



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto de extractos de tres especies de quelites sobre la actividad de la
enzima ureasa de *Helicobacter pylori***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

GUADALUPE VANESSA URIBE ESTANISLAO

ASESOR

IRMA ROMERO ÁLVAREZ



Ciudad Universitaria, CDMX. 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Ruth Edith Martin Fuentes

VOCAL: Profesora: Gloria Díaz Ruíz

SECRETARIO: Profesora: Irma Romero Álvarez

1er. SUPLENTE: Profesora: Carolina García Peña

2° SUPLENTE: Profesora: Carmina Montiel Pacheco

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 2, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA

EDIFICIO D. PRIMER PISO. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

SUSTENTANTE:

GUADALUPE VANESSA URIBE ESTANISLAO

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto CONACyT 214286 “Rescate de especies subvaloradas tradicionales de la dieta mexicana y su contribución para el mejoramiento de la nutrición en México” por el apoyo otorgado. Así como a la Dra. Ma. Amanda Gálvez Mariscal, responsable técnico del proyecto.

Al programa DGAPA-PAPIIT IN216414 “Estudio del mecanismo de acción de extractos y compuestos aislados de plantas medicinales sobre *H. pylori*” por apoyar parcialmente el desarrollo del trabajo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Helicobacter pylori	2
2.1.1 Microbiología de <i>H. pylori</i>	2
2.1.2 Epidemiología de la infección.....	4
2.1.3 Vías de transmisión	4
2.1.4 Patologías asociadas.....	5
2.1.5 Métodos de diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	5
2.1.6 Mecanismos de patogenicidad.....	6
2.2 Enzima Ureasa	9
2.2.1 Estructura de la ureasa de <i>H. pylori</i>	9
2.2.2 Reacción catalizada por la ureasa	11
2.2.3 Propiedades cinéticas.....	13
2.2.4 Ureasa como factor de colonización	14
2.2.5 Importancia de los inhibidores de la ureasa de <i>H. pylori</i>	16
2.3 Plantas comestibles y su potencial medicinal	16
2.3.1 Especies tradicionales subvaloradas y subutilizadas	17
2.3.2 Características generales y etnofarmacológicas de las ETSS seleccionadas ..	19
2.3.2.1 <i>Anoda cristata</i> (L) Schltldl.....	19
2.3.2.2 <i>Cnidocolus chayamansa</i> Mc Vaugh.....	20
2.3.2.3 <i>Crotalaria longirostrata</i>	21
2.4 Potencial anti-<i>Helicobacter pylori</i> de los extractos de las especies seleccionadas	22
2.5 Hipótesis	23
2.6 Objetivos	23
2.6.1 Objetivos específicos	23
2.6.2 Objetivos adicionales	23
III. METODOLOGÍA	24
3.1 Material vegetal	24
3.1.1 <i>Anoda cristata</i> (L) Schltldl (Alache).....	24
3.1.2 <i>Crotalaria longirostrata</i> (Chepil)	24
3.1.3 <i>Cnidocolus chayamansa</i> McVaugh (Chaya).....	25
3.2 Compuestos evaluados	25
3.3 Obtención de los extractos	25
3.3.1 Extractos diclorometano-metanol (DM)	25
3.3.2 Extractos acuosos (AQ)	25
3.4 Caracterización de los extractos	26
3.4.1 Cuantificación de fenoles totales.....	26

3.4.2 Cuantificación de flavonoides.....	26
3.4.3 Perfil cromatográfico	26
3.4.4 Perfil fitoquímico cualitativo preliminar	27
3.4.4.1 Presencia de saponinas	27
3.4.4.2 Presencia de esteroides en extractos de DM.....	27
3.4.4.3 Presencia de cumarinas	28
3.5 Cultivo e identificación de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504.....	28
3.6 Extracción y purificación parcial de la ureasa de <i>H. pylori</i>.....	29
3.6.1 Determinación de la actividad enzimática de la ureasa	31
3.7 Efecto de los extractos de las tres especies de quelites y de los distintos tratamientos sobre la ureasa.....	32
3.7.1 Ensayos en presencia de ureasa	32
3.8 Análisis estadístico	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1 Obtención de los extractos.....	34
4.2 Caracterización de los extractos.....	35
4.2.1 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides	35
4.2.2 Perfil cromatográfico de extractos DM	36
4.2.3 Perfil fitoquímico cualitativo preliminar	39
4.3 <i>Helicobacter pylori</i> y la ureasa.....	42
4.3.1 Propagación y mantenimiento de la cepa <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504	42
4.3.2 Identificación bioquímica.....	42
4.3.3 Identificación molecular por amplificación del gen <i>ureA</i> por PCR.....	43
4.3.5 Obtención de la ureasa de <i>H. pylori</i>	44
4.4 Determinación de la actividad enzimática	45
4.5 Tratamientos sobre la ureasa.....	47
4.5.1 Determinación del efecto del Ácido acetohidroxámico (AHA) sobre la actividad enzimática de la ureasa	47
4.5.2 Determinación del efecto de los extractos acuosos de las diferentes especies de quelites	48
4.5.3 Determinación del efecto de los extractos Diclorometano-metanol de las diferentes especies de quelites.....	50
4.5.4 Efecto de dos de los flavonoides presentes en la especie <i>Anoda cristata</i> (Alache) sobre la ureasa	51
4.5.5 Otros productos naturales con actividad anti- <i>H. pylori</i>	56
V. CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS.....	59
ANEXO.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA SIGNIFICADO

A

A	Absorbancia
AGS	Células de Adenocarcinoma gástrico humano
AHA	Ácido acetohidroxámico
Ala-AQ	Extracto Acuoso de Alache
Ala-DM	Extracto Diclorometano-Metanol de Alache
Ala-MU	Mucílago de Alache
AQ	Acuoso
ATCC	American Type Culture Collection
B	
BSA	Albúmina de suero bovino
C	
CCF	Cromatografía en Capa Fina
Cf	Concentración final
Cha1	Chaya 1: Procedencia San Pedro Chimay, Yucatán
Cha1-AQ	Extracto acuoso de Chaya 1
Cha1-DM	Extracto Diclorometano-Metanol de Chaya 1
Cha2	Chaya 2: Procedencia Timucuy, Yucatán
Cha2-AQ	Extracto acuoso de Chaya 2
Cha2-DM	Extracto Diclorometano-Metanol de Chaya 2
CheC.AQ	Extracto acuoso de Chepil Cultivado
CheC-DM	Extracto Diclorometano-Metanol de Chepil Cultivado
CheC-MU	Mucílago de Chepil Cultivado
CheS-AQ	Extracto acuoso de Chepil Silvestre
CheS-DM	Extracto Diclorometano-Metanol de Chepil Silvestre
CheS-MU	Mucílago de Chepil Silvestre
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria del crecimiento

D

DM Diclorometano-metanol

DMSO Dimetilsulfóxido

E

EAG Equivalentes de Ácido Gálico

EC Clasificación enzimática

EQ Equivalentes de Quercetina

ETSS Especie Tradicional Subvalorada y Subutilizada

I

IC₅₀ Concentración de inhibición media de la actividad enzimática

P

PBS Buffer salino de fosfatos

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

S

SN1 Sobrenadante 1

SN2 Sobrenadante 2

I. INTRODUCCIÓN

Una dieta incorrecta, malos hábitos alimenticios y de vida pueden ser un factor determinante para el desarrollo de diversas patologías. Sin embargo, el consumo de ciertos alimentos podría prevenir algunas enfermedades, es por ello que actualmente diversas investigaciones están enfocadas en la prevención de condiciones patológicas (Santini, *et al.*, 2016). Dentro de estas investigaciones se encuentra la búsqueda de plantas comestibles con actividad antimicrobiana; de las cuales se han reportado plantas utilizadas en la dieta con actividad antibiótica sobre la bacteria *Helicobacter pylori*. Esta bacteria coloniza el estómago humano, provocando daño en el tejido epitelial del hospedero, induciendo a gastritis, úlcera péptica, y a largo plazo la infección constituye un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico. La infección por *H. pylori* está presente en más del 50% de la población mundial y en México, se reporta una seroprevalencia del 66% (Torres *et al.*, 1998).

Dentro del proyecto CONACYT 214286 “Rescate de especies subvaloradas tradicionales de la dieta mexicana y su contribución para el mejoramiento de la nutrición en México”, que busca la reinserción de plantas como los quelites en la dieta y los mercados nacionales, se encontró que extractos de tres de estas especies: Alache (*Anoda cristata* (L) Schltldl), Chaya (*Cnidoscolus chayamansa* McVaugh) y Chepil (*Crotalaria longirostrata*) poseen actividad anti-*Helicobacter pylori*, y por lo tanto, podrían incidir en el control de patologías generadas por la bacteria, como la gastritis y úlcera, dándole un valor agregado al consumo de estas especies.

Considerando los resultados obtenidos en la investigación anterior, en este estudio se evaluó si los extractos de los diferentes quelites tenían la capacidad de inhibir la actividad de la enzima ureasa de *H. pylori*. Esta enzima es un factor de colonización de gran importancia para la bacteria al permitirle sobrevivir a las condiciones ácidas del estómago humano y así establecer una infección. Los resultados obtenidos mostraron que ningún extracto inhibe a la enzima, por lo que se concluye que este no es el mecanismo por el cual los extractos tienen su actividad antibiótica.

II. ANTECEDENTES

2.1 *Helicobacter pylori*

La bacteria fue descrita en 1984 por Barry Marshall y Robin Warren quienes demostraron el rol de la bacteria en las patologías de gastritis y formación de úlcera péptica (Marshall y Warren, 1984, Marshall *et al.*, 1985). Sin embargo, fue hasta 1989 cuando la bacteria dejó de ser nombrada *Campylobacter pylori* ya que se transfirió al género *Helicobacter* (Goodwin, *et al.*, 1989), puesto que difiere del género *Campylobacter* en estructura flagelar, perfil de ácidos grasos, y secuencia del RNA ribosomal de la subunidad 16S. De esta manera, la bacteria se nombró *Helicobacter pylori*, conocida por colonizar el estómago humano y estar presente en el 50% de la población mundial. *H. pylori* se contrae usualmente en la infancia y una vez adquirida la infección provocada puede persistir de por vida (Moodley, 2016).

2.1.1 Microbiología de *H. pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, espiral, mutiflagelada, neutrófila (con aclimatación al ácido), microaerófila y de crecimiento lento.

La morfología principal es en forma espiral (2-4 x 0.5-1 μm), característica de células jóvenes, sin embargo, puede presentar formas variadas (Figura 2.1), desde bacilos, espirales (forma de S), curvas (forma de U), hasta cocos. Esta última morfología es indicativa de un estado viable no cultivable que se presenta bajo condiciones de estrés, tales como envejecimiento celular, variaciones de temperatura, contacto con oxígeno y tratamiento con antibióticos (Boyanova, 2011).

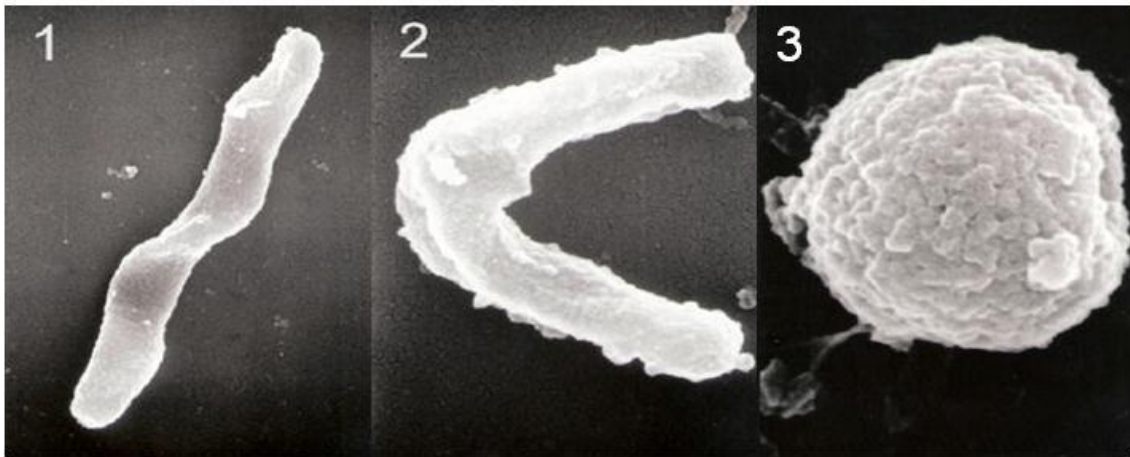


Figura 2.1. Microscopía electrónica de *Helicobacter pylori* 1) Forma espiral 2) Forma de U 3) Forma cocoide (Tomadas de Dus et al., 2013)

Al igual que otras bacterias Gram negativas, *H. pylori* produce vesículas de membrana externa. Estas transportan proteínas de membrana, porinas, adhesinas y factores de virulencia (Boyanova, 2011).

H. pylori posee de dos a seis flagelos unipolares (3 μm de longitud) con un bulbo en la punta.

La bacteria es microaerófila, crece en concentraciones de oxígeno de 5-19% (con un óptimo de 5-6%), 5-10% de dióxido de carbono y humedad alta a 37°C. *H. pylori* es neutrófila, desarrollándose a pH 6-0-7.0 *in vitro*, sin embargo, puede crecer en el ambiente gástrico humano, debido a su mecanismo de aclimatación al ácido que será descrito en el apartado 2.2.4.

Características bioquímicas.

H. pylori presenta metabolismo quimioorganótrofo. La glucólisis-gluconeogénesis es la principal vía de producción de energía. No hidroliza gelatina, almidón, caseína y tirosina. La oxidasa está presente, así como la catalasa. Producen ureasa y fosfatasa alcalina. No hay producción de pigmentos (Solnick y Vandamme, 2001).

2.1.2 Epidemiología de la infección

H. pylori infecta tanto a mujeres como hombres, se estima que alrededor del 50% de la población mundial es portadora de la bacteria (Pellicano, *et al.*, 2016). A pesar de que la infección ocurre en todo el mundo, hay diferencias significativas en la prevalencia de la infección entre países y dentro de los mismos. En general, la prevalencia de la infección por *H. pylori* en países desarrollados es menor, en comparación con los países de bajo desarrollo (Mitchell, 2001).

El nivel socioeconómico está asociado a la adquisición de *H. pylori*, en términos de factores de riesgo significa que un bajo ingreso económico, casas pequeñas, una familia numerosa, bajo nivel de educación y falta de facilidades para la higiene pueden favorecer la transmisión de la bacteria (Koletzko y Mégraud, 2016). La adquisición de la bacteria ocurre principalmente en la infancia, ya que puede ser transmitida dentro del seno familiar.

