B, indispensables para el buen funcionamiento de su hospedero. En condiciones naturales, las cepas de *E. coli* que conforman dicha micro biota no producen ningún daño; sin embargo, en situaciones que favorecen la salida de su hábitat natural o en individuos con trastornos inmunes, la bacteria puede causar enfermedad. En los últimos 60 años se ha demostrado la participación de esta bacteria como patógeno primario, causante de trastornos gastrointestinales. Se ha propuesto a *E. coli* como una enfermedad emergente debido a que en el proceso evolutivo han sufrido cambios (mutaciones y/o la adquisición de islas de patogenicidad), que les han conferido propiedades de virulencia mediante las cuales pueden causar tipos nuevos de enfermedad asociados a ella, incluso en individuos sin trastornos inmunes graves (Eslava *et al.*, 2001). Esta evolución y emergencia de nuevas cepas patógenas es un proceso de dos pasos. El primero es la creación de variación genética en la virulencia entre cepas en una población bacteriana por eventos de mutación, transferencia genética lateral o recombinación. Algunas de estas mutaciones se pierden por deriva génica. El segundo paso es en donde domina la selección natural y la nueva cepa virulenta tiene que dispersarse y aumentar su frecuencia en relación con otras menos virulentas. *E. coli* O 157: H7 ejemplifica este proceso de evolución en dos pasos. Las infecciones con esta cepa son del orden de 20,000 enfermos y 250 muertes principalmente en países como EU., Argentina, Alemania, Japón, Canadá e Inglaterra. Esta cepa produce colitis hemorrágica que es clínicamente distinta de los otros tipos de diarrea causadas por bacterias enteropatógenas. La adquisición de determinantes de virulencia incluyen islas de patogenicidad que codifican para factores de adherencia intestinal, genes de fagos que codifican para citotoxinas poderosas, así como proteínas de estrés que le confieren resistencia a ácido (Whittam, 1998). En México se



ha visto que este tipo de cepa se relaciona sólo con diarrea de tipo secretor leve o moderado y no existen reportes de cuadros de colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico (Eslava *et al.*, 2001).

En los últimos años, el conocimiento sobre *E. coli* causante de diarrea en humanos ha tenido importantes avances, lo que ha dado lugar a que en la actualidad se reconozcan principalmente cinco grupos: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) y *E. coli* enteroagregativo (EAEC), identificados tanto por sus mecanismos de patogenicidad como por sus características epidemiológicas y antigénicas (Eslava *et al.*, 2001). Algunos autores reconocen un tipo más de *E. coli* (DAEC) que adhiere difusamente (Polotsky *et al.*, 1997), aunque hay mucho debate acerca de si puede o no ser causante de diarreas y el hecho de que pueden estar involucradas en infecciones del tracto urinario (Forestier *et al.*, 1996). Otro grupo que también se menciona es el (STEC) o *E. coli* que produce una toxina tipo Shigella, que es igual a EHEC (Law, 2000). Por último, se menciona otro grupo el (AEEC) para las *E. coli* que causan lesiones de adherencia y destrucción, que reuniría a los grupos EPEC y EHEC antes mencionados como subgrupos (Beutin *et al.*, 2003).

#### **IV.1.2.- Adherencia**

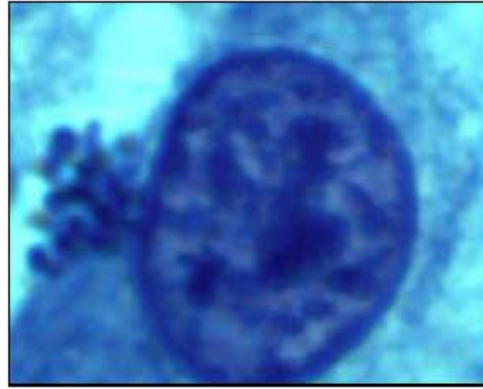
De acuerdo con una teoría bien aceptada, los organismos patogénicos deben de adherirse a las superficies celulares para tener un soporte que les permita posteriores interacciones que resulten en el establecimiento y la enfermedad. El huésped tiene numerosas barreras innatas, que pueden ser generales o específicas para particulares formas de entrada, que impiden la colonización. Entre estas barreras están la desecación, acidez, mucosa, enzimas antimicrobianas y péptidos, peristalsis, exfoliación celular y la competencia con la microflora. A parte de que la carga neta negativa que prevalece en la superficie de los microorganismos y las células del huésped causan una repulsión electroestática que contrarresta uniones débiles o no específicas

de los patógenos a las células. Por todo esto la adherencia bacteriana requiere de una unión fuerte y específica entre ligandos moleculares en la superficie del patógeno y receptores en la superficie celular del huésped. Sin este tipo de adherencia o unión los microbios estarían desarmados para resistir en el huésped (Nougayrède *et al.* 2003). Pasando el estómago, las bacterias viables deben de adherirse a la mucosa del intestino para impedir su desprendimiento por el constante flujo peristáltico. Aún en zonas relativamente estancadas, tales como el colon y el tracto vaginal, el movimiento Browniano puede separar de la superficie tisular a las bacterias que no logran fijarse con firmeza a las células del hospedero (Law, 2000; Velasco *et al.*, 2000).

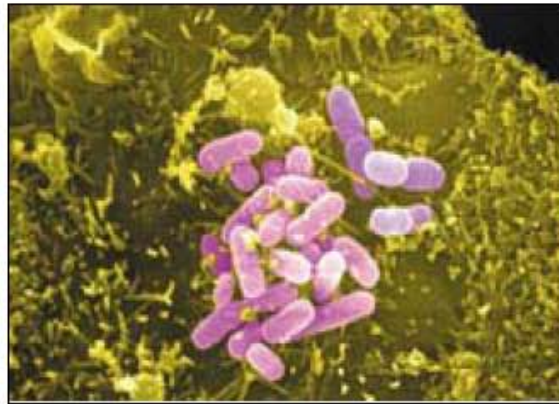
#### **IV.1.3.- *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**

El término EPEC fue acuñado por Nataro *et al.*, 1996 hace medio siglo para indicar los serogrupos de *E. coli* asociados con la diarrea y por muchos años estos organismos fueron identificados rutinariamente por sus serogrupos “O”. Después de mucho tiempo se vio que no había un consenso de estos serogrupos O de EPEC por lo que el OMS convocó a una reunión en 1987 para definir los serogrupos. Según esta reunión los siguientes serotipos O se iban a considerar EPEC: O 26, O 55, O 86, O 114, O 119, O 125, O 126, O 127, O 128, O 142 y O 158. Para esta época ya había estudios que mostraban que esos serogrupos contenían diferentes tipos diarrogénicos pero sus diferencias patogénicas todavía no eran evidentes (Campos *et al.* 2004). *E. coli* enteropatógena son causantes de diarreas agudas en niños en los países en desarrollo. Otros síntomas son el vómito y fiebre. Los brotes de EPEC en países desarrollados eran comunes en los años 40’s y 50’s, pero su incidencia ha ido disminuyendo desde entonces. Sin embargo EPEC sigue siendo importante en brotes ocasionales en guarderías y centros pediátricos. EPEC sigue siendo un importante patógeno causante de mortalidad infantil en países en desarrollo, que reportan una mortalidad de 30% en los últimos brotes. La infección con EPEC se estima que causa la muerte de cien mil niños por año (Velasco *et al.*, 2000).

Presenta principalmente una adherencia de tipo localizado (**Figuras 2 y 3**) aunque se han encontrado cepas con un patrón difuso. En el presente trabajo se estudió la inhibición de la adherencia del patrón localizado.



**Figura 2. Acercamiento de una Célula HEp-2 en la que se observa una colonia de bacterias de EPEC tomado con un microscopio óptico**



**Figura 3. Colonia Localizada de Clearly *et al.*, 2004**

#### **IV.1.4.- Formación del pedestal por la adherencia de *Escherichia coli* enteropatógena**

*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es uno de los agentes causales de la diarrea severa en niños menores de cinco años. La adherencia al epitelio del intestino, es uno de los primeros eventos que realiza la bacteria para colonizar el tracto digestivo. La adherencia de EPEC presenta tres pasos primordiales y bien

caracterizados; el primero es la adherencia a la célula blanco por mecanismos que todavía no se conocen detalladamente y la formación de la microcolonia característica del patrón localizado mediada por *bfp*. El segundo paso es la inserción del receptor translocado de intimina (*tir* por sus siglas en inglés) y las proteínas secretadas por EPEC (Esp's por sus siglas en inglés). El tercer paso es la adherencia íntima que se presenta después de que *tir* es fosforilada y se une a la intimina, lo cuál genera una serie de cambios de citoesqueleto en la célula formando el llamado pedestal. Por último se da el fenómeno de attaching / effacing (a/e) en el cuál hay un borrado de las microvellosidades de las células epiteliales del intestino delgado. Estos procesos se describen de una manera más detallada en el **Apéndice 2**.

#### **IV.1.5.- Importancia de *Escherichia coli* como patógeno causante de la diarrea en**

##### **México**

*E. coli* es uno de los patógenos más comúnmente aislado en casos de diarreas. Pero identificar si es parte de la micro biota intestinal o patógeno es un problema. Uno de los grandes problemas para evaluar el verdadero impacto de *E. coli* que causan diarrea en el mudo y en México ha sido el hecho de que no se cuentan con técnicas de diagnóstico rápidas y baratas. Desafortunadamente, las técnicas bioquímicas tradicionales del laboratorio microbiológico permiten identificar a estos grupos de *E. coli*. Inicialmente en los años 70 algunas de estas cepas fueron identificadas utilizando la técnica de asas ligada de conejo (para el caso de toxinas), que como es obvio esta técnica sólo permite identificar un número muy limitado de muestras y no permite diferenciar de cual grupo de *E. coli* se trata. Posteriormente vinieron ensayos en células, o inmunológicos, los cuales son muy caros. Actualmente se utilizan técnicas de biología molecular dando lugar a una búsqueda más exhaustiva de la presencia de estas cepas en brotes o casos de diarrea, pero aún estas técnicas moleculares como el “colony blot” son laboriosas y costosas. Las enfermedades diarreicas en México continúan siendo de gran importancia en la Salud Pública Nacional, son la segunda causa de

morbilidad, reportándose más de 4600 millones de casos en 1999. Por Lo tanto es de suma importancia evaluar y conocer el porcentaje de éstas enfermedades que son producidas por las *E. coli* que causan diarrea (García, 2000).

Sin embargo, existen evidencias epidemiológicas que incriminan a los diferentes serogrupos de *E. coli* como agentes responsables de la patogénesis de la diarrea, observándose una tasa muy alta de morbilidad infantil en diferentes regiones del mundo, principalmente en países en desarrollo. En México, en estudios con niños menores de cinco años con un cuadro clínico de diarrea, se reporta como el patrón más frecuentemente aislado al agregativo, observándose en niños con diarrea aguda con y sin sangre. La adherencia difusa se observó en niños con diarrea aguda en quienes se identificó otro patógeno (Rotavirus, Adenovirus, *Salmonella* y *Shigella*), por lo cuál se puede señalar que cepas que presentan este tipo de adherencia no tienen una importancia clínica en la patogénesis de la diarrea. El grupo de *E. coli* que presenta adherencia localizada, se asocio principalmente a casos de diarrea aguda sin sangre, en otras palabras cepas EPEC. Se reporto que el 86% de las cepas que presentan adherencia correspondiente a los patrones localizado y agregativo, se han relacionado en otros estudios de niños con cuadros de diarrea. Se ha demostrado que ETEC tiene una lata frecuencia (18-22%) como agente causal de la diarrea (Reyes, 2000).

En estudios de Mathewson *et al.*, 1987 probaron que las cepas que se adherían a células HEP-2 que no eran del tipo de EPEC eran las causantes de las diarreas de los turistas que visitaban México. En este estudio se concentraron en 154 muestras de niños con diarrea aguda y 137 niños sin diarrea, y observaron las propiedades enteroadherentes de estas muestras. Las cepas que tuvieron una adherencia localizada fueron 13% de los niños enfermos y 0.7% de los niños sanos. Cepas con adherencia difusa tuvieron un total de 20.8% de los niños enfermos y 7.3 % en los sanos. Cepas EPEC fueron aisladas en un 4.5% de pacientes enfermos y en un 6.7% en controles. De las cepas que adherían de forma localizada un 20% pertenecían a

serogrupos EPEC reconocidos, y de las que presentaban una adherencia difusa 3.1% pertenecían también a serogrupos EPEC reconocidos.

En otros reportes de frecuencia de aislamiento de *E. coli* se ha reportado para las ETEC un 28% en condiciones endémicas y 65% en condiciones de brote; para las EIEC en un 11% en condiciones endémicas y 0.8 en condiciones de brote; para las EPEC en condiciones endémicas en un 6 % y en condiciones de brote en un 0.7%; para las EHEC en un 5% en condiciones endémicas y 0.08% en condiciones de brote; para las no patógenas en un 50% en condiciones endémicas y 33% en condiciones de brote (Flisser *et al.*, 2002).

En otro estudio de 1997 a 1999 se recibieron 12658 cepas de *E. coli* aisladas de cuadros de diarreas. Se encontró que el 58% de estas eran cepas patógenas de *E. coli*. El 37% de las cepas fueron ETEC siendo así, el grupo más importante capaz de producir diarrea, principalmente en niños menores de dos años de edad. De EIEC la frecuencia fue de 10%, y de EPEC de 7%. La frecuencia de EHEC fue la más baja encontrándola sólo en un 4% de los casos. La alta frecuencia de ETEC en niños menores de dos años, puede estar asociada al hecho de que es en esta edad cuando los niños dejan de ser amamantados. El grupo EIEC que da un cuadro clínico semejante al *Shigella* sp., no causó diarrea con moco y sangre como se esperaba. El grupo EPEC se encontró también en niños menores de 2 años principalmente. En cuanto a las EHEC ninguna era O157:H7 y la diarrea que causó no se presentó con sangre ni era asociada a HUS (síndrome urémico hemolítico) (Rodríguez *et al.*, 2001).

Por último, Meza Aguilar (2005) muestra la importancia de EPEC en México. En este estudio se aislaron entre el mes de Noviembre del 2003 y Marzo del 2004 de hospitales de Culiacán, Sinaloa; se estudiaron 98 muestras de niños con y sin diarreas menores de 5 años con promedio de 18 meses para los niños con diarrea y 32 meses para el grupo control. Las cepas identificadas como *E. coli* se caracterizaron por

tipificación serológica para establecer el grupo patógeno al que correspondían. Se identificaron 470 cepas de *E. coli* (231 de niños con diarrea y 239 sin diarrea), de las cuales se tipificaron 369 (78.5%). El grupo patogénico que se aisló con más frecuencia fue EPEC y fue el único patotipo que fue aislado de manera significativa de niños con diarrea. La frecuencia de aislamiento de EPEC fue de 31% de niños con diarrea y de un 2% de niños sin diarrea. De los demás patotipos de *E. coli* se aislaron en una frecuencia de 18% el ETEC, 10% el EAEC y del 20% para el EHEC. De estos patotipos los ETEC y EAEC no fueron aislados significativamente de niños con diarrea, presentando una frecuencia similar con muestras de niños sin diarreas. Por último el EHEC fue aislado significativamente de niños sin diarrea, es decir la frecuencia de aislamiento de niños sin diarrea fue de 47%, mucho mayor que la frecuencia de 20% en niños con diarrea. En este estudio no se aislaron cepas DAEC y EIEC. Estos resultados coinciden con un estudio realizado en Morelos, México, con un cohorte de 75 niños seguidos a lo largo del primer año de vida, en el cuál se demostró que los grupos EPEC (64%) y EHEC (82%) eran los patógenos más frecuentemente aislados de los niños que presentaban diarrea (Cravioto *et al.*, 1990). Las diferencias en el aislamiento de EHEC entre estos dos estudios podrían deberse a los métodos de identificación como la zona geográfica. Lo importante es que EPEC fue frecuentemente y significativamente aislado de niños con diarrea, lo cuál reitera la importancia de este patógeno.

## V.- Planteamiento del problema

En México existe, en la práctica, un sistema plural o mixto de la atención a la salud en el que coexisten la medicina profesional, la tradicional y la doméstica o casera. Para amplios sectores de la sociedad mexicana, y en particular los indígenas, la medicina tradicional constituye el principal o único recurso para la atención a la salud; para otros, mucho más numerosos, la medicina tradicional es una alternativa complementaria a la medicina profesional (Sepúlveda, 1994). La terapia antibacterial presenta métodos alternativos a la medicina alópata, entre éstos la aplicación de extractos acuosos de plantas medicinales es uno de los principales ante la escases de recursos económicos. Sin embargo, los mecanismos de acción de muchas plantas aún no se han esclarecido por lo que su estudio resulta de gran importancia (Turi *et al.*, 1997). Las especies del Geranio han sido usadas en todo el mundo por diferentes culturas contra malestares estomacales y diarreas, sin embargo, el estudio de los mecanismos de acción específicos contra dichos padecimientos no se han realizado.

La mayoría de los estudios que se han realizado para caracterizar los compuestos activos de esta planta han sido enfocados a la búsqueda de antimicrobianos o sustancias bacteriostáticas y aunque se han identificado fracciones con una o ambas propiedades un gran número de otras más no poseen tales actividades. Ante la perspectiva de que la planta tiene propiedades curativas se ha planteado la posibilidad de que las fracciones sin actividad antibiótica presenten otro tipo de propiedades. Al respecto se ha propuesto que el efecto de dichas fracciones interfiera en los procesos de colonización de los microorganismos causantes de las diarreas. Estudios previos sobre inhibición de la adherencia inducida por extractos de plantas han sido realizados en nuestro laboratorio por Vázquez, 2001 y por Rodríguez, 2001.



Algunos de los estudios sobre inhibición de la adherencia han utilizado antimicrobianos conocidos en dosis no letales. En dichos estudios se menciona que el efecto de inhibición de la adherencia se debe a diferentes factores como es el caso de una disminución en la producción de fimbrias, a cambios en la composición o expresión de proteínas de la membrana externa y a cambios en las propiedades eléctricas e hidrofóbicas de la superficie de *E. coli* (Desnottes *et al.*, 1989; 1992; 1994).

En relación a los extractos naturales se ha propuesto la participación de las lectinas de plantas y frutas, al respecto se cuenta con resultados positivos en extractos de calabaza, chayote, naranja, ciruela, papaya, marrubio, salvia, manzanilla y ruda, sobre *E. coli* O157:H7 (Rodríguez, 2001), sin embargo, no se conoce si en el caso específico del geranio son las lectinas, o compuestos con propiedades de antibiótico o se trata de efectos específicos sobre las estructuras bacterianas implicadas en la adherencia.

## **VI.- Justificación**

La adherencia es uno de los pasos determinantes en el proceso infeccioso de las bacterias (Deitsch *et al.*, 1997) y su inhibición podría ser una alternativa muy importante en la cura y / ó prevención de las diarreas y otras enfermedades. En los últimos años se han estudiado los efectos de extractos de plantas, así como de dosis no letales de antimicrobianos conocidos y cambios de osmolaridad por sales, sobre la adherencia de las bacterias a células, observando en algunos casos efecto de gran inhibición. Algunos de los compuestos que se piensa tienen este tipo de actividad son lectinas, carbohidratos y pequeños péptidos. Estos compuestos se encuentran en extractos acuosos de las plantas y podrían estar envueltos, junto con compuestos con actividad antimicrobiana moderada, en la inhibición de las bacterias a las células y por consiguiente, una mejoría del padecimiento al ingerir las plantas que los poseen.

## **VII.- OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar de *Geranium seemanni* compuestos que inhiban la adherencia de EPEC, que posteriormente puedan ser usados para prevenir o tratar la diarrea.

## **VIII.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Obtener el material vegetal e identificarlo.
- 2.- Obtener extractos liofilizados crudos de *Geranium seemanni*.
- 3.- Evaluar la actividad antiadherente y / ó antimicrobiana de *G. seemanni*.
- 4.- Aislar el compuesto responsable del efecto de inhibición de la adherencia
- 5.- Caracterizar químicamente el compuesto responsable del efecto de inhibición de la adherencia

## **IX.- HIPÓTESIS**

Si el extracto liofilizado de *G. seemanni* tiene compuestos con actividad antiadherente y/o antimicrobiana sobre *E. coli*, entonces el fraccionamiento de los mismos facilitará su caracterización química e incrementará su actividad biológica.

## **X.1.- MATERIAL Y MÉTODO**

### **X.1.2.- Material vegetal**

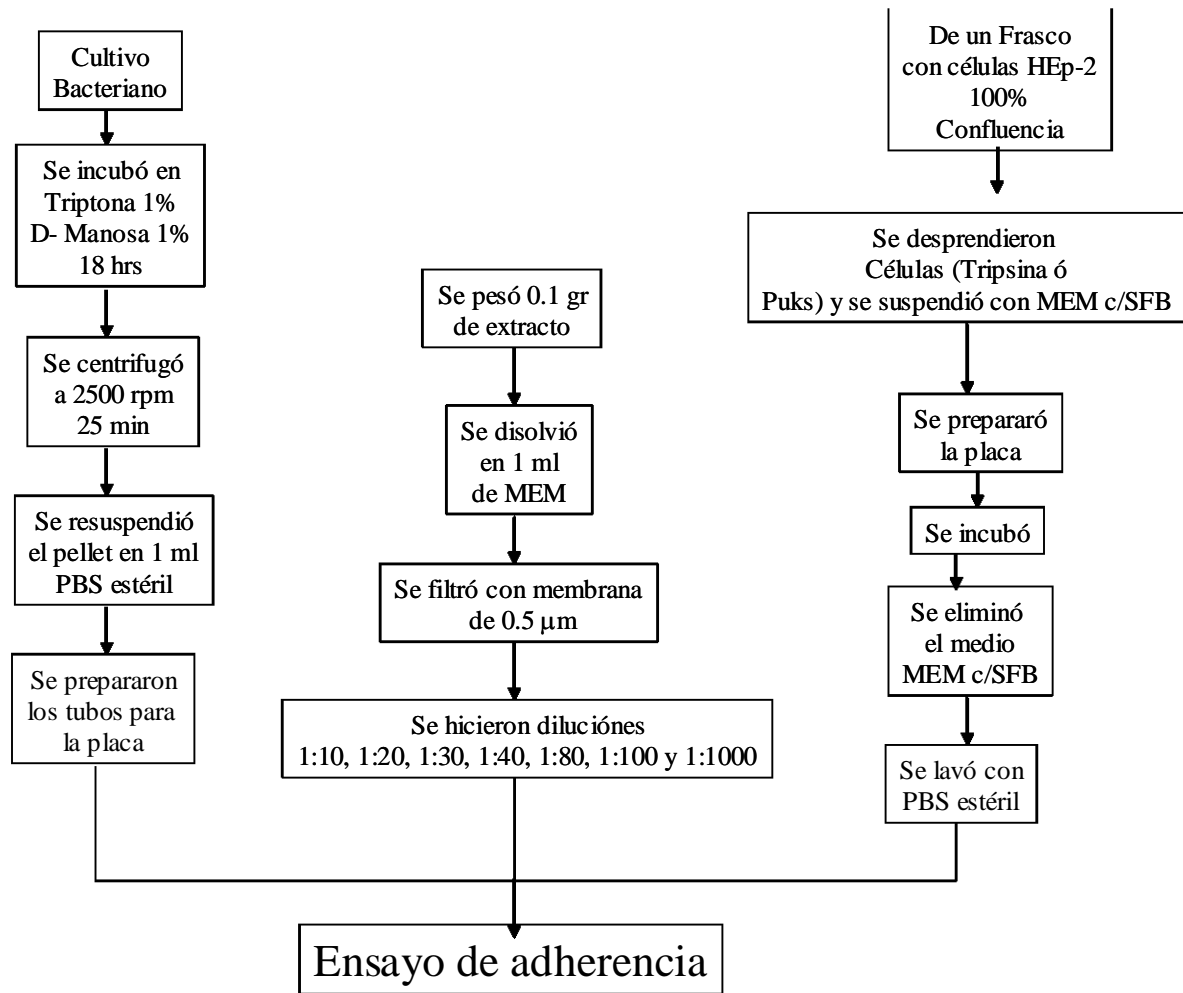
La parte aérea de *G. seemanni* fue colectada en el Km 28-30 de la carretera a Oaxtepec, municipio de Santa Ana Tlacotenco de Milpa Alta en agosto del 2003 y 2004. Se colectaron ejemplares de herbario los cuáles fueron identificados y depositados en el herbario del MEXU con el número de registro 1166937.

### **X.1.3.- Obtención del extracto acuoso de manera caliente y obtención del extracto liofilizado de *Geranium seemanni***

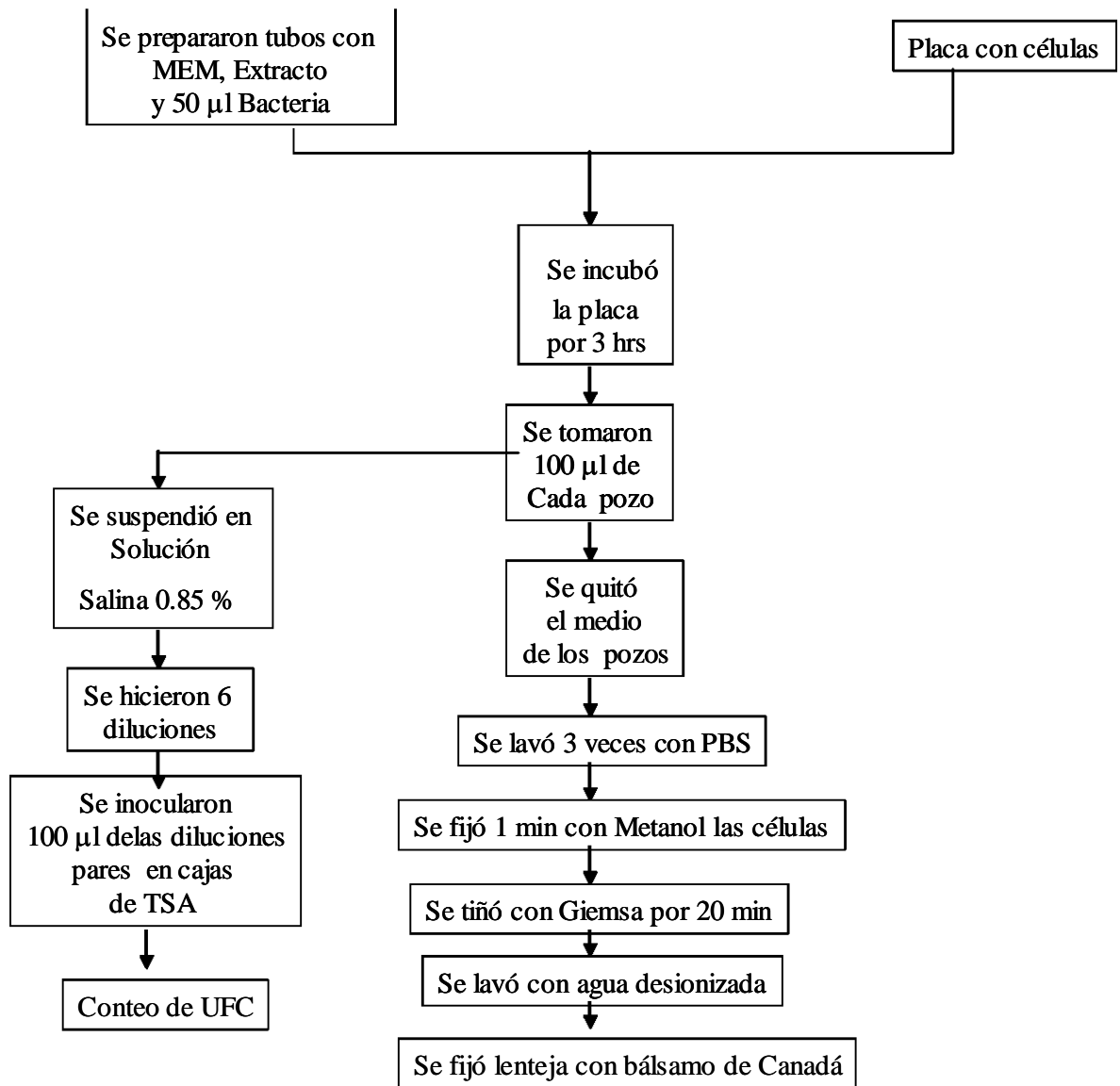
Se pesaron en total 8 lotes de 25 g de las partes áreas de *G. seemanni* (200 g de planta en total), cada lote se extrajo con 500 mL de agua caliente durante 30 minutos, posteriormente fueron filtrados y liofilizados. Los rendimientos se obtuvieron por diferencias de peso y se almacenaron a 4 °C.

### **X.2.1.- Inhibición de la adherencia**

Se realizaron ensayos de adherencia a células HEp-2; utilizando el método propuesto por Cravioto y cols. (1979) con algunas modificaciones (**Figuras 4 y 5**).



**Figura 4.** Preparación de ensayo de adherencia



**Figura 5.** Ensayo de adherencia

### **X.2.2.- Preparación de extracto liofilizado crudo, fracciones, sub- fracciones y antimicrobianos para el ensayo adherencia**

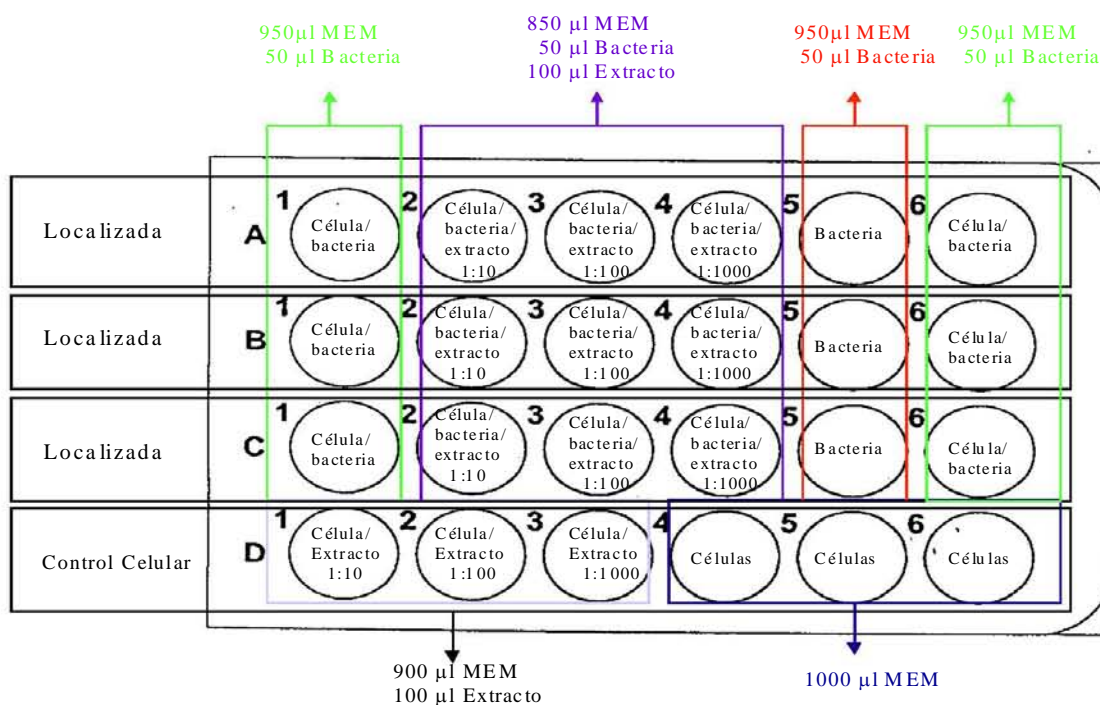
Se pesó 0.1 g del extracto a probar en un tubo eppendorf, se le agregó 1 mL de MEM (**Apéndice 4**) sin SFB para diluir y se filtró por una membrana Fluoropore estéril (Millipore FHLPO1300), con un poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y 13 mm de diámetro. El filtrado se colectó en tubo eppendorf estéril para obtener la dilución 1:10, posteriormente en condiciones de esterilidad se hicieron las siguientes diluciones con MEM: 1:20, 1:40, 1:80, 1:100 y 1:1000.

Las fracciones y subfracciones se prepararon de la misma manera pero pesando 0.01g. Para preparar los controles positivos antimicrobianos (ciprofloxacina (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sulfato de gentamicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y chloramfenicol (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )) se pesaron 0.01g de ciprofloxacina y sulfato de gentamicina, y 0.04 g de chloramfenicol y se hicieron diluciones hasta tener un stock con una concentración 10 veces mayor de la deseada para que a la hora de diluirlo en los pozos a 1 mL se tuviera la concentración deseada.

### **X.2.3.- Preparación de inóculo bacteriano**

Se inoculó una cepa control del patrón de adherencia localizada con clave FMU 89302, (E2348/69) serotipo O127:H7 de *E. coli* durante 18 horas a 37<sup>0</sup> C, en agitación (150 rpm) en tubos con 3 mL de caldo Triptona al 1 % (**Apéndice 4**) con D-manosa al 1 % (**Apéndice 4**). El cultivo obtenido se centrifugó 25 minutos a 2500 rpm, se eliminó el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendió en 1 mL de amortiguador de fosfatos PBS (**Apéndice 5**). Se preparó un tubo estéril por cada pozo de la placa en los cuáles se agregaron 50  $\mu\text{L}$  del inóculo bacteriano (excepto los controles celulares), 850, 950 y 1000  $\mu\text{L}$  de MEM sin SFB

(dependiendo del pozo) y 100  $\mu$ L del extracto (excepto controles celulares y bacterianos). La forma en la que se preparó los inóculos bacterianos se esquematizan en la **Figura 6**. Se utilizaron dos placas para las diferentes diluciones.



**Figura 6.** Disposición de células HEp-2, Bacterias de *E. coli* y concentración de extracto

### X.2.4.- Preparación de Células HEp-2

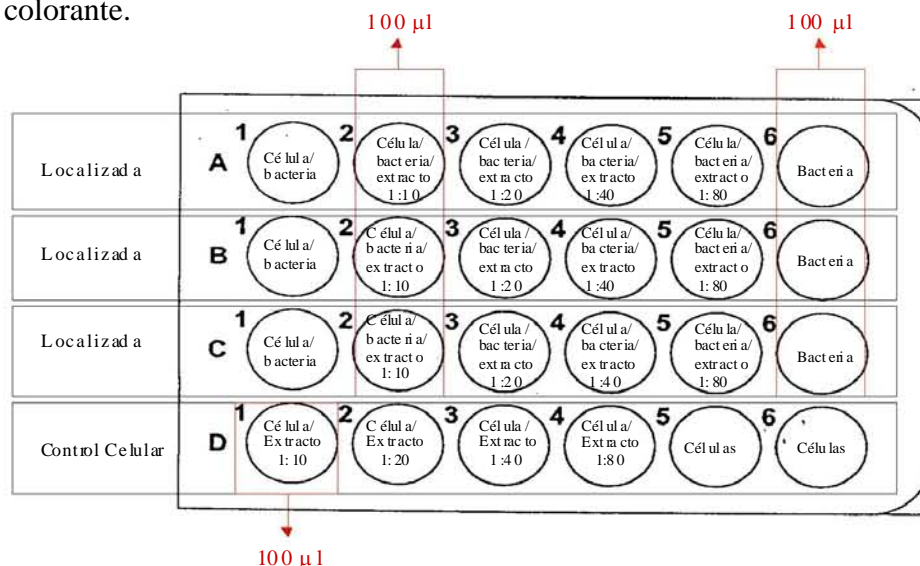
Las células HEp-2 de una botella para crecimiento celular de 250 mL con 100% de confluencia (cantidad de células) se lavaron con 2 mL de solución de PUKS (**Apéndice 5**) desechando el sobrenadante por el lado contrario de la monocapa. Se agregaron otros 2 mL de la solución de PUKS y se incubó por 3-5 minutos, hasta que la monocapa celular se puso turbia. Las células se resuspendieron en 25 mL de MEM. Previamente se había preparado una placa de propileno de 24 pozos colocando una lenteja (cubreobjetos redondo estéril) en cada pozo a excepción de los pozos en los que no se iban a crecer las células (**Figuras 6**). Se agregó 1 mL de células resuspendidas a cada pozo que contenía la lenteja. A los pozos donde no se



crecieron las células no se les agregó nada. La placa se incubó a 37 ° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5% y 85 % de humedad durante 24 horas para obtener una monocapa de 90 al 95 % de confluencia. Antes de inocular las cepas de *E. coli* se retiró de cada pozo con células el medio con una pipeta Pasteur y se lavó tres veces con PBS estéril para quitar los residuos de medio.

### X.2.5.- Ensayo de adherencia

Se agregó a los pozos previamente lavados con PBS el inóculo bacteriano con el extracto a probar (**Figura 5**). Las placas se incubaron por 3 horas a 37 ° C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, después de este periodo, de los pozos 2A, 2B, 2C , 5A, 5B, 5C y 6A (**Figura 7**) se tomaron 100 µL en condiciones de esterilidad. Para visualizar el efecto de los extractos se descartó de cada pozo el resto del medio de cultivo y se lavó tres veces con 1 mL de PBS, con la finalidad de quitar las bacterias no adheridas a las células. La preparación se fijó con 1 mL de metanol por 1 minuto, posteriormente se adicionó 1 mL de colorante de Giemsa dejando teñir durante 20 minutos; cada pozo se lavó nuevamente tres veces con 1 mL de agua desionizada para eliminar el exceso de colorante.



**Figura 7.** Pozos de los cuáles se tomo una muestra de 10µL para hacer el conteo de UFC para observar un posible efecto antimicrobiano

Las lentes teñidas se sumergieron 30 seg. en cada una de las siguientes soluciones: Acetona 1; acetona 2; acetona / xileno (vol / vol), xileno 1; xileno 2 para deshidratar las células.

Para observar al microscopio las lentes se colocaron en un portaobjetos y se fijaron con bálsamo de Canadá, colocando la lente con la monocapa celular hacia abajo, las preparaciones una vez secas se observaron con el objetivo de inmersión.

De cada experimento se hicieron 3 repeticiones en dos placas. Se analizaron 10 campos por preparación, se contó el número de células colonizadas (que tuvieran colonias adheridas) para determinar el porcentaje de células infectada. Se comparó el número de células infectadas del control contra el de los extractos y se enlistaron los cambios o daños que se observaron en las células de cada una de las muestras.

#### **X.2.6.- Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC)**

Se hicieron 6 diluciones seriadas en solución salina (0.85 %), con 100  $\mu$ L tomados de cada uno de los pozos. Se inocularon 100  $\mu$ L de las diluciones pares (dilución 2, 4, y 6) en cajas de TSA y se sembraron con un asa triangular para dispersar las bacterias y contar las UFC. Se incubaron por 18 horas y se contaron las UFC. Se utilizaron controles positivos antimicrobianos. Se graficaron los datos de UFC de los antimicrobianos, pozos con extractos y fracciones, así como de los controles bacterianos para compararlos.

#### **X.2.7.- Prueba t de Student**

La prueba de t de Student se realizó comparando el número de UFC sin extracto contra el número de UFC con extracto. La Prueba de “t” de Student se realizó en Excel con una cola debido a que los datos que se

esperaban eran inferiores a los del control, es decir tenían una dirección. Los estadísticos con dos colas se hacen cuando los datos no tienen una dirección establecida. Por último se tomó en cuenta el tipo de estadísticos con datos pareados y un grado de libertad debido a que era el que mejor se ajustaba a las condiciones del ensayo. Para el caso del pozo D1, sólo se hizo una dilución y se inoculó una caja petri con TSA con tapa cerrada para descartar la posibilidad de contaminación por el extracto.

### **X.2.8.- Imágenes**

Se tomaron imágenes (100x) de los diferentes ensayos en un microscopio de luz (Microscopio ZEISS AX10LAB HBO 50 conectado a una cámara Cool Snap –Pro, Color and Integrated Solution, Media Cybernetics The Imaging Experts) y se capturaron en el programa LAB WORK 45, posteriormente se editaron en el programa Adobe Photoshop 4.0. (**Figuras 1 a la 17 del Apéndice 3**).

### **X.2.9.- Prueba de cepas clínicas con el extracto crudo**

El inóculo bacteriano de las cepas clínicas se preparó de la misma forma antes mencionada (en “Preparación de inóculo bacteriano”). Se utilizaron 5 cepas, de 15 que nos fueron provistas por la facultad de Medicina, que presentaron un patrón localizado definido y repetible (3 repeticiones en total). Las cepas que se escogieron fueron: FMU 47767, FMU 40824, FMU 48473, FMU 89461 y FMU 40824. Se probó la actividad de inhibición de la adherencia de estas cepas clínicas sólo con la dilución más alta del extracto liofilizado de *G. seemanni*, es decir 10mg/mL. El extracto liofilizado se preparó de la misma forma antes mencionada.

### **X.3.1.- Obtención de fracciones y probar actividad de inhibición de la adherencia del patrón localizado de *E. coli* a células HEP-2 así como antimicrobiana**

Para la separación y el aislamiento de los principios activos se utilizaron técnicas cromatográficas de columna y placa fina.

El extracto liofilizado (13g) fue fraccionado en una cromatografía de columna usando como fase estacionaria gel de sílice con una partícula 75-120 y como fase móvil se utilizó acetato de etilo 100%, mezclas de acetato de etilo – metanol incrementándose gradualmente la polaridad hasta metanol – agua 9.5: 0.5.

Se recuperaron 85 alícuotas de 250 mL las cuáles fueron concentradas a presión reducida y mediante CPF se juntaron por similitud obteniéndose 10 fracciones. A cada fracción se le evaluó actividad antiadherente y antimicrobiana en una concentración de 1 mg/mL.

Las fracciones activas se separaron por medio de una columna de filtración de SEPHADEX LH20. La columna se eluyó con etanol, se colectaron alícuotas de 10 mL y se concentraron a presión reducida y mediante CPF se juntaron por similitud. Se evaluó la actividad antiadherente y antimicrobiana de cada subfracción en una concentración de 1mg/mL.

Por último se utilizaron métodos químicos así como cromatográficos (columna SEPHADEX LH20, placa preparativa, HPLC y HPLC-MS) para aislar los compuestos con actividad antiadherente.

#### **X.4.1.- Caracterización de los compuestos activos**

La caracterización de las estructuras se realizaron mediante estudios espectroscópicos (UV, IR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C y MS).

## **XI.1.- RESULTADOS**

### **XI.1.2.- Material vegetal**

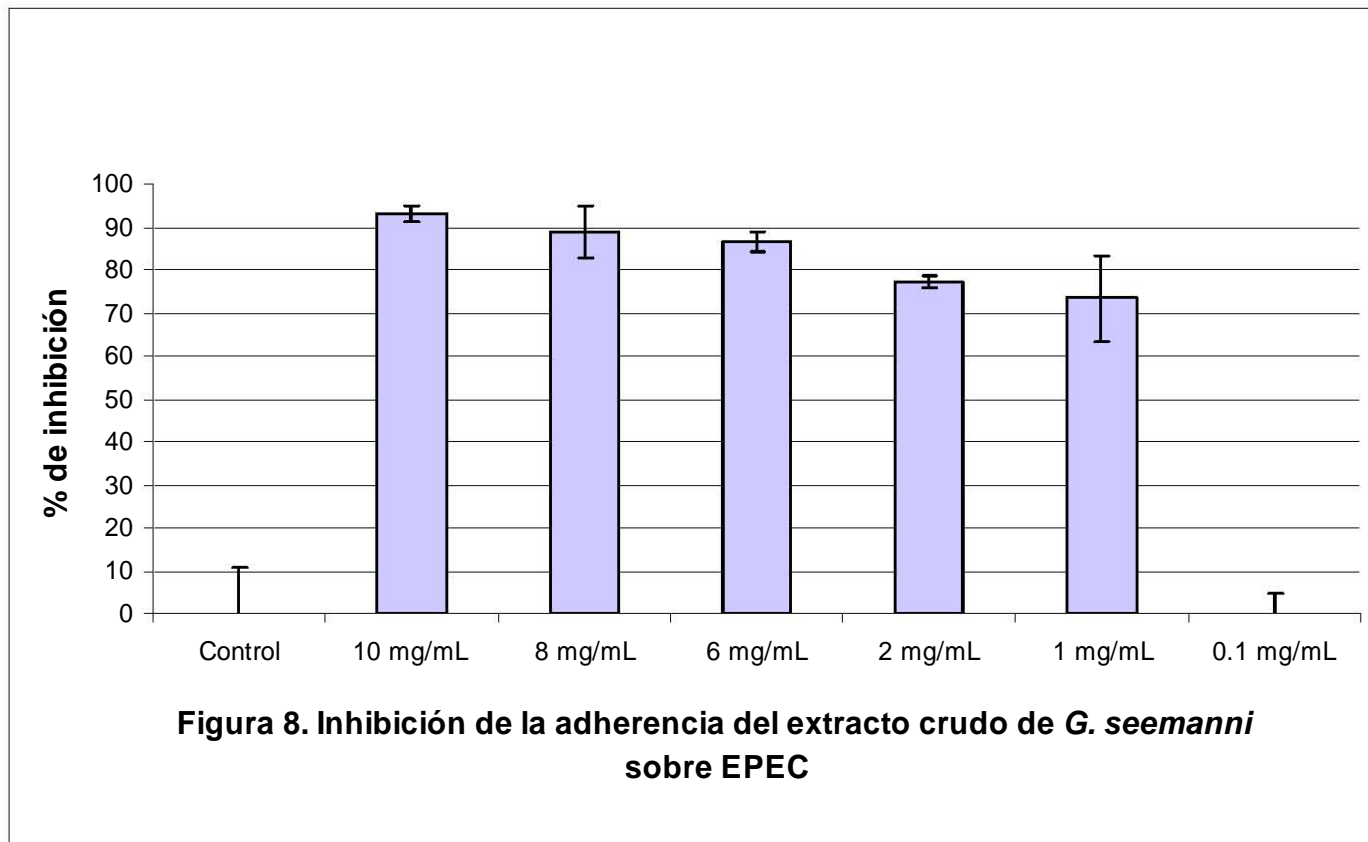
Los ejemplares colectados presentaban flor y fruto y fueron identificados por el Dr. Lucio Lozada Pérez en el laboratorio de plantas vasculares de la Facultad de Ciencias como *G. seemanni* y fueron depositados en el Herabrio MEXU con el número de registro 1166937.

### **XI.1.3.- Obtención del Extracto Liofilizado Crudo**

El rendimiento obtenido del extracto liofilizado fue del 10.01% (20.02 g).

### **XI.1.4.- Efecto antiadherente y antimicrobiano del extracto liofilizado crudo de *Geranium seemanni***

En cuanto a la evaluación del efecto antiadherente del extracto liofilizado de *G. seemanni* se observó un efecto de dosis respuesta ya que al aumentar la concentración aumentó la inhibición y a una concentración de 10 mg/mL se observó el 93% de inhibición (**Figura 8**).



Se muestran imágenes del control de adherencia de EPEC (**Figuras 1 y 2 del Apéndice 3**) e imagen del extracto liofilizado crudo de *G. seemanni* (**Figura 3 Apéndice 3**) en las cuáles se observa las diferencias en cuanto a colonias localizadas de EPEC adheridas a células HEp-2.

Para determinar si la inhibición de la adherencia pudiera estar relacionada con efecto antimicrobiano de los compuestos del geranio, se realizaron ensayos para conocer el efecto de las mismas sobre el crecimiento de la bacteria. Al evaluar las UFC se observó que ninguna de las concentraciones utilizadas inducía efecto antimicrobiano ( $P < 0.05$ ) (**Cuadro 2**) (**Figuras 4 y 5 del Apéndice 3**). Lo anterior permite establecer que no hay compuestos con actividad antimicrobiana por lo que los componentes presentes en el extracto liofilizado de *G. seemanni* tienen propiedades antiadherentes sobre EPEC.

**Cuadro 2. UFC de las bacterias crecidas con y sin extracto crudo de *Geranium seemanni***

UFC de bacterias crecidas sin extracto (x10 <sup>6</sup> )	UFC de bacterias crecidas con extracto (x10 <sup>6</sup> )
52	53
10	49
41	44
43	34
57	46
67	55

### **XI.1.5.- Ensayos de adherencia a células HEp-2 con el extracto liofilizado crudo y cepas clínicas de EPEC con patrón localizado**

Al realizar el ensayo de inhibición de la adherencia con el extracto liofilizado crudo a una concentración de 10mg/mL sobre 5 cepas clínicas de *E. coli* con patrón de adherencia localizado se observó inhibición del patrón de adherencia localizada en todas las cepas clínicas y de la cepa control positiva utilizada en el estudio (*E. coli* E2348/47). El efecto de inhibición pudiera estar relacionado con la regulación de la expresión del gene *Bfp* responsable de las fimbrias *bfp* que se han relacionado con los eventos de autoagregación y formación de la microcolonia característica del patrón localizado de EPEC (**Figuras 1 y 2**). Sin embargo, es necesario realizar estudios con diferentes mutantes en los genes involucrados en la adherencia de tipo localizado.

### **XI.1.6.- Ensayos de adherencia y antimicrobiano con fracciones de sílica gel**

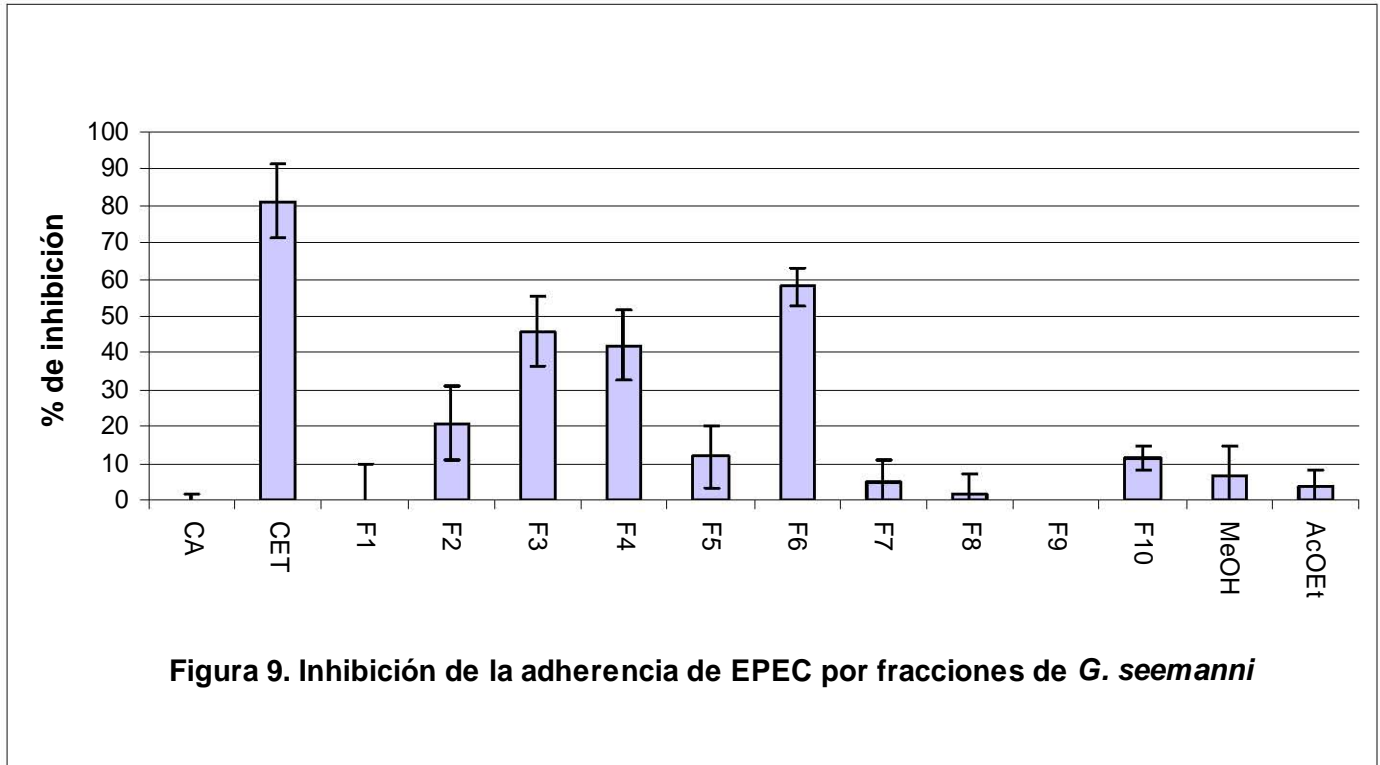
Para el proceso de fraccionamiento uno de los procedimientos utilizados fue la separación en columna de sílica gel, en este proceso se obtuvieron 10 fracciones al utilizar diferentes eluyentes (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3.** Fracciones obtenidas de la columna de sílica gel y sistemas de elusión

<b>Nombre de Fracción combinada</b>	<b>Número de Fracciones</b>	<b>Eluyente</b>	<b>Proporción %</b>
<b>1</b>	1-3	Acetato de etilo / Acetato de etilo / Metanol	100  90 / 10
<b>2</b>	4-7	Acetato de etilo / Metanol	80 / 20 70 / 30
<b>3</b>	8-14	Acetato de etilo / Metanol	60 / 40
<b>4</b>	15-29	Acetato de etilo / Metanol	50 / 50
<b>5</b>	30-37	Acetato de etilo / Metanol	40 / 60
<b>6</b>	38-40	Acetato de etilo / Metanol	30 / 70
<b>7</b>	45-55	Acetato de etilo / Metanol	20 / 80
<b>8</b>	56-61	Acetato de etilo / Metanol	10 / 90
<b>9</b>	62-73	Metanol	100
<b>10</b>	74-85	Metanol / Agua	95 / 5

Con cada una de las 10 fracciones se realizaron ensayos de inhibición de la adherencia utilizando una concentración final de 1mg/mL, los resultados se compararon contra el efecto inducido por el extracto crudo a una concentración de 10mg/mL, el cual se incluyó en cada uno de los ensayos como control positivo.

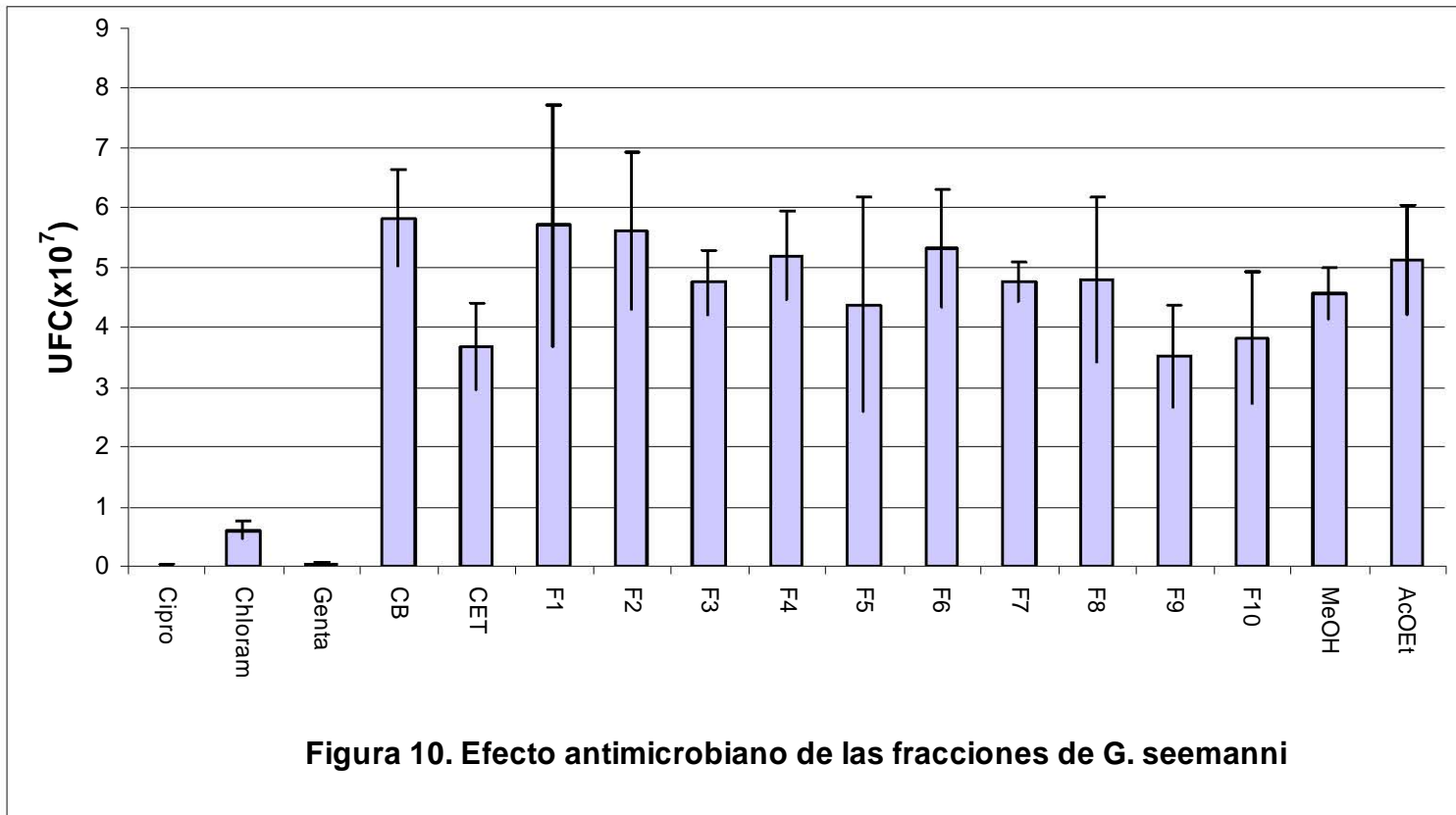




Control de adherencia (CA), control extracto liofilizado crudo (CET), fracciones del extracto liofilizado (F1-F10), control del solvente metanol (MeOH), control de acetato de etilo (AcOEt)

Las fracciones F1, F7, F8 y F9 no indujeron inhibición de la adherencia (**Figura 9**), las fracciones F2, F5 y F10 tuvieron una actividad del 10- 20%, solo las fracciones F3 (4.0699g, 31 % de rendimiento), F4 (3.0436g, con un rendimiento de 23.41%) y F6 (0.7941g, con un rendimiento de 6.1%) mostraron efecto de inhibición de la adherencia del 50%, de éstas F6 fue la que mostró mayor actividad (60% de inhibición), por los resultados obtenidos solo estas últimas se seleccionaron para el fraccionamiento subsecuente. Para definir que el efecto de inhibición no estaba relacionado con el metanol o el acetato de etilo se adicionaron estos a las placas del ensayo de adherencia, el efecto observado fue negativo por lo que se puede considerar que la inhibición observada con las fracciones F3, F4 y F6 se debe a compuestos presentes en *G. seemannii*. Para conocer si los compuestos presentes en las fracciones con actividad de inhibición (F3, F4 y F6) presentaban actividad de antimicrobiano se realizó nuevamente un ensayo en el que se realizó la cuenta de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

En este ensayo el efecto se comparo contra los antimicrobianos ciprofloxacina (0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sulfato de gentamicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cloramfenicol (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), los resultados mostraron en todas las fracciones cuentas  $10^2$  grados de magnitud mayores que las obtenidas con los tres antimicrobianos (**Figura 10**).



Ciprofloxacina 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Cipro), cloramfenicol 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Chloram), sulfato de gentamicina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Genta), control bacteriano (CB), control extracto liofilizado crudo (CET), fracciones del extracto liofilizado (F1-F10), control del solvente metanol (MeOH), control de acetato de etilo (AcOEt)

Al realizar el ensayo de adherencia con los antimicrobianos se encontró ausencia de colonias adheridas a las célula, debido al efecto letal sobre las bacterias morían y no a una actividad antiadherente (fotos del efecto del cloramphenicol y ciprofloxacina Figuras 4 y 5 del Apéndice 3).

### **XI.1.7.- Separación de las fracciones activas por SEPHADEX LH 20**

Se seleccionaron para la separación por columna de SEPHADEX LH20 las fracciones F3, F4 y F6 que fueron las que mostraron un mayor efecto antiadherente. En la cromatografía de F3 se obtuvieron 28 subfracciones diferentes (**Cuadro 4**).

**Cuadro 4. Sub- Fracciones de la Fracción 3 obtenidas de la columna de SEPHADEX LH 20 eluída con Etanol**

<b>Nombre de Fracción combinada</b>	<b>Número de Fracciones</b>
<b>F3 S1</b>	1-6
<b>F3 S2</b>	7
<b>F3 S3</b>	8-9
<b>F3 S4</b>	10-14
<b>F3 S5</b>	15
<b>F3 S6</b>	16
<b>F3 S7</b>	17
<b>F3 S8</b>	18-23
<b>F3 S9</b>	24-26
<b>F3 S10</b>	27-35
<b>F3 S11</b>	36-53
<b>F3 S12</b>	54-58
<b>F3 S13</b>	59-63
<b>F3 S14</b>	64-67
<b>F3 S15</b>	68-74
<b>F3 S16</b>	75-82
<b>F3 S17</b>	83-87
<b>F3 S18</b>	88-113
<b>F3 S19</b>	114-129
<b>F3 S20</b>	130-147
<b>F3 S21</b>	148-155
<b>F3 S22</b>	156-163
<b>F3 S23</b>	164-172
<b>F3 S24</b>	173-181
<b>F3 S25</b>	182-184
<b>F3 S26</b>	185-191
<b>F3 S27</b>	192-210
<b>F3 S28</b>	211-218

La cromatografía de F4 con el mismo procedimiento se obtuvieron 24 subfracciones (**Cuadro 5**).

**Cuadro 5. Sub- Fracciones de la Fracción 4 obtenidas de la columna de SEPHADEX LH 20 eluída con Etanol**

<b>Nombre de Fracción combinada</b>	<b>Número de Fracciones</b>
F4 S1	1-8
F4 S2	9-11
F4 S3	12-19
F4 S4	20-22
F4 S5	23-27
F4 S6	28-39
F4 S7	40-45
F4 S8	46-50
F4 S9	51-72
F4 S10	73-83
F4 S11	84-91
F4 S12	92-104
F4 S13	105-115
F4 S14	116-121
F4 S15	122-147
F4 S16	148-157
F4 S17	158-177
F4 S18	178-182
F4 S19	183-198
F4 S20	199-217
F4 S21	218-252
F4 S22	253-277
F4 S23	278
F4 S24	279

La Fracción F6 que mostró mayor actividad antiadherente al igual que las dos anteriores fue separada en una columna de SEPHADEX LH20 y de esta se obtuvieron 6 sub-fracciones (**Cuadro 6**).