En México, se reporta una seroprevalencia de la infección del 66%, siendo el factor de riesgo más importante la edad, ya que la infección en los mexicanos comienza en etapas tempranas de la vida (Torres, *et al.*, 1998). A pesar de que la infección está asociada con condiciones socioeconómicas bajas, en nuestro país la infección no depende del área geográfica ni de las características poblacionales.

2.1.3 Vías de transmisión

A pesar de que aún no se han determinado las rutas exactas de la transmisión de *H. pylori*, al parecer la vía gastro-oral (a través del vómito) y la oral-oral (a través de la saliva después de la regurgitación) son las más importantes. Esto ocurre principalmente por contacto persona-persona dentro de una familia, siendo la madre la principal fuente de infección (Koletzko y Mégraud, 2016), por lo que si en una familia hay un individuo afectado probablemente los demás miembros contraerán la infección.

La vía fecal-oral es menos probable, sin embargo, *H. pylori* podría ser transmitida por heces si existen enfermedades diarreicas e higiene inadecuada. Además, en caso de que las heces fecales lleguen al agua se podría dar lugar a la contaminación de esta con la bacteria. Algunos estudios han demostrado que *H. pylori* puede estar presente en el agua, no obstante, esos resultados son dudosos ya que la detección de la bacteria se realizó por amplificación del DNA bacteriano por PCR y no por aislamiento de *H. pylori* (Koletzko y Mégraud, 2016).

2.1.4 Patologías asociadas

A pesar de que el estómago debería ser un ambiente estéril, debido a la secreción de ácido, *H. pylori* infecta el estómago humano causando una respuesta inflamatoria denominada gastritis. A pesar de que la mayoría de las infecciones son asintomáticas, aproximadamente 10% de los individuos afectados desarrolla lesiones gástricas como úlcera péptica, 1-3% presenta cáncer gástrico (Cirak *et al.*, 2007, De Falco, *et al.*, 2015) y 0.1% desarrolla linfoma MALT (Linfoma de tejido linfático asociado a mucosa) (Wang *et al.*, 2014). La bacteria es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico, por lo que la OMS la clasificó como Carcinógeno Grupo 1 (IARC, 1994).

2.1.5 Métodos de diagnóstico de la infección por *H. pylori*

Los métodos de detección de la infección se clasifican en Invasivos y No invasivos. Los Invasivos involucran la toma de una biopsia, mientras que los No Invasivos se efectúan a partir de muestras de sangre, heces o del aliento. Cada prueba tiene ventajas y desventajas, a pesar de ello permiten diferenciar si existe una infección activa o si hubo exposición a la bacteria.

Métodos invasivos

- Endoscopía
- Biopsia
 - Cultivo de *H. pylori*
 - Prueba rápida de la ureasa
 - Histología
 - Métodos moleculares

Métodos no invasivos

- Prueba del aliento con urea
- Examen coprológico
 - Anticuerpos contra *H. pylori*
 - Visualización directa
- Serología: Detección de IgA, IgG e IgM

2.1.6 Mecanismos de patogenicidad

A diferencia de otras bacterias que atraviesan el ambiente gástrico y son incapaces de multiplicarse, *H. pylori* puede crecer dentro del ambiente gástrico a pesar del pH ácido. En el estómago humano infectado, se ha reportado una densidad bacteriana de hasta 10^6 Unidades Formadoras de Colonias por gramo de tejido gástrico (Fischer y De Reuse, 2016).

H. pylori entra al cuerpo humano a través de la vía oral y es expuesta al pH del estómago humano (pH 1-2), una vez que atraviesa el cuerpo del estómago llega al antro, donde establece la infección principalmente (Figura 2.2).

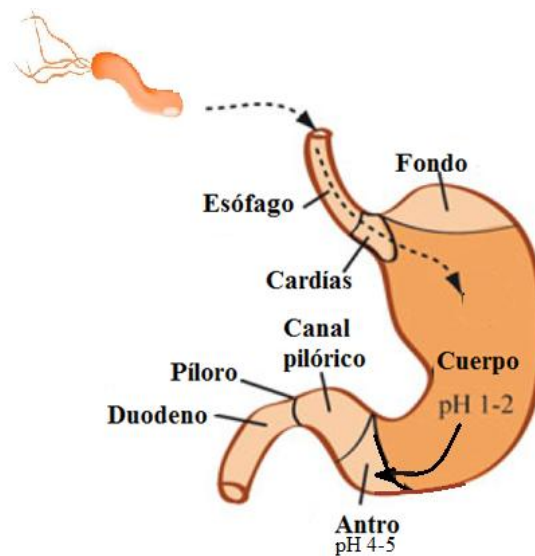


Figura 2.2. Localización de *H. pylori* en el estómago humano. *H. pylori* debe atravesar el ambiente gástrico hasta llegar a su principal sitio de infección, el antro. En donde el pH es más alto (Tomado y modificado de Fischer y De Reuse, 2016).

H. pylori posee distintos mecanismos de patogenicidad para la colonización gástrica, daño al tejido epitelial y sobrevivencia al ambiente gástrico los cuales se resumen en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Factores de supervivencia, colonización y virulencia identificados en *H. pylori*

Mecanismo de patogenicidad	Factor	Efecto
Colonización	Flagelos	Movimiento a través de la mucosa
	Ureasa	Aclimatación del ácido
	Adhesinas	Unión de la bacteria al epitelio gástrico
Daño al tejido	Enzimas proteolíticas	Glucosulfatasa que degrada mucinas
	Citotoxina CagA (120 kDa)	Inflamación, proliferación celular, defectos en la polaridad del epitelio y desorganización del citoesqueleto
	Citotoxina vacuolizadora (VacA)	Daño al epitelio por vacuolización y muerte celular
	Ureasa	Efecto tóxico del NH ₃ producido en células epiteliales, alteración de las uniones estrechas de las células
	Fosfolipasa A	Digestión de fosfolípidos en membrana celular
	Alcohol deshidrogenasa	Generación de acetaldehído que provoca daño a la mucosa gástrica
Supervivencia	Superóxido dismutasa y catalasa	Prevención del daño por especies reactivas derivadas del oxígeno (producidas por la respuesta inmune)
	Forma cocoide	Estado viable no cultivable (Forma de resistencia)
	Proteína de choque térmico	Estabilización y posible reparación de proteínas bajo condiciones adversas
	Lipopolisacárido	Antígeno O: Homología con el grupo Lewis X/Y Evadir la respuesta inmune

Adaptado de Andersen y Wadström, 2001.

Los factores de colonización que permiten a *H. pylori* atravesar el ambiente gástrico y establecerse se ilustran en la Figura 2.3.

En primer lugar la motilidad conferida por la presencia de flagelos aunada a su morfología espiral le permite atravesar la capa de moco que cubre al epitelio gástrico. Asimismo, la enzima ureasa le brinda la capacidad de neutralizar y amortiguar el ácido del ambiente gástrico. Cabe destacar que mutantes de la bacteria sin ureasa, o sin flagelos son incapaces de colonizar la mucosa gástrica en animales de laboratorio (Eaton, *et al.*, 1991 y 1992).

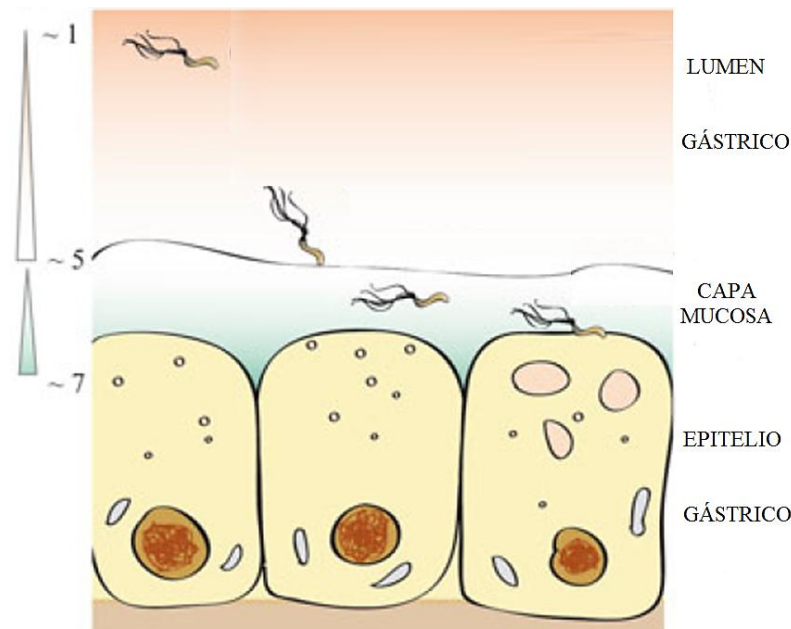


Figura 2.3. Colonización por *H. pylori*. La motilidad mediada por flagelos y la enzima ureasa, permiten a *H. pylori* atravesar el lumen gástrico y llegar a las células del epitelio y así establecer una infección (Tomado y modificado de Fisher y De Reuse, 2016).

Se ha encontrado que el 20% de la población de *H. pylori* se encuentra adherida al huésped y el 80% restante se encuentra libre en la mucosa gástrica.

La motilidad y la enzima ureasa le ayudan a *H. pylori* a llegar a las células del epitelio en donde hace uso de adhesinas, las cuales son factores esenciales para la colonización del epitelio gástrico pues permiten a la bacteria unirse a las células del estómago, provocando inflamación y daño al tejido.

Los principales factores de virulencia son su isla de patogenicidad (CagPAI), en especial la proteína CagA (citotoxina asociada al gen A) y, VacA (citotoxina vacuolizadora A), además del gen promotor de úlcera duodenal *dupA*.

2.2 Enzima Ureasa

La enzima ureasa: urea amidohidrolasa EC 3.5.1.5 ejerce una sola función catalítica que es la hidrólisis de la urea. *H. pylori* expresa a la enzima ureasa, la cual es de gran importancia ya que le permite sobrevivir y actuar bajo las condiciones ácidas del estómago humano y así establecer una infección.

2.2.1 Estructura de la ureasa de *H. pylori*

El *cluster* del gen de la ureasa de *H. pylori* está constituido por siete genes. Los genes *ureA* y *ureB* codifican para las subunidades estructurales α de 26.5 kDa (Figura 2.4) y β de 61.7 kDa (Figura 2.5) que forman la estructura básica de la enzima. La enzima se activa cuando se unen dos moléculas de Ni^{2+} a cada subunidad β , esta adición la llevan a cabo las proteínas accesorias codificadas por los genes *ureE*, *ureF*, *ureG* y *ureH*. El gen *ureI* codifica para un canal que permite el paso de la urea y que es dependiente del pH. La ureasa constituye más del 15% de las proteínas de *H. pylori* y puede formar supracomplejos (Sachs, 2005).

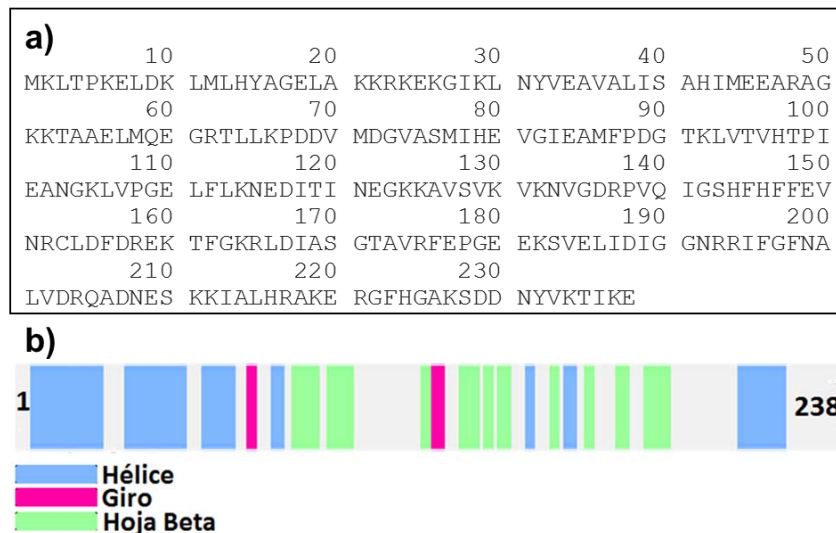


Figura 2.4. Secuencia de aminoácidos (a) y estructura secundaria (b) de la subunidad α de la ureasa de *H. pylori* (Consultado en UniProt).

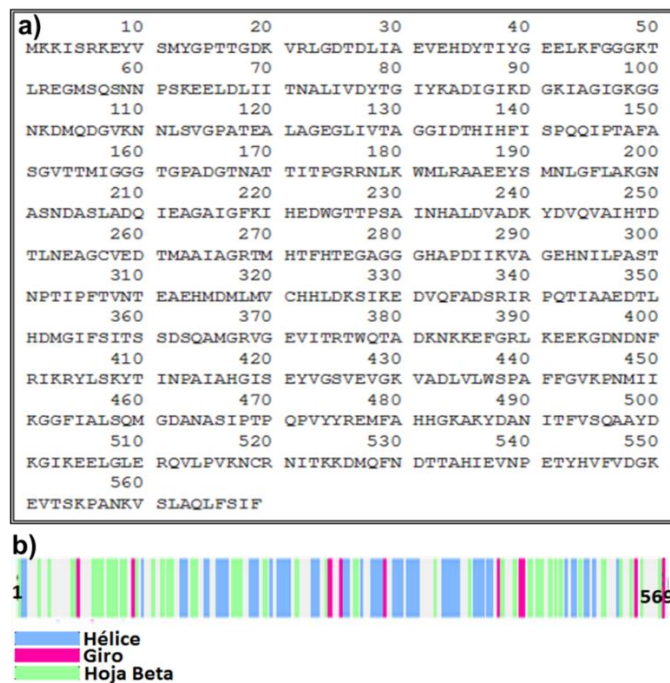


Figura 2.5. Secuencia de aminoácidos (a) y estructura secundaria (b) de la subunidad β de la ureasa de *H. pylori* (Consultado en UniProt).

En cuanto a la estructura cuaternaria de la ureasa, se tiene en primer lugar que tres subunidades α - y β - forman un complejo heterotrimérico $(\alpha\beta)_3$ (Figura 2.6 a). A su vez cuatro de estos complejos forman un ensamble dodecamérico supramolecular esférico, el cual da la estructura final a la ureasa de *H. pylori* (Figura 2.6 b) (Ha, *et al.*, 2001).