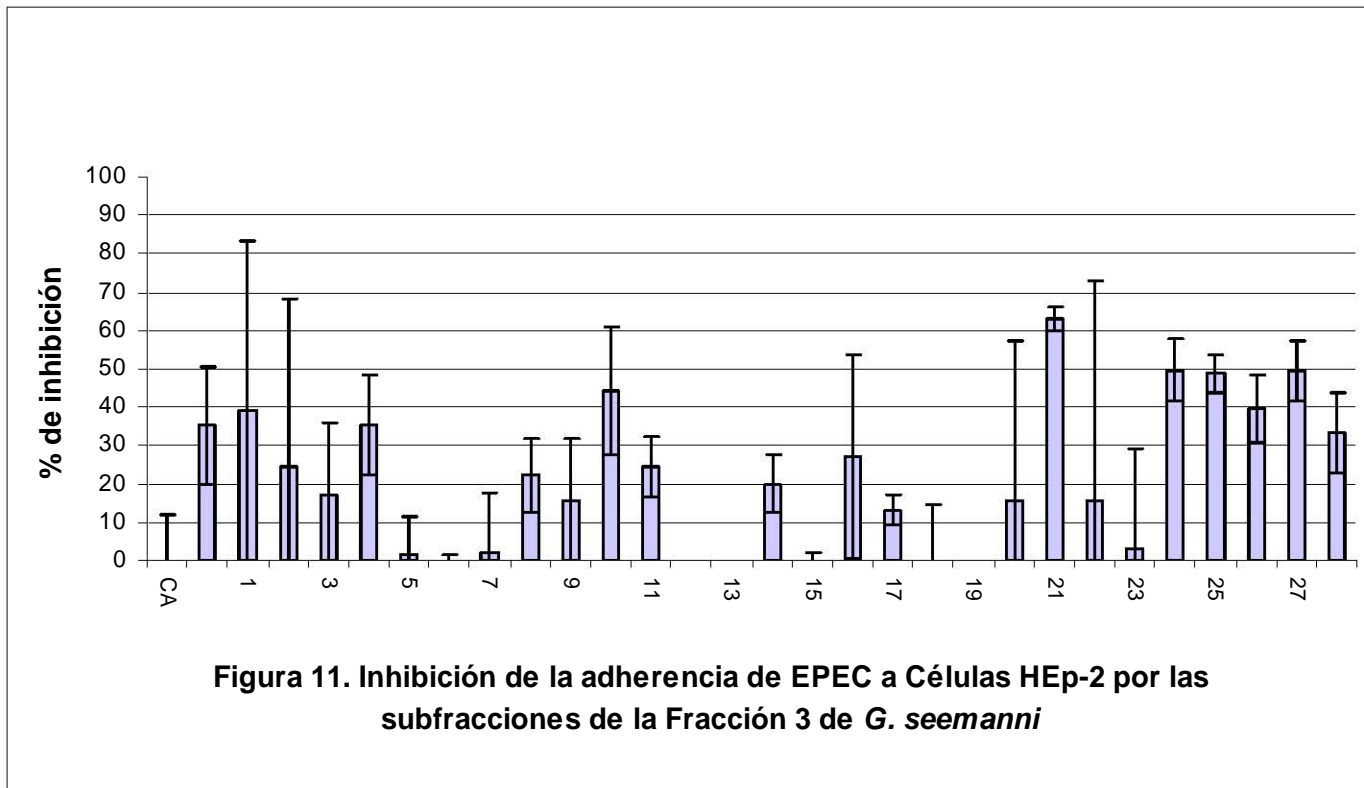
**Cuadro 6. Sub- Fracciones de la Fracción 4 obtenidas de la columna de SEPHADEX LH 20 eluída con Etanol**

<b>Nombre de Fracción combinada</b>	<b>Número de Fracciones</b>
F6 S1	1-4
F6 S2	5-22
F6 S3	23-32
F6 S4	33-44
F6 S5	45-77
F6 S6	78

### **XI.1.8.- Efecto antimicrobiano y antiadherente de las sub- fracciones**

De la misma manera que en el caso de las fracciones con cada una de las sub-fracciones (“S”) obtenidas se analizó si presentaban efecto antiadherente y/o antimicrobiano. La concentración utilizada de cada una de las sub-fracciones fue de 1mg/mL y para cada ensayo se utilizaron los controles referidos previamente.

De las Subfracciones de la Fracción 3 se obtuvo la siguiente Gráfica donde se muestra el porcentaje de adherencia por cada subfracción (**Figura 11**).



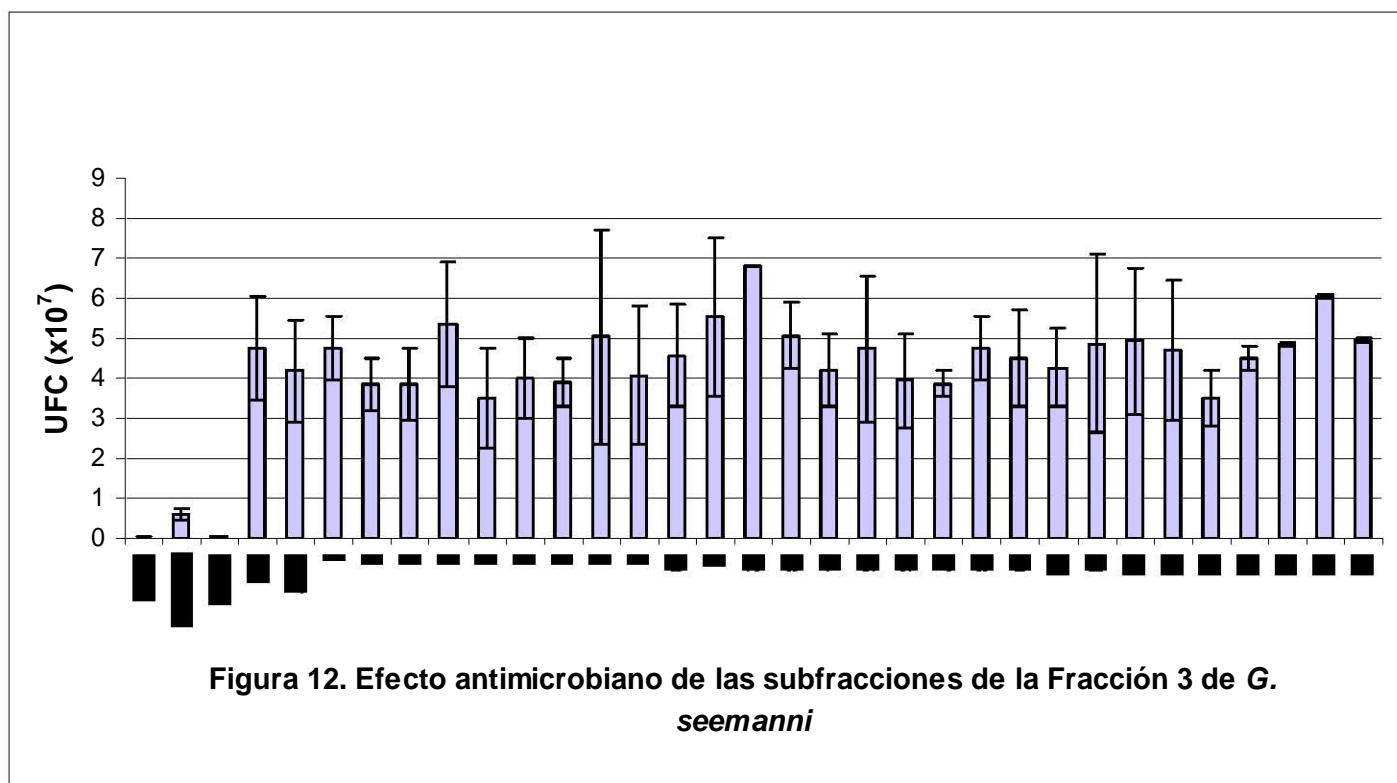
**Figura 11. Inhibición de la adherencia de EPEC a Células HEp-2 por las subfracciones de la Fracción 3 de *G. seemanni***

Control de adherencia (CA), control de extracto liofilizado crudo (CET) seguido de las subfracciones de la fracción 3 (1-28)

En este ensayo se utilizó una concentración de 1 mg/mL del extracto total, al determinar el porcentaje de inhibición de la adherencia se observó que era del 35%. De las 28 subfracciones ocho (F3S4, F3S8, F3S10, F3S25, F3S26, F3S27, F3S28 y F3S29), mostraron inhibición de la adherencia proporcionalmente comparable a la del control. La sub- fraccion F3S21 fue la que presentó un efecto mayor con 63 % de inhibición de la adherencia, las sub-fracciones F3S11 y F3S14 fueron las que presentaron un menor efecto con porcentajes de inhibición de aproximadamente el 20%. Una observación interesante fue el hecho de que

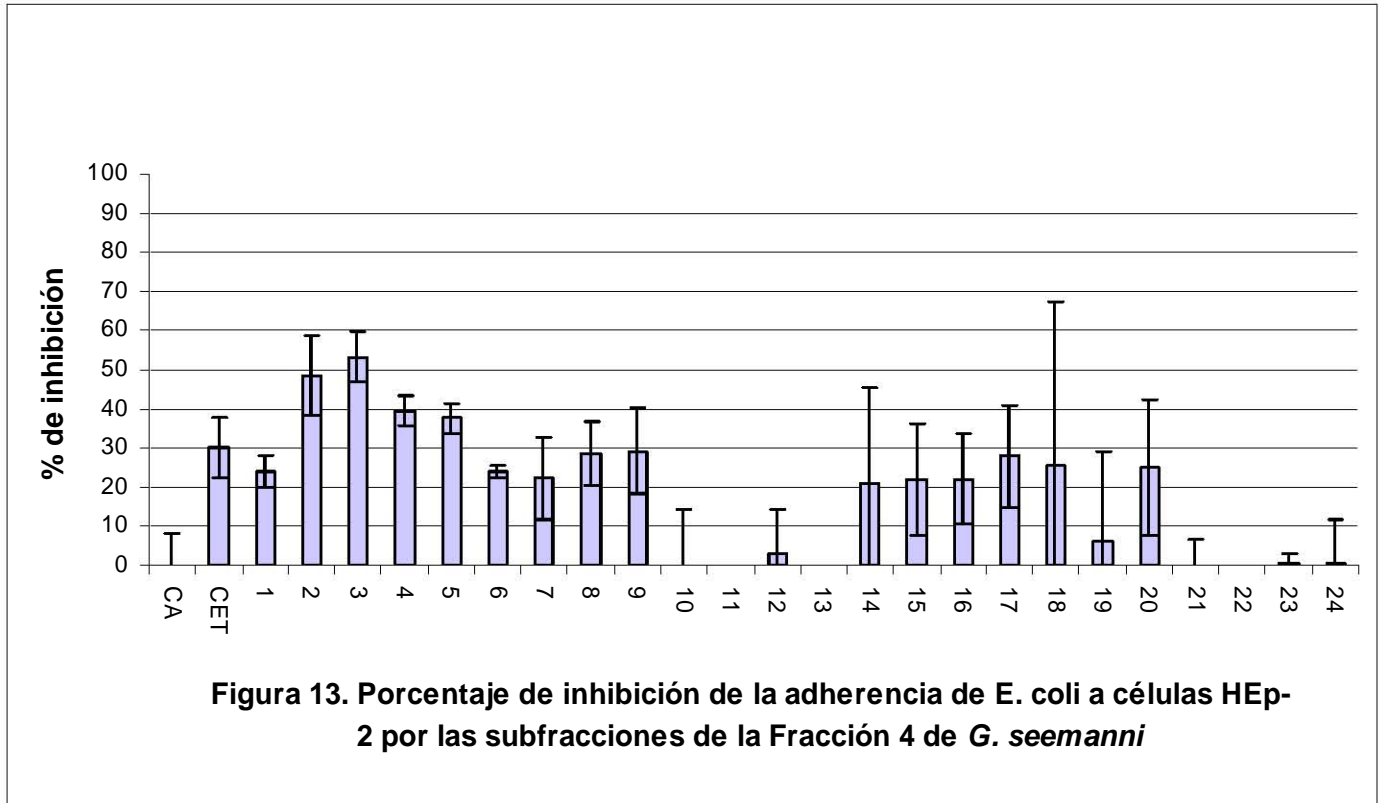
las sub-fracciones F3S6, F3S12, F3S13, F3S18 y F3S19 disminuyeron la inhibición de la adherencia. Por otro lado se observó que las fracciones de F3S3 a F3S10 modificaban el pH (acidificación) del medio MEM, lo cuál sugiere que en éstas fracciones hay algún ácido orgánico.

El análisis del efecto antimicrobiano de las sub- fracciones de F3 mostró un resultado similar al obtenido con la fracción correspondiente el cual al ser comparado contra el efecto de los antimicrobianos utilizados reportó un incremento de  $10^2$  órdenes de magnitud mayor en las UFC (**Figura 12**).



Ciprofloxacina 0.01 µg/ml (Cipro), cloramfenicol 4 µg/mL (Chloram), sulfato de gentamicina 1 µg/mL (Genta), control bacteriano (CB), control extracto liofilizado crudo (CET) seguido de las subfracciones de la fracción 3 (1-28)

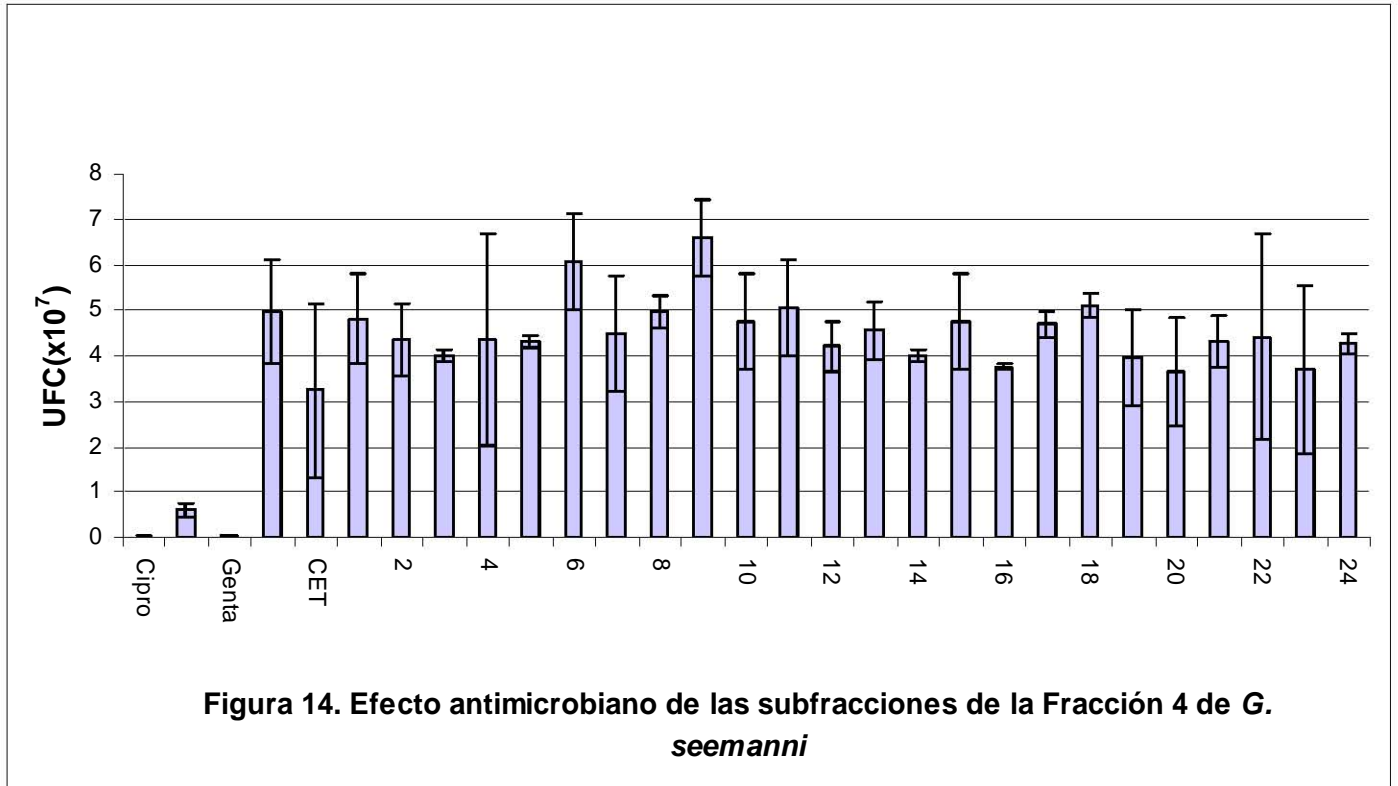
El análisis de las Subfracciones de F4 mostró los siguientes resultados (**Figura 13**); las sub- fracciones de F4S2 a F4S9 presentaron efecto de inhibición igual o superior al inducido por CET. De éstas F4S2 y F4S3 indujeron el mayor efecto de inhibición con 48% y 53% respectivamente, por otro lado las sub- fracciones y F4S1 y F4S13 y F4S14 a F4S20 presentaron los menores porcentajes de inhibición (entre 20 y 27 %).



**Figura 13. Porcentaje de inhibición de la adherencia de E. coli a células HEp-2 por las subfracciones de la Fracción 4 de G. seemanni**

Control de adherencia (CA), control de extracto liofilizado crudo (CET) seguido de las subfracciones de la fracción 4 (1-24)

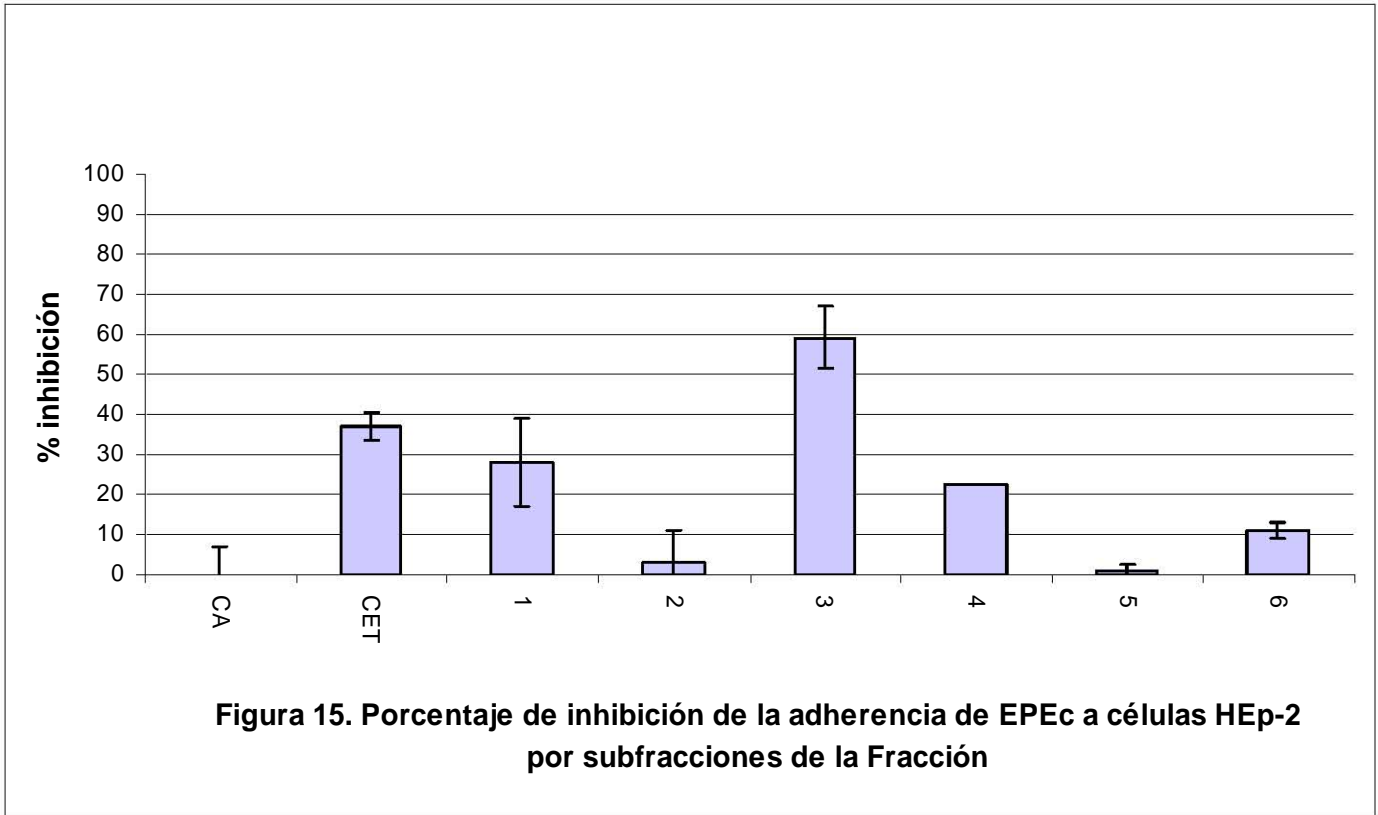
Finalmente como ya se había observado previamente algunas subfracciones (F4S10 a F4S13 y F4S21 a F4S24) en lugar de inhibir incrementan la adherencia. Cabe destacar que de algunas de las fracciones con actividad (F4S2 y F4S3), se obtuvo un buen rendimiento durante el fraccionamiento obteniendo aproximadamente 200mg cada subfracción. En este ensayo también se observó acidificación del medio MEM inducido por las subfracciones F4S3 a F4S6, F4S11 y F4S21. Con relación al ensayo de actividad antimicrobiana de las subfracciones los resultados fueron similares a los referidos previamente, en estos se observa que ninguna de las subfracciones tiene actividad antimicrobiana (**Figura 14**).



Ciprofloxacina 0.01 µg/ml (Cipro), cloramfenicol 4 µg/mL (Chloram), sulfato de gentamicina 1 µg/mL (Genta), control bacteriano (CB), control extracto liofilizado crudo (CET) seguido de las subfracciones de la fracción 4 (1-24)

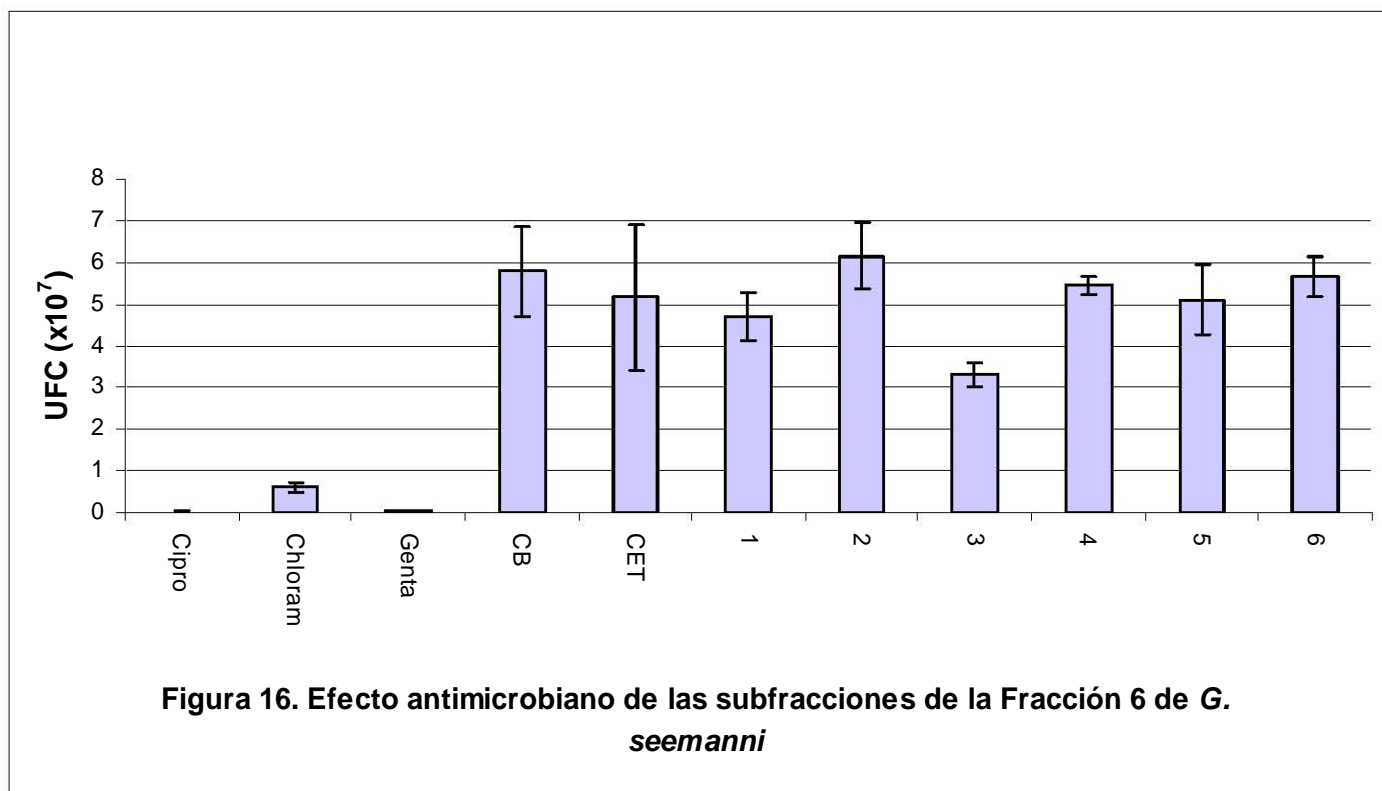
Los resultados relacionados con las Subfracciones de F6 se muestran en la **figura 15**, en ésta se aprecia que las sub-fracciones F6S1 y F6S3 mostraron una inhibición del 28% y 59% respectivamente, F6S4 mostró inhibición de 22% y las restantes F6S2, F6S5 y F6S6 solo presentaron inhibición menor al 10%. En todas estas sub- fracciones el rendimiento fue menor a 50mg.





Control de adherencia (CA), control de extracto liofilizado crudo (CET) seguido de las subfracciones de la fracción 6 (1-6)

Con respecto al ensayo de actividad antimicrobiana (**Figura 16**), los resultados son iguales a los observados con las diferentes fracciones y sub-fracciones, es decir no hay efecto antimicrobiano con ninguna de ellas.



Ciprofloxacina 0.01 µg/ml (Cipro), cloramfenicol 4 µg/mL (Chloram), sulfato de gentamicina 1 µg/mL (Genta), control bacteriano (CB), control extracto liofilizado crudo (CET) seguido de las subfracciones de la fracción 6 (1-6)

### XI.1.9.- Semi- purificación de compuestos con actividad antiadherente

Con las subfracciones F3S4, F3S8 y F4S3 que fueron algunas de las que mostraron actividad y con las que se contaba con una cantidad suficiente, se procedió a realizar su caracterización. Estas presentaron similitudes por CPF y esto se confirmó por ERMN de 200 MHz, mostrando que F3S4 y F4S3 eran similares (**Figuras 17 y 18**). Con el propósito de identificar la o las sustancias activas de F3S4 se realizó cromatografía en placa preparativa y cromatografía líquida (HPLC). Por ninguno de los dos procedimientos se pudo realizar la separación de los compuestos. Al realizar la RMN se determinó que la mayoría de los compuestos son azúcares, uno de éstos se identificó como sacarosa. Aunque, se trato de separar los azúcares por acetilación lo único que se pudo obtener fue poliacetato de sacarosa determinado por su espectro de RMN (no mostrado). Otro intento para realizar la separación de compuestos de F3S4 fué a través del empleo de una columna de SEPHADEX LH20 con un sistema metanol (90%) agua (10%). Con este procedimiento

se obtuvieron 5 fracciones (I-V), en éstas al realizarles RMN y cromatografía de placa fina se observó que la única diferencia era la cantidad de sacarosa pero los compuestos no se separaron totalmente, de las 5 fracciones III F3S4 fue la que se mostró con mayor pureza (**Figura 19**). En éste los azúcares casi no se observan y además se aprecian señales bien definidas (7 ppm, 4.3 ppm, 3.9 ppm, 3.6 ppm y 2.7 ppm y 2.2 ppm), que podrían ser del compuesto mayoritario. Con el propósito de purificar III F3S4 se utilizó HPLC (Condiciones en Apéndice 6). El cromatograma obtenido (**Figura 20**) sugiere que la subfracción esta constituida por 7 compuestos diferentes y que la sacarosa podría formar parte del compuesto lo cuál impide que se separe y por consiguiente siempre esta presente. Sin embargo, al realizar la correlación con los espectros de RMN HETCOR (**Figura 21**) no corresponde. Con los espectros de  $^1\text{H}$ , UV y HETCOR obtenidos, se pudo proponer lo que corresponde a la estructura del compuesto (**Figuras 19, 21 y 22**).

Con relación a F4S3 se realizó una separación en columna con SEPHADEX LH20 con un sistema de cloroformo / metanol (1:1). Al igual que en el caso anterior se obtuvieron 5 fracciones (I –V antes del F4S3). Nuevamente se encontró la presencia de azúcares (sacarosa) en las 5 fracciones, aunque IF4S3, IVF4S3 y VF4S3 los presentan en menor cantidad.