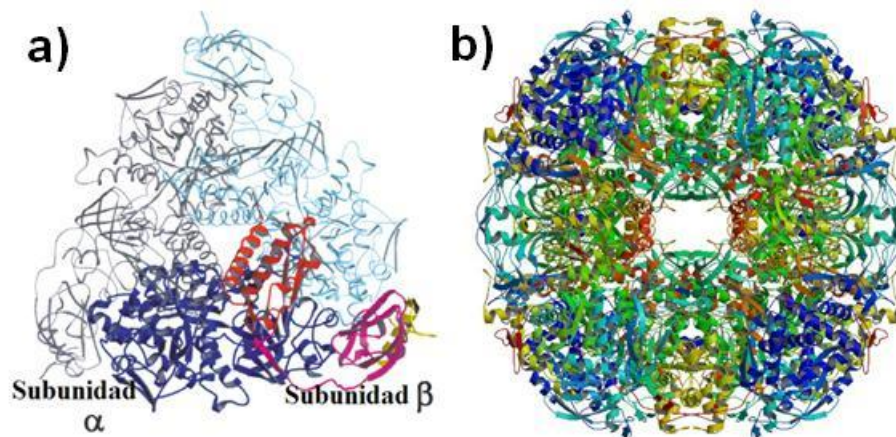


Figura 2.6. Estructura cuaternaria de la ureasa de *H. pylori*. a) Ensamble trimérico (Modificado de Ha, *et al.*, 2001) b) Ensamble supramolecular (Consultado en Protein Data Bank).

2.2.2 Reacción catalizada por la ureasa

Esta enzima pertenece a la familia de las amidohidrolasas y fosfortriesterasas, las cuales se caracterizan por la presencia de núcleos metálicos en sus sitios activos. La función de estos metales es activar al sustrato y al agua para la reacción. Entre otras metalohidrolasas dinucleares, las ureasas son únicas al poseer Ni^{2+} en el sitio activo (Krajewska, 2009)

La reacción catalizada por la ureasa es la hidrólisis de la urea, sus productos iniciales son un carbamato y amoníaco, el primero se hidroliza espontáneamente en amoníaco y ácido carbónico (Figura 2.7).



Figura 2.7. Reacción catalizada por la ureasa

De acuerdo a la estructura cristalográfica de la ureasa de *H. pylori*, se propone que el mecanismo catalítico de la enzima involucra un dominio que consiste en una hoja móvil (*Flap*) que funciona como bisagra. En la conformación abierta permite el acceso y ajuste del sustrato al sitio activo (Figura 2.8). Una vez que la urea está dentro del sitio activo induce un cambio conformacional de la hoja flexible, llevándola a una posición cerrada por un rearrreglo del residuo Ala- α 365. En la conformación cerrada, el enlace C-N de la urea es roto y la urea es convertida en amoníaco y un carbamato-Níquel. Finalmente, el amoníaco es liberado del sitio activo y la hoja móvil flexible es abierta (Xiao, *et al.*, 2012).

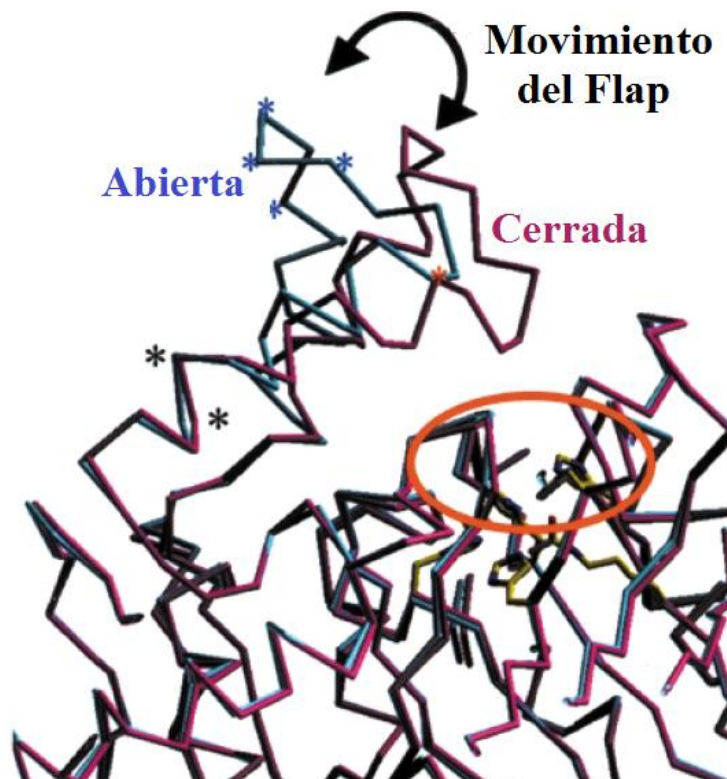


Figura 2.8. Hoja móvil y sitio activo de la Ureasa. Superposición de la conformación abierta (azul) y cerrada (violeta) de la ureasa. El sitio activo está circulado. (Imagen modificada de Ha, *et al.*, 2001).

De acuerdo a Krajewska, 2009, existen distintos mecanismos de reacción propuestos para la hidrólisis de la urea catalizada por la ureasa. Se ha propuesto que en el sitio activo de la enzima (Figura 2.9), el átomo de oxígeno de la urea se une al ion Ni^{2+} (1), debido a que es más electrofílico, provocando que el carbono de la urea sea susceptible a un ataque nucleofílico. Luego, reemplazando las moléculas de agua de los residuos de triptófano (W1 a W3), la urea se enlaza al ion de níquel (2) a través del nitrógeno de uno de sus grupos amino, haciendo un enlace bidentado. De esta forma se facilita el ataque nucleofílico del agua sobre el grupo carbonilo de la urea, resultando en la formación de un intermediario tetraédrico desde el cual el NH_3 y el carbamato son liberados. Por otro lado, existe la propuesta de que el ataque nucleofílico es presentado por el hidróxido “puente” (WB) o bien, que el residuo His320 localizado en la hoja móvil del sitio activo, puede hacerlo.

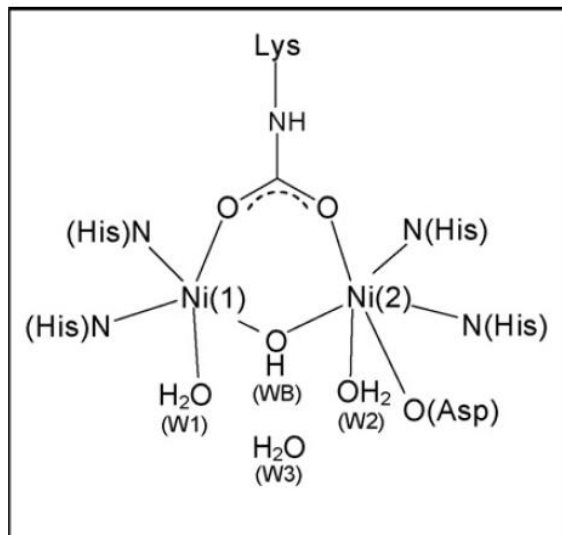


Figura 2.9. Sitio activo de la ureasa nativa (Krajewska, 2009).

Existe otra propuesta en la cual se plantea un enlace monodentado de la urea solo al Ni^{2+} (I), mientras que el Ni^{2+} (2) libera una molécula de agua que actuaría ahora como el nucleófilo para el átomo de carbono de la urea. Este último mecanismo ha sido respaldado por cálculos de dinámica molecular (Manunza, *et al.*, 1999).

2.2.3 Propiedades cinéticas

La ureasa de *H. pylori* posee una K_M en un intervalo 0.2-0.8 mM. Su pH óptimo se encuentra de 7.0 a 8.2 y su punto isoeléctrico entre 5.90-5.99 (Evans, *et al.*, 1991)

La K_M de la ureasa de *H. pylori* es considerada de las más bajas dentro de las ureasas microbianas, las cuales tienen valores de K_M de 10 a 100 mM.

El comportamiento cinético presentado por la enzima varía dependiendo de las condiciones, ya que en estado puro exhibe una cinética sigmoide a concentraciones de urea ≤ 0.1 mM, sin embargo, en presencia de conservadores como polietilenglicol o a altas concentraciones de urea adopta una cinética de Michaelis-Menten (Gang, *et al.*, 2009).

2.2.4 Ureasa como factor de colonización

A diferencia de otras bacterias, *H. pylori* puede colonizar el epitelio gástrico a pesar del pH ácido del estómago. El mecanismo de aclimatación al ácido desarrollado por *H. pylori* es único, permitiendo a la bacteria mantener su pH periplásmico a niveles en los que tanto el pH del citoplasma como el potencial de membrana sean adecuados para el crecimiento (Marcus, *et al.*, 2005). Esta habilidad le es conferida por la enzima ureasa, que al hidrolizar a la urea producida por el huésped y convertirla en NH_3 y CO_2 , aporta la capacidad de neutralización y un efecto de buffer contra el ácido (Sachs *et al.*, 2005). La baja K_M de la ureasa de *H. pylori* (0.2-0.8 mM) indica su gran afinidad por la urea, permitiendo la utilización de la urea presente en el estómago humano (5 mM).

El sistema de aclimatación al pH, incluye además de la ureasa, otras proteínas como un canal para la urea y la anhidrasa carbónica.

El gen *ureI* codifica para un canal localizado en la membrana interna de la bacteria que es dependiente de pH y que se abre como respuesta a la acidez del medio, permitiendo la entrada de urea al citoplasma. UreI presenta características de un canal no saturable e independiente del voltaje que se abre de acuerdo al pH del medio, teniendo baja apertura a pH neutro y alta apertura a pH=5 o menor. De esta manera permite la entrada de urea al citoplasma de la bacteria bajo las condiciones ácidas del estómago. Por lo que UreI es un factor clave para la aclimatación al ácido por parte de *H. pylori* (Sachs, 2005).

Por otro lado, la enzima anhidrasa carbónica también juega un importante papel en este mecanismo de aclimatación al ácido estomacal. Dicho mecanismo, se describe a continuación y se esquematiza en la Figura 2.10.

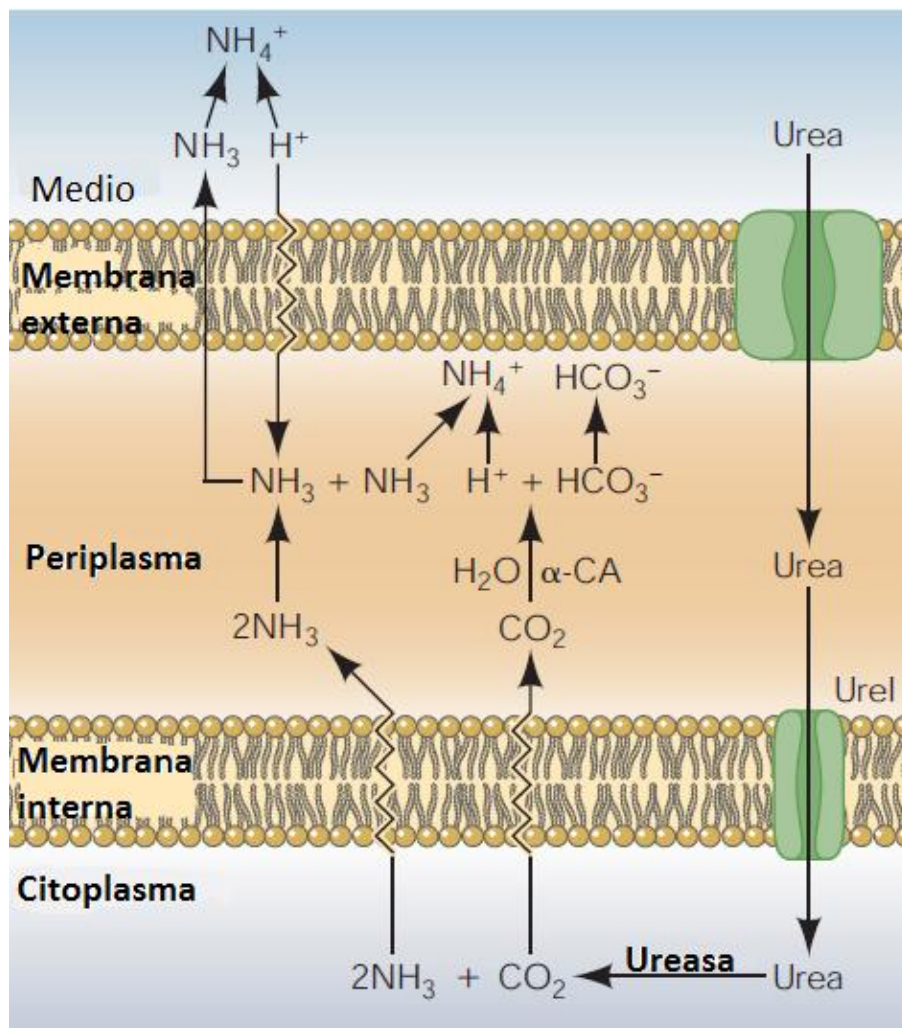


Figura 2.10. Modelo de aclimatación al ácido en *Helicobacter pylori*. (Adaptado de Sachs, 2005)

La membrana externa de *H. pylori* posee porinas permeables a la urea y a los protones. Con la acidificación del medio, el canal Urel se abre y la urea entra al citoplasma, en dónde es hidrolizada por la ureasa, produciendo 2NH_3 y CO_2 , que al ser volátiles salen al periplasma. Los protones entrantes son neutralizados por el NH_3 , formando NH_4^+ . Por otro lado, la anhidrasa carbónica citoplasmática genera HCO_3^- , que es un amortiguador a pH neutro más fuerte que el NH_3 . De igual manera, el NH_3 que fluye al periplasma puede neutralizar la acidez entrante, mientras que el CO_2 se convierte por acción de la anhidrasa carbónica, a H^+ y HCO_3^- . Un segundo NH_4^+ es formado junto con un HCO_3^- , siendo este el que brinda una mayor amortiguación de pH en el rango de pH 6.1 (Sachs, 2005).

2.2.5 Importancia de los inhibidores de la ureasa de *H. pylori*

Un estudio llevado a cabo con mutantes ureasa-negativos, reveló que éstos son incapaces de colonizar modelos animales, demostrando que la actividad enzimática es vital para la colonización del epitelio gástrico (Eaton y Krakowka, 1994). Debido a esto, los inhibidores de la ureasa pueden ser terapias efectivas para el tratamiento de la infección por *H. pylori*. Sin embargo, los inhibidores disponibles comercialmente como fosforodiamidatos, derivados del ácido acetohidroxámico e imidazoles, son tóxicos y de baja estabilidad, por lo que no son usados clínicamente (Modolo, *et al.*, 2015). Aquí radica la importancia de la búsqueda de nuevos inhibidores de la ureasa que tengan una buena estabilidad y baja toxicidad.

2.3 Plantas comestibles y su potencial medicinal

La alimentación y el estilo de vida son esenciales para promover y mantener una buena condición de salud, además de prevenir posibles enfermedades.