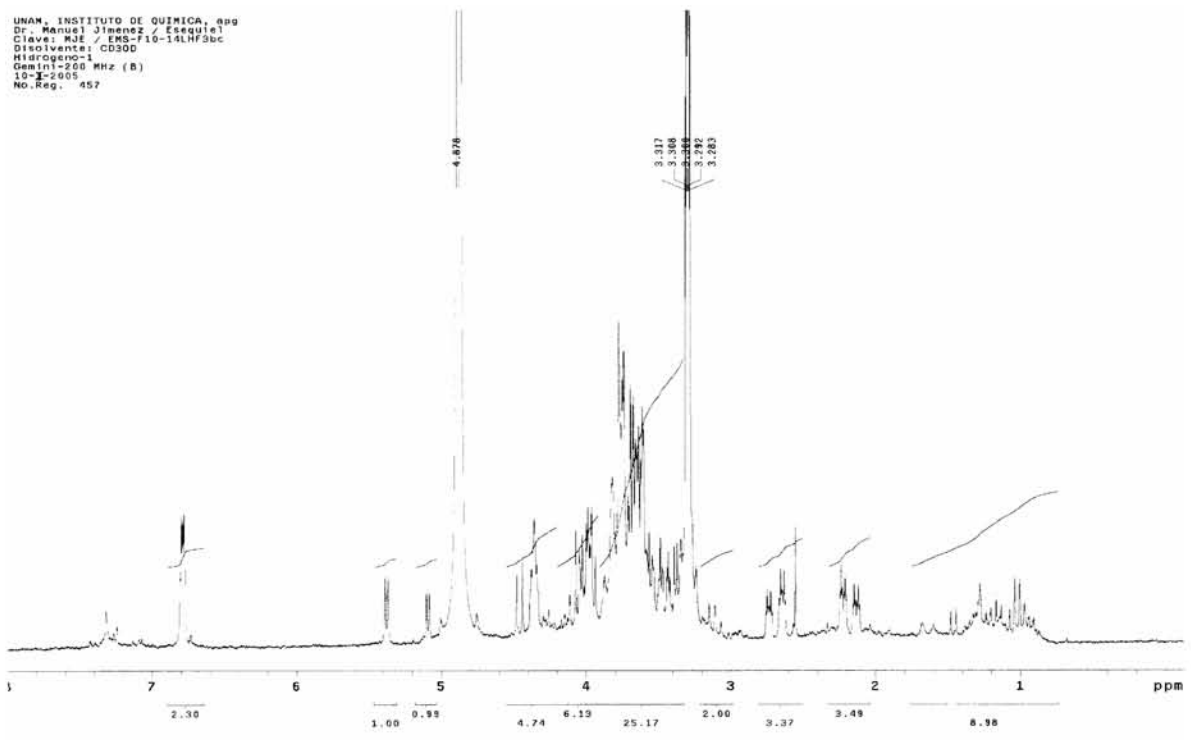


Figura 17. ERMN <sup>1</sup>H de la F3S4

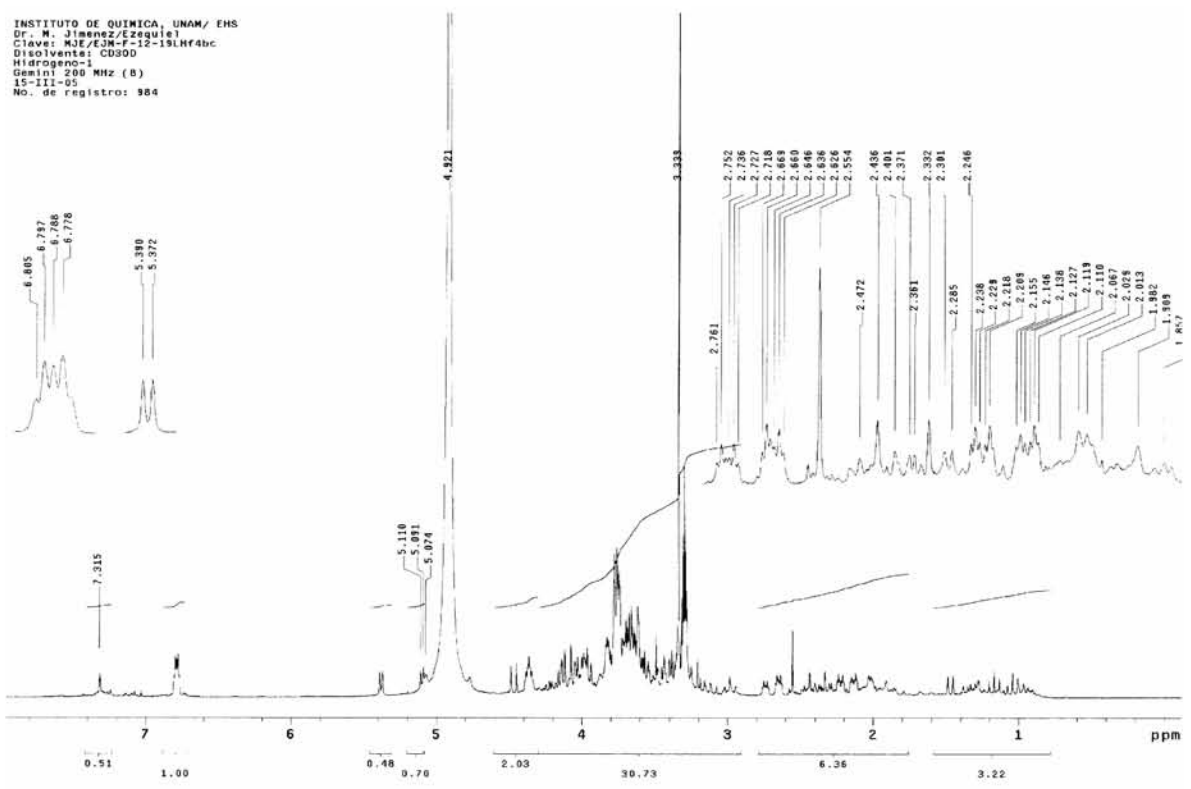


Figura 18. ERMN <sup>1</sup>H de la F4S3



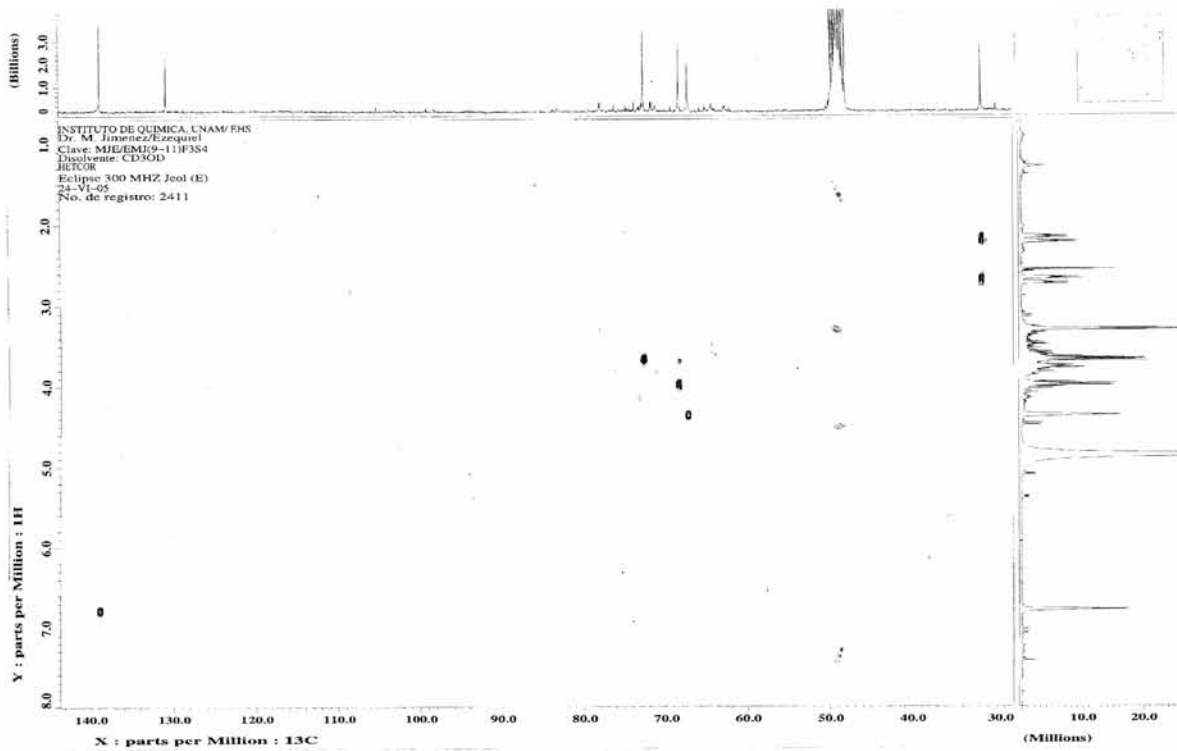


Figura 21. ERMN HETCOR IIF3S4

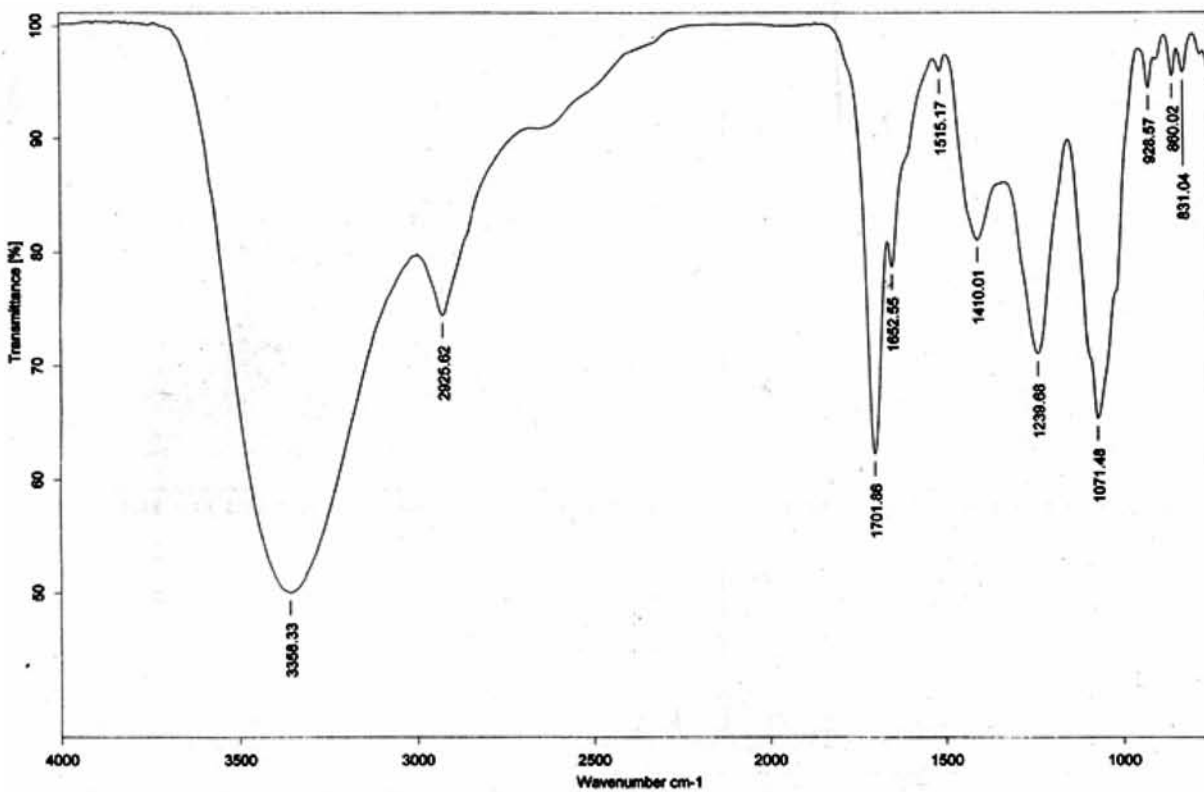
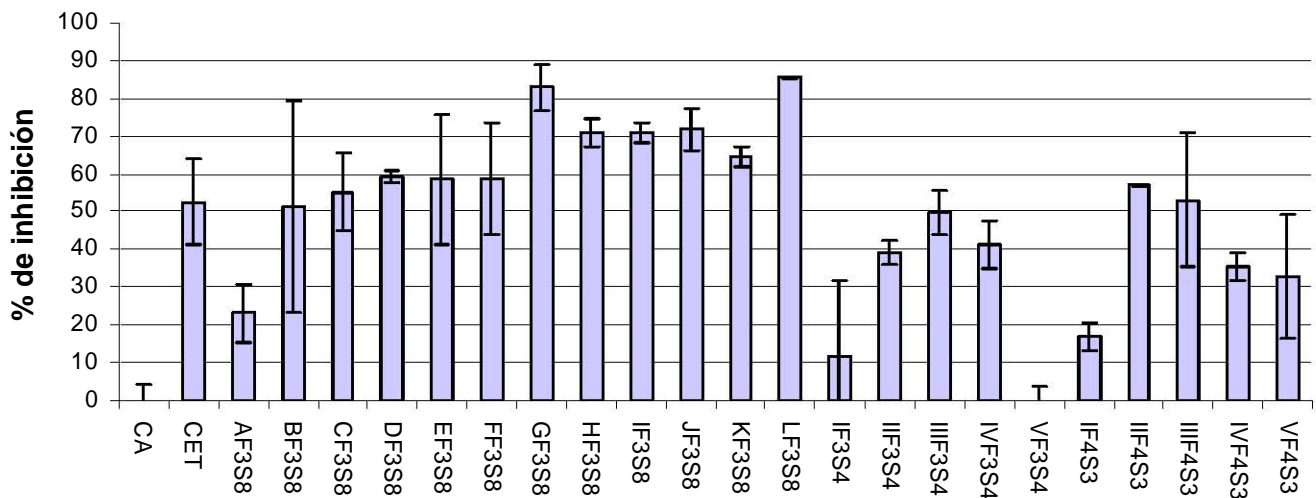


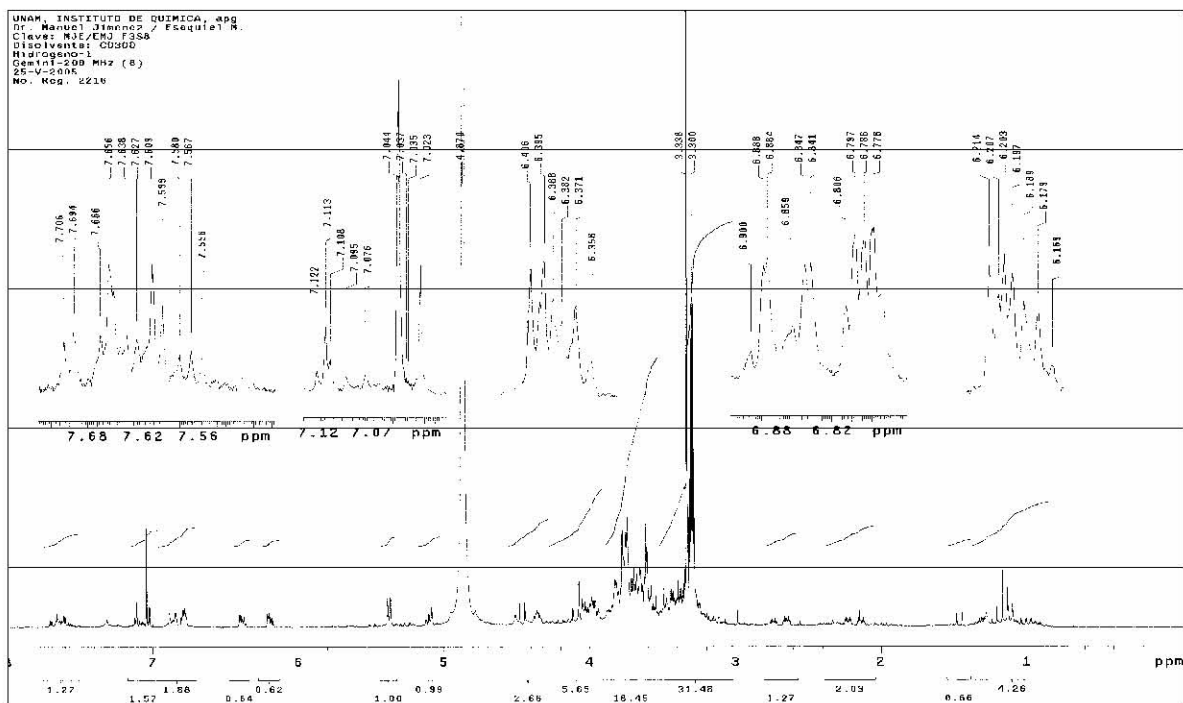
Figura 22. Espectro de UV de la IIF3S4

Con respecto a la fracción F3S8 (**Figura 24**) se trató de realizar la separación utilizando una placa preparativa, con este procedimiento se obtuvieron 12 fracciones a las que se les denominó AF3S8 hasta LF3S8. Como en los casos anteriores se realizó RMN de 200 MHz (**Figura 25**) tanto de AF3S8 como de cada una de las fracciones previamente obtenidas. El espectro que se obtuvo de AF3S8 mostró la presencia de sacarosa, por otro lado los correspondientes de BF3S8 y CF3S8 (**Figura 26 y 27**) mostraron una imagen similar a la reportada para F3S4 y F4S3. Lo anterior hacía suponer que al existir patrones compartidos por diferentes fracciones, la imagen observada podría corresponder al compuesto con actividad antiadherente. Para probar lo anterior se analizaron todas las fracciones para evaluar su efecto sobre la adherencia de EPEC. Las fracciones se utilizaron a una concentración final en los pozos de 1mg/mL y el ensayo se realizó de acuerdo a lo previamente referido. Con excepción de las fracciones AF3S8 (**Figura 7 Apéndice 3**), IF3S4 y IF4S3 que dieron porcentajes de inhibición menores a los obtenidos con el extracto liofilizado crudo (CET) y la fracción VF3S4 que no inhibió la adherencia, todas las otras fracciones inhibieron la adherencia de EPEC en proporción semejante e incluso algunas mayormente a la observada con CET (**Figura 23**).



**Figura 23. Inhibición de la adherencia de EPEC a células HEp-2 por fracciones de F3S4, F4S3 y F3S8**

Simbología similar a figuras anteriores.



**Figura 24. ERMN <sup>1</sup>H de la F3S8**



Instituto de Química, UNAM, RPM  
Dr. M. Jimenez / Ezequiel  
Clave: MJE/ENJAF358  
D2O  
Varian-Gemini 200 MHz-A  
1H  
No. Orden: 2271  
30-05-05

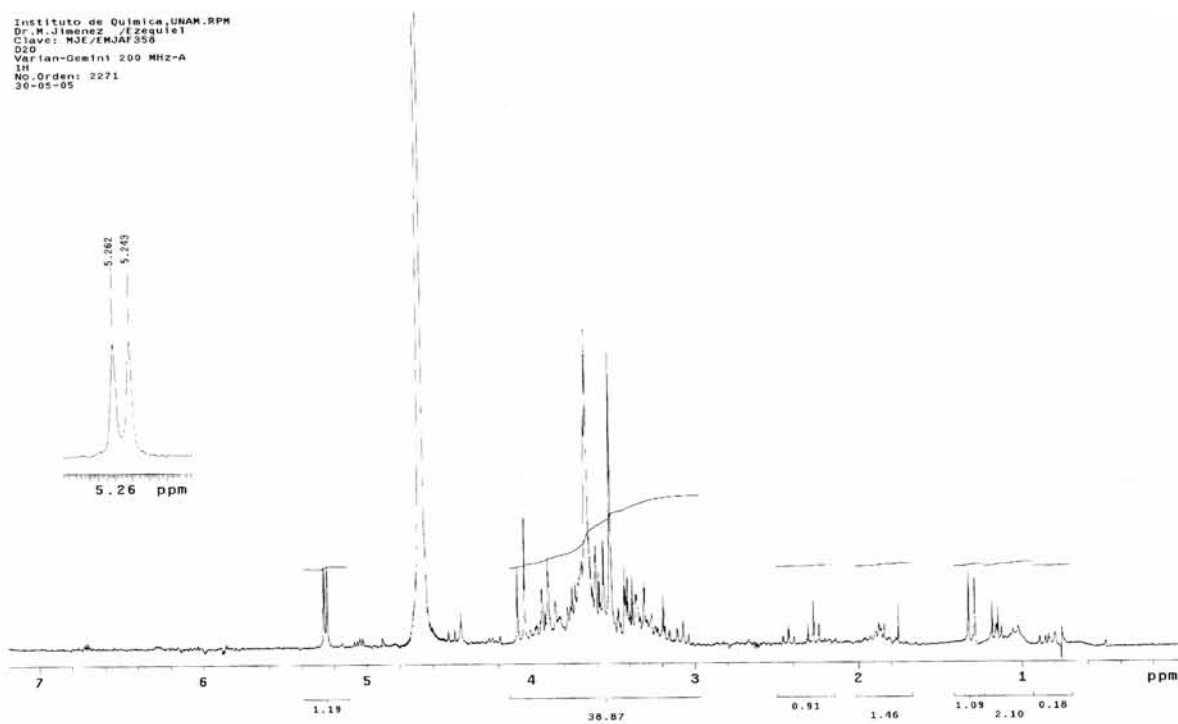


Figura 25. ERMN  $^1\text{H}$  de la AF3S8

Instituto de Química, UNAM, RPM  
Dr. M. Jimenez / Ezequiel  
Clave: MJE/ENJBF358  
D2O  
Varian-Gemini 200 MHz-A  
1H  
No. Orden: 2270  
30-05-05

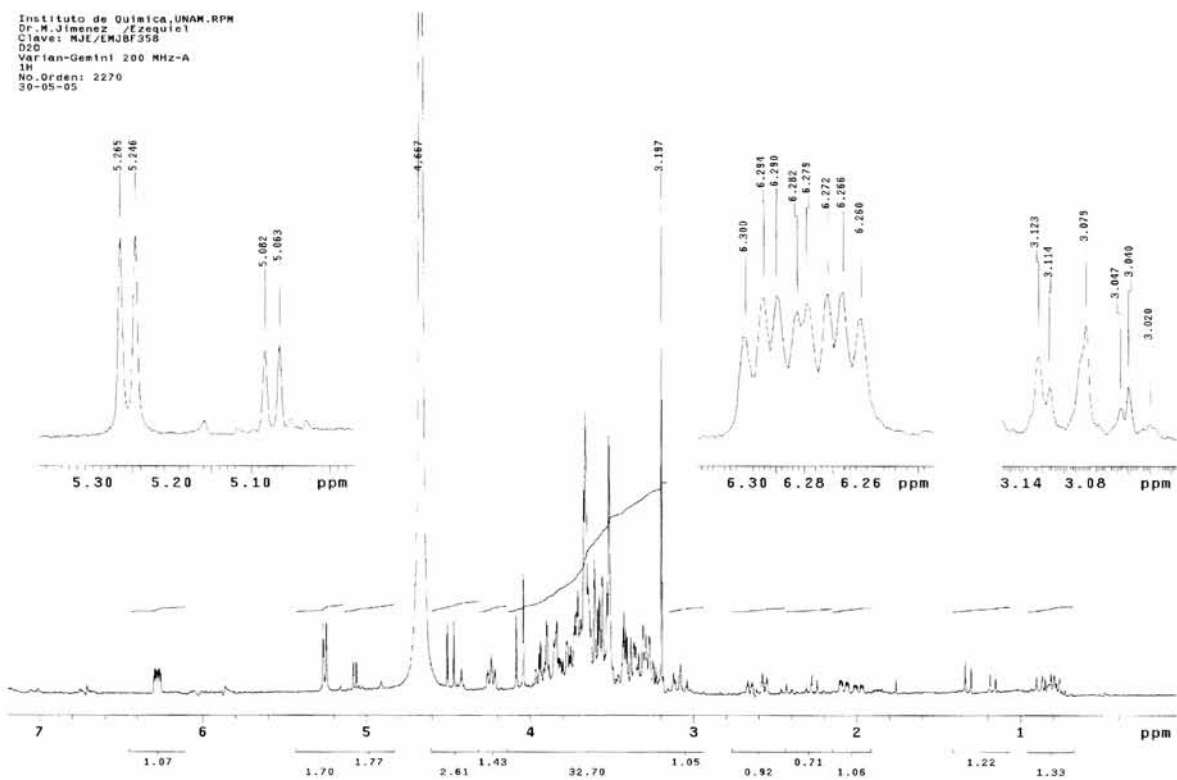
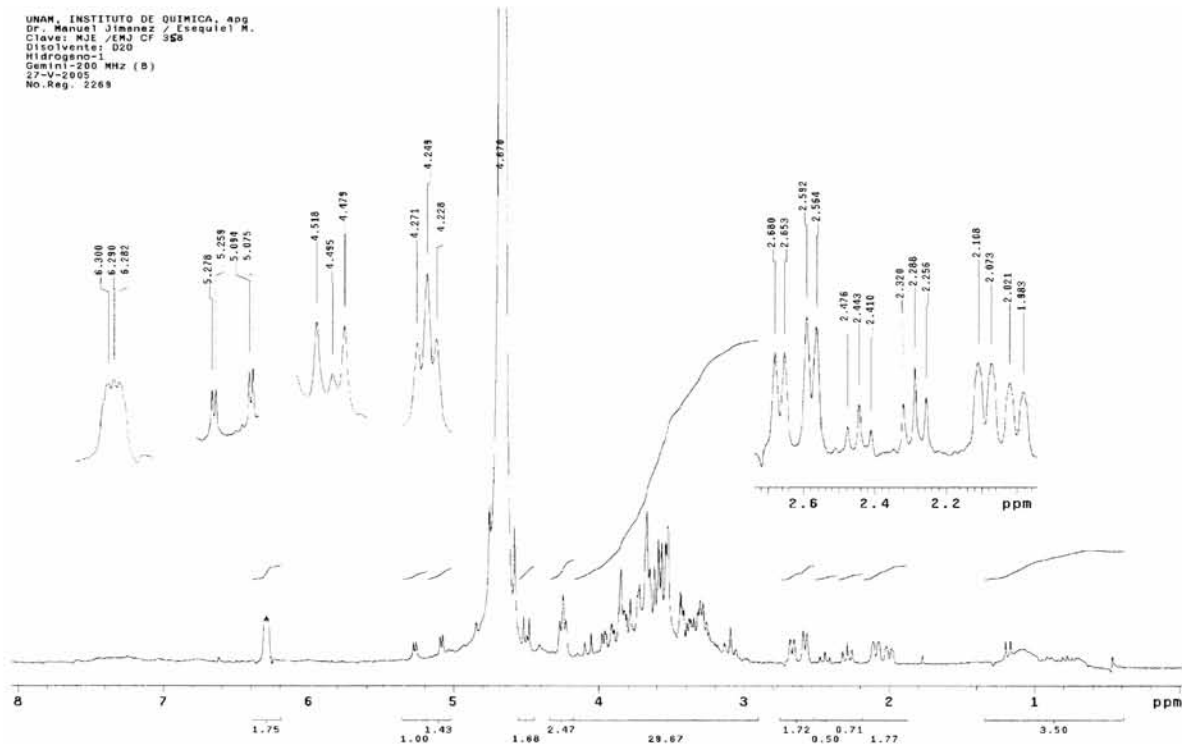


Figura 26. ERMN  $^1\text{H}$  de la BF3S8



**Figura 27. ERMN  $^1\text{H}$  de la CF3S8**

Como se refirió previamente la fracción GF3S8 fue una de las que mostró mayor actividad de inhibición de la adherencia (82%) (**Figura 10 Apéndice 3**), sin embargo, por la escasa cantidad de producto con la que se contaba no fue posible realizar su caracterización por RMN de 300 MHz de una y dos dimensiones.

Se realizó un intento más para identificar los compuestos presentes en esta fracción por RMN de Hidrógeno y Carbono así como Masas (**Figuras 28, 29 y 30**). Las fracciones LF3S8, IIF3S4 y IVF3S4 fueron las que mostraron mayor actividad de inhibición de la adherencia con 85% en la primera (con un espectro que muestra la presencia de sacarosa) y 49% en las otras dos. Estas últimas tienen entre sus componentes un compuesto ácido que modificaba el pH del medio (MEM) utilizado para el cultivo de células. En estas tres fracciones se identificó en las imágenes del espectro un patrón semejante lo que sugiere que corresponde al compuesto del geranio que interfiere con la adherencia de EPEC.



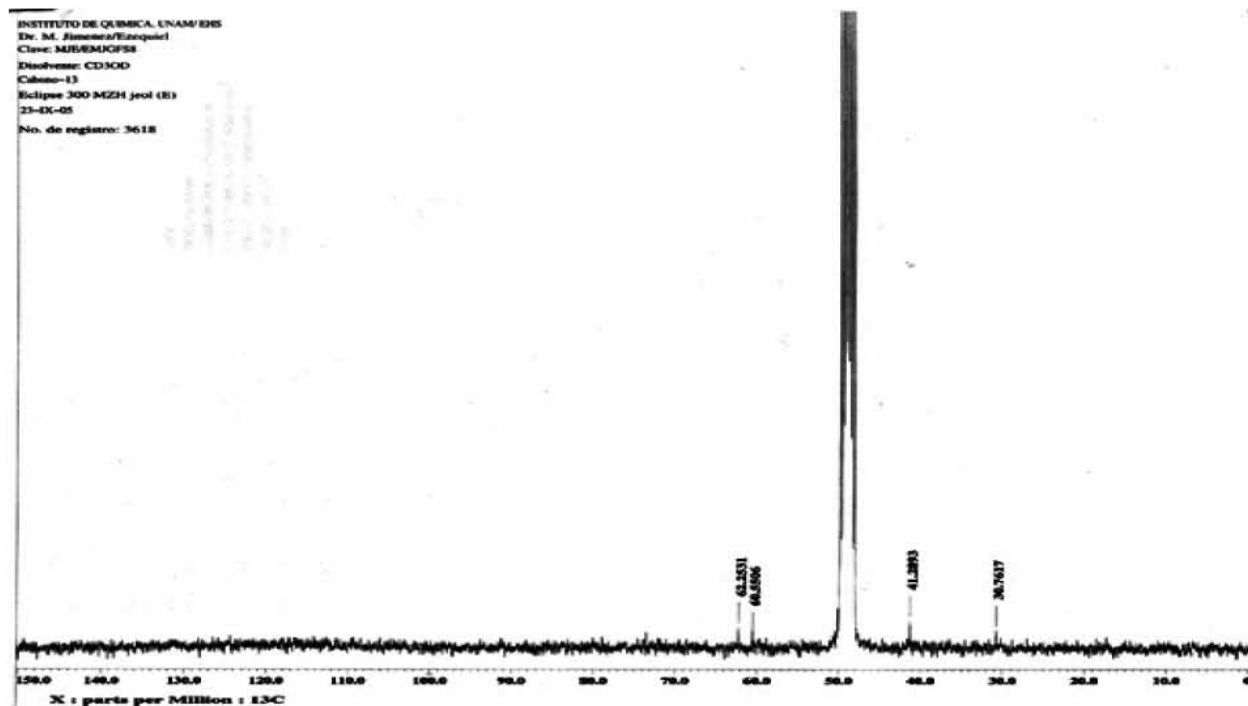


Figura 29. ERMN <sup>13</sup>C de la GF3S8

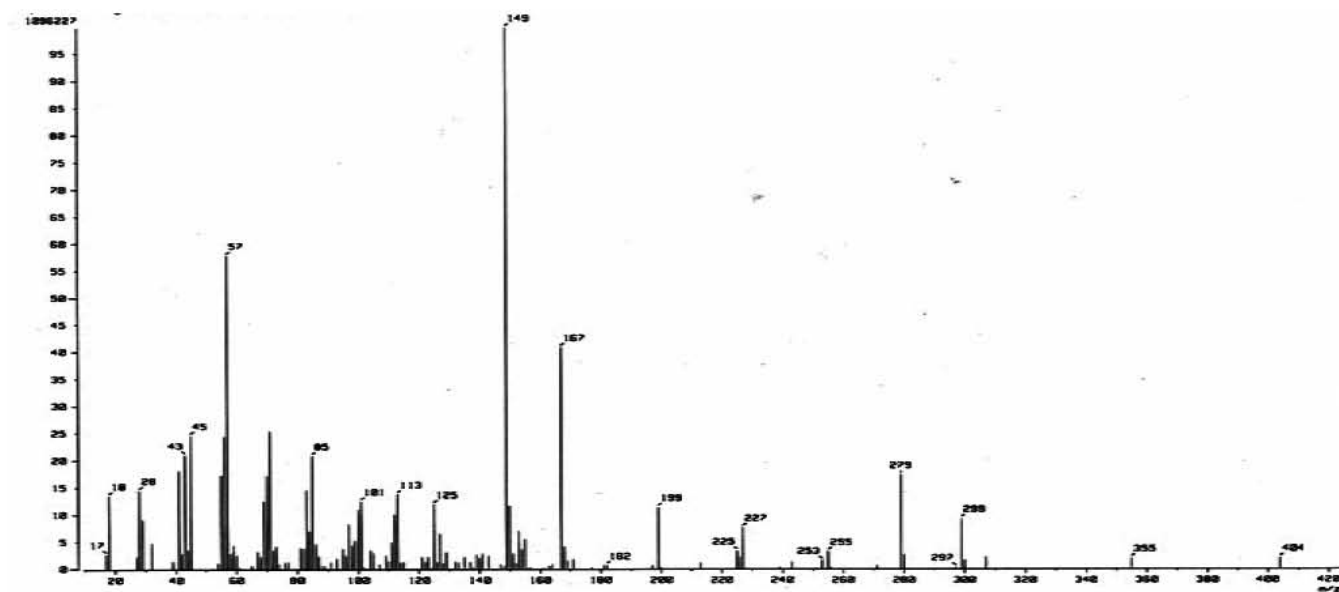
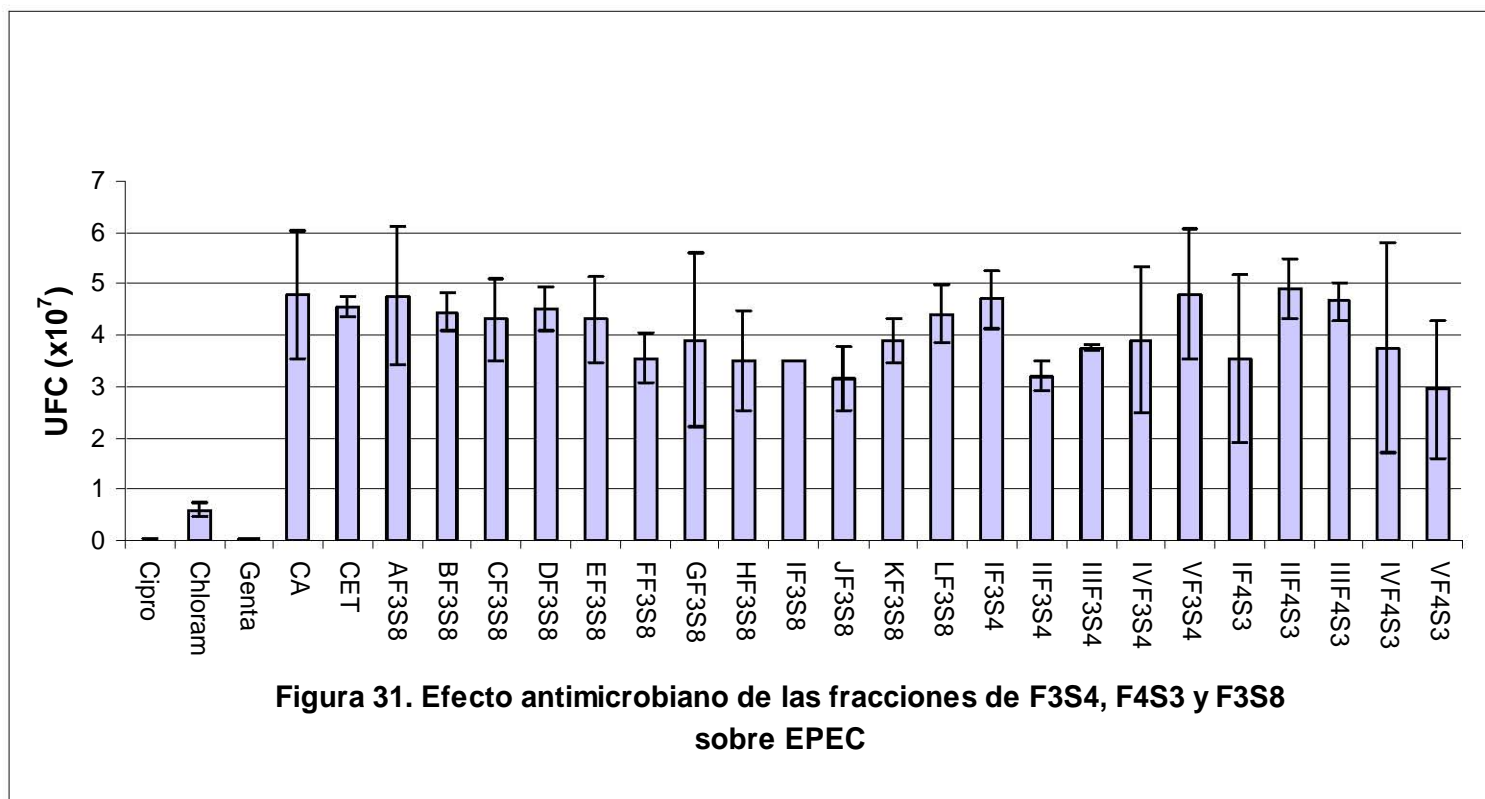


Figura 30. Masas de la fracción GF3S8



Simbología similar a la utilizada anteriormente.

### XI.1. 10.- Identificación de compuestos mayoritarios de fracciones activas

De los fraccionamientos anteriores se pudo determinar que las primeras fracciones (IF3S4, IF4S3, AF3S8 y BF3S8) eran principalmente sacarosa (**Figuras 17, 18, 25 y 26**) y no presentaron actividad (**Figura 30**). CF3S8 mostró similitudes en las señales de RMN con IIF3S4, IIIF3S4 y IVF3S4, así como, IIF4S3, IIIF4S3 y IVF4S3 (**Figuras 17, 18, 19 y 27**), todas las cuáles tuvieron actividad antiadherente (**Figura 30**) (**Figura 6 Apéndice 3**). Parecía que las señales de RMN y las actividades coincidían, e indicaban que podrían ser el compuesto activo. De estas fracciones la IIIF3S4 fue la más pura y presentó un espectro de RMN de <sup>1</sup>H y HETCOR (**Figura 19 y 21**) que permitió proponer una estructura y el compuesto se identificó como el ácido shikimico.

### XI.1.11.- Caracterización del ácido shikimico en fracciones activas y ácido shikimico puro

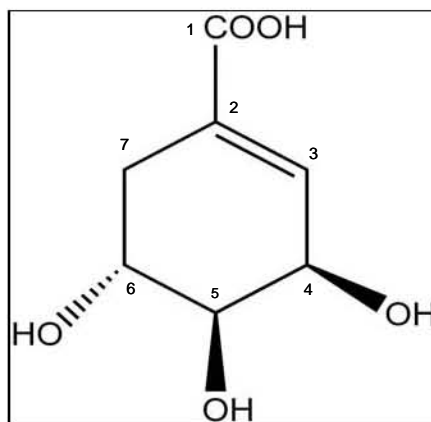
Se analizó una muestra del ácido shikimico puro (Sigma-Aldrich) por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT y de dos dimensiones (HETCOR) (**Figuras 33, 34, 35 y 36**, respectivamente), para confirmar su presencia en las fracciones del extracto de geranio estudiado. Las señales obtenidas en esta parte del estudio coincidieron plenamente con las observadas en el espectro de IIF3S4 (**Figura 19 y 21**). Para conocer si el ácido shikimico utilizado en el estudio correspondía al isómero del caracterizado en las fracciones del geranio, se analizaron las constantes de acoplamiento (J) de la señales del espectro de RMN de IIF3S4 (**Figura 19**) y se compararon con las del ácido shikimico puro (**Figura 33 y 34**). Los resultados (**Cuadro 7 y 8**) muestran que ambos son el mismo isomero del ácido shikimico, es decir (3R, 4S, 5R)-(-) 3, 4, 5 -trihydroxy - 1-ácido carboxílico ciclohexano (**Figura 7**).

**Cuadro 7. Señales del espectro de hidrógeno para el ácido shikimico puro y obtenido de *G. seemanni* donde se muestran los desplazamientos químicos, multiplicidad, integración y constantes de acoplamiento**

Ácido Shikimico	Ácido Shikimico obtenido de <i>G. seemanni</i>
Señal 2.2ppm dt (1H, J=1.8 Hz, 7.5Hz, 5.1Hz, 3 Hz ) H7	Señal 2.1ppm dt (1H, J=1.74Hz, 7.32 Hz, 5.55 Hz, 3.51 Hz) H7
Señal 2.7ppm dt (1H, J=1.8 Hz, 7.5Hz, 5.1Hz, 3 Hz) H7'	Señal 2.7ppm dt (1H, J=1.74Hz, 7.32 Hz, 5.55 Hz, 3.51 Hz) H7'
Señal 3.6ppm dd (1H, J=3.99Hz, 7.5Hz) H5	Señal 3.6ppm dd (3?H, J=4.11 Hz, 7.62 Hz) H5
Señal 3.9ppm dt (1H, J=7.5 Hz, 5.1 Hz, 3 Hz, 5.4Hz) H6	Señal 3.9ppm dt (1H, J=7.62 Hz, 5.55 Hz, 3.51 Hz, 5.58 Hz) H6
Señal 4.3ppm m (1H, J=3.6 Hz, 3.99 Hz, 5.4 Hz) H4	Señal 4.3 ppm m (1H, J= 3.51 Hz, 4.11 Hz, 5.58 Hz) H4
Señal 6.7ppm m (1H, J=3.6Hz, 1.8Hz) H3	Señal 6.7 ppm m (1H, J=3.51 Hz, 1.74 Hz) H3

**Cuadro 8. Señales del espectro de RMN 300 MHz de  $^{13}\text{C}$  comparando el Ácido shikimico puro y el obtenido en las fracciones de *Geranium seemanni***

	Ácido Shikimico	Ácido Shikimico de fracción
Carbono 1 (C)	170.061 ppm	170.0960 ppm
Carbono 2 (C)	130.771 ppm	130.8024 ppm
Carbono 3 (CH)	138.813 ppm	138.7726 ppm
Carbono 4 (CH)	67.341 ppm	67.3386 ppm
Carbono 6 (CH)	68.448 ppm	68.4226 ppm
Carbono 5 (CH)	72.775 ppm	72.7665 ppm
Carbono 7 (CH <sub>2</sub> )	31.678 ppm	31.6864 ppm



**Figura 32. Estructura del ácido shikimico o (3R, 4S, 5R) –(-) 3, 4, 5 –trihydroxy – 1- ácido carboxílico ciclohexano**

Instituto de Química, UNAM (H. Ríos)  
 Dr-M-Jimenez/Ezequiel  
 Clave: MJE/EMJ-A8  
 No-registro 3359  
 Experimento: H  
 Disolvente: CD3OD  
 Varian Unity-300-MHz (D)  
 Agosto-29-2005

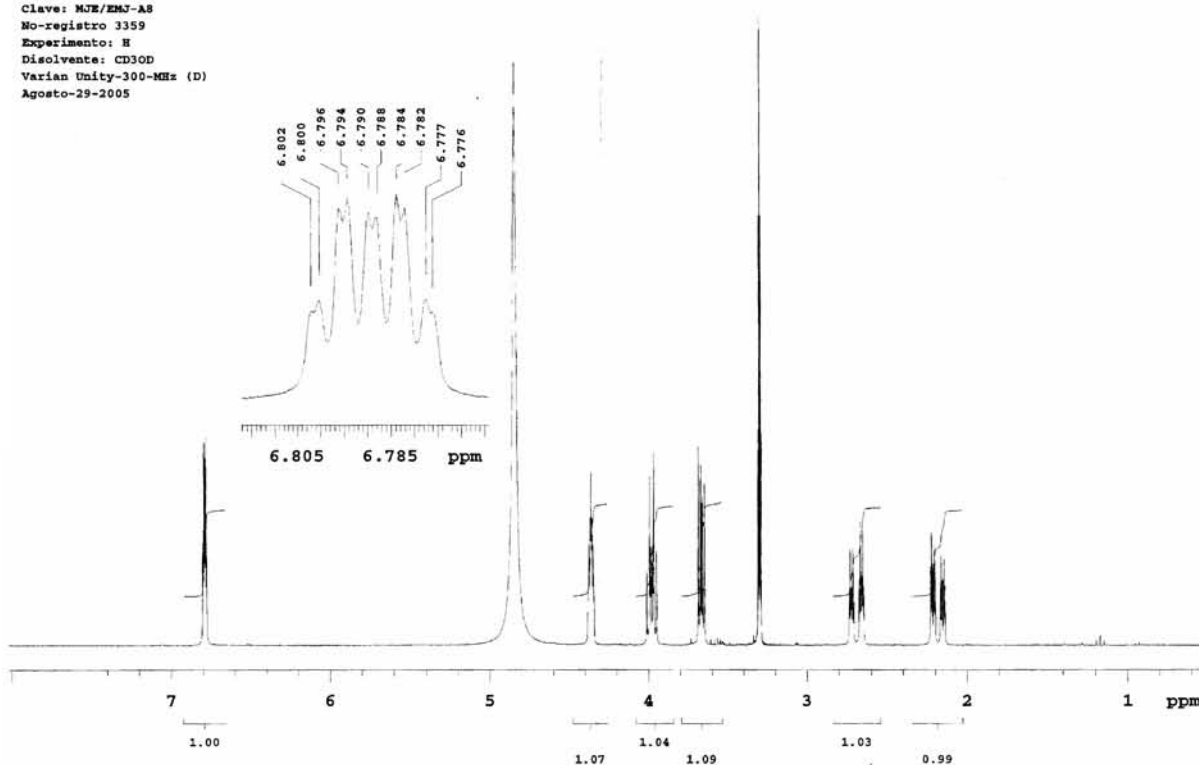


Figura 33. ERMN  $^1\text{H}$  del ácido shikimico

Instituto de Química, UNAM (H. Ríos)  
 Dr-M-Jimenez/Ezequiel  
 Clave: MJE/EMJ-A8  
 No-registro 3359  
 Experimento: H  
 Disolvente: CD3OD  
 Varian Unity-300-MHz (D)  
 Agosto-29-2005

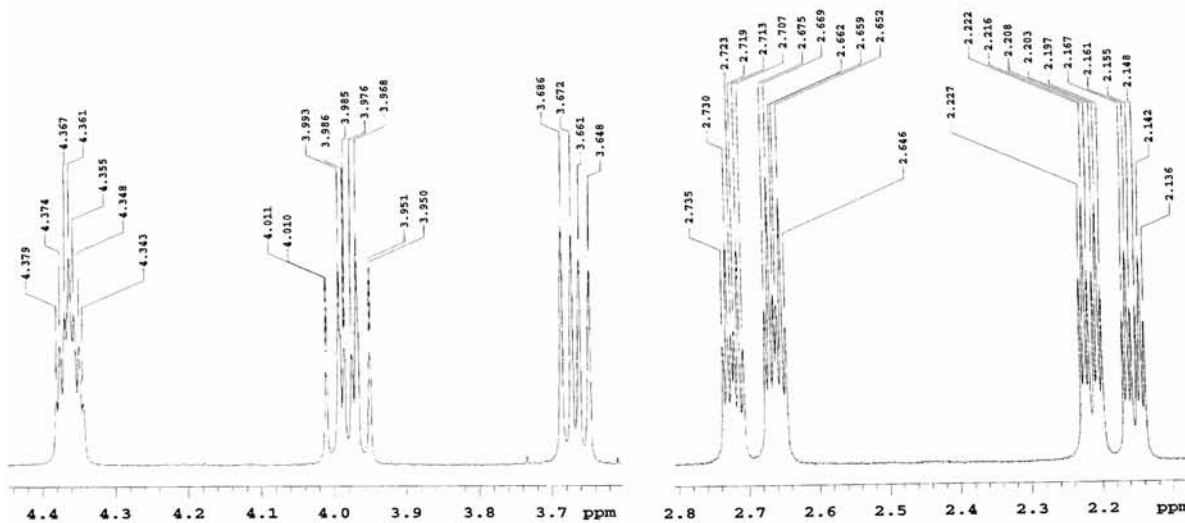


Figura 34. ERMN  $^1\text{H}$  del ácido shikimico (ampliación 2 a 5 ppm)



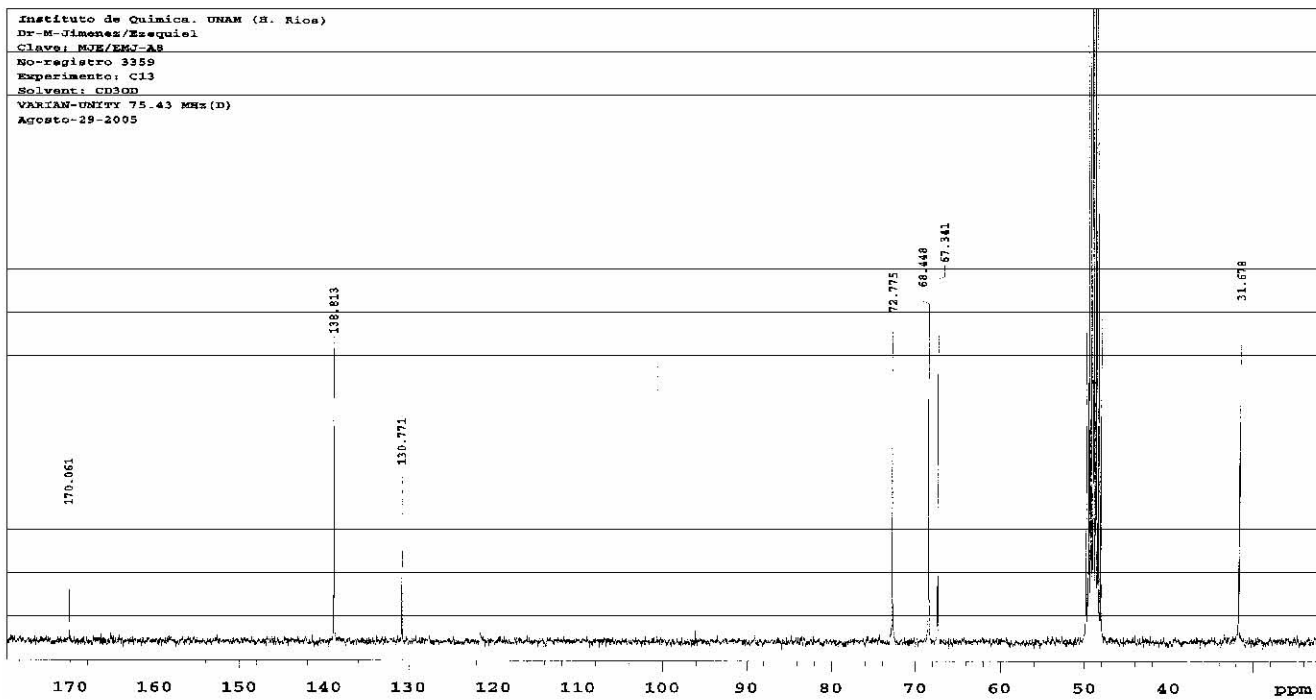


Figura 35. ERMN  $^{13}\text{C}$  del ácido shikimico

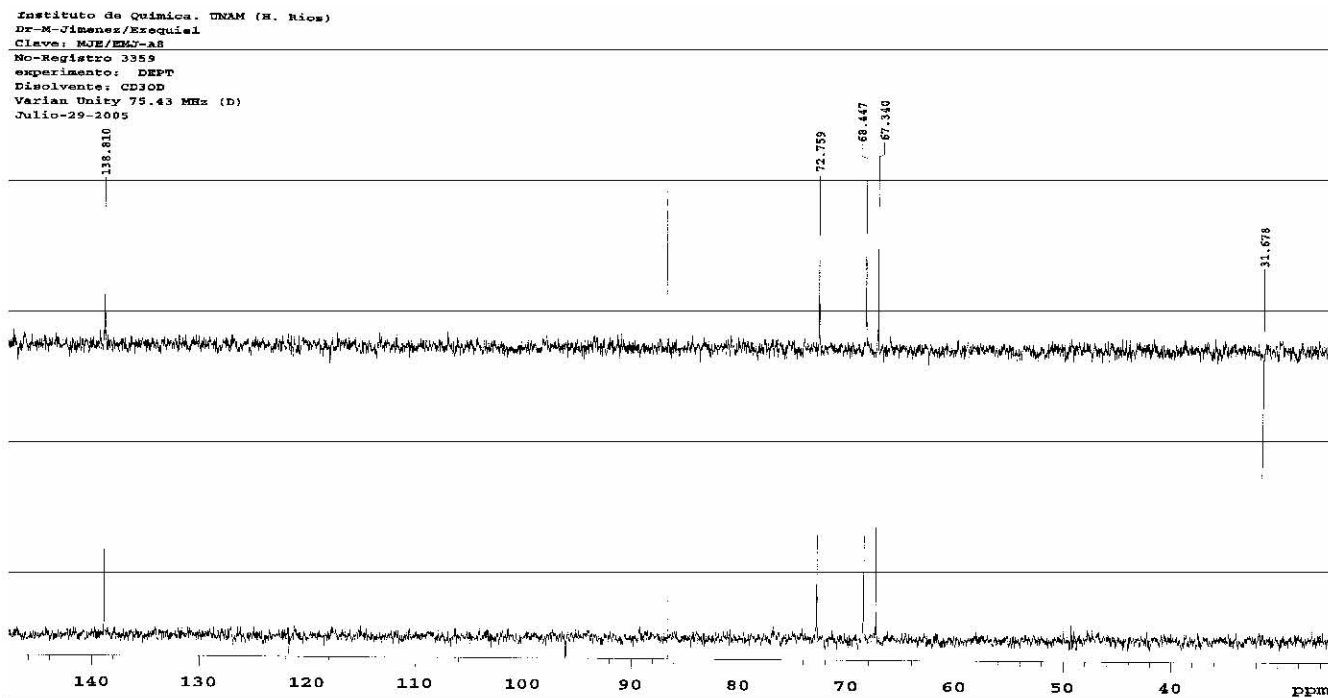
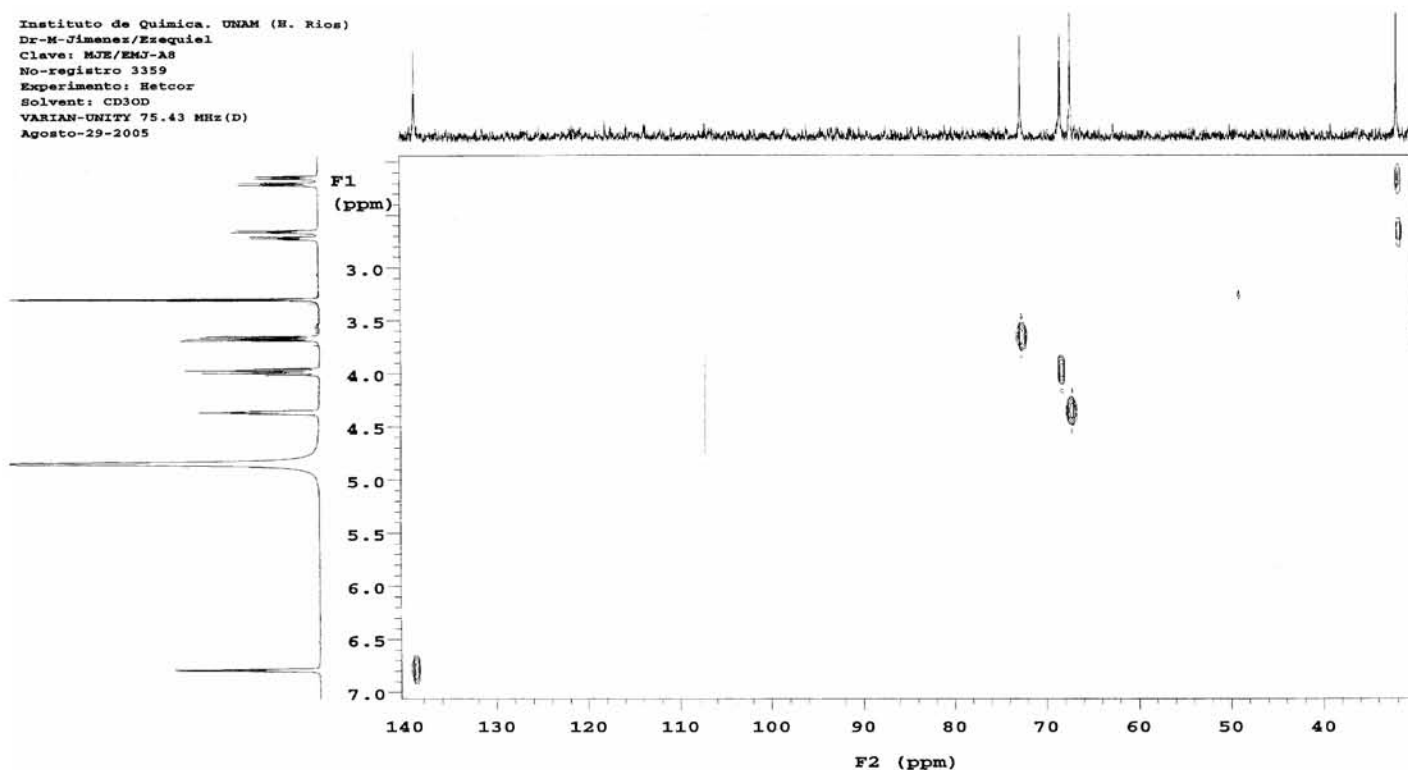


Figura 36. ERMN DEPT del ácido shikimico

Instituto de Química, UNAM (H. Ríos)  
Dr-H-Jimenez/Ezequiel  
Clave: MJE/EMJ-AS  
No-registro 3359  
Experimento: Hetcor  
Solvent: CD3OD  
VARIAN-UNITY 75.43 MHz(D)  
Agosto-29-2005



**Figura 37. ERMN HETCOR del ácido shikimico**

Los ERMN del ácido shikimico puro y la fracción activa son similares y corroboran, como compuesto mayoritario de la fracción IIIF3S4 al ácido shikimico, por el siguiente análisis de los espectros de ambos:

a) En  $\delta_H$  2.2 (dt) y 2.7 (dt) correspondiente a los H-7 y H-7' se observó un sistema  $A_2X$  (**Figura 19 y Figuras 33 y 34**). La señal correspondiente del carbono aparece  $\delta_C$  31.678 (C-7) (**Figura 21 y 35**) y corresponde a un  $CH_2$  como se aprecia en la señal hacia abajo en el DEPT (**Figura 36**), y la relación de ambas señales de  $^{13}C$  y  $^1H$  en el espectro de HETCOR (**Figura 21 y 37**).

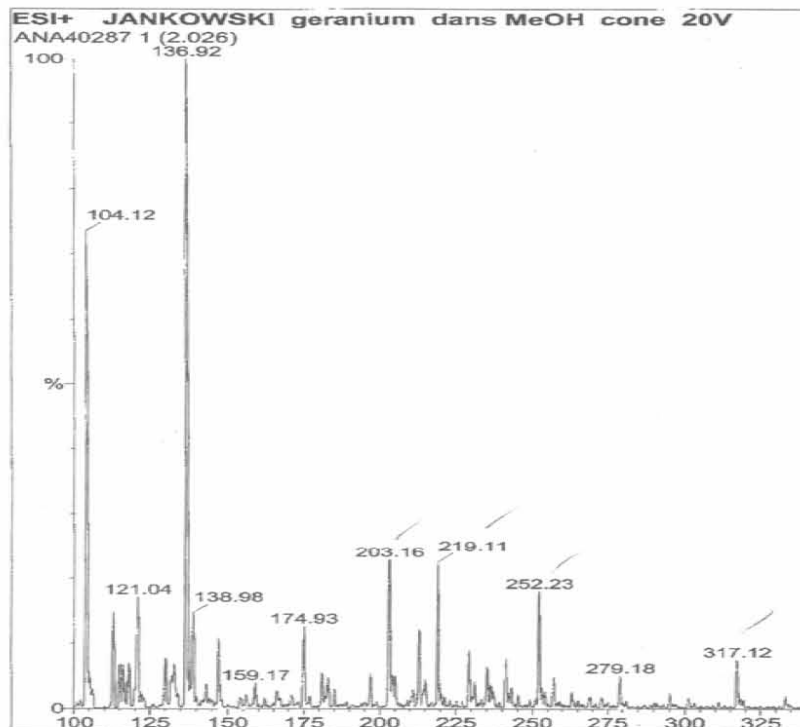
b) En  $\delta_H$  3.6 (dd) la señal correspondiente al H-5 (**Figura 19, 33 y 34**). La señal correspondiente del carbono aparece  $\delta_C$  72.775 (**Figura 21 y 35**) y corresponde a un CH como se aprecia en la señal hacia arriba en el DEPT (**Figura 36**), y la relación de ambas señales de  $^{13}C$  y  $^1H$  en el espectro de HETCOR (**Figura 37**).

c) En  $\delta_{\text{H}}$  3.9 (dt) la señal corresponde al H-6 (**Figura 19, 33 y 34**). La señal correspondiente del carbono aparece en  $\delta_{\text{C}}$  68.448 (**Figura 21 y 35**) y corresponde a un CH como se aprecia en la señal hacia arriba en el DEPT (**Figura 36**), y la relación de ambas señales de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  en el espectro de HETCOR (**Figura 21 y 37**).

d) En  $\delta_{\text{H}}$  4.3 (m) la señal corresponde al H-4 (**Figuras 19, 33 y 34**). La señal correspondiente del carbono aparece en  $\delta_{\text{C}}$  67.341 (**Figuras 21 y 35**) y corresponde a un CH como se aprecia en la señal hacia arriba en el DEPT (**Figura 36**), y la relación de ambas señales de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  en el espectro de HETCOR (**Figura 21 y 37**).

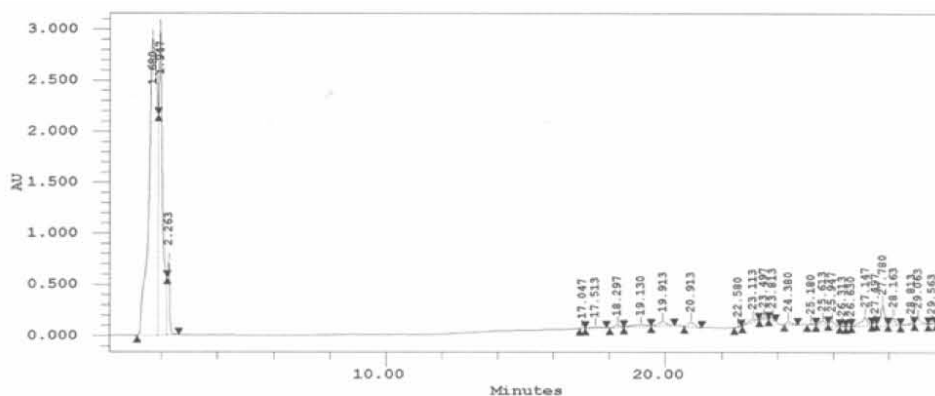
e) En  $\delta_{\text{H}}$  6.7 (m) la señal corresponde al H-3 (**Figuras 19, 33 y 34**). La señal correspondiente del carbono aparece en  $\delta_{\text{C}}$  138.810 (**Figura 21 y 35**) y corresponde a un CH como se aprecia en la señal hacia arriba en el DEPT (**Figura 36**), y la relación de ambas señales de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  en el espectro de HETCOR (**Figura 21 y 37**).