Existen investigaciones que han demostrado que especies de plantas utilizadas en la alimentación cotidiana, tienen actividad contra *H. pylori*, y por tanto, su consumo podría mejorar las patologías producidas por la bacteria (O'Mahony *et al.* 2005, Castillo-Juárez y Romero, 2007, Srikanta y Dharmesh, 2012). Aunque el mecanismo por el que actúan no está completamente determinado, se propone que podría ser Preventivo (evitando la colonización), Atenuante, (disminuyendo o retrasando el crecimiento de bacterias) o Eliminator. Algunos ejemplos de plantas comestibles con actividad anti-*H. pylori* son el perejil, la manzanilla, las alcachofas, las espinacas chinas, entre otras.

Las plantas contienen una gran variedad de compuestos con el potencial de funcionar como antibióticos y ser tan efectivos como los comerciales; además de que, al ser compuestos novedosos, no presentan problemas de resistencia microbiana.

2.3.1 Especies tradicionales subvaloradas y subutilizadas

De acuerdo a Mohan y Dutta, 2013, la disponibilidad de alimento para abastecer el mundo entero depende de pocas especies cultivadas o “cultivos mayores”. Hasta hoy, solo 30 especies de plantas son utilizadas para cubrir el 95% de los requerimientos de alimentos del mundo. Estos son amplia e intensivamente cultivados y desarrollados por selección extensiva desde una gran reserva de agro-biodiversidad. Aquí surge la necesidad de expandir la explotación de la gran diversidad de plantas que podrían ampliar los cultivos para el abastecimiento de alimentos y así proveer a la creciente población humana, evitando la dependencia de solo algunos cultivos, especialmente frente al cambio climático.

Diversos factores, como la apariencia física, sabor, propiedades nutrimentales, métodos de cultivo, calidad de proceso, ganancias y otros son responsables de la promoción y aceptación de los “cultivos mayores”, por lo que se ha hecho uso de la biotecnología con el fin de conservarlos, mientras que se ha dejado de lado a las especies tradicionales subvaloradas y subutilizadas (ETSS) a pesar de que éstas pueden ser una fuente excelente para nutrición, biocombustibles, compuestos medicinales, entre otros.

Pero, ¿qué es una especie tradicional subvalorada y subutilizada? Son especies categorizadas como “cultivos menores” al tener menor importancia global en términos de producción y valor en el mercado. Se mantienen tradicionalmente en sus centros de origen o por algunos agricultores locales, ya que son de gran importancia para la subsistencia de sus comunidades, siendo adaptadas a tierras marginadas. Constituyen una parte importante de la dieta local, pues proveen nutrimentos de gran importancia como proteínas, vitaminas y nutrimentos inorgánicos, asimismo, juegan un importante rol en la medicina tradicional.

Las ETSS continúan manteniéndose por las preferencias socio-culturales y el uso tradicional. No obstante, permanecen subutilizadas a pesar de su potencial para contribuir al beneficio de la población rural y a la seguridad alimentaria. Por lo general, están inadecuadamente caracterizadas ya que han sido ignoradas por la investigación, el desarrollo y la conservación. Por lo anterior, las ETSS

generalmente son de bajo rendimiento y no compiten con los cultivos mayores, a pesar de que muchas de ellas tienen potencial para ser económicamente viables ya que, en comparación a los cultivos mayores, requieren de menor inversión y por lo tanto, podrían contribuir a la producción de agricultura sostenible. Otra limitación, es la falta de conocimiento en la taxonomía, reproductividad biológica, genética, agronomía y calidad (Mohan y Dutta, 2013).

Algunas organizaciones internacionales e investigadores han reconocido la importancia de las especies subvaloradas y subutilizadas encaminadas hacia la seguridad alimentaria y el mejoramiento de la calidad de vida en las comunidades rurales. Un ejemplo de ello es el proyecto CONACYT 214286, “Rescate de especies subvaloradas tradicionales de la dieta mexicana y su contribución para el mejoramiento de la nutrición en México” que, con el fin de lograr la reinserción de las ETSS en los mercados y dieta nacionales, ha estudiado su potencial desde aspectos etnobotánicos, antropológicos, sensoriales, económicos y sociológicos, así como químicos, bioquímicos, moleculares y médicos. Este proyecto eligió tres especies de quelites: Alache (*Anoda cristata*), Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*) y Chepil (*Crotalaria longirostrata*), debido a que contienen una elevada cantidad de hierro y otros nutrimentos inorgánicos que se encuentran ausentes en la dieta de los mexicanos y que son de gran importancia en el crecimiento infantil (Gálvez, 2016).

Los quelites son considerados como ETSS en los sistemas de abasto y mercadotecnia que no los favorecen, con la consecuente disminución en su demanda y abasto. Son plantas herbáceas de follaje comestible, generalmente no cultivadas, cuyas hojas y tallos tiernos se consumen ligeramente cocinados (Bye, 1981). Ejemplos de ellos son plantas como las verdolagas, cenizos, quintoniles, huauzontles, flores de calabaza, guías de frijol y calabaza, entre otras (Gálvez y Peña, 2015). Estas plantas fueron parte de la base de una buena nutrición en Mesoamérica, ya que contienen una gran cantidad de nutrimentos conocidos. Por otra parte, los quelites poseen una enorme variedad de fitoquímicos o sustancias cuya importancia para la salud ha sido poco estudiada (Gálvez y Peña, 2015).

2.3.2 Características generales y etnofarmacológicas de las ETSS seleccionadas

2.3.2.1 *Anoda cristata* (L) Schltldl

Familia: Malvaceae.

Nombre común: Alache, amapola, violeta, malvón de campo.

Es una planta ampliamente distribuida en México, se puede encontrar en climas cálido, semicálido, semiseco y templado (Rendón, *et al.*, 2001).

Mide hasta 1 m de altura, los tallos presentan vellosidades y las hojas son principalmente triangulares. Las flores son pedúnculos largos, axilares, con cáliz, de color morado (Figura 2.11) El fruto es verde y posee forma similar a la de una estrella debido a la presencia del cáliz (BDMTM, 2009).



Figura 2.11. Alache colectado

Está presente en los cultivos de maíz, alfalfa, avena, cebada, cártamo, frijol, entre otros (Villaseñor y Espinosa, 1998). Siendo estos sitios los principales lugares de recolección. El alache es muy apreciado por su sabor.

Los brotes y hojas frescos son puestos en agua con un poco de tequesquite y se hierve hasta que el caldo toma una consistencia viscosa. Esta preparación es mezclada con otros vegetales como calabazas, hongos y frijoles (Rendón, *et al.*, 2001). La planta se emplea en distintas patologías como dolor e inflamación gastrointestinal, padecimientos respiratorios, dolores musculares, fiebre, entre otros (BDMTM, 2009). Uno de los usos más relevantes es su utilización para el tratamiento de la diabetes y recientemente se encontró que dos de los flavonoides mayoritarios en la planta: la acetina y la diosmetina poseen actividad hipoglucemiante. (Brindis, 2011; Juárez-Reyes *et al.*, 2015; Juárez-Reyes, 2016).

2.3.2.2 *Cnidoscolus chayamansa* Mc Vaugh

Familia: Euphorbiaceae.

Sinónimos: *Cnidoscolus aconitifolius*

Nombre común: Chaya

Originaria de América Central, habita en climas cálido y semicálido. (BDMTM, 2009). En México se encuentra principalmente en la región sureste. Asociada a vegetación de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio. Es un arbusto de hasta 3 m de altura que posee tallos numerosos con látex abundante. Las hojas tienen vellosidades irritantes al tacto (Figura 2.12) Las flores son blancas y en racimos (BDMTM, 2009).



Figura 2.12. Hojas de chaya

Se encuentra cultivada en huertos familiares o jardines, y a menudo, está presente junto a otros cultivos en las milpas (Ayala, 2016).

Las hojas son consumidas en distintos guisos una vez cocidas y también son utilizadas para la preparación de bebidas (Loarca-Piña, *et al.*, 2010).

Es usada como remedio tradicional para el tratamiento de diabetes, reumatismo, inflamación y desórdenes gastrointestinales. Asimismo, se ha encontrado que distintos extractos de la planta poseen actividad antioxidante, anti-inflamatoria, cardioprotectora (García-Rodríguez, *et al.*, 2014), antimutagénica y antidiabética (Loarca-Piña, *et al.*, 2010).

2.3.2.3 *Crotalaria longirostrata*

Familia: Fabaceae

Nombre común: Chepil. También conocido como chipil o chipilín.

Es una planta originaria de América Central y en México está distribuida en la región sur. Habita en climas desde seco a semiseco, templado y tropical (BDMTM, 2009).

Mide aproximadamente 30 cm de altura, el tallo es verde, pero en ocasiones la base es leñosa. Tiene las hojas formadas por tres hojuelas juntas en uno de sus extremos y se encuentran en toda la planta. Las flores nacen en racimos que están en las puntas de las ramas y son amarillas. (BDMTM, 2009)

Crece principalmente en los cultivos y a la orilla de los caminos. Se encuentran con mayor frecuencia los chepiles silvestres, pero también existen variedades cultivadas, que se caracterizan por tener hojas de mayor tamaño (Figura 2.13) (Ayala, 2016).



Figura 2.13. Chepiles. 1) Chepil silvestre en campo abierto. 2) Chepil cultivado recolectado.

El chepil es un ingrediente frecuente en recetas gastronómicas, se utilizan las hojas para preparar tamales o caldo, también se utiliza como especia o condimento en algunos platillos (Ramírez-Hernández, 2014).

Se ha encontrado que es una planta con alto contenido de nutrimentos inorgánicos y vitamina C, además de tener una alta actividad antioxidante (Jiménez-Aguilar, *et al.*, 2015).

2.4 Potencial anti-*Helicobacter pylori* de los extractos de las especies seleccionadas

En un estudio realizado previamente en el laboratorio donde se llevó a cabo la presente tesis, se determinó la concentración mínima inhibitoria del crecimiento (CMI) de *H. pylori* de distintos extractos de las ETSS seleccionadas. Los extractos de diclorometano-metanol de las tres especies tienen una actividad de buena a moderada (Tabla 2.2) y dos compuestos reportados en el Alache, la acacetina y la diosmetina, presentan alta actividad contra la bacteria (Martínez, 2016).

Tabla 2.2. CMI de los extractos y compuestos evaluados contra *H. pylori*

Quelite	Extracto o compuesto	CMI (µg/mL)	Actividad
Alache	Diclorometano-metanol	250.00	Moderada
	Acuoso	>500.00	Nula
	Acacetina	7.82*	Alta
	Diosmetina	7.82*	Alta
Chayas	Diclorometano-metanol	62.50	Buena
	Acuoso	>500.00	Nula
Chepiles	Diclorometano-metanol	125.00	Buena
	Acuoso	>500.00	Nula
Controles positivos	Amoxicilina	0.005	
	Metronidazol	250.00	

*CMI 90

Escala de referencia con base en la CMI de los antibióticos de referencia.

Actividad	Nula	Baja	Moderada	Buena	Alta
CMI (µg/mL)	>500	>300 - 500	>125 - 300	>15.63 - 125	≤15.63

Además, se determinó su efecto sobre la adherencia de la bacteria a la línea celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) y se encontró que todos los extractos inhiben la adhesión de *H. pylori* entre el 20-60%.

Los resultados indican el potencial de las ETSS analizadas, particularmente de algunos extractos y compuestos, para ser usados en el control de las enfermedades producidas por *H. pylori*.

2.5 Hipótesis

Las especies *Anoda cristata*, *Cnidoscolus chayamansa* y *Crotalaria longirostrata* poseen actividad anti-*H. pylori* a través de la inhibición de la enzima ureasa.

2.6 Objetivos

Determinar el efecto *in vitro* de extractos y compuestos presentes en tres especies de quelites seleccionadas *Anoda cristata*, *Cnidoscolus chayamansa* y *Crotalaria longirostrata* sobre la enzima ureasa de *Helicobacter pylori*.

2.6.1 Objetivos específicos

Obtener y caracterizar preliminarmente los extractos de las tres especies de quelites seleccionadas.

Extraer la enzima ureasa de *H. pylori* para realizar los ensayos.

Establecer las condiciones experimentales óptimas para la determinación de la actividad enzimática.

Determinar el efecto sobre la enzima ureasa de extractos y compuestos de las tres especies seleccionadas de quelites.

2.6.2 Objetivos adicionales

Determinar el efecto del ácido anacárdico 15:0 sobre la enzima ureasa de *H. pylori*.

III. METODOLOGÍA

3.1 Material vegetal

Se utilizaron hojas de las tres especies, a partir de las muestras que a continuación se enuncian:

3.1.1 *Anoda cristata* (L) Schltl (Alache)

Colectado e identificado por Mtra. Edelmira Linares y Dr. Robert Bye del Instituto de Biología, UNAM. 02 de junio de 2015.

Lugar de colecta: Col. Santa Rosa, Nepantla, Municipio de Tepetlixpa, Estado de México. 18°58'57.468" N, 98°49'40.008" O, 2038 m snm. Ejemplar depositado en el Herbario Nacional con Número de MEXU 1,445,645.

Hábitat: Área agrícola en laderas del lado oeste del arroyo Ozumba en bosque alterado de pino-encino.

3.1.2 *Crotalaria longirostrata* (Chepil)

Chepil cultivado

Colectado por Magali Martínez Cortés del CIIDIR Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional. 13 de julio de 2015.

Lugar de colecta: Camino Real San Juan, San Antonio Castillo Velasco, Ocotlán de Morelos, Oaxaca, México. 16°48.481" N y 96°40'25.24" O, 1498 m snm.

Hábitat: Terreno de cultivo de maíz y hortalizas.

Chepil silvestre

Colectado por Magali Martínez Cortés del CIIDIR Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional. 02 de septiembre de 2015.

Lugar de colecta: Camino Real San Juan, San Antonio Castillo Velasco, Ocotlán de Morelos, Oaxaca, México. 16°48'30.712" N y 96°40'21.349" O, 1498 m snm.

Hábitat: Terreno sin labranza, creciendo entre pastizales.

3.1.3 *Cnidoscolus chayamansa* McVaugh (Chaya)

Colectadas por la Dra. Amanda Gálvez. Fac. de Química, UNAM y la Mtra. Clarisa Jiménez Bañuelos del Jardín Botánico Regional, Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

Chaya 1: Colectada en San Pedro Chimay en el municipio de Mérida, Yucatán.

Chaya 2: Colectada en Timucuy en el municipio de Mérida, Yucatán.

3.2 Compuestos evaluados

Acetina. Sigma-Aldrich ® Pureza $\geq 97\%$ (HPLC). 284.26 g/mol

Ácido acetohidroxámico (AHA). Sigma-Aldrich ® Pureza 98%. 75.07 g/mol

Diosmetina. Santa Cruz Biotechnology, Inc. Pureza $\geq 98\%$. 300.27 g/mol

Quercetina. Sigma-Aldrich ® Pureza $\leq 95\%$. 302.24 g/mol

Ácido anacárdico 15:0. Calbiochem® 96.9%. 348.5 g/mol

3.3 Obtención de los extractos

3.3.1 Extractos diclorometano-metanol (DM)

Se obtuvieron por maceración exhaustiva de 50 g de planta seca y molida con 500 mL de una mezcla de diclorometano-metanol 1:1 por 72 h. Se filtró el disolvente y se evaporó en un rotaevaporador a presión reducida, el extracto fue secado ($T=25^{\circ}\text{C}$) y se obtuvo el porcentaje de rendimiento ((Masa de extracto/ masa de material vegetal)*100).

3.3.2 Extractos acuosos (AQ)

Se partió de 10 g de planta seca y molida, la cual se agregó en 500 mL de agua hirviendo y se reposó 30 min. La infusión se filtró y se liofilizó para obtener el extracto. En el caso de alache y chepil, a la infusión filtrada se le agregó etanol (1:1) para precipitar el mucílago, el cual se separó mediante centrifugación (6 000 rpm, 15 min). El etanol remanente se eliminó en un rotaevaporador a presión reducida. El extracto fue liofilizado y se obtuvo su rendimiento; mientras que el mucílago fue secado en estufa a 37°C .

3.4 Caracterización de los extractos

Para la cuantificación de fenoles y flavonoides se partió de soluciones 1 mg/mL disueltas en metanol en el caso de los extractos DM y en agua bidestilada para los extractos acuosos.

3.4.1 Cuantificación de fenoles totales

Se realizó de acuerdo a García-Rodríguez *et al.*, 2014. Para llevar a cabo la reacción colorimétrica se utilizaron 50 µL de cada solución, se agregaron 2.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/10, posteriormente se adicionaron 2 mL de Na₂CO₃ al 7.5%. Se agitó y se incubó en un baño con agua a 45°C por 15 min. Al término se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro Ultrospec® 2000 de Pharmacia Biotech. Para el cálculo de la concentración se usó una curva de ácido gálico como estándar (Sigma®, 100% pureza) en concentraciones de 25 a 300 µg/mL, la cual se presente en el Anexo de esta tesis.

3.4.2 Cuantificación de flavonoides

La cuantificación se realizó de acuerdo a Nazari, *et al.*, 2014 con algunas modificaciones. Se colocaron 500 µL de cada solución en un tubo de ensayo y se agregaron 1.5 mL de metanol. Se agregó 100 µL de AlCl₃ al 10% y 100 µL de CH₃COONa·3H₂O 1M. Posteriormente se añadieron 2.8 mL de agua para completar un volumen de 5 mL en cada tubo. La reacción se incubó por 30 min en la oscuridad. Al término se midió la absorbancia a 415 nm. Para la cuantificación, se usó una curva patrón de Quercetina en concentraciones de 2.5 a 15 µg/mL, la cual se presenta en el Anexo de la tesis.

3.4.3 Perfil cromatográfico

Se realizaron cromatografías en capa fina colocando 25 µg de cada uno de los extractos de diclorometano-metanol sobre placas de aluminio recubiertas con sílica gel 60 F₂₅₄ de Merck®, utilizando diferentes sistemas de elución. Fueron reveladas bajo luz ultravioleta con longitud de onda 254 nm y 365 nm; además de vainillina sulfúrica con calentamiento a 105°C por 5 min.

La luz de onda corta UV-254 nm, permite la detección de sustancias que desactivan la fluorescencia, en general, compuestos con dobles enlaces C=C conjugados que lucen como zonas oscuras destacando del color verde de fondo que está dado por la placa de cromatografía en capa fina marcada con 60 F₂₅₄. La luz UV-365 nm permite la detección de sustancias con fluorescencia en luz ultravioleta de onda larga.

El sistema vainillina-ácido sulfúrico es considerado un revelador general ya que permite visualizar diferentes compuestos al dar lugar a diferentes coloraciones según la presencia de esteroides, alcoholes superiores, fenoles y aceites esenciales.

3.4.4 Perfil fitoquímico cualitativo preliminar

Se determinó la presencia de esteroides, cumarinas y saponinas de acuerdo a Dávalos, *et al.*, 2012, con algunas modificaciones.

Se utilizaron soluciones de 1 mg/mL disueltas en metanol en el caso de los extractos DM y con agua bidestilada en los extractos acuosos.

3.4.4.1 Presencia de saponinas

Se llevó a cabo la prueba de la espuma. Se diluyó la solución 1/10. Tomando 3 mL de esta dilución en un tubo de ensayo de 13x100 mm. Se agitaron vigorosamente por 30 s y se dejó en reposo por 5 min, posteriormente se midió la altura de la espuma. Si la altura de la espuma es <5 mm la prueba se considera negativa; si se encuentra entre 5 y 10 mm, se considera un contenido moderado de saponinas; si es >15 mm, se atribuye un contenido alto de saponinas.

3.4.4.2 Presencia de esteroides en extractos de DM

En primer lugar, se realizó una separación de los compuestos no polares. Se colocaron en un embudo de separación 5 mL de la solución del extracto (1 mg/mL), 5 mL de agua y 5 mL de éter anhidro.

Se recolectó la fase etérea, con la cual se llevó a cabo la prueba de Liebermann-Burchard. Se tomó 1 mL y se colocó en una caja Petri de vidrio hasta sequedad

del solvente. Posteriormente, se resuspendió en 1 mL de cloroformo y se repartió en tubos de ensayo con tapa. Se agregaron dos gotas de anhídrido acético a cada tubo y después se agregó una gota de ácido sulfúrico concentrado a los tubos (excepto uno que fungió como control). Una coloración azul o verde indica la presencia de esteroides; una coloración rosada a violeta indica la presencia de triterpenos, mientras que coloraciones amarillo pálido indican la presencia de esteroides o triterpenos saturados.

3.4.4.3 Presencia de cumarinas

Se tomó 1 mL de cada solución de extracto (1 mg/mL) y se colocó en un tubo de ensayo con tapa, colocando una tira de papel filtro impregnada de una solución de NaOH al 6% en la pared del tubo sin tocar la solución. Se calentó en un mechero hasta desprendimiento de vapores. El papel filtro se dejó secar al aire y se observó bajo luz UV-365 nm. Se consideró una prueba positiva por la presencia de puntos fluorescentes en el papel filtro.

3.5 Cultivo e identificación de *Helicobacter pylori* ATCC 43504

Se utilizó la cepa de *H. pylori* ATCC 43504 cultivada en agar Casman suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 5%, vancomicina (10 mg/L), trimetoprima (5 mg/L), anfotericina (2 mg/L) y polimixina B (2.5 mg/L), por 24 h a 37°C bajo condiciones microaerofílicas (10% CO₂, 5% O₂). Las bacterias fueron recolectadas y almacenadas en caldo Brucella suplementado con suero fetal bovino al 10% y glicerol al 10% a -70°C hasta su utilización.

Cada lote bacteriano se sometió a los siguientes controles de calidad: morfología en la tinción de Gram, pruebas bioquímicas (ureasa, catalasa y oxidasa) y moleculares (PCR).

Prueba de oxidasa. La placa de Dihidrocloreuro de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMDF) (Dry Slide Oxidase, DIFCO), se torna morada al contacto con las bacterias debido a la acción del Citocromo C (esta reacción depende de la actividad de la enzima citocromo oxidasa bacteriana).

Prueba de catalasa. El peróxido de hidrógeno es descompuesto por lo que se observa un burbujeo provocado por la liberación de oxígeno.

Prueba rápida de ureasa. Se utiliza una solución de urea 6 M a un pH de 7.0 y se le agrega 0.05% de rojo de fenol hasta obtener un color amarillo. Esta prueba se basa en que el rojo de fenol es un indicador de pH ácido. Al contacto con las bacterias, la ureasa hidroliza a la urea y libera amoníaco que eleva el pH provocando que el rojo de fenol pase a un color rosa-rojo.

Prueba por amplificación por PCR del gen *ureA*. Se extrajo el DNA cromosomal de la bacteria y se procedió a la amplificación por PCR del gen *ureA* (que codifica para la subunidad α de la enzima ureasa), utilizando como primer *forward* la secuencia 5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3') y *reverse* la secuencia 3'-5' (5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3') (Clayton, *et al.*, 1990) en un termociclador TechGene. El fragmento que se amplifica debe tener un peso aproximado de 400 pb. La detección del amplificado se llevó a cabo por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, revelado con bromuro de etidio bajo luz UV.

3.6 Extracción y purificación parcial de la ureasa de *H. pylori*

Para la obtención de la enzima se partió de un cultivo fresco de *H. pylori* crecido en medio Mueller-Hinton (suplementado con ciclodextrina al 0.2% y los 4 antibióticos ya mencionados) bajo condiciones microaerofílicas con agitación (150 rpm) que se encontrara en la fase logarítmica de crecimiento (A_{660} entre 0.6 a 0.9) (Fig. 3.1 a).

Las bacterias se colectaron por centrifugación (5 000 rpm, 10 min, 4°C) (Fig 3.1 b) y el precipitado resultante se lavó dos veces con buffer salino de fosfatos (PBS) pH=7.2.

Las bacterias se disolvieron en PBS con 100 μ L de coctel de inhibidores de proteasas (Roche®) (Fig. 3.1 c) y se lisaron por sonicación (Sonicador Branson 250, 90 s, 40 W, 4°C) (Fig. 3.1 d).

El lisado se centrifugó 10 min, 12 000 rpm, 4°C (Centrifuga Beckman J2-21, rotor JA-21) para eliminar paredes celulares y bacterias íntegras (Fig. 3.1 e).

El sobrenadante (SN1) fue centrifugado nuevamente 50 min a 40 000 rpm, 4°C (Ultracentrífuga Beckman XL-90, rotor 65 Ty) (Fig. 3.1 f), este segundo sobrenadante (SN2) se colectó y fue utilizado como la fuente de enzima. El SN1 y SN2 conservan la actividad enzimática hasta por un mes a 4°C.

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) utilizando albúmina de suero bovina (BSA) como estándar. La curva patrón se muestra en el Anexo de esta tesis.

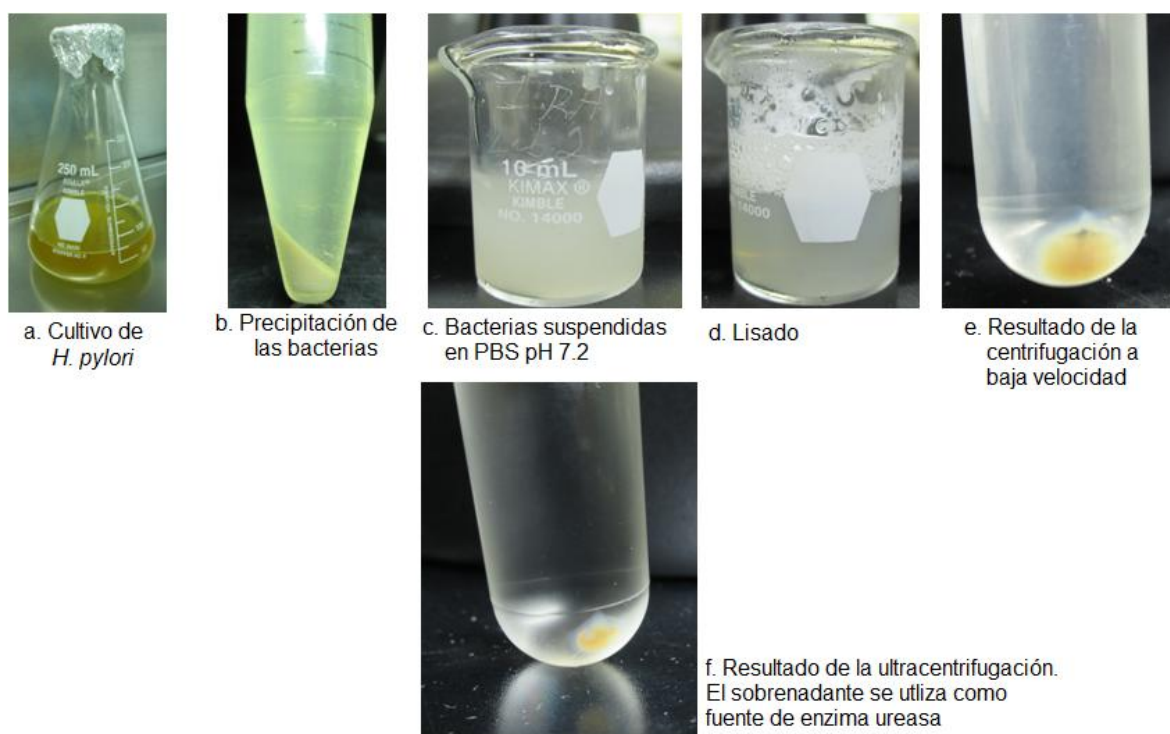


Figura 3.1 Fotografías representativas del proceso de extracción de la enzima ureasa de *H. pylori*

La presencia de la proteína fue verificada por técnicas electroforéticas y de inmunoelectrotransferencia (Western Blot). La electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes en una cámara de BioRad a 120 V. El gel se tiñó con azul de Coomassie, y las subunidades estructurales de la ureasa urea y ureβ se identificaron de acuerdo a su peso molecular. El cálculo del peso molecular de las bandas se muestra en el Anexo.

Las proteínas se electrotransfirieron del gel a una membrana de Polifluoruro de Vinilideno (Millipore®) en el aparato Semi-Dry Transfer Unit TE70/77 GE Healthcare Life Science (Amersham) durante 1:45 h, a 50 mA. La membrana fue incubada con el anticuerpo Ureasa α y con el anticuerpo Ureasa β , ambos de Santa Cruz Biotechnology Inc Nos. SC-21016 y SC-22742, respectivamente. Se utilizó como anticuerpo secundario Goat anti-rabbit (SC-2004) y se realizó la detección mediante quimioluminiscencia de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.6.1 Determinación de la actividad enzimática de la ureasa

La actividad enzimática se midió con un método espectrofotométrico en el que se cuantifica la cantidad de NH_3 liberado por la hidrólisis de la urea usando una modificación del método de Berthelot, cuya reacción se ilustra en la Figura 3.2 (Weatherburn, 1967, Diez et al., 1997), respecto a una curva patrón de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la cual se muestra en el Anexo de la tesis.