Las señales del ácido shikimico de la IIF3S4 fueron similares, en cuanto a acoplamientos y desplazamientos de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  (**Cuadro 7 y 8**), por lo cuál hay ácido shikimico en esta fracción y las señales de  $^1\text{H}$  (2.2, 2.7, 3.6, 3.9, 4.3 y 6.7 ppm) que se observaron en BF3S8 (**Figura 26**), CF3S8 (**Figura 27**), F3S4 (**Figura 17**), F4S3 (**Figura 18**), son del ácido shikimico. Estas señales se observaron hasta la F3S10 y F4S9 (no se muestran los espectros de RMN), lo cuál indica que existe en esas fracciones una buena cantidad de ácido shikimico. Otro dato de la gran cantidad de ácido shikimico es un Espectro de Masas ESI (**Figura 38**) que se hizo del extracto liofilizado crudo de *G. seemanni* donde aparece la señal de un peso molecular de 174.93 que corresponde al peso molecular del ácido shikimico con una fórmula  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5$ .

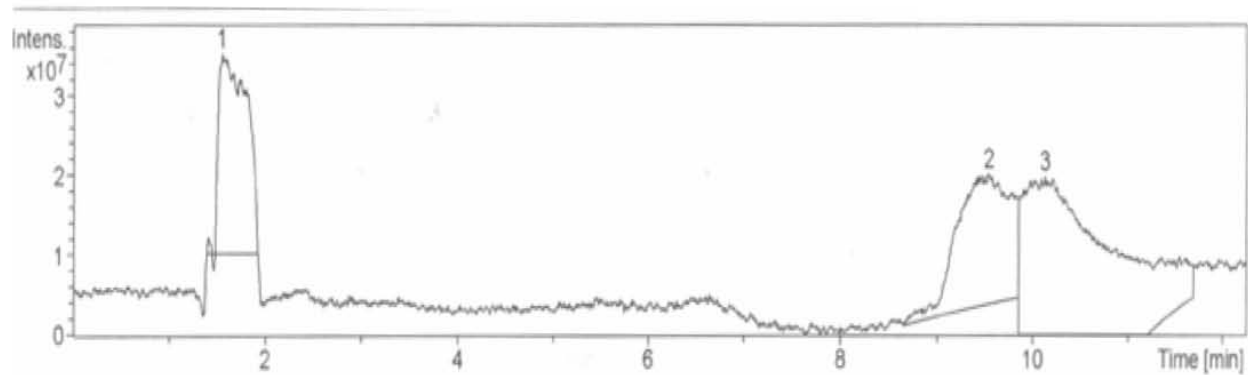


**Figura 38. Espectro de Masas ESI del Extracto liofilizado crudo de *G. seemanni***

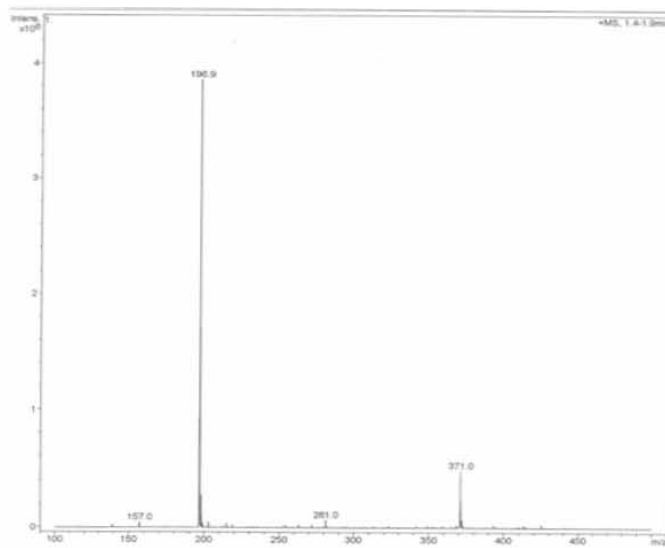
Para confirmar que el compuesto que se encuentra en las fracciones activas en mayor concentración es el ácido shikimico y saber en que proporción, se analizó por HPLC y HPLC-MS corridas en condiciones similares (**Apéndice 6**) comparándolo con la fracción activa IIF4S3. A continuación se muestran los cromatogramas y Espectros de Masas obtenidos (**Figuras 39, 40, 41, 42, 43 y 44**).



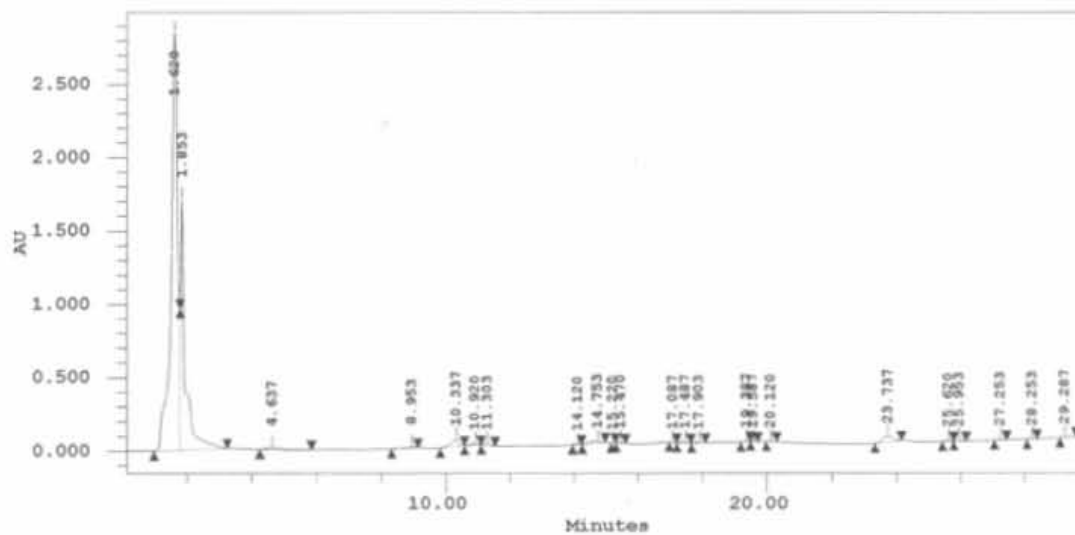
**Figura 39. Cromatograma de HPLC del ácido shikimico**



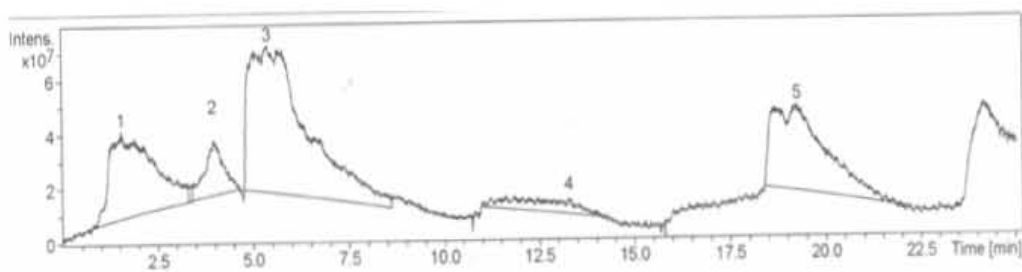
**Figura 40. Espectro de HPLC-MS del ácido shikimico**



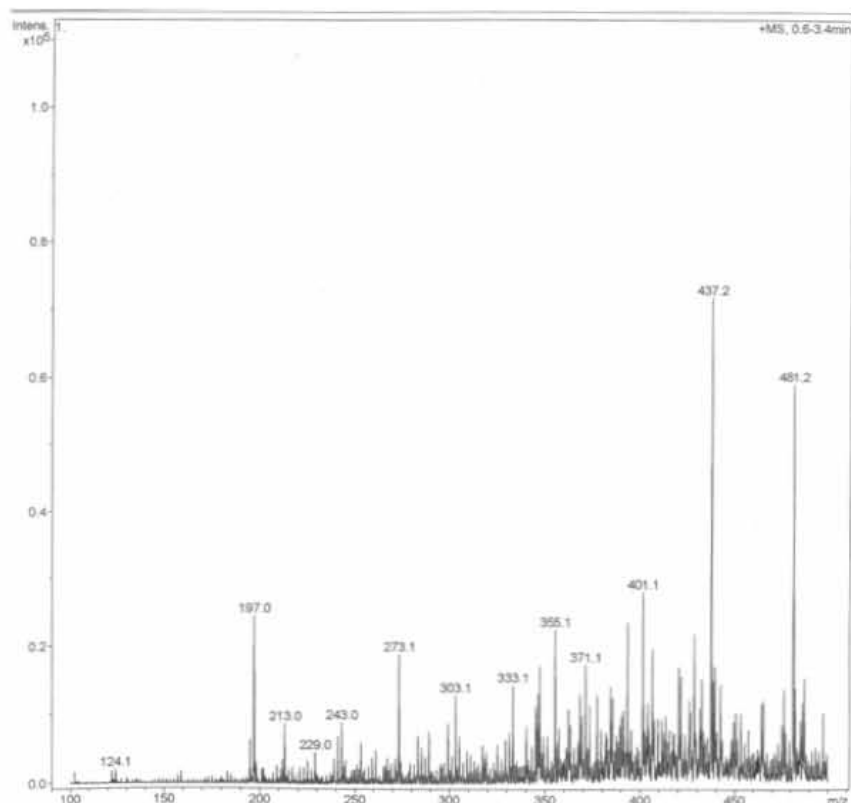
**Figura 41. Espectro de Masas del primer compuesto obtenido por HPLC-MS del ácido shikimico**



**Figura 42. Cromatograma de HPLC de la fracción IIF3S4**



**Figura 43. Espectro HPLC-MS de la fracción IIF3S4**



**Figura 44. Espectro de Masas del compuesto 1 obtenido por HPLC-MS de la fracción III F3S4**

Finalmente por medio del HPLC y HPLC-MS se confirmó la presencia del ácido shikimico en la fracción III F3S4. Se obtuvo un señal que corresponde a la del ácido shikimico puro con una retención de 1.6 minutos (**Figura 39**). Por medio de HPLC-MS se obtuvo una señal con una retención de 1.6 minutos que corresponde al ácido shikimico (**Figuras 40 y 41**), dicho compuesto tuvo un peso de 197 (**Figura 41**), que corresponde al peso del ácido shikimico (174) mas el peso del sodio (Na) (23). Esta señal en 197 es la mayoritaria vista por su tamaño, se observan señales en 157, 281 y 371, que son mínimas y podrían ser impurezas. En el caso de la señal de 371 puede corresponder a una dimerización del ácido shikimico ( $174+174=348$ ) más el peso del sodio (23) que se pueden dar por el método utilizado. En cuanto a la fracción III F3S4 se observa una señal con la misma retención del ácido shikimico en 1.6 minutos (**Figura 42**). Esta señal en 1.6 minutos corresponde a un porcentaje de 65.99% del total de la fracción y es la

mayoritaria. Esto concuerda con el hecho de que esta fracción acidificó el medio MEM tornándolo amarillo al igual que el ácido shikimico puro en las dos primeras concentraciones (10mg/mL y 1mg/mL). La fracción IIF3S4 de la cuál se pesaron 10mg y se tenía una concentración final en el pozo de 1mg/mL, tenía un total de aproximadamente 0.65 mg/mL de ácido shikimico (65.99%) y todavía acidificaba el medio MEM. La concentración 0.1mg/mL del ácido shikimico puro ya no acidificaba el medio MEM. Esto sugería que en la fracción IIF3S4 había más cantidad de ácido shikimico que 0.1 mg/mL, lo cuál se confirmó con el HPLC. Por medio de HPLC-MS se obtuvieron seis picos con tiempos de retención de 1.6, 4.0, 5.4, 13.3, 19.2 y 23.3 minutos (**Figura 43**) que son los otros compuestos presentes en la mezcla bioactiva que no se han identificado. La señal 3 con una retención de 5.4 minutos no se observa por HPLC (**Figura 42**), lo cuál sugiere que se trata de compuestos que no pueden ser vistos por UV. Estos compuestos tienen pesos que van de 120 a 476 y que podrían ser azúcares. La señal en 1.6 minutos del espectro de la fracción IIF3S4 de HPLC-MS (**Figura 43**) corresponde principalmente al ácido shikimico, y en el espectro de masas de dicha señal (**Figura 44**) se observa un pico con un peso de 197, que como ya se había mencionado, corresponde al ácido shikimico (174) más el peso de un sodio (23). Al igual que en las masas del ácido shikimico puro, se observa una señal en 371 que corresponde a un dímero del ácido shikimico (348) más el peso del sodio (23). También se observan otras señales con pesos que van del 124 a 481. Esto muestra como aún usando HPLC es difícil separar los compuestos presentes en la fracción IIF3S4, ya que con una retención de 1.6 minutos se obtienen varios compuestos vistos por HPLC (UV) y por su masa por HPLC-MS.

Se corrió una placa de cromatografía en placa fina con un sistema metanol: acetato de etilo (2: 8) donde se pusieron muestras de la F3S4 y F4S3 junto con algunos monosacaridos (**Figura 45**). Se muestra de izquierda a derecha: F3S4, azúcar, manitol, maltosa, sacarosa, galactosa, rafinosa, treosa, sorbitol, glucosa y F4S3. Se revelaron con sulfato cérico. Se observa que podría haber cualquiera de estas azúcares, ya que se podrían translapar y ningún azúcar corre más que la fracción lo cuál puede sugerir que son polisacaridos lo



que pueden afectar la adherencia. Se está tratando de identificar estos azúcares para corroborar el efecto que pudieran tener sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2.



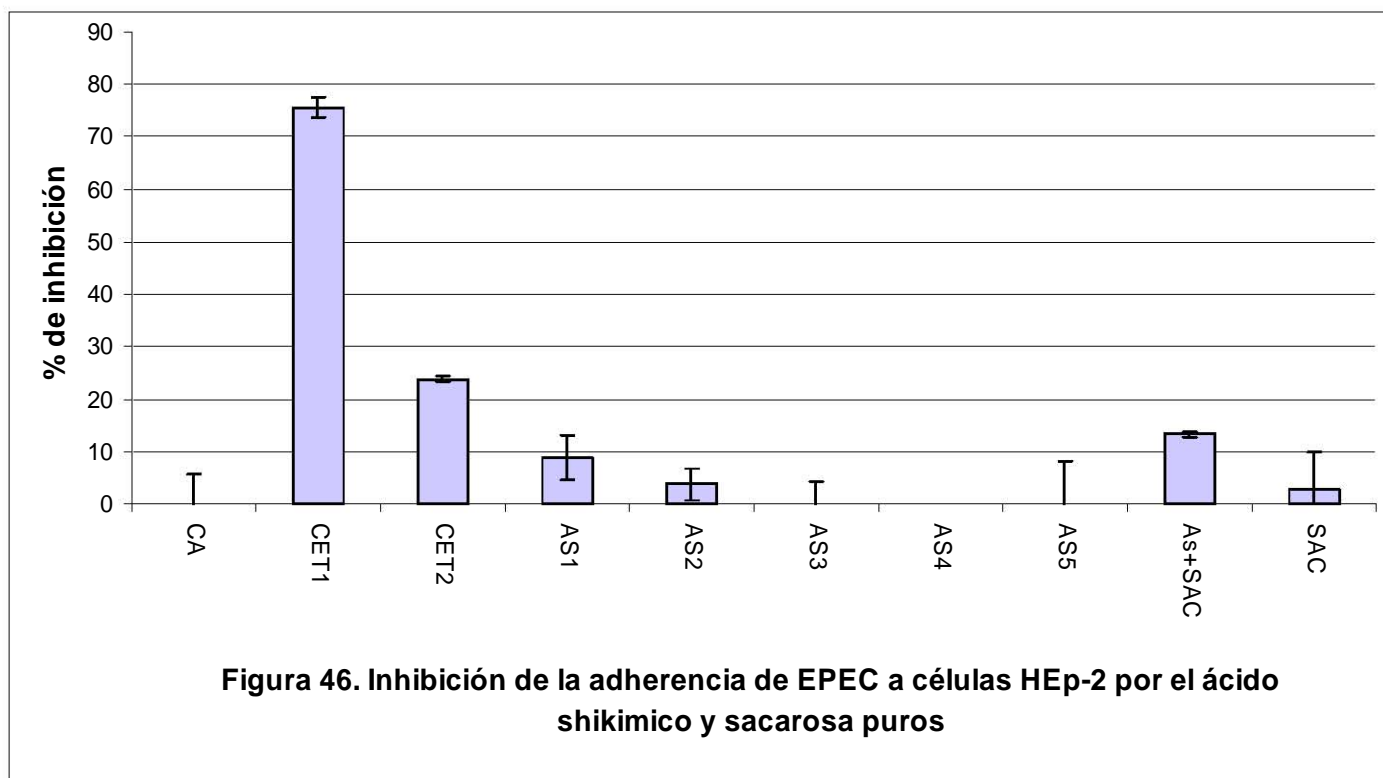
**Figura 45. Placa cromatográfica de azúcares  
eluída con un sistema metanol: acetato de etilo (2: 8)**

El ácido shikimico es un precursor del metabolismo primario de microorganismos y plantas, que puede mimetizar azúcares por lo cuál podría tener una actividad antiadherente. Es precursor de compuestos aromáticos y de amino ácidos aromáticos como el triptofano, tirosina y fenilalanina (Klaus M. Hermann y Lisa M. Weaver, 1999).

#### **XI.1.12.- Efecto de la sacarosa y del ácido shikimico puros**

Los espectros de RMN, tanto de de hidrógeno como el HETCOR de dos dimensiones de la fracción IIIIF3S4 (**Figura 19 y 21**) reportaron la presencia del ácido shikimico en varias de las fracciones activas (F3S4, F4S3 y F3S8). Para evaluar si la sacarosa y/o el ácido shikimico, los dos compuestos identificados en algunas de las fracciones con actividad antiadherente pudieran ser los responsables de tal efecto, se probaron para definir su participación sobre la adherencia localizada de EPEC a células HEp-2. Del ácido shikimico se hicieron cinco diluciones, en las primeras dos (10mg/mL y 1mg/mL) se observó que acidificaban el medio de cultivo tal y como se había observado con F3S3 a F3S10, IIF3S4 a IVF3S4, F4S3 a F4S6 y IIF4S3 a

IVF4S3). Se mezclaron 200µL el ácido shikimico con 200µL de la sacarosa para descartar un efecto sinérgico o antagónico entre los dos compuestos. Los resultados obtenidos muestran que ninguno de los dos compuestos por separado o mezclados inhibe la adherencia de EPEC (**Figura 46**) (**Figuras 11, 12, 13, 14, 15 y 16 del Apéndice 3**).

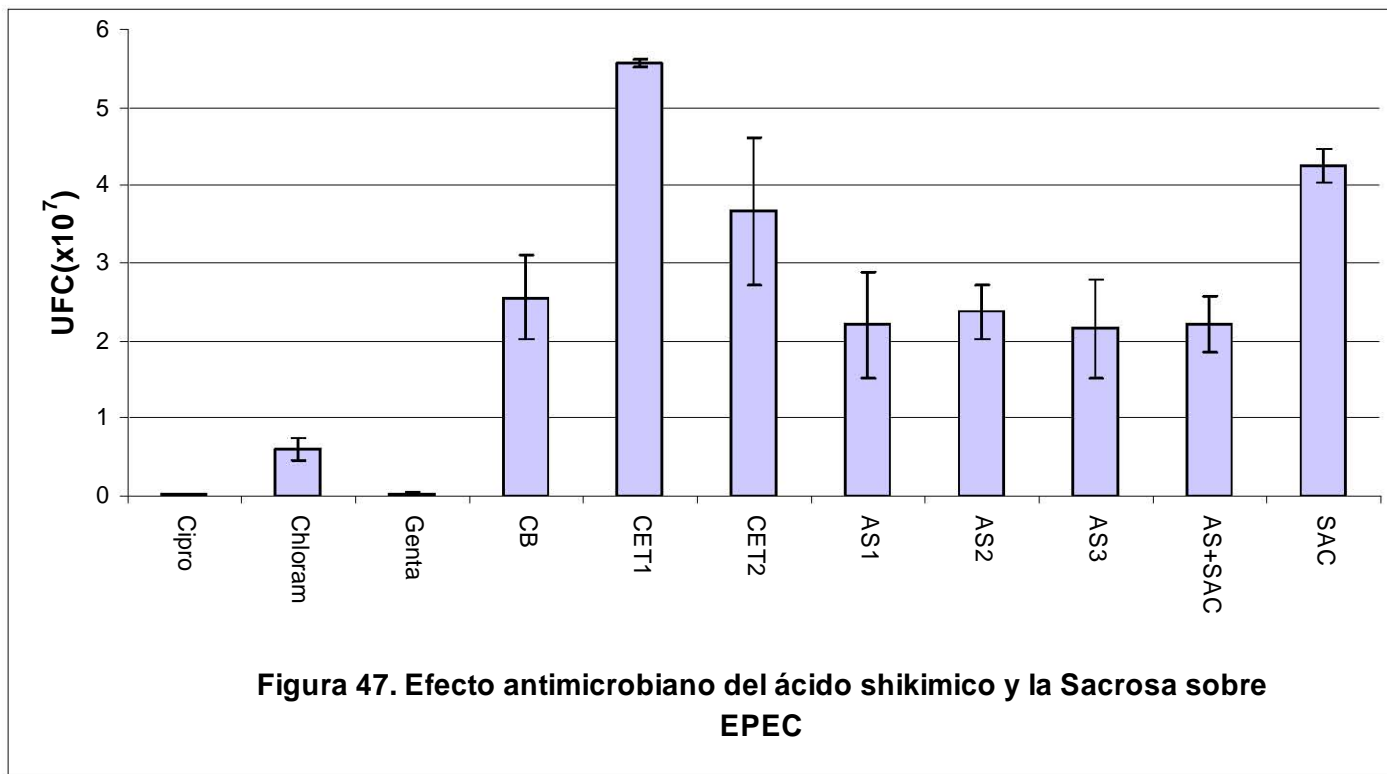


Control de adherencia (CA), control liofilizado crudo 10 mg / mL (CET1), control liofilizado crudo 1 mg / mL (CET2), ácido shikimico 1 mg / mL (AS1), 0.1 mg / mL (AS2), 0.01 mg / mL (AS3), 0.001 mg / mL (AS4), 0.0001 mg / mL (AS5), mezcla ácido shikimico más sacarosa al 50% (As+SAC) y sacarosa 1mg / mL (SAC)

Resultado interesante observar que a partir de la concentración de 10 µg / mL de ácido shikimico se incrementa la adherencia, efecto que también se identificó con algunas de las fracciones obtenidas en el estudio.

Los resultados del ensayo de actividad antibacteriana (**Figura 47**) de estos compuestos fue similar a lo obtenido durante todo el estudio, ninguno de los dos compuestos interfiere con el crecimiento de EPEC lo

que finalmente apoya que los componentes del geranio obtenidos en el fraccionamiento participan en la inhibición de la adherencia sin interferir con el crecimiento de la bacteria.



Ciprofloxacina 0.01 µg / mL (Cipro), cloramfenicol 4 µg / mL (Chloram), sulfato de gentamicina 1 µg / mL (Genta), Control bacteriano (CB), extracto liofilizado crudo 10 mg / mL (CET1), extracto liofilizado crudo 1 mg / mL (CET2), ácido shikimico 1 mg / mL (AS1), 0.1 mg / mL (AS2), 0.01 mg / mL (AS3), 0.001 mg / mL (AS4), 0.0001 mg / mL (AS5), mezcla ácido shikimico más sacarosa al 50% (As+SAC) y sacarosa 1mg / mL (SAC)

## XII.- ANÁLISIS DE RESULTADOS

Aunque el geranio es una planta ampliamente conocida existen serios problemas taxonómicos en el género, principalmente debido a una mala aplicación del nombre *Geranium mexicanum*. Esto ha dado lugar a que durante muchos años se haya usado el nombre de *Geranium mexicanum* en un sentido amplio, englobando a muchas especies de geranios (Moore, 1943). Con respecto a la planta utilizada en el estudio su

identificación reportó que se trata de *G. seemanni*, es probable que muchos estudios en los que se ha propuesto haber trabajado con *Geranium mexicanum* en realidad se trataba de la especie analizada en nuestro trabajo.

En relación al rendimiento al obtener el extracto liofilizado crudo se obtuvieron en total 20.02 g que corresponden aproximadamente al 10% del producto procesado, resultado interesante que al observar las características del extracto liofilizado éste era de color café claro con un olor dulce, ésta última apreciación sugería la presencia de azúcares hecho que fue confirmado al realizar la caracterización de las fracciones.

El principal interés del estudio se enfocó a identificar las fracciones del extracto liofilizado del geranio que participaban en la inhibición de la adherencia de EPEC descartando la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana ya que en estudios anteriores (Mendoza et al., manuscrito en revisión) se reportó la actividad antiadherente de *G. seemanni*. Resulta importante resaltar que el efecto de inhibición de la adherencia con este extracto mostró mayor intensidad (**Figura 8**) (**Figura 3 del Apéndice 3**), lo cual podría estar relacionado con las condiciones ambientales en donde crece la especie, la época de colecta, etc., pues se sabe que influyen en la producción y / o concentración de metabolitos secundarios. También se analizó si el extracto presentaba actividad antibacteriana encontrándose que en ninguno de los casos se presentó muerte bacteriana (**Cuadro 2**).

Para analizar si el efecto de inhibición del extracto crudo de *G. seemanni* se daba en otras cepas de EPEC se decidió probar sobre 5 cepas clínicas aisladas de niños con diarrea, se pudo comprobar que la actividad del extracto sobre la adherencia de tipo localizado se presenta en forma generalizada lo que plantea su empleo en forma genérica en los casos de diarrea relacionados con cepas EPEC. El efecto observado se relaciona con una interferencia en la formación de la microcolonia de bacterias (**Figuras 2 y 3**) y una adherencia dispersa a lo largo de la célula, evento que se ha relacionado con la expresión de las fimbrias *bfp*. Lo

anterior hace suponer un efecto en la regulación del gene *bfp* ya que los resultados coinciden con lo descrito al utilizar mutantes knock out de *bfp* (Clearly *et al.* 2004). En este estudio se muestra que las cepas con la mutación no expresaban la fimbria y al presentarse tal situación se presentaban cambios en el patrón de adherencia en el que se incluía la ausencia en la formación de microcolonias típicas del patrón localizado. La participación de las fimbrias *bfp* en el patrón de adherencia localizado se corroboró al realizar dobles y triples mutantes de *bfp*, *espA* y *eae* (intimina), observándose que las mutantes *bfp* negativas aunque se adherían a las células no formaban las microcolonias del patrón localizado de las cepas EPEC. Lo anterior se confirmó al observar la adherencia de dobles y triples mutantes hecho que a su vez permitió establecer la participación de EspA en la adherencia pero no en la formación de las microcolonias.

Para identificar las fracciones del geranio asociadas con la inhibición de la adherencia se fraccionó por diferentes columnas y se probó cada una de ellas utilizando la prueba de adherencia de EPEC a células HEp2. Así se llegó a la fracción activa IIF3S4 de la cuál se pudo indentificar el ácido shikimico y sacarosa, estudios posteriores de HPLC y HPLC-MS mostraron que el ácido shikimico es el compuesto mayoritario con un 65%. Se adquirió el ácido shikimico comercialmente y se analizó por RMN, HPLC y HPLC-MS, corroborando la presencia del isómero del ácido shikimico presente en la fracción activa IIF3S4. Para establecer si el ácido shikimico o la sacrosa presentes en la fracción activa eran los compuestos activos se probaron los compuestos puros. La falta de actividad del ácido shikimico puro (**Figuras 11, 12 y 13 del Apéndice 3**) sugiere que alguno de los otros 5 compuestos mayoritarios observados por HPLC de la IIF3S4 (**Figura 42 y 43**), y las demás fracciones, es el compuesto activo, o que el ácido shikimico requiere de otro compuesto del extracto para ser activo. Hay varios casos en los cuáles no hay una actividad con los compuestos puros comprados y que los compuestos semi-aislados tienen actividad por la presencia, tal vez, de otros que tengan un efecto sinérgico. No se pudo separar los demás compuestos de la IIF3S4 debido a las bajas concentraciones y cantidades obtenidas, por lo que no se conoce que otros compuestos mayoritarios tienen y cuál de estos tiene el efecto de inhibición de la adherencia, o que mezclas de estos

compuestos podrían tenerla. Tal vez a la hora de separarlos y purificarlos ninguno de los compuestos tenga la actividad y se requiere de la mezcla para tener la actividad. Por otro lado hay reportes de que un cambio en el pH del medio podía afectar la adherencia de EPEC cambiando las propiedades eléctricas e hidrofóbicas de la superficie de EPEC, y el ácido shikimico cambia el pH del medio tal vez afectando la adherencia y teniendo un efecto de inhibición (Desnottes *et al.*, 1989; 1992; 1994; Loubeyre, 1992; Ravizzola *et al.*, 1993; Braga *et al.*, 2002;). Sin embargo no hay un efecto marcado de inhibición con el ácido shikimico puro y el cambio de pH, por lo cuál parece que no se afecta significativamente la adherencia, aunque en las primeras concentraciones hay una inhibición del 8% que podría deberse al cambio de pH observado por el cambio de coloración del MEM (concentraciones 1mg/mL y 0.1mg/mL) (**Figura 46**) (**Figura 11 Apéndice 3**). Las concentraciones menores no acidificaron el medio y se ve un aumento de adherencia que disminuye con las diluciones. Por otro lado, se observa un efecto de inhibición del 13% del ácido shikimico con la sacarosa, un efecto mayor que el ácido shikimico solo (8% en la concentración mayor) y la sacarosa sólo (2%) (**Figura 46**) (**Figura 15 del Apéndice 3**). Esto podría apoyar la idea de que un azúcar en la fracción podría tener un efecto sinérgico con el ácido shikimico y que el efecto de inhibición de la adherencia observado en las fracciones es debido al efecto de varios compuestos. La sacarosa también presentó un aumento de las UFC (**Figura 47**) lo cuál no aumento la adherencia de EPEC (**Figura 46**) (**Figura 14 del Apéndice 3**). El control de extracto total (CET) en la concentración 10mg/mL también presento un gran aumento de más de el doble de las UFC comparado con el control bacteriano (CB) (**Figura 47**). En este caso, aún habiendo un aumento considerable del número de bacterias, hay una gran disminución de la adherencia a células HEp-2 (**Figura 46**) (**Figura 3 Apéndice 3**). Es interesante que aún habiendo un aumento de bacterias o UFC, disminuya el número de bacterias adheridas, lo cuál sugiere la existencia de un compuesto o compuestos que interfieren con la adherencia sin tener un efecto antimicrobiano. Se propone que los compuestos del extracto de *G. seemanni* afectan la adherencia de EPEC

a células HEP-2 por *bfp*, ya sea adhiriéndose a esta fimbria directamente, a su receptor celular, o que se regule la expresión de esta fimbria.