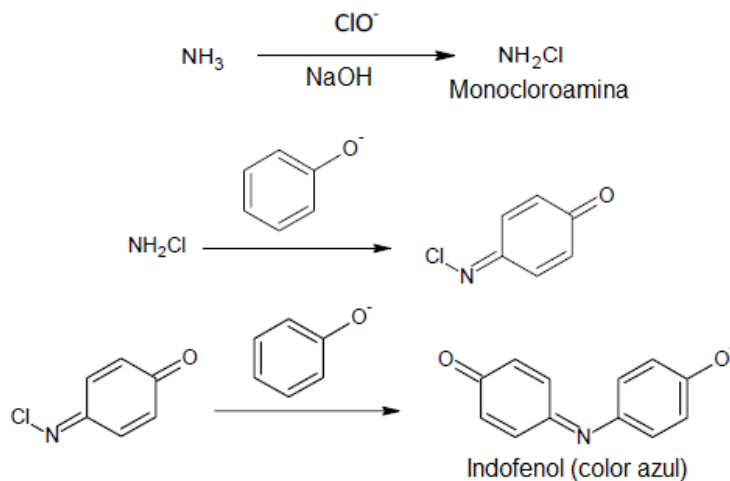


Figura 3.2. Reacción de Berthelot

En una placa de ELISA de 96 pozos se colocaron 100 μL de ureasa (2 μg de proteína parcialmente pura) y se aforó a 130 μL con PBS pH=7.2. La reacción enzimática se inició añadiendo 20 μL de urea 37.5 mM (Cf= 5 mM) y se incubó por 10 min a 37°C. Pasado este tiempo se añadieron 50 μL de solución A (Fenol 0.714 M) y 100 μL de solución B (NaOH 0.714 M/NaOCl 0.357 M). La reacción colorimétrica se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se leyó la absorbancia a 600 nm en un lector de placas ELISA BioRad® Modelo 2550.

3.7 Efecto de los extractos de las tres especies de quelites y de los distintos tratamientos sobre la ureasa

Los extractos fueron disueltos justo antes a la realización de los experimentos. En el caso de los extractos de diclorometano-metanol y de los flavonoides, se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®) como solvente y en el caso de los extractos acuosos, los mucílagos y el AHA, se utilizó agua bidestilada. Las disoluciones de los tratamientos fueron preparadas para utilizarse a concentraciones finales en el ensayo de 250.00, 125.00, 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 µg/mL; para decidir la concentración más alta a utilizar se consideró el valor de CMI correspondiente. En el caso del AHA se utilizaron concentraciones de 200.00, 100.00, 50.00, 25.00, 12.50, 6.25 µg/mL (Espinosa-Rivero, *et al.*, 2015).

3.7.1 Ensayos en presencia de ureasa

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre la ureasa, se incubó a la enzima en ausencia y presencia de los diferentes tratamientos y se midió la liberación de amoníaco por el método de Berthelot, como ya se describió. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos, incluyendo los controles pertinentes. A continuación se describen las condiciones consideradas:

Tratamientos. Se colocaron 100 µL de ureasa (2 µg de proteína parcialmente pura), 10 µL de tratamiento (ácido acetohidroxámico, extracto o flavonoides) en las distintas concentraciones ensayadas y se aforó a 130 µL con PBS.

Se incubó por 10 min a 37°C. Posteriormente se añadieron 20 µL de urea 37.5 mM (Cf=5 mM) y la reacción se incubó por 10 min.

Control Actividad enzimática óptima (100% de actividad). Se colocaron 100 µL de ureasa (2 µg de proteína parcialmente pura), 10 µL de solvente (el usado para disolver el tratamiento respectivo) y se aforó a 130 µL con PBS. Se incubó durante 10 min a 37°C. Posteriormente se añadió 20 µL de urea 37.5 mM (Cf= 5mM) y esta reacción se incubó por 10 min a 37°C.

Blanco de tratamientos. Se colocaron 10 μL de tratamiento en las distintas concentraciones ensayadas y se aforó a 130 μL con PBS. Se dejó incubar durante 10 min. Posteriormente se añadieron 20 μL de urea 37.5 mM (Cf=5 mM) y se incubó por 10 min.

Después del tiempo de incubación con urea, en todos los pozos se agregó 50 μL de solución A (Fenol 0.714 M) y 100 μL de solución B (NaOH 0.714 M/NaOCl 0.357 M). La reacción colorimétrica se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se leyó la absorbancia a 600 nm. Cada condición se realizó por cuadruplicado. Para cada uno de los experimentos se realizó una Curva Patrón usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como estándar. Adicionalmente, se hicieron blancos de ureasa y urea para corroborar que no existiera algún efecto adicional de estas moléculas sobre la reacción colorimétrica.

El porcentaje de inhibición de la actividad enzimática, se obtiene calculando la actividad enzimática presentada en cada tratamiento, tomando como 100% los valores obtenidos en el Control de actividad enzimática “óptima”.

3.8 Análisis estadístico

Cada extracto se evaluó al menos cuatro veces y se obtuvo la desviación estándar.

En el caso del diseño experimental para la determinación de las condiciones óptimas de la medición de actividad enzimática, se realizó un Análisis de varianza de un factor con un nivel de significancia del 0.05%. En caso de existir diferencia significativa, se llevó a cabo una comparación de medias de acuerdo a la prueba de Bonferroni, con un alfa de 0.05 (dos colas).

Para el efecto de los extractos se realizó un análisis de varianza de un factor con un nivel de significancia del 0.05%. En el caso de encontrar diferencia significativa se realizó una comparación clásica de medias, utilizando un alfa de 0.05% (Una cola).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de los extractos

En la Tabla 4.1 se presentan las muestras utilizadas en el presente estudio, el tipo de extracto realizado con su clave de identificación (que se utilizará a lo largo de la Tesis) y los rendimientos obtenidos para cada uno de ellos.

Tabla 4.1. Extractos obtenidos a partir del material vegetal

Quelite	Muestra	Extracto	Clave	Rendimiento (%)
Alache	-	Diclorometano-metanol	Ala-DM	13.71
		Acuoso	Ala-AQ	19.20
		Mucílago	Ala-MU	6.06
Chaya	San Pedro Chimay	Diclorometano-metanol	Cha1-DM	11.15
		Acuoso	Cha1-AQ	28.61
	Timucuy	Diclorometano-metanol	Cha2-DM	14.16
		Acuoso	Cha2-AQ	19.38
Chepil	Cultivado	Diclorometano-metanol	CheC-DM	18.92
		Acuoso	CheC-AQ	12.42
		Mucílago	CheC-MU	5.63
	Silvestre	Diclorometano-metanol	CheS-DM	18.55
		Acuoso	CheS-AQ	16.50
		Mucílago	CheS-MU	6.08

Como puede observarse, se obtuvo un rendimiento mayor mediante extracción acuosa, a excepción de los chepiles en los que el extracto orgánico (DM) presenta un rendimiento mayor.

4.2 Caracterización de los extractos

Una vez obtenidos los extractos se llevó a cabo una caracterización fitoquímica preliminar para cuantificar, en primer lugar el contenido de fenoles y flavonoides totales.

4.2.1 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides

La Tabla 4.2 muestra el contenido de dichos compuestos en los extractos.

Tabla 4.2. Contenido fitoquímico de los extractos

Extracto	Fenoles (μg EAG/mg extracto)	Flavonoides (μg EQ/mg extracto)
Ala-DM	31.0 \pm 3.9	66.1 \pm 7.1
Cha1-DM	36.1 \pm 5.1	52.9 \pm 8.7
Cha2-DM	40.0 \pm 7.5	69.3.0 \pm 7.1
CheC-DM	51.7 \pm 3.8	37.5 \pm 7.2
CheS-DM	54.5 \pm 7.2	38.9 \pm 5.5
Ala-AQ	54.2 \pm 9.6	17.4 \pm 0.5
Cha1-AQ	38.6 \pm 10.9	3.9 \pm 1.4
Cha2-AQ	39.4 \pm 9.7	6.1 \pm 1.9
CheC-AQ	64.4 \pm 2.1	8.8 \pm 3.1
CheS-AQ	75.3 \pm 13.5	10.3 \pm 1.6

EAG=Equivalentes de ácido gálico. EQ=Equivalentes de Quercetina

Los extractos Ala-AQ, CheC-AQ, CheS-AQ poseen mayor contenido de compuestos fenólicos, en comparación con sus homólogos de DM (Ala-DM, CheC-DM y CheS-DM). No existen diferencias en cuanto al contenido de fenoles totales entre extractos de una misma especie, como es el caso del chepil y la chaya, cuyos extractos no presentan diferencias entre sí.

Como se observa, el método usado para la preparación de los extractos acuosos (infusión), permitió la obtención de compuestos fenólicos. La solubilidad de los compuestos fenólicos depende en gran parte de los grupos hidroxilo, el peso molecular y la longitud de las cadenas de hidrocarburos de las moléculas presentes y a menudo son extraídos en solventes polares obteniéndose altos rendimientos, lo que concuerda con la mejor obtención de compuestos fenólicos en algunos de los extractos acuosos en comparación con los de DM. Aunado a esto, se ha reportado que en ocasiones el rendimiento de los fenoles se puede incrementar con la temperatura (Iloki-Assanga, *et al.*, 2015).

Por otro lado, cabe destacar que los compuestos fenólicos están frecuentemente asociados a otras moléculas, como terpenos y clorofilas (Iloki-Assanga, *et al.*, 2015) mismos que dificultan la cuantificación de los primeros.

En tabla 4.2, se muestra que el contenido de compuestos flavonoides es mayor en los extractos DM que en los AQ (a pesar de que en estos últimos el contenido de fenoles totales es mayor), esto podría indicar que la extracción de la planta con DM favoreció la obtención de este tipo de compuestos.

4.2.2 Perfil cromatográfico de extractos DM

Se utilizaron tres sistemas de elución con el fin de separar lo mejor posible los diferentes compuestos de los extractos: Diclorometano: Metanol (2:8), Metanol 100% y Acetato de etilo: Ácido acético glacial: Ácido fórmico: Agua (12:1:1:1.5) (Figuras 4.1 a 4.3, respectivamente)

Utilizando la fase móvil Diclorometano:metanol (2:8), la cual es una mezcla de mediana polaridad, se observa una mayor elución de los compuestos no polares en comparación con las cromatografías en que se eluyó con los otros solventes más polares. Sobre todo, se concentran en el frente de elución de la cromatografía, bajo luz UV-365 se observan zonas rojas, que al ser reveladas con vainillina sulfúrica se observan color violeta, por lo que algunos de ellos podrían ser terpenos.

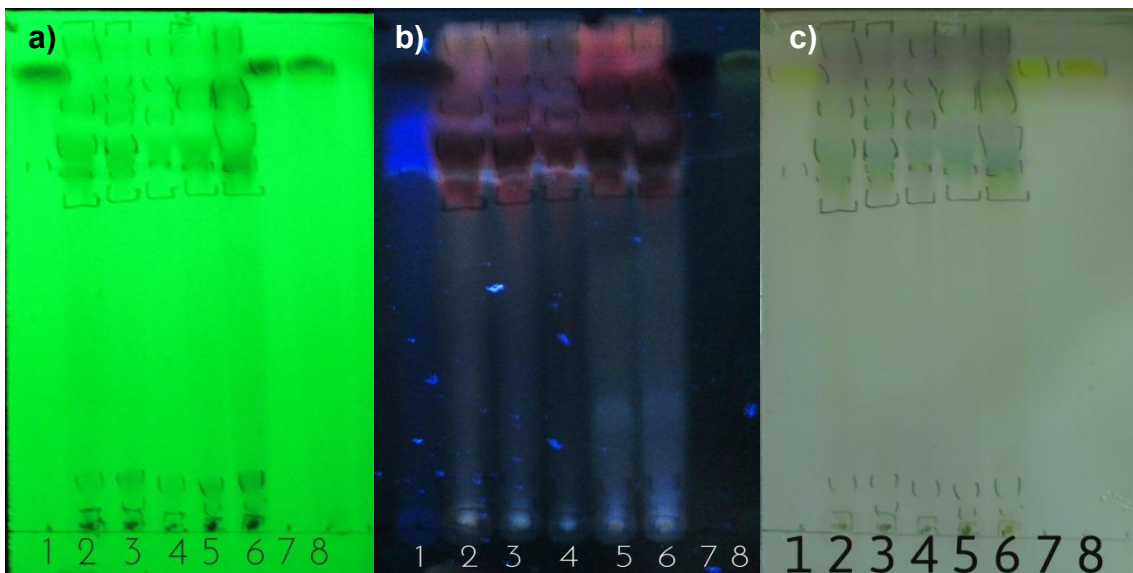


Figura 4.1. CCF de los extractos DM. Sistema de elución Diclorometano:Metanol (2:8).

a) Placa revelada bajo luz UV-254 nm; b) Placa bajo luz UV-365 nm; c) Placa revelada con vainillina sulfúrica bajo luz visible. 1: Acacetina; 2:Ala-DM; 3:Cha1-DM; 4:Cha2-DM; 5: CheC-DM; 6:CheS-DM; 7: Diosmetina; 8: Quercetina.

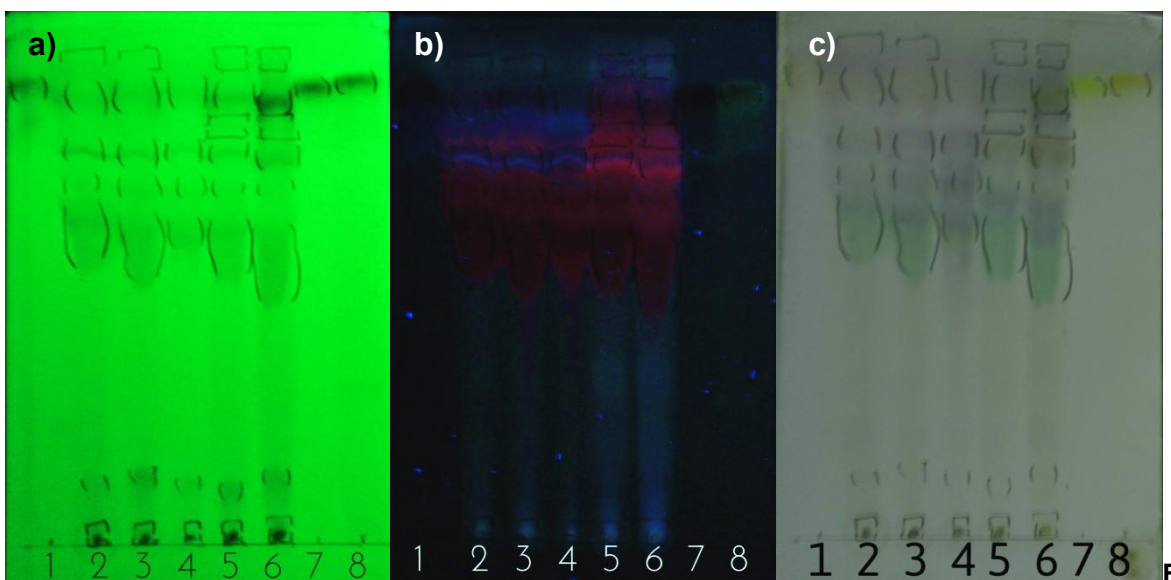


Figura 4.2. CCF de los extractos de DM de los quelites. Sistema de elución: Metanol 100%.

a) Placa revelada bajo luz UV-254 nm; b) Placa revelada bajo luz UV-365 nm; c) Placa revelada con vainillina sulfúrica. 1: Acacetina; 2:Ala-DM; 3:Cha1-DM; 4:Cha2-DM; 5: CheC-DM; 6:CheS-DM; 7: Diosmetina; 8: Quercetina.

En el caso del sistema de elución con metanol 100%, se logra una mejor separación de los extractos, sin embargo, solamente se separan los compuestos no polares nuevamente, no obstante, se logra una distribución más amplia en la placa que con el sistema anterior, permitiendo la disgregación de los compuestos polares de los no polares.

Los colores desarrollados con la reacción de vainillina van desde verde, violeta, amarillo y amarillo-café, de acuerdo a Wagner y Blat, 2009, estos podrían indicar la presencia de terpenos. Como puede apreciarse, las tres especies tienen un patrón similar de compuestos.

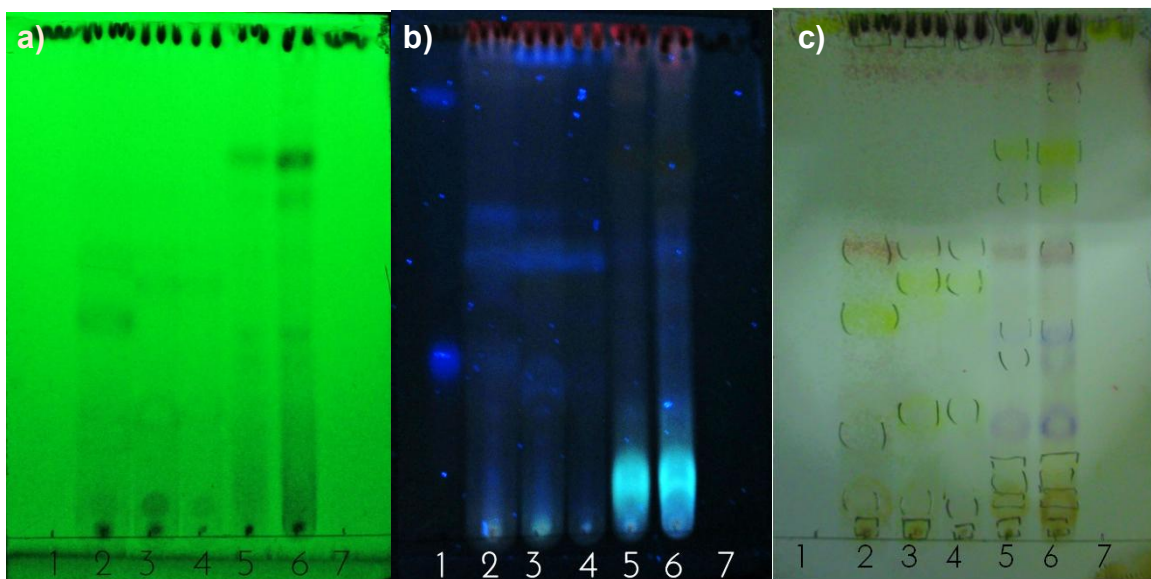


Figura 4.3. CCF de los extractos DM. Sistema de elución: Acetato de etilo: Ác. Acético: Ác. Fórmico: Agua (12:1:1:1.5).

a) Placa revelada bajo luz UV-254 nm; b) Placa bajo luz UV-365 nm; c) Placa revelada con vainillina sulfúrica bajo luz visible.

1: Acacetina; 2:Ala-DM; 3:Cha1-DM; 4:Cha2-DM; 5: CheC-DM; 6:CheS-DM;
7: Diosmetina.

El sistema de elución Acetato de etilo: Ác. Acético: Ác. Fórmico: Agua (12:1:1:1.5) permitió una mayor separación de los componentes más polares de los extractos. Sin embargo, no hubo una buena disgregación de los compuestos no polares, los cuales se condensaron al frente de corrida. En este caso, se logró encontrar diferencias entre las especies, ya que el patrón de bandas es distinto para los extractos de cada planta.

El revelado con vainillina mostró bandas que van desde naranja-café, amarillas azules, violetas, y rojas. De acuerdo a Wagner y Blat, 2009, se podría tratar de glicósidos flavonoides, flavonoides y/o flavonas, saponinas, diterpenos y terpenos, respectivamente. En el Anexo se presenta una tabla con los valores de Rf obtenidos para cada una de las bandas resueltas en este sistema de elución.

De acuerdo al patrón de bandas, los extractos de chepil (Carriles 5 y 6) presentaron mayor variedad de contenido de fitoquímicos. Destacando las bandas azules-violetas, que podrían indicar el contenido de saponinas.

4.2.3 Perfil fitoquímico cualitativo preliminar

Los resultados de las pruebas cualitativas se resumen en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Determinación cualitativa del contenido fitoquímico de los extractos

Extracto	Presencia de saponinas	Presencia de esteroides		Presencia de cumarinas
		Resultado	Descripción coloración	
Ala-DM	+	++	Verde intensa	-
Cha1-DM	-	+	Amarilla-verde	-
Cha2-DM	-	+	Amarillo pálido	-
CheC-DM	++	+	Amarillo pálido	++
CheS-DM	+++	+	Amarillo pálido	++
Ala-AQ	-	ND	ND	-
Cha1-AQ	+	ND	ND	-
Cha2-AQ	+	ND	ND	-
CheC-AQ	-	ND	ND	-
CheS-AQ	-	ND	ND	-

SIMBOLOGÍA. Saponinas: (-) Negativo; (+) Presencia de espuma; (++) Espuma= 5 mm; (+++) Espuma mayor a 5 mm. Esteroides: (-) Negativo; (+) Cambio coloración; (++) Cambio de coloración e intensidad de esta; (ND) No Determinado. Cumarinas: (-) Negativo; (++) Abundancia de fluorescencia.

Estas pruebas son un indicio del tipo de compuestos que están presentes en los distintos extractos y que podrían asociarse a su actividad anti-*H. pylori*.

Los resultados positivos a la prueba de la espuma se muestran en la Figura 4.4. En este caso sólo la espuma de los extractos DM de Chepil, logró alcanzar un valor mayor a 5 mm considerándose un indicio de la presencia de saponinas.

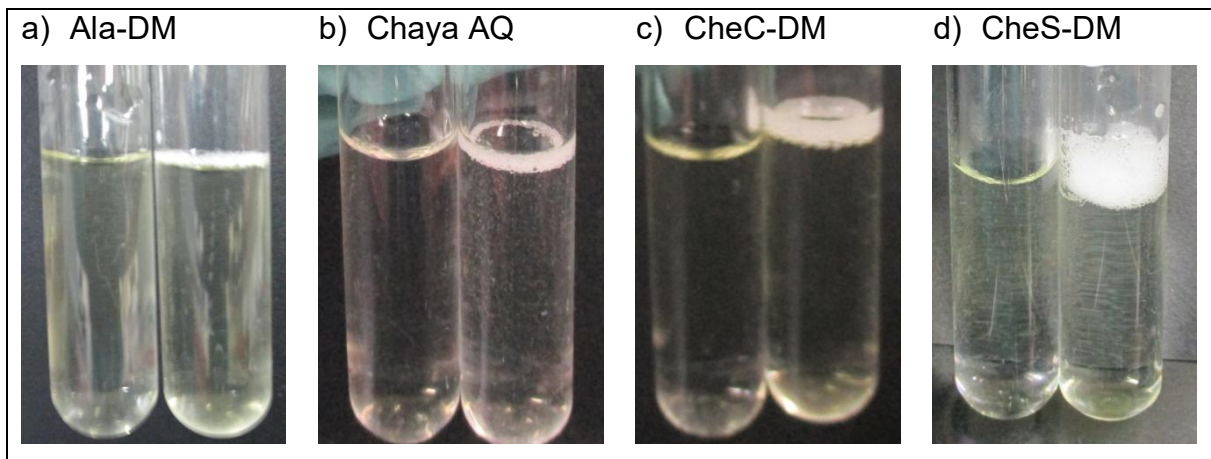


Figura 4.4. Prueba de la espuma. Extractos DM de Chepil, en comparación con un control de los extractos sin agitación.

En cuanto al contenido de esteroides, todos los extractos DM fueron positivos a la prueba, indicando la presencia de este tipo de compuestos. Se destaca el extracto DM de Alache, puesto que presentó un notorio cambio de coloración respecto al control. Esta prueba se ilustra en la Figura 4.5



Figura 4.5. Prueba de Liebermann-Burchard. A la izquierda tubo control, a la derecha tubo del extracto Ala-DM, la coloración verde intensa indica la presencia de esteroides.

Respecto a la prueba de cumarinas, solamente los extractos DM de las muestras de Chepil fueron positivos a la prueba. En la Figura 4.6 se muestra el resultado obtenido.

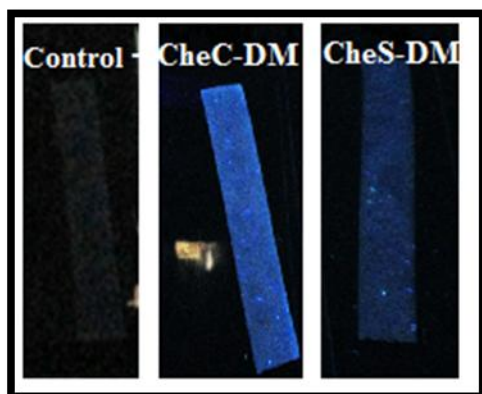


Figura 4.6. Prueba rápida para cumarinas para los extractos de DM de Chepil. Observación bajo luz UV-365 nm. La fluorescencia indica la presencia de cumarinas.

4.3 *Helicobacter pylori* y la ureasa

4.3.1 Propagación y mantenimiento de la cepa *Helicobacter pylori* ATCC 43504

Se llevó a cabo el cultivo, mantenimiento e identificación de la bacteria *H. pylori*. Se elaboraron distintos lotes de bacterias, en suficiente cantidad para utilizarse a lo largo del desarrollo experimental y que se conservaron almacenados a -70°C . Como parte de la identificación de la bacteria, se presenta una observación al microscopio de un frotis con tinción de Gram realizado en uno de los lotes utilizados (Figura 4.7).

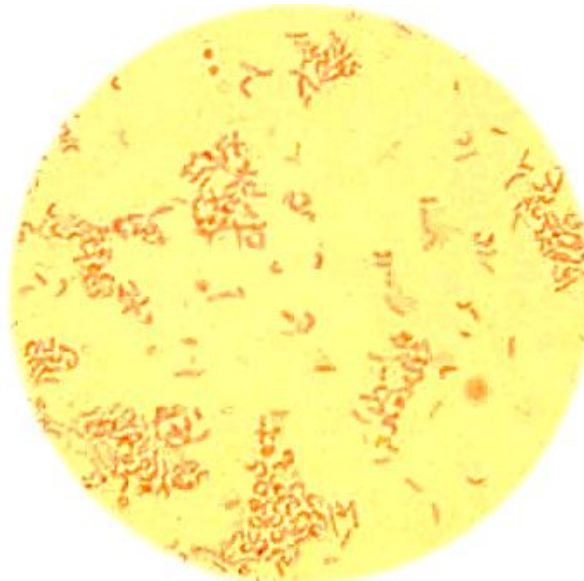


Figura 4.7. Tinción de Gram de un cultivo puro de *H. pylori*. Se observan bacilos Gram negativos con la morfología típica de la bacteria, en forma de U y algunos en forma espiral., Preparación: Frotis fijo para un cultivo en agar Casman-Sangre de *H. pylori* con tinción de Gram. Aumento 100X.

4.3.2 Identificación bioquímica

Los lotes de bacterias obtenidos se identificaron por pruebas bioquímicas convencionales. Los lotes fueron positivos a Oxidasa, a Catalasa y a Ureasa (Figura 4.8). Estos resultados indican que el perfil bioquímico es el de *H. pylori*.

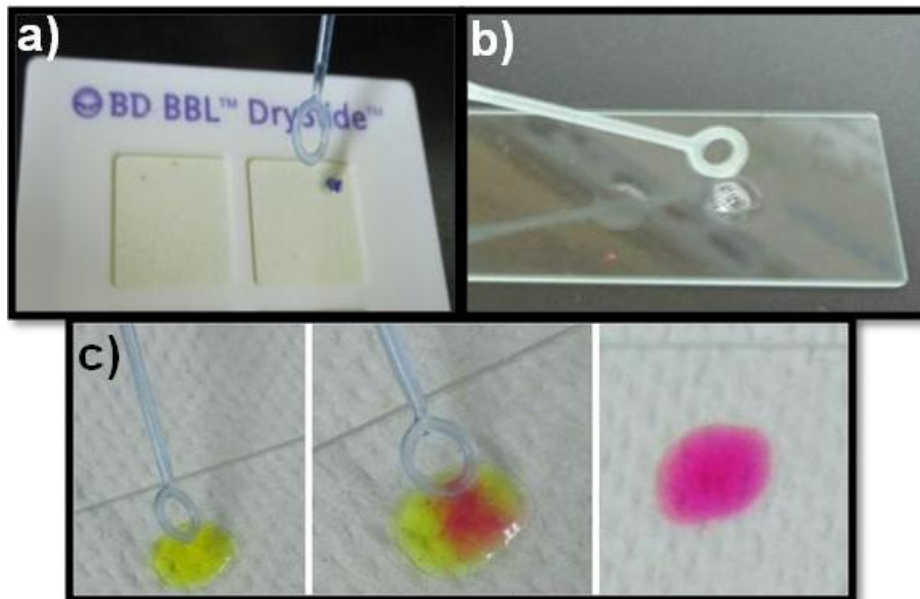


Figura 4.8. Prueba bioquímicas para la identificación de *H. pylori*. a) Prueba de oxidasa positiva. b) Prueba de catalasa positiva c) Prueba de ureasa positiva.

4.3.3 Identificación molecular por amplificación del gen *ureA* por PCR

Los resultados se muestran en la Figura 4.9. Se observa la amplificación de un fragmento de 400 pb correspondiente al gen *ureA*, que identifica e indica la expresión de la enzima ureasa en la cepa de *H. pylori* utilizada.