Falta caracterizar los compuestos de la F6 que tuvieron actividad a los cuáles no se les continuó el fraccionamiento debido a la poca cantidad obtenida. El mismo problema hubo con la GF3S8 (**Figuras 28, 29 y 30**) (**Figura 10 del Apéndice 3**) en donde se trato de caracterizar el compuesto pero debido a la poca cantidad no se le pudo hacer el HETCOR. Son pocas señales del  $^{13}\text{C}$  (**Figura 29**) que se observan lo cuál no concuerda con los pesos que se observan en el espectro de Masas (**Figura 30**). Esto podría ser debido a la poca cantidad de compuesto por lo cuál no se observan todas las señales del  $^{13}\text{C}$ .

Falta caracterizar las otras azúcares que parece haber en las fracciones así como los otros 5 compuestos mayoritarios de las fracciones, para ver si alguno de ellos tiene la actividad antiadherente.

Por último se podrían probar mutantes *bfp*<sup>-/-</sup> y *EspA*<sup>-/-</sup>, y mutantes dobles, para poder determinar con mayor exactitud el blanco del compuesto, aunque todo parece indicar a *bfp* como blanco del compuesto y a *EspA* como principal medio de adherencia de la bacteria en ausencia de *bfp*.

### **XIII.- CONCLUSIÓN**

El Extracto liofilizado de *G. seemanni* presentó inhibición de la adherencia de *E. coli* enteropatógena (EPEC) a células HEp-2.

El extracto liofilizado crudo de *G. seemanni* presentó un efecto de inhibición de la autoagregación bacteriana o formación de colonias sobre 5 cepas clínicas de EPEC, lo cuál sugiere un efecto del extracto sobre *bfp*, fimbria involucrada en la autoagregación bacteriana.

Se identificó y caracterizó ácido shikimico como el compuesto mayoritario de fracciones activas aunque este compuesto puro adquirido en Sigma- Aldrich no presentó un efecto de inhibición de la adherencia de EPEC a células HEp-2.

Se requieren más estudios con respecto a la purificación de los compuestos activos involucrados en la inhibición de la adherencia por extractos de *G. seemanni* sobre *E. coli* enteropatógena, sin embargo, los resultados obtenidos confirman que el uso de las infusiones puede ayudar a combatir la diarrea ocasionada por *E. coli* enteropatógena y que su uso como remedio tradicional podría tener un beneficio inhibiendo la adherencia de EPEC.



## XIV.1.1.- A P É N D I C E 1

### Trabajos realizados con miembros del género *Geranium*

El aceite esencial de *G. robertianum* tiene propiedades analgésicas y antisépticas y lo constituyen más de 100 componentes, de los cuales al menos 72 están identificados. Entre ellos se encuentran principalmente monoterpenos y 13 flavonoides (Quijano, 2003).

*Geranium niveum* S. Watson es una planta que reporta actividad contra protozoarios como *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*. Esta planta crece en los bosques de pino encino de las montañas del este de Chihuahua, México. Es una planta con un amplio uso entre los Tarahumaras que la denominan “makiki”. La utilizan como purgante y remedio contra el dolor de los riñones (Calzada *et. al.*, 1999). De esta se aislaron 2 nuevas Proantocyanidinas de Tipo A que recibieron el nombre de Geraninas A y B. Adicionalmente se obtuvieron mahuannin B (3), reynoutrin(4), hyperin(5), methyl gallate(6), y ácido 3- $\beta$ -caffeoil-12-oleanen-28-oic. Otros estudios han demostrado que las proantocianidinas tienen actividad antiinflamatoria, antiviral, antibacteriana, inhibitoria de enzimas, antioxidante y propiedades de atrapar radicales. Es esta última actividad antioxidante, la que investigaron Maldonado *et al.*, 2005, mostrando que las Geraninas A y D tiene una gran actividad antioxidante similar al resveratrol y ácido ascórbico. La propiedad antioxidante de las Geraninas A y D contenidas en *Geranium niveum* podría parcialmente explicar el gran uso de esta planta en el sistema herbolario tradicional Tarahumara para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, dolor, y fiebres asociadas al estrés oxidativo.

Las raíces de *Geranium mexicanum* son usadas en la herbolaria tradicional para tratar la diarrea y disentería. *Geranium mexicanum* es una planta endémica de México usada en la herbolaria tradicional como purgativo, y como remedio contra la tonsillitis, tos, urticaria, disentería y diarrea, siendo su nombre vernáculo “pata de león”, nombre que también recibe *Geranium seemanii*, especie con la cuál se confunde muy seguido. De las raíces de *Geranium mexicanum* se extrajeron con metanol y diclorometano compuestos con actividad antiprotozoaria contra *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*. Los compuestos principales con actividad antiprotozoaria fueron flavan-3-ol y (-)-epicatechin. Otros compuestos aislados que tuvieron actividad moderada fueron (+) - catechin, tyramine y  $\beta$ -sitosterol3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside. Los datos obtenidos en este estudio y en el de Alanís, *et al.* 2003 confirman que el (-)- epicatechin es el compuesto principal que puede ser usado para el desarrollo de un terapéutico contra la diarrea y disentería causada por *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* (Calzada *et. al.*, 2005). Alanís *et al.* 2005 probó el efecto antimicrobiano de un total de 26 plantas contra 8 especies de enteropatógenos. Una de las plantas que se probaron contra *E. coli* O157:H7, *E. coli* ATCC 25922, dos *Shigella sonnei*, dos *Shigella flexneri* y dos *Salmonella* sp.; fue *Geranium mexicanum*, la cuál reporto una buena actividad antimicrobiana en sus extractos metanólicos y acuosos. Con extractos metanólicos de las partes áreas se obtuvieron resultados de inhibición del crecimiento con una concentración de 8 mg/mL de 56.8% con *E. coli* ATCC 25922, de 69.2% *E. coli* O157:H7, de 60 y 57.1% con *Shigella sonnei*, de 100% con ambas *Shigella flexneri* y de 25% con ambas *Salmonella* sp. Con extractos metanólicos de las raíces se obtuvieron resultados de inhibición del crecimiento con una concentración de 8 mg/mL de 13.5% con *E. coli* ATCC 25922, de 17.9% *E. coli* O157:H7, de 46.7 y 42.9% con *Shigella sonnei*, de 28.6% y 100% con ambas *Shigella flexneri* y de 25% y 12.5% con ambas *Salmonella* sp. Con extractos acuosos de las partes aéreas se obtuvieron resultados de inhibición del crecimiento con una concentración de 8 mg/mL de 7.7% con *E. coli* ATCC 25922, de 33.3% *E. coli* O157:H7, de 52% y 46.7% con *Shigella sonnei*, de 100% con ambas *Shigella flexneri* y de 25.9% y

28.0% con ambas *Salmonella* sp. Con extractos acuosos de las raíces se obtuvieron resultados de inhibición del crecimiento con una concentración de 8 mg/mL de 53.8% con *E. coli* ATCC 25922, de 60.0% *E. coli* O157:H7, de 76.0% y 73.3% con *Shigella sonnei*, de 100% con ambas *Shigella flexneri* y de 55.6% y 52.0% con ambas *Salmonella* sp. Concluyen que *Caesalpinia pulcherria* (Tabachín), *Chiranthodendron pentadactylon* (Flor de Manita), *Cocos nucifera* (Coco), *Geranium mexicanum* (raíces y partes aéreas), *Hippocratea excelsa* (Canmcerina) y *Punica granatum* (Granada) son plantas con una actividad considerable contra enteropatógenos y ofrecen una alternativa para tratar enfermedades con agentes infecciosos resistentes a antimicrobianos.

*Geranium thunbergii* Sieb, et. Zucc. (Conocida como Gennoschoko en Japón) es una planta que se utiliza en esa región contra la diarrea y como preventivo contra el cáncer. Se reporta una actividad de inhibición de TNF  $\alpha$ , con lo cuál podría tener un uso contra el cáncer. El compuesto al cuál se le atribuye esta actividad es la geranina, un tanino muy estudiado (Okabe *et al.* 2001).

*Geranium sanguineum* L. es una planta muy utilizada en Bulgaria. Los extractos acuosos y etanolicos se emplean para tratar malestares gastrointestinales, problemas eruptivos de la piel, diversas infecciones así como en procesos inflamatorios. También se demostró que esta planta tiene actividad contra influenza A y B, atribuyendo dicha actividad a un complejo polifenólico compuesto de flavonoides, catequinas, taninos gálicos y ácidos fenólicos (Serkedjieva, 1998). Este efecto terapéutico del complejo fenólico de *G. sanguineum* necesitaba una explicación la cuál podía deberse a más de actividad biológica como un efecto antiviral específico, una acción inmunomodulante no selectiva, así como algunas interacciones biológicas y farmacológicas no específicas conocidas de los polifenoles como la unión a proteínas, atrapar radicales y actividades antioxidantes. Así se probó el efecto del extracto de Complejo fenólico sobre la actividad

fagocítica de los Polimorfonucleados (PMN) y macrófagos peritoneales (MØ). Se tomo en cuenta el nivel de MØ alveolares y peritoneales, así como los leucocitos PMN en sangre, así como la inhibición de la adherencia de los PMN en presencia de anticuerpos específicos a lo largo de nueve días en ratones infectados con el virus de Influenza A/Aichi/2/68 (H3N2). En paralelo se estudiaron los parámetros de infección, como tiempo de sobre vivencia medio (MST), desencadenamiento de infección viral pulmonar y consolidación pulmonar. El complejo polifenólico aumento la cantidad de MØ alveolares y peritoneales en ratones infectados y controles en 2 a 2.5 veces más. La migración de los MØ alveolares y peritoneales aumento en 1 a 1.5 veces más en el grupo de ratones infectados, y de 4 a 5 veces más en ratones controles sin infectar, observando un máximo al noveno día. El complejo polifenólico estimuló la actividad fagocítica de los PMN en sangre, tanto en ratones infectados como controles sin infectar. El índice de la inhibición de la adherencia de leucocitos disminuyó en ratones infectados y en los tratados con el complejo polifenólico. El tratamiento de los ratones infectados con el complejo polifenólico prolongo el tiempo de sobre vivencia medio, desencadenamiento de infección pulmonar y consolidación pulmonar. La estimulación del sistema inmune por el complejo polifenólico extraído de *G. sanguineum* contribuyen al efecto general de proteger contra el virus de influenza (Ivanova *et al.*, 2005). En Bulgaria se reconocen 23 especies que comprenden tres subgéneros y 9 secciones. Se reporta el uso de los flavonoides identificados en las diferentes especies, para establecer relaciones filogenéticas entre ellas (Ivancheva, 2000). También se ha reportado una actividad contra el virus del Herpes simplex tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2). Demostrando que los extractos acuosos de esta planta, que contenían de 29% a 49% de taninos y 0.05% a 1% de flavonoides, tenían actividad *in vitro* contra HSV-1 y HSV-2, así como en un modelo animal (Serkedjieva, 1999).

*Geranium caespitosum* G. presentó actividad como antibacteriano contra cepas multi- resistentes a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* (Stermitz, 2003).

*Geranium pratense* subsp. *finitimum* W., es un Geranio muy utilizado en la medicina tradicional Turca donde recibe el nombre de "Turnagagasi". Las partes aéreas de la planta son utilizadas contra la diarrea, diurético, homeostático, tónico y droga antidiabética. Adicionalmente se estudió la habilidad de algunos flavonoides purificados para atrapar radicales libres (Akdemir, 2001). Esta especie también se ha estudiado en Mongolia, donde se observó la influencia de extractos metanólicos sobre la  $\alpha$ -amilasa en ratones inhibiendo la enzima en un 43.9% (Kobayashi *et al.*, 2003).

#### **XIV.1.2.- A P É N D I C E 2**

##### **Generalidades de *E. coli* y EPEC**

*E. coli* es un bacilo Gram negativo corto ( $0.5 \times 4 \mu$ ), anaerobio facultativo, no esporulado, provisto de flagelos peritricos y fimbrias, que puede o no presentar cápsula. Su metabolismo se caracteriza porque fermenta la glucosa y otros azúcares con producción de gas. Es una bacteria catalasa positiva, oxidasa negativa y reduce nitratos a nitritos. Pertenece a la tribu *Escherichiae* y al género *Escherichia* y junto con otras bacterias previamente referidas pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Mediante el análisis de sus propiedades metabólicas se han descrito como especies del género: *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* y *E. vulneris* (Eslava *et al.*, 2001).

*E. coli* se ha caracterizado utilizando sus propiedades metabólicas estableciendo biotipos, por el análisis de sus antígenos somáticos (O, 175), capsulares (K) y flagelares (H, 56), utilizando anticuerpos específicos es que se reconocen diferentes serotipos (formula antigénica O: H). También se utilizan los antígenos de fimbrias, la susceptibilidad de bacteriófagos (fagotipos), la producción de bacteriocinas (colicinas) y sus mecanismos de patogenicidad para agruparla (Reyes, 2000; Eslava *et al.*, 2001).

Se ha encontrado que la leche materna es un factor importante en la protección contra infecciones intestinales y respiratorias infantiles. Estudios epidemiológicos indican que la leche materna protege a los niños de la mayoría de los patógenos entéricos, incluyendo a *E. coli* diarreogénica. Se han publicado numerosos reportes acerca de la importancia de los anticuerpos contenidos en la leche que protegen contra enfermedades gastrointestinales en humanos y animales. Ensayos de inhibición de la adherencia contra cepas EPEC (patrón localizado) mostraron una actividad positiva atribuida a inmunoglobulinas de tipo A (IgA) que reaccionaban contra la intimina y otras proteínas desconocidas (Manjares *et al.*, 2000). Este es un proceso diferente al que se da con los extractos de plantas, pero es una forma de abordar el mismo problema.

La incidencia de EPEC entre los casos de diarrea estudiados en Chile es de 23% (Nataro *et al.*, 1996); en estudios en Brasil es de 30%, 23% y 10.7% casos de EPEC en niños enfermos y 18.2% de EPEC atípicas en niños sanos (de Almeida *et al.* 1998; Keller *et al.*, 2002; Scaletsky *et al.*, 2002;); por otro lado estudios del 2004 en Brasil demuestran que serotipos que eran típicos, como el O55, O111 y O115 son ahora raros, mientras que otras cepas enteroadherentes no del tipo de EPEC, pertenecientes al serogrupo O 125, fueron las que prevalecieron en niños menores de 1 año, ninguna de estas tenía el gen para *bfp* (Rodriguez *et al.* 2004) en estudios en Argentina del 80% (Ortiz *et al.*, 1992); en estudios en México es aproximadamente del 6% (Reyes, 2000); en un estudio en Francia es de 6.5% (Forestier *et al.*, 1996); el rango de aislamiento en un estudio en un campo de refugiados en Tailandia fue de 11% de 148 niños menores de 1 año (Echeverría *et al.*, 1987); el rango de aislamiento en Holanda es de 6.5% (Rademaker *et al.*, 1993); en Hanoi, Vietnam, se aisló EPEC en un 6.6% de niños con diarrea y en un 4.4% de niños sanos (Nguyen *et al.*, 2005). Por último se han aislado Cepas EPEC de conejos, vacas y perros, lo cuál podría ser usado para hacer pruebas *in vivo* en estos animales (Stephan *et al.*, 2004; Nakazato *et al.*, 2004; Dow *et al.*, 2005).

Históricamente se han reconocido, no por la presencia de factores de virulencia específicos, sino por pertenecer a ciertos serotipos O: H. Se conocen dos tipos de EPEC: los EPEC típicos poseen el plásmido EAF (Entero Adherence Factor); y las EPEC atípicas que no poseen el plásmido EAF (Scaletsky *et al.*, 1999; Giammanco *et al.*, 1996; Bouzari *et al.*, 2000). Las cepas EPEC pertenecen a un grupo de bacterias patógenas que inducen un rearrreglo de actina en las células epiteliales resultando en la formación de un pedestal bajo la bacteria adherida (Brendan *et al.*, 1991). Dos regiones del genoma de EPEC codifican para los factores de virulencia involucrados en el establecimiento de una infección. El operón *bfp*, localizado en el plásmido EAF, dirige la producción de la fimbria *bfp*, una fimbria de tipo IV asociada con la adherencia localizada y el fenómeno de auto agregación bacteriana, el cuál a su vez esta regulado transcripcionalmente por los genes per A, B y C. Cuando la bacteria hace contacto con la célula eucarionte se activan los genes de LEE el cual esta organizado en 5 operones (LEE1-LEE5). LEE puede ser dividida en muchas regiones distintas. En un lado se encuentran los genes *EspA*, *EspB* y *EspD*, que codifican para proteínas secretadas requeridas para señales de transducción y la lesión de adherencia y destrucción A/E. En el otro extremo están los genes para un sistema de secreción de tipo III, requerido para la secreción de proteínas incluyendo los productos de *EspA*, *EspB* y *EspD*. Una tercera región, entre las otras ya mencionadas, contiene el gen *eae* que codifica para la intimina (se reconocen básicamente 4 tipos) una proteína de membrana externa requerida para la adherencia íntima, y *Tir*, que codifica para la proteína Tir que actúa como receptor de la intimina. Los genes de adherencia se activan cuando EPEC llega al intestino delgado. La proteína EspA forma una estructura tubular (translocon) por donde pasan otras proteínas como EspB, EspD y Tir. En la célula eucariota Tir se fosforila en los residuos de tirosina y se inserta en la membrana de la célula eucariota donde sirve de receptor de la intimina. De esta forma actúa como foco para la acumulación de actina, y se piensa que transmite señales a la célula hospedera que dan lugar a cambios fisiológicos que incluyen liberación de calcio almacenado intracelularmente, activación de enzimas como fosfolipasa C y cambios en el potencial de la membrana. Esto resulta en la destrucción de la membrana y las microvellosidades

intestinales ocasionando la hipersecreción de agua y electrolitos. Este cuadro histopatológico es conocido como lesión de adherencia y destrucción A/E. Los genes responsables de esta lesión son *esc*, *sep*, *esp*, *tir* y *eae*, codificados en LEE. LEE esta regulado por *per*, el cuál activa la transcripción de un gen de LEE (*ler*) el cuál esta encargado de activar la transcripción de todos los genes de LEE (Law, 2000; Girón, 2000; Puente, 2001).

*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es un patógeno gram negativo que causa diarrea acuosa crónica principalmente en niños. La infección con EPEC se estima que causa la muerte de cien mil niños por año (Vallance y Finley, 2000). Las cepas EPEC pertenecen a un grupo de bacterias patógenas que inducen un rearrreglo de actina en las células epiteliales resultando en la formación de un pedestal bajo la bacteria adherida (Brendan *et al.*, 1991). EPEC se adhiere por medio de adhesinas, que se encuentran en la punta de estructuras tubulares alargadas llamadas Fimbria o Pili, a las células epiteliales del intestino en microcolonias o agregados de bacterias, en un proceso referido como adherencia localizada (Goosney *et al.*, 2001). Se propone un modelo de dos pasos para la adherencia de EPEC a las células. El primer paso que se da por una adherencia no íntima inicial, donde la unión de la bacteria a la superficie de la célula huésped esta mediada por una adhesina que no se ha definido. Hay hipótesis de que esta adherencia inicial podría estar mediada por *bfp* u otros Pili o fimbrias desconocidas todavía, por el flagelo, por EspA o por la íntima. El segundo paso en la adherencia es el de secreción de proteínas (EspS o *Escherichia coli* secreted proteins), formación de un filopodio transitorio y la adherencia íntima de la bacteria a la superficie de la célula huésped, proceso que se ha estudiado mucho y que conlleva a la formación del pedestal por medio de un rearrreglo de actina (Nougayréde *et al.*, 2003). Dos regiones del genoma de EPEC codifican para los factores de virulencia involucrados en el establecimiento de una infección. El operón *bfp*, localizado en el plásmido EAF, dirige la producción de la fimbria *bfp*, una fimbria de tipo IV asociada con la adherencia localizada y el fenómeno de auto agregación bacteriana. Cuando la bacteria hace contacto con la célula



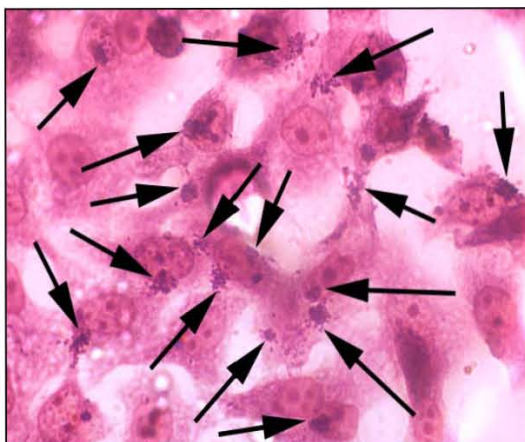
eucarionte se activan los genes de LEE el cual esta organizado en 5 operones (LEE1-LEE5). En un lado se encuentran los genes EspA, EspB y EspD, que codifican para proteínas requeridas para señales de transducción y la lesión A/E. En el otro extremo están los genes para un sistema de secreción de tipo III compuesto de cerca de 20 proteínas incluyendo a EscV y EscN que son esenciales para la secreción y translocación, requerido para la secreción de proteínas incluyendo los productos de EspA, EspB y EspD. Una tercera región, entre las otras ya mencionadas, contiene el gen eae que codifica para la intimina (se reconocen básicamente 4 tipos) una proteína de membrana externa requerida para la adherencia íntima, y Tir (EspE), que codifica para la proteína Tir que actúa como receptor de la intimina. Los genes de adherencia se activan cuando EPEC llega al intestino delgado. La proteína EspA forma una estructura tubular (translocon) por donde pasan EspB y EspD que forman un poro por el cuál pasan otras proteínas efectoras como EspF, EspG, EspH, Map y Tir. De estas EspF y EspG afectan varios procesos de células huésped pero no juegan una función importante en la formación del pedestal. Map esta envuelta en la inducción de un filopodio dependiente de la proteína GTPasa Cdc42 transitoria después del cuál se forma el pedestal de actina estimulado por la inhibición de la Cdc42 (Brendan *et al.*, 1991). EspH aumenta la cinética de formación del pedestal, de manera independiente a Tir, por medio de la represión directa o indirecta de la señalización de Cdc42. EspB interactúa con la proteína que une  $\alpha$  actina  $\beta$  catenin y su expresión en células de mamífero inducen rearrreglo de actina (Campellone *et al.*, 2004). EPEC puede utilizar dos vías separadas para inducir la polimerización de actina, una que depende de Tir y el reclutamiento de N-WASP y la otra vía, que es previa a la inserción de Tir, por medio del reclutamiento de “rafts” o balsas acompañadas de la acumulación de annexina 2. Esta última vía es desencadenada por componentes de LEE (Esps), que desencadenan la acumulación de colesterol y proteínas unidas a glycosyl phosphatidylinositol (componentes de los rafts o balsas) en sitios de unión de la bacteria con la superficie de la célula del huésped y un reclutamiento de la annexina 2 en estas balsas de una manera específica. La annexina 2 se une al citoesqueleto de actina de una

manera dependiente de calcio y la acumulación de balsas en el sitio de unión de la bacteria con la célula huésped desencadena un rearrreglo de actina previo a la inserción de Tir y la formación del pedestal. Tir es una proteína trifuncional. Su dominio extracelular se une a la intimina, lo cuál resulta en la adherencia íntima de la bacteria a la superficie de la célula. Esta unión inserta a Tir en la membrana y activa la fosforilación de la serina y tirosina 474 e inhiben la formación del filopodio y activan la formación del pedestal (Brendan *et al.*, 2002). El extremo N terminal se extiende hacia el citoplasma de la célula del huésped y se une a la proteína de adhesión focal  $\alpha$  – actinin, talina (Cantarelli *et al.*, 2001) y vinculina. Estas interacciones por si solas no son suficientes para la formación del pedestal de actina, aunque si anclan a la bacteria al citoesqueleto celular. La formación del pedestal requiere el extremo C terminal de Tir, el cuál es fosforilada por una protein cinasa A en la serine y tirosina 474 y usa a Nck para reclutar a N-WASP que a su vez recluta y activa al complejo Arp 2/3, que núclea a la actina y estimula la formación de filamentos de actina. De esta forma Tir mimetiza aspectos de señalización mediada por integrinas y receptor de tirosin cinasa en los extremos N y C terminal respectivamente (Gruenheid *et al.*, 2002; Nougayréde *et al.*, 2003). Adicionalmente se reportado que cortactin también se une a Tir en el extremo N Terminal y juega un papel importante, junto a N-WASP, en el reclutamiento de Arp 2/3 y aumentando su actividad de polimerización de F- actina en cooperación (Cantarelli *et al.*, 2002). El extremo C terminal de Tir podría actuar como una proteína activadora de GTPasa lo cuál esta envuelto en la represión del filopodio transitorio y promueve la formación del pedestal de actina. Adicionalmente se demostrado que se recluta la citoqueratina 8 (CK8) y 18 (CK18) en la formación del pedestal, Tir y CK 18 no sólo están envueltos en mantener el pedestal sino que también están envueltos en su formación. Es posible que la CK18 conecte a Tir directamente con los filamentos intermedios, con lo cuál Tir une a EPEC con la red de microfilamentos y filamentos intermedios (Bachelor *et al.*, 2004). Otras proteínas que se reclutan al pedestal son CrkII, Grb2 (ambas proteínas adaptadoras que median interacciones proteína- proteína, puede que Grb2 active la cascada

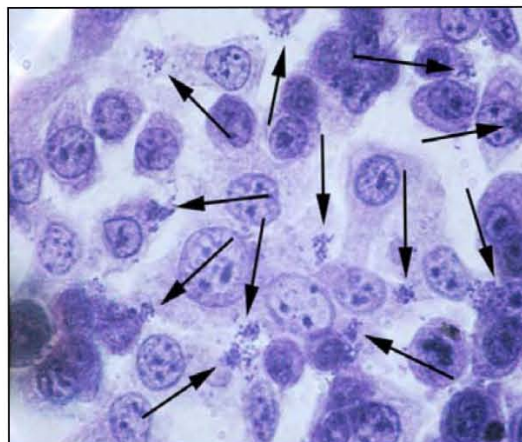
de N-WASP – Arg2/3), ADF/coifilina, LPP, p130cas, Shc, gelsolina (que puede ser reclutada al principio de la adherencia para proveer a EPEC de una fuente de extremos libres de filamentos de los cuales se pueda formar el pedestal), CD44, calpactina, zyxina y vinculina. CD44 y calpactina son reclutados independientemente de la inserción de Tir. Son muchas las similitudes de la formación del pedestal EPEC con la formación de adhesiones focales (Goosney *et al.*, 2001). De esta forma actúa como foco para la acumulación de actina, y se piensa que transmite señales a la célula hospedera que dan lugar a cambios fisiológicos que incluyen liberación de calcio almacenado intracelularmente, activación de enzimas como fosfolipasa C y cambios en el potencial de la membrana. Esto resulta en la destrucción de la membrana y las microvellosidades intestinales ocasionando la hipersecreción de agua y electrolitos. Este cuadro histopatológico es conocido como lesión de adherencia y destrucción A/E (Law, 2000; Girón, 2000; Puente, 2001).

### XIV.1.3.- A P É N D I C E 3 Fotos de adherencia de EPEC a células HEp-2

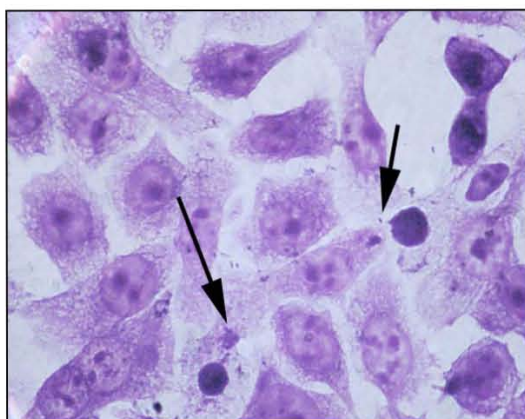
Fotos tomadas en un microscopio óptico a 100x donde se observan las células HEp-2 de carcinoma faríngeo con colonias localizadas de bacterias de EPEC adheridas (puntas de flechas).



**Figura 1.** Primer Control de Adherencia de EPEC



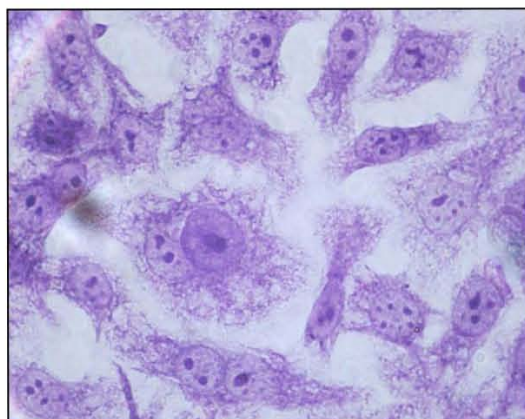
**Figura 2.** Segundo Control de Adherencia de EPEC



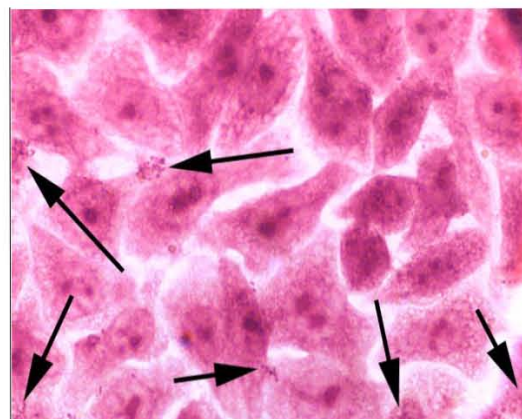
**Figura 3.** Efecto del Control Extracto Total (10mg/mL) sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2



**Figura 4.** Efecto del Chloramphenicol (4  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2

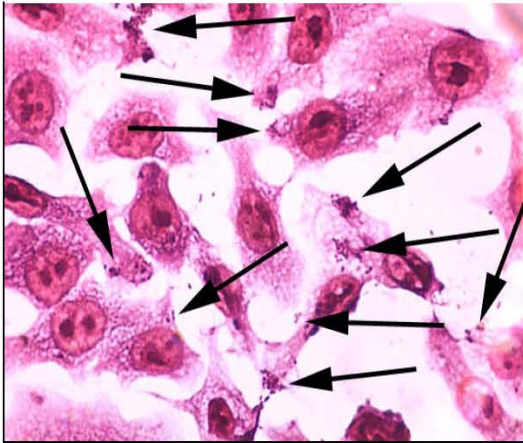


**Figura 5.** Efecto de la Ciprofloxacina (0.01  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2

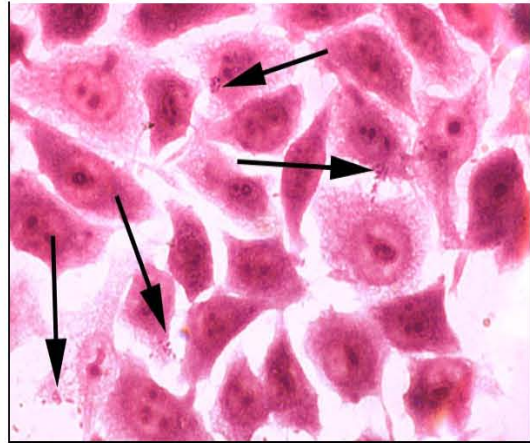


**Figura 6.** Efecto de la Fracción III F3S4 sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2

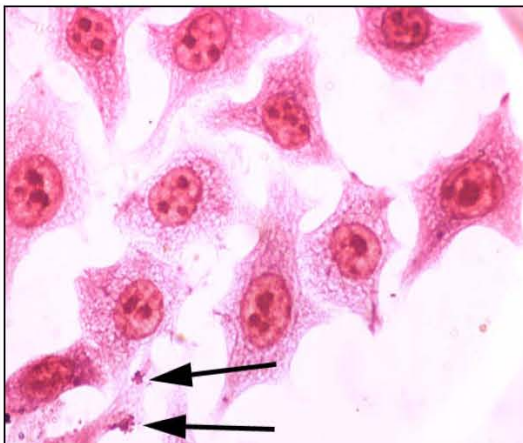




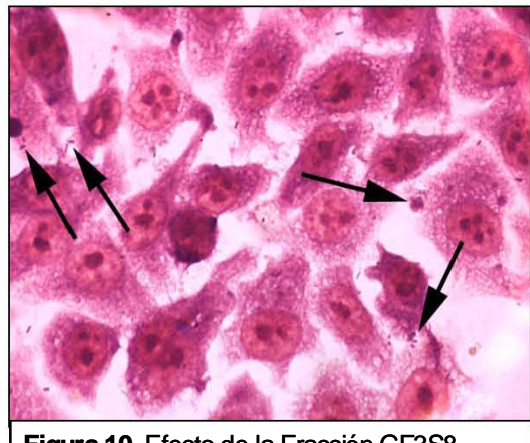
**Figura 7.** Efecto de la Fracción AF3S8 sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2



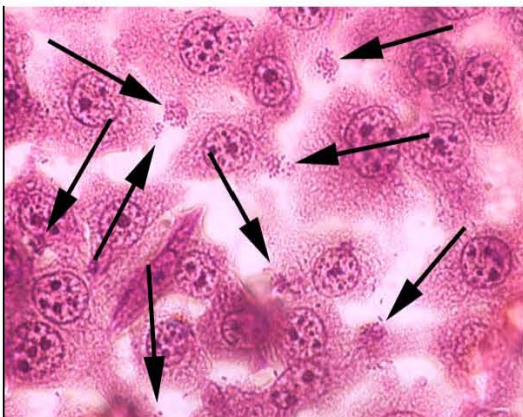
**Figura 8.** Efecto de la Fracción BF3S8 sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2



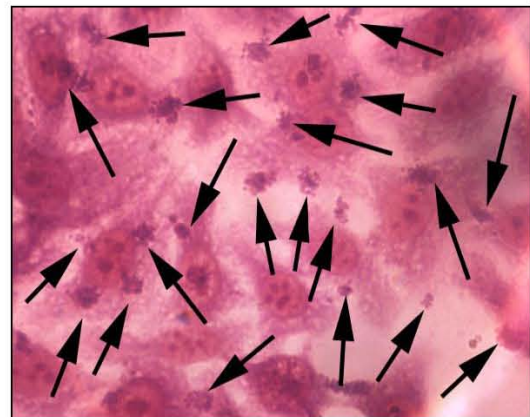
**Figura 9.** Efecto de la Fracción CF3S8 sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2



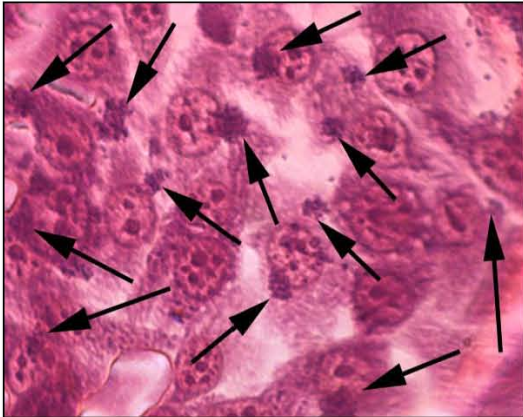
**Figura 10.** Efecto de la Fracción GF3S8 sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2



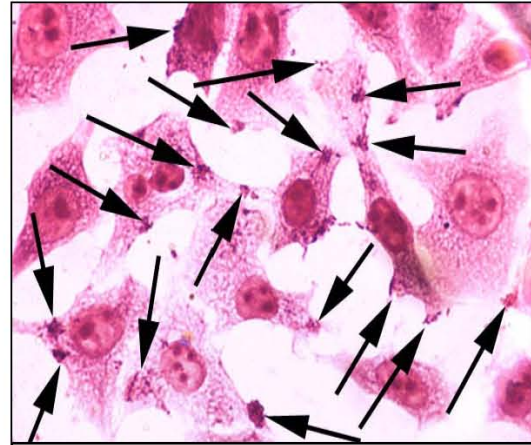
**Figura 11.** Efecto del Ácido shikimico (1mg/mL) sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2



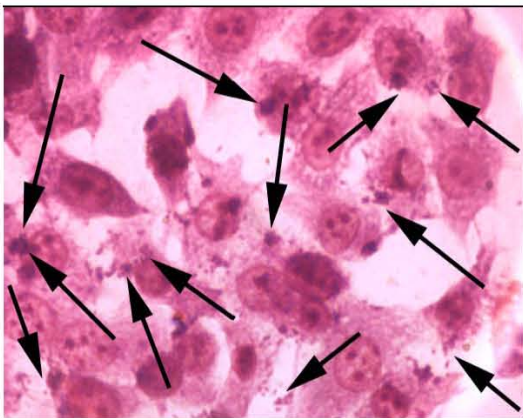
**Figura 12,** Efecto del Ácido shikimico (0.01mg/mL) sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2



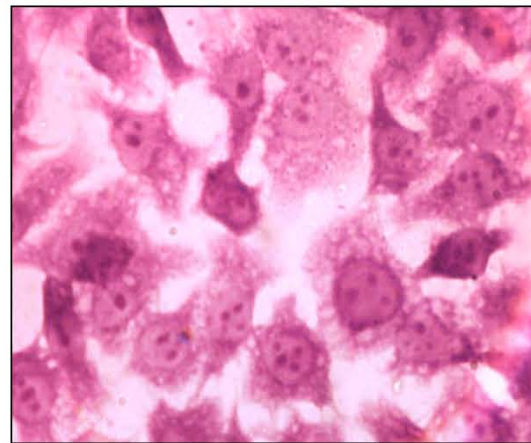
**Figura 13.** Efecto del Ácido shikimico (0.0001 mg/mL) sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2



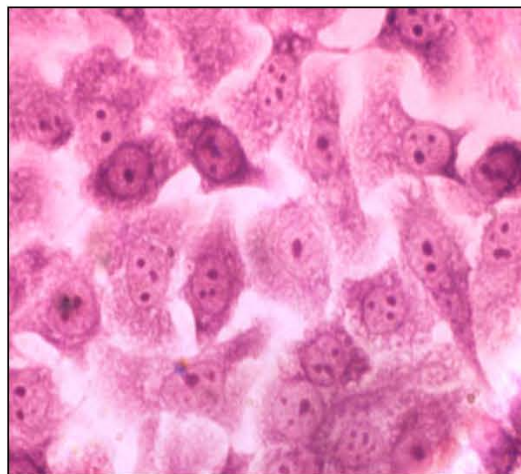
**Figura 14.** Efecto de la Sacarosa sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2



**Figura 15.** Efecto del Ácido Shikimico con Sacarosa sobre la adherencia de EPEC a células HEp-2



**Figura 16.** Control celular con Ácido shikimico (1mg/mL)



**Figura 17.** Control Celular



## XIV.1.4.- Apéndice 4

### **Medios**

Solución D- Manosa al 10%

Diluir 10 g de D- Manosa en 100 mL de agua destilada  
Esterilizar por filtración con membrana de 0.22  $\mu$   
Se guarda a 4 ° C

### **Triptona al 1 %**

Diluir 1 g de Triptona en 100 mL de agua destilada  
Distribuir 3 mL en tubos de 13 x 100 con rosca  
Tapar los tubos y esterilizar a 121 ° C durante 15 minutos  
Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37 ° C  
Se guarda a 4 ° C

### **Agar MacCONKEY**

Disolver 40 g de agar en 1 L de agua destilada  
Calentar y dejar hervir por un minuto  
Esterilizar a 121 ° C durante 15 minutos  
Vaciar aproximadamente 20 mL en cajas petri en condiciones de esterilidad  
Esperar a que gelifique  
Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37 ° C  
Se guarda a 4 ° C

### **Agar Sangre**

Diluir 40 g de base agar sangre en 1 L de agua destilada  
Calentar y dejar hervir por un minuto  
Esterilizar a 121 ° C durante 15 minutos  
Colocar en baño maría a 45 ° C  
Agregar en condiciones de esterilidad 50 ml de sangre de carnero desfibrinada  
Vaciar aproximadamente 20 mL en cajas petri en condiciones de esterilidad  
Esperar a que gelifiquen  
Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37 ° C  
Se guarda a 4 ° C

### **Agar de Soya Trypticaseina (TSA)**

Disolver 17 g de digerido pancreático de tripsina en 1 L de agua destilada  
Disolver 3 gr de digerido enzimático de soya en 1 L de agua destilada

Disolver 2.5 g de Dextrosa en 1 L de agua destilada  
Disolver 5 g de Cloruro de Sodio en 1 L de agua destilada  
Disolver 2.5 g de Fosfato Dipotásico en 1 L de agua destilada  
Calentar y dejar hervir por 1 minuto  
Esterilizar a 121 ° C durante 15 minutos  
Vaciar aproximadamente 20 mL en cajas petri en condiciones de esterilidad  
Esperar a que gelifiquen  
Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37 ° C  
Se guarda a 4 ° C

\*En caso de hacer tubos de 13 x 100 con rosca:  
Se agregan 3 mL a cada tubo antes de esterilizar  
Se ponen los tubos de tal forma que estén inclinados  
Esperar a que gelifiquen  
Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37 ° C  
Se guarda a 4 ° C

### **Medio mínimo Esencial de Eagle (MEM)**

Agregar 100 mL de MEM 10 x a 900 ml de agua desionizada estéril (ó agregar el contenido sólido de un frasco de MEM) en condiciones de esterilidad  
Agregar 10 mL de Bicarbonato de Sodio pH 7.4 – 7.6 al 80 %  
Agregar 10 mL de HEPES  
Agregar 10 mL de L- Glutamina  
Agregar 10 mL de una mezcla de antibióticos (Penicilina – Streptomycin)  
Se filtra toda la mezcla con una membrana de 0.22 µm ayudado por una jeringa de 60 mL  
Se recibe el filtrado en frescos previamente tratados y esterilizados  
Se tapan y se etiquetan  
Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h o 48 h a 37 ° C  
Se guarda a 4 ° C  
Se agrega 10% de SFB en condiciones de esterilidad conforme se vaya utilizando  
Después de agregar el SFB se dejar a prueba de esterilidad durante 24 h o 48 h a 37 ° C

### **Colorante de Giemsa**

Se pesa 1 g de colorante de Giemsa  
Se agrega a 54 mL de Glicerol en agitación  
Se agregan 84 mL de Metanol  
Se filtra  
Se envasa en un frasco ámbar

### **FeCl<sub>3</sub> (para tinción de taninos)**

Se agregan 4.2 mL de ácido clorhídrico (HCl) a 500 mL de agua  
Se agregan 13.5 g de Cloruro Férrico (FeCl<sub>3</sub>)  
Se filtra y se guarda en una botella ámbar



## **XIV.1.5.- A P É N D I C E 5**

### **Soluciones y lavado de material**

#### **PBS**

Se agregan 8 g de NaCl a 800 mL de agua destilada en agitación

Se agrega 0.2 g de KCl

Se agrega 1.15 g de Fosfato de Sodio Dibásico

Se agrega 0.2 g de Fosfato de Potasio Monobásico

Se ajusta a pH de 7.2

Se afora a 1000 mL

Se pone en frascos y se esteriliza

#### **Solución de PUKS**

Se agregan 8 g de NaCl en 1 L de agua desionizada estéril en condiciones de esterilidad

Se agregan 0.4 g de KCl

Se agrega 0.35 g de NaHCO<sub>3</sub>

Se agrega 0.336 g de EDTA

Se filtra todo con una membrana de 0.22 µm y se envasa en frascos estériles previamente tratados

Se dejar a prueba de esterilidad durante 24 h o 48 h a 37 ° C

#### **Solución Salina 0.85 %**

Se diluyen 8.5 g de NaCl en 1 L de agua destilada

Se pone en tubos cónicos de 100 mL

Se esteriliza a 121 ° C durante 15 minutos

Se guarda a 4 ° C

#### **Lavado de material de vidrio para cultivo celular (nuevo)**

Se enjuaga de 3 a 5 veces el material con agua desionizada.

Se seca a 120 ° C durante 1 hora.

Se esteriliza a 120 ° C en calor húmedo por 30 minutos.

#### **Lavado de material de Vidrio para cultivo celular (usado)**

Se enjuaga con agua corriente el material sucio.

Se enjuaga de 3 a 5 veces con agua desionizada.

Se sumerge en hipoclorito de sodio al 10 % por 24 horas.

Se enjuaga con agua corriente y se pasa a una solución de ácido clorhídrico al 2 % por 24 horas.

Se enjuaga 10 veces con agua desionizada.

Se seca a 100 ° C durante 1 hora.

Se envuelve y se esteriliza a 120 ° C (calor húmedo) durante 30 minutos.

## **XIV.1.6.- A P É N D I C E 6**

### **Condiciones del HPLC**

Condiciones del HPLC: (Waters 600 CL-5-LCR-IQUI) con una columna Adsorbosphere HS C18 de 15cm y 4.6 mm de diámetro y con un tamaño de partícula de 5 $\mu$ m, con un detector UV 210 a 650, con un flujo 1.0 mL/min a temperatura ambiente y con un sistema de metanol/agua 10/90

## XV.- REFERENCIAS

- Akdemir, Z. (2001). Polyphenolic compounds from *Geranium pratense* and their free radical scavenging activities. *Phytochemistry*, 56,189-193
- Alanís, A.; Calzada, F.; Cervantes M., A.; Torres J. y Ceballos, G. (2005) Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 100, pp. 153-157
- Almeida M.; M. da Silva R.; Donaire L.; Moreira L. y Martínez M. (1998). Enteropathogens associated with acute diarrheal diseases in children. *J. Pediatría (Río J.)* 1998, 74 (4)291-298
- Argueta, V. (1994). Atlas de la medicina tradicional Mexicana. Vol: I, II y III. Instituto Nacional Indigenista
- Batchelor M.; Guignot J.; Patel A.; Cummings N.; Cleary J.; Knutton S.; Holden D.; Connerton I. y Frankel G. (2004). Involvement of the intermediate filament protein cytokeratin-18 in actin pedestal formation during EPEC infection. *EMBO reports* 2004
- Beutin, L.; Marchés, O.; Bettelheim, K.; Gleier, K.; Zimmermann, S.; Schmidt, H. y Oswald, E. (2003). HEp-2 Cell Adherence, Actin Aggregation, and Intimin Types of Attaching and Effacing *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy Infants in Germany and Australia. *Infect Immun.* 2003 Jul;71(7):3995-4002.
- Boldi M., A. (2004). Libraries from natural product – like scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology.* 8: 281-286
- Bouzari, S.; Jafari, M.; Shokouhi, F.; Parsi, M. y Jafari, A. (2000). Virulence-related DNA sequences and adherence patterns in strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 185, 89-93
- Braga, P.; Piatti, G. y Regio, S. (2002). Sub-inhibitory concentrations of brodimoprim inhibit adhesion of *E. coli* to human uroepithelial cells. *Journal of Chemotherapy*, 14, págs. 161-165
- Brendan, K.; DeVinney, R.; Stein, M.; Reinscheid, D.; Frey, E. y Finlay B., B. (1991). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. *Science.*254(5032):710-3.
- Butler S., M. (2004). The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J. Nat. Prod.* 2004, 67 , 2141-2153
- Bye, R.; Linares, E. y Estrada, E. (1995). Biological diversity of medicinal plants in México. *Phytochemistry of medicinal plants*, Vol. 29, Chapter 4, págs. 61-85
- Campellone G.; Rankin S.; Pawson T.; Kirschner W.; Tipper T. y Leong M. (2004). Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly. *The Journal of Cell Biology*, Volume 164, Number 3, February 2, p. 407–416

- Campos C.; Franzolin M. y Trabulsi L. (2004). Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99(6): 545-552, October 2004
- Calzada, F.; Rojas, C.; Meckes, M.; Rivera, R.; Bye, R. Y Mata, R. (1999). Geranins A and B, New Antiprotozoal A – Type Proanthocyanidins from *Geranium niveum*. Journal of natural Products, Vol. 62, págs. 705-709
- Calzada, F.; Cervantes M., A. y Yépez – Mulia, L. (2005). In vitro antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. Journal of Ethnopharmacology, 98(2005)191–193
- Cantarelli V.; Takahashi A.; Yanagihara I.; Akeda Y.; Imura K.; Kodama T.; Kono G.; Sato Y. y Honda T. (2001). Talin, a host cell protein, interacts directly with the translocated intimin receptor, Tir, of enteropathogenic *Escherichia coli*, and is essential for pedestal formation. Cellular Microbiology, 3(11), 745-751
- Cantarelli V.; Takahashi A.; Yanagihara I.; Akeda Y.; Imura K.; Kodama T.; Kono G.; Sato Y.; Iida T. y Honda T. (2002). Cortactin is necessary for F- actin Accumulation in pedestal Structures Induced by Enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Infection and immunity, Vol. 70, No.4, p. 2206-2209
- Clearly J.; Lai L.; Shaw K.; Straatman-Iwanowska A.; Donnenberg S.; Frankel G. y Knutton S. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of Bundle Forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. Microbiology, 150, 527-538
- Cravioto, A.; Reyes, R.; Trujillo, F.; Uribe, F.; Navarro, A.; De la Rosa, J.; Hernández, J.; Pérez, G. y Vázquez, V. (1990). Risk of Diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. Am. J. Epidemiol.; 131:896-904
- Deitsch, K.; Moxon, E. y Wellems, T. (1997). Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. Microbiol molecular biology Rev., 61(3), 281-293
- Desnottes, J.; Diallo, N.; Loubeyre, C. y Moreau, N. (1989). Effect of pefloxacin on microorganism: host cell interaction. Presse Med. 18 págs. 1572-1575
- Desnottes, J.; Le Roy, D. y Diallo, N. (1992). Effect of subminimal inhibitory concentrations of pefloxacin on the piliation and adherence of *Escherichia coli*. Infectology Immunology, 60, págs. 2297- 2304
- Desnottes, J.; Diallo, N. y Loubeyre, C. (1994). Effect of sub – inhibitory concentrations of cefixime on the morphology, hemagglutination and adhesiveness of urinary strains of *Escherichia coli*. New Microbiology, 17, págs. 211-216
- Dow M.; Tóth I.; Alexa P.; Davies M.; Malik A.; Oswald E. y Nagy B. (2005). Predominance of *afr2* and *ral* Fimbrial Genes Related to Those Encoding the K88 and CS31A Fimbrial Adhesins in Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolates from Rabbits with Postweaning Diarrhea in Central Europe. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar.2005, p.1366–1371, Vol.43, No.3

Echeverría P.; Taylor D.; Bettelheim K.; Chatkaeomorakot A.; Changchawalit S.; Thongcharoen A. y Leksomboon U. (1987) HeLa Cell-Adherent Enteropathogenic *Escherichia coli* in Children under 1 Year of Age in Thailand. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug.1987, p.1472-1475

Eslava, C. (2000). *Escherichia coli* enteroagregativa patógeno emergente. Memorias del congreso XXXII latinoamericano de microbiología. Vol. 43 : suplemento1, número M1.S3, página 50

Eslava, C.; Torres, J.; Echaniz, G.; Parra, N.; Molina, J.; Conde, C. y Zamilpa, L. (2001). *Escherichia coli*. PAC Infecto – 2, Programa de actualización continua en infectología, Tomo 4, Unidad 7, págs. 408-412

Flisser, A.; Villa, A.; Campos, C.; Domínguez, F.; García, B.; Suárez, R.; Servín, A.; Monroy, I.; Lozano, H.; Cogco, L.; Angeles, G.; Martínez, I.; Virgen, S.; Campuzano, R.; Campos, S.; Bracho, C.; Díaz, A.; Rosa, J.; Magos, C.; Gutiérrez, A. y Correa, D. (2002). Infectious Diseases in Mexico. A survey from 1995-2000. Archives of medical Research, 33, págs. 343-350

Forestier C.; Darfeuille-Michaud A.; Wasch E.; Rich C.; Petat E.; Denis F. y Joly B. (1992). Adhesive properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhea in Africa. J Infect Dis.166(6):1295-1310.

Forestier C.; Darfeuille-Michaud A.; Wasch E.; Rich C.; Petat E.; Denis F. y Joly B. (1996). Enteroadherent *Escherichia coli* and Diarrhea in Children: a Prospective Case-Control Study. Journal of clinical Microbiology, Vol. 34, No. 12, p. 2897–2903

García E., T. (2000). Las *Escherichia coli* que causan diarrea en humanos y su diagnóstico molecular. Memorias del congreso XXXII latinoamericano de microbiología. Vol. 43 : suplemento1, número de resumen J1.S1, página 176

Giammanco A.; Maggio M.; Giammanco G.; Morrelli R.; Minelli F.; Scheutz F. y Caprioli A. (1996). Characteristics of *Escherichia coli* Strains Belonging to Enteropathogenic *E. coli* Serogroups Isolated in Italy from Children with Diarrhea. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 34, No. 3, p. 689–694

Girón J., A. (2000). *E. coli* enteropatógeno. Memorias del congreso XXXII latinoamericano de microbiología. Vol. 43: suplemento1, número de resumen M1.S3, página 49

Goosney L., D.; Viney, R. y Finlay B., B. (2001). Recruitment of cytoskeletal and signalling proteins to Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Pedestals. Infection and immunity, May 2001, Vol.69, No.5, p.3315-3322

Gruenheid S.; De Vinney R.; Bladt F.; Goosney D.; Gelkop S.; Gish G.; Pawson T. y Finlay B. (2002). Enteropathogenic *E. coli*. Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in Host cells. Nature Cell Biology, Vol. 3, Sep. 2001, p. 856-859

IMSS (2002). Instituto Mexicano del Seguro Social. Guía para el cuidado de la salud. Niños menores de 10 años.

Ivancheva, S. (2000). A chemosystematic study of eleven *Geranium* species. Biochemical Systematics and Ecology, 28, 255-260

Ivavona, E.; Toshkova, R.; Sekedjieva, J. (2005). A plant polyphenol-rich extract restores the suppress functions of phagocytes of influenza virus- infected mice. *Microbes Infect.* 7 (3):391-398

Keller R.; Ordoñez J.; Oliveira R.; Trabulsi L.; Baldwin T. y Knutton S. (2002). Afa, a Diffuse Adherence Fibrillar Adhesin Associated with Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, Vol. 70, No. 5, p. 2681–2689

Kobayashi K.; Baba E.; Fushiya S.; Takano F.; Batkhui J.; Dash T.; Sanchir C. y Yoshizaki F. (2003). Screening of Mongolian Plants for Influence on Amylase Activity in Mouse Plasma and Gastrointestinal Tube. *Biol. Pharm. Bull.*, 26(7) ,1045—1048

Kobayashi K. (2003). Screening of Mongolian Plants for Influence on Amylase Activity in Mouse Plasma and Gastrointestinal Tube. *Biol. Pharm. Bull.* 26(7) 1045—1048

Law, D. (2000). A REVIEW Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 729 – 745

Loubeyre C.; Desnottes J. y Moreau N. (1992). Influence of sub-inhibitory concentrations of antibacterials on the surface properties and adhesion of *Escherichia coli*. *Drugs and Experiment Clinic Research*, 18, págs. 233-237

Maldonado P.; Rivero- Cruz I.; Mata R. y Pedraza – Chaverri J. (2005). Antioxidant activity of A- Type Proanthocyanidins From *Geranium niveum* (Geraniaceae). *J.Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1996-2001

Manjares H.; Parra S.; Berrocal E.; Ocaña A. y Cravioto A. (2000). Antigen Detection in Enteropathogenic *Escherichia coli* Using Secretory Immunoglobulin A Antibodies Isolated from Human Breast Milk. *Infection and immunity*, Vol. 68, No. 9, págs. 5030-5036

Marjorie M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, vol. 12, No. 4 , págs. 564-582

Mathewson J.; Oberhelman A.; Dupont L.; de la Cabada F. y Garibay V. (1987). Enteroadherent *Escherichia coli* as a Cause of Diarrhea among children in Mexico. Vol.25.No.10 *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Oct.1987, p.1917-1919

Mendoza J., E. (2003). Estudio del efecto antibacteriano y antiadherente de extractos de *Geranium sp.* Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM

Meza A., D. (2005). Aislamiento y caracterización serológica de *Escherichia coli* aislada de niños con y sin Diarrea en dos hospitales de la Ciudad de Culiacán, Sinaloa. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Moore, E. (1943). A revision of the genus *Geranium* in Mexico and Central América. *Contributions from the gray herbarium of Harvard University* – No. CXLVI, páginas 1-108

Nakazato G.; Gyles C.; Ziebell K.; Keller R.; Trabulsi R.; Gomes A.; Irino K.; Dias Da Silveira W. y Pestana De Castro F. (2004). Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E.coli* (EPEC). *Veterinary Microbiology* 101 (2004) 269–277

Nataro J.; Kaper J.; Robins-Browne R.; Prado V.; Vial P. y Levine M. (1996). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J Med Microbiol.* 1996 Jun;44(6):438-43.

Newman J., D.; Cragg M., G. y Snader M., K. (2003). Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J.Nat.Prod.*2003,66,1022-1037

Nguyen T.; Le Van P.; Le Huy C.; Nguyen K., G. y Weintraub A. (2005). Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Feb.2005, p.755–760, Vol.43, No.2

Nougayréde J.; Fernandes J. y Donnenberg S. (2003). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cellular Microbiology* 5 (6), p. 359 – 372

Okabe S.; Suganuma M.; Mayoshi Y.; Taniguchi S.; Yoshida T. y Fujiki H. (2001). New TNF-  $\alpha$  Releasing Inhibitors, Geraniin and Corilagin, in Leaves of *Acer nikoense*, Megusurino-ki. *Biol. Pharm. Bull.* 24(10) 1145—1148

Ortiz A.; Ruttler M.; Garcia B.; Balbi L.; Cruzado M.; Risler N. y Castro C. (1992). Accumulation of actin and adhesion to HEp-2 cells of strains of *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Mendoza, Argentina. *J Diarrhoeal Dis Res.* 10(1):31-4.

Polotsky Y.; Nataro J.; Kotler D.; Barrett T. y Orenstein J. (1997). HEp-2 Cell Adherence Patterns, Serotyping, and DNA Analysis of *Escherichia coli* Isolates from Eight Patients with AIDS and Chronic Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 35, No. 8, p. 1952–1958

Puente; J. L. (2001). *Escherichia coli* enteropatógena, modelo de una cascada reguladora en el control de la virulencia bacteriana. *Memorias del congreso XXXII latinoamericano de microbiología.* Vol. 43 : suplemento1, número de resumen M4.S10, página 83

Quijano, L. (2003). *Geranium robertianum*. Folium 6 instituto de química, UNAM

Rademaker C.; Fluit A.; Jansze M.; Jansen W.; Glerum J. y Verhoef J. (1993). Frequency of enterovirulent *Escherichia coli* in diarrhoeal disease in The Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993 Feb;12(2):93-7.

Ravizzola G.; Longo M.; Pollara P.; De Francesco M. y Pizzi R. (1993). Effect of subinhibitory concentrations of lomefloxacin on bacterial adherence. *Journal of Antimicrobiological Chemotherapy*, 31, págs. 37-45

Reyes, L. (2000). Fenotipos de adherencia a células HEp-2 de cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea. Tesis de Licenciatura, UNAM

Rodrigues J.; Thomazini M.; Morelli A. y de Batista C. (2004). Reduced Etiological Role for Enteropathogenic *Escherichia coli* in Cases of Diarrhea in Brazilian Infants. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan.2004, p.398–400, Vol.42, No.1

Rodríguez G.; Moreno A.; Cortés I.; Tenorio J. y Montiel E. (2001). *Escherichia coli* productora de diarrea en niños. Memorias del congreso XXXII latinoamericano de microbiología. Vol. 43 : suplemento1, número MB, página 389

Scaletsky I.; Pedroso M.; Oliva C.; Carvalho R.; Morais M. y Fagundes-Neto U. (1999). A Localized Adherence-Like Pattern as a Second Pattern of Adherence of Classic Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells That Is Associated with Infantile Diarrhea. Infection and immunity, Vol. 67, No. 7, p. 3410–3415

Scaletsky I.; Fabbriotti S.; Silva S.; Morais M. y Fagundes-Neto U. (2002). HEp-2–Adherent *Escherichia coli* Strains Associated with Acute Infantile Diarrhea, São Paulo, Brazil. Emerging Infectious Diseases • Vol. 8, No. 8, págs. 855 -858

Sepúlveda, J. (1994). Diarreas y cólera. Cuadernos de Salud. Secretaría de Salud. México. 1994.

Serkedjjeva, J. (1998). In vitro anti-influenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. Antiviral Research, 37, 121–130

Serkedjjeva, J. (1999). Short communication Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. Journal of Ethnopharmacology, 64, 59–68

Stermitz, F. (2003). Polyacylated Neohesperidosides From *Geranium caespitosum* : Bacterial Multidrug Resistance Pump Inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 13 (2003)1915 –1918

Turi, M.; Turi, E.; Koljalg, S. y Mikelsaar, M. (1997). Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of *Escherichia coli* strains of different origin. APMIS. 52; págs 175-177

Vallance B. y Finley B. (2000). Colloquium. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. PNAS. Vol. 97, no.16, págs. 8799-8806

Vázquez A., S. (2001). Actividad antibacteriana de extractos vegetales contra cepas de *Escherichia coli* de origen clínico. Tesis de Licenciatura, enero 2001, Los Reyes Iztacala, UNAM

Velasco R.; Ávalos J.; Ugalde S. y López M. (2000). Principales factores bacterianos que promueven la colonización e invasión de los tejidos humanos. Profesores al día, Educación química, abril 2000, págs. 274-283

Velázquez R.; Valencia A.; Gutiérrez G.; Calvillo M.; Delgado A.; Rivera R.; Torres J. y Hernández O. (2001). Importancia de los agentes virales como causa de diarrea grave en los niños menores de cinco años de edad que requieren hospitalización, y factores de riesgo asociados. Múltiples fuentes de la investigación en salud. Proyectos estratégicos del IMSS, Capítulo 7, págs. 133-152



Vuorela P.; Leinonen M.; Saikku P.; Tammela P.; Rauha J.; Wennberg T. y Vuorela H. (2004). Natural Products in the Process of Finding New Drug Candidates. *Current Medicinal Chemistry*, 2004, 11, 1375-1389

Whittam, T. (1998). Rumors of disease in the global village: Outbreak Verification. *Emerging infectious Diseases*. Vol. 6, págs. 97-102