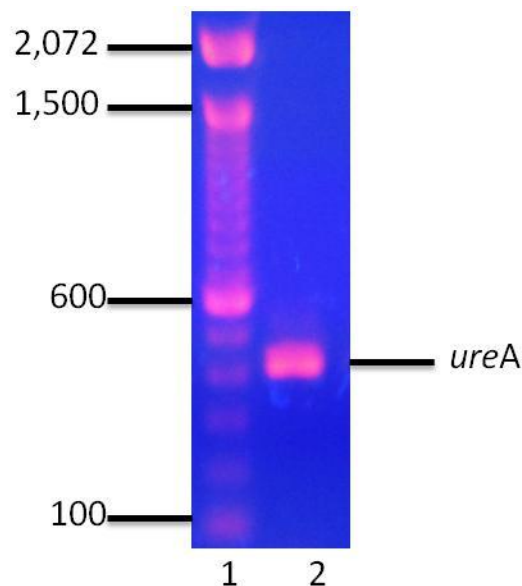


Figura 4.9. Identificación por PCR de *H. pylori* por amplificación del gen *ureA*. Carril 1. Marcadores de peso molecular 100 bp DNA Ladder. Carril 2. Banda correspondiente al producto de amplificación, cuyo peso corresponde al gen *ureA* de *H. pylori*, con 411 pb.

4.3.5 Obtención de la ureasa de *H. pylori*

La enzima fue extraída siguiendo la metodología descrita. Debido a que la enzima ureasa se encuentra localizada principalmente en el citoplasma y solo una pequeña cantidad se encuentra en la superficie (Hong *et al.*, 2003), el lisado de la célula es necesario para la obtención del extracto crudo a fin de obtener mayor cantidad de enzima. En los primeros dos pasos de purificación, las fracciones obtenidas contienen restos celulares como membranas y otros contaminantes que pueden presentar ciertas interferencias, por lo que la centrifugación diferencial que se efectúa permite obtener una enzima con actividad específica mayor (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Purificación parcial de la ureasa de *H. pylori*

Paso de purificación	Vol. (mL)	Actividad (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Actividad total (U)*	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg proteína)	Veces De purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	4.5	109.0	2.6	490.3	11.9	41.2	1.0	100
**SN1	4.0	83.0	1.5	331.8	6.0	55.3	1.3	67.7
***SN2	3.9	69.2	1.1	270.0	4.3	62.8	1.5	55.1

*Una unidad de ureasa es la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de amonio/min a pH=7.2. ** SN1: Sobrenadante 1. *** SN2: Sobrenadante 2.

En la Figura 4.10 se muestra el análisis electroforético y la inmunodetección de la preparación utilizada como fuente de enzima donde se aprecian las dos subunidades estructurales de la ureasa. A pesar de que no se hizo una purificación total de la enzima, se trabajó con una fracción enriquecida.

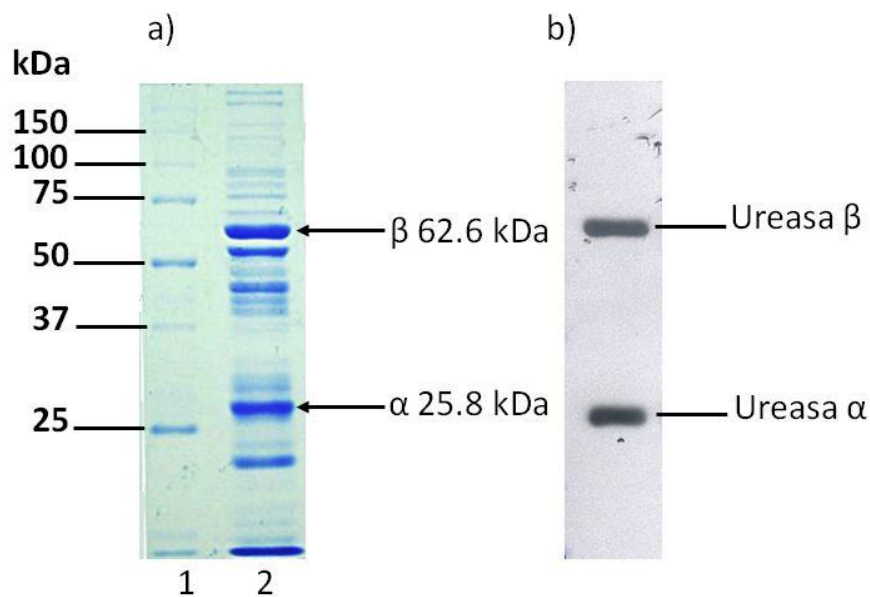


Figura 4.10. Análisis proteico de la enzima extraída. a) Gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes del Sobrenadante 2. 1. Marcadores de peso molecular. 2. Sobrenadante 2 resultante de la ultracentrifugación (30 μ g de proteína). Las flechas negras, de arriba hacia abajo, indican la banda correspondiente a la subunidad β y α de la enzima ureasa de *H. pylori*, respectivamente. b) Análisis por Inmunodetección (**Western blot**). Las bandas corresponden a las subunidades β y α de la enzima ureasa de *H. pylori*.

4.4 Determinación de la actividad enzimática

Al revisar las condiciones reportadas en la literatura para la determinación de la actividad enzimática, se encontró discrepancia en algunas de las variables, por lo que para establecer las condiciones experimentales óptimas para la determinación de la actividad enzimática se decidió realizar un diseño experimental en el que se compararon dos condiciones de temperatura, dos tiempos de incubación con el sustrato y dos concentraciones de proteína. Los resultados se muestran en la Tabla 4.5.

De acuerdo al análisis de varianza de los tratamientos realizados, se encontró suficiente evidencia para rechazar que al menos dos medias son iguales. Encontrándose diferencia significativa del tratamiento 2 (37°C, 10 min reacción, 2 μ g de proteína) respecto al resto de los tratamientos, lo que indica que éstas son las condiciones óptimas para la medición de la actividad enzimática.

Se obtienen valores mayores de actividad enzimática en los tratamientos realizados a 37°C que a 25°C, coincidiendo con la temperatura óptima de la enzima (Gang *et al.*, 2009); sin embargo, no hay suficiente evidencia para asegurar que se aumenta la actividad enzimática respecto al tiempo de incubación.

Por otra parte, la actividad fue mejor con la cantidad más alta de proteína, como se tenía previsto. Considerando estos resultados las condiciones elegidas para el desarrollo de los ensayos fueron: 37°C, 10 min de incubación y 2 µg de proteína.

Tabla 4.5. Determinación de temperatura y tiempo a utilizarse para la medición de actividad enzimática

Variable/ N° tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura (°C)	37	37	37	37	25	25	25	25
Tiempo de incubación de reacción enzimática (min)	10	10	20	20	10	10	20	20
Cantidad de proteína utilizada (µg)	1	2	1	2	1	2	1	2
Actividad enzimática total* (mU)	17.8±5.3	34.9±4.6	17.6±2.4	29.1±2.2	9.3±2.1	22.6±4.4	8.4±1.5	22.9±1.3

*Promedio resultante de 2 determinaciones por decuplicado. En **negritas** la mejor actividad encontrada.

4.5 Tratamientos sobre la ureasa

4.5.1 Determinación del efecto del Ácido acetohidroxámico (AHA) sobre la actividad enzimática de la ureasa

Para validar el método de medición enzimática con el uso de extractos como posibles inhibidores, se realizaron experimentos usando Ácido acetohidroxámico como control positivo, el cual es un inhibidor competitivo de la enzima (Todd y Hausinger, 1989). De acuerdo a los resultados se obtiene el 100% de inhibición con 200 $\mu\text{g/mL}$, teniendo una IC_{50} de 20.3 $\mu\text{g/mL}$ =0.27 mM. (Figura 4.11).

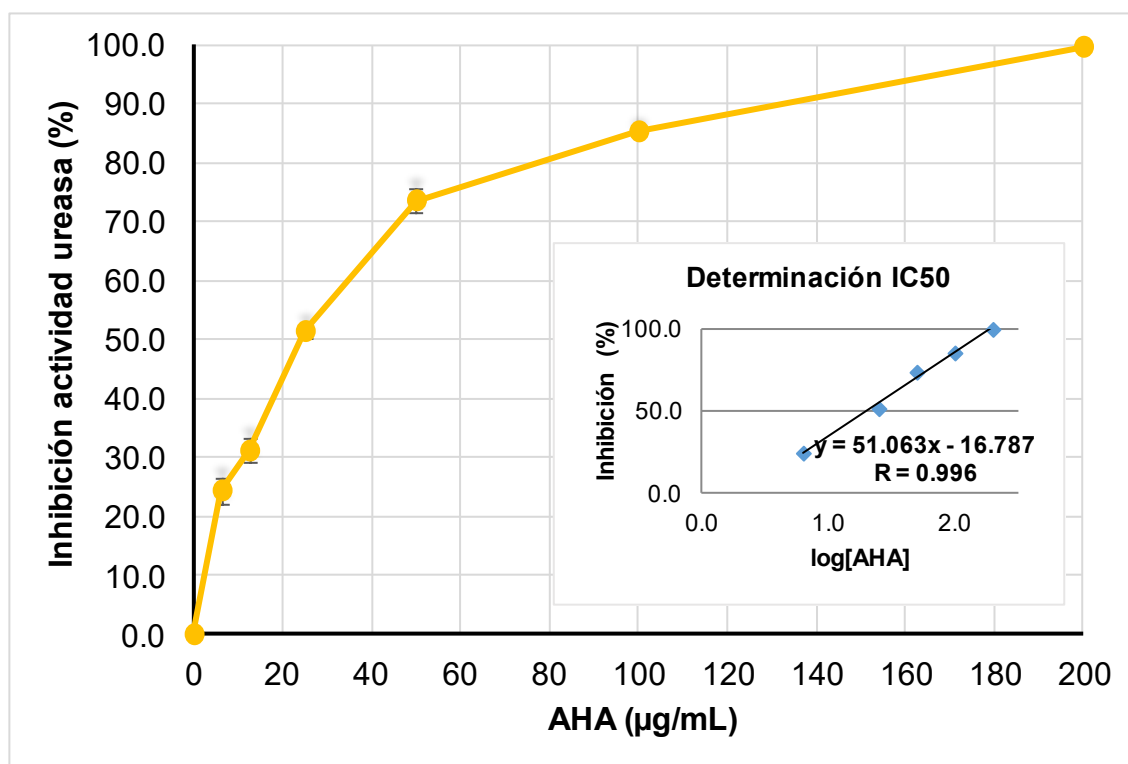


Figura 4.11. Inhibición de la actividad ureasa por el ácido acetohidroxámico (AHA).
En recuadro determinación de IC_{50} .

El valor determinado de IC_{50} , se encuentra dentro del orden de magnitud del valor reportado en la literatura 0.15 mM (Espinosa-Rivero *et al.*, 2015, Yu *et al.*, 2015).

4.5.2 Determinación del efecto de los extractos acuosos de las diferentes especies de quelites

El efecto de los extractos acuosos de quelites sobre la actividad de la ureasa se presenta en la Figura 4.12. Los resultados indican que ninguno de los extractos presentó un efecto inhibitorio de la actividad enzimática a las concentraciones empleadas. Para comparación, en el mismo gráfico se presenta la inhibición por AHA. En el caso de los extractos de Cha2-AQ y CheS-AQ se presenta un ligero efecto de activación enzimática, mismo que no es significativo y es atribuido a la variación en las mediciones. Estos resultados se correlacionan con el hecho de que los extractos acuosos no poseen actividad anti-*H. pylori* (Tabla 2.2).

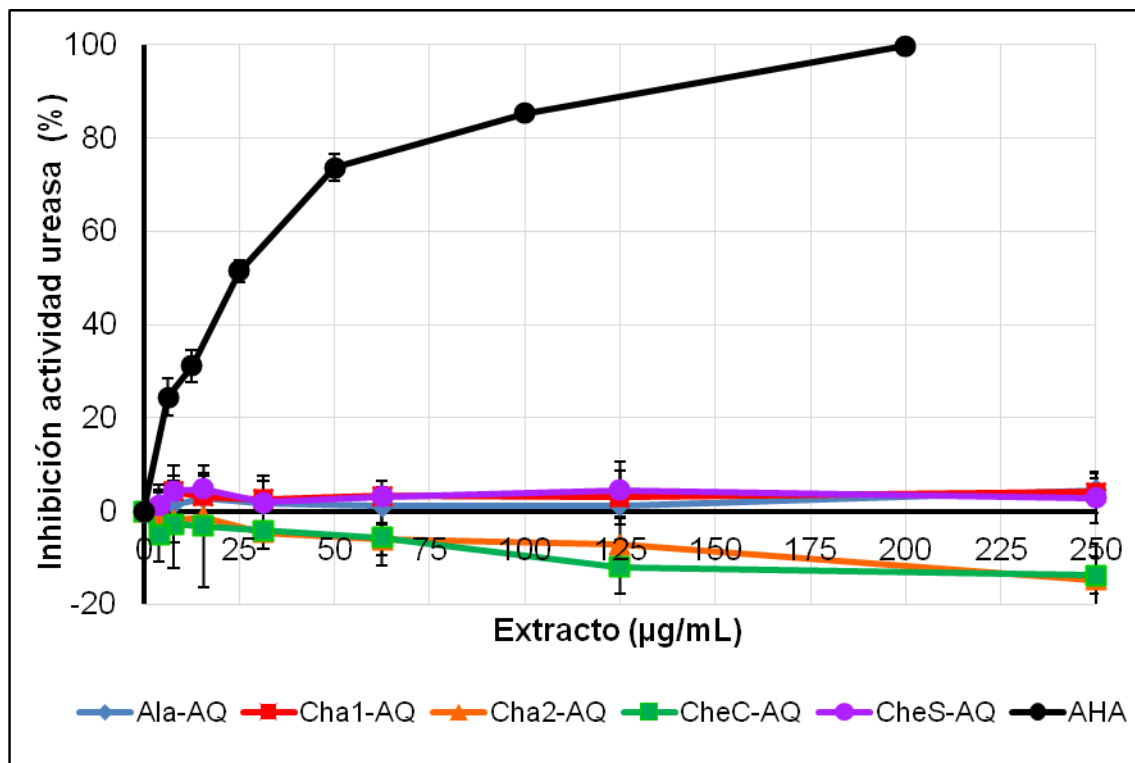


Figura 4.12. Comparación del efecto de los extractos acuosos de los quelites y del AHA sobre la actividad enzimática de la ureasa de *H. pylori*

Como se mencionó anteriormente, los extractos acuosos de las plantas alache y chepil presentaron mucílago. Con el objetivo de evaluar si estos mucílagos pudieran ejercer algún efecto sobre la ureasa, se evaluó su efecto. Los resultados se presentan en la Figura 4.13 y muestran que los mucílagos Ala-MU y CheS-MU, ejercieron un leve efecto inhibitorio de la enzima, mientras que el Che-MU no tuvo ningún efecto.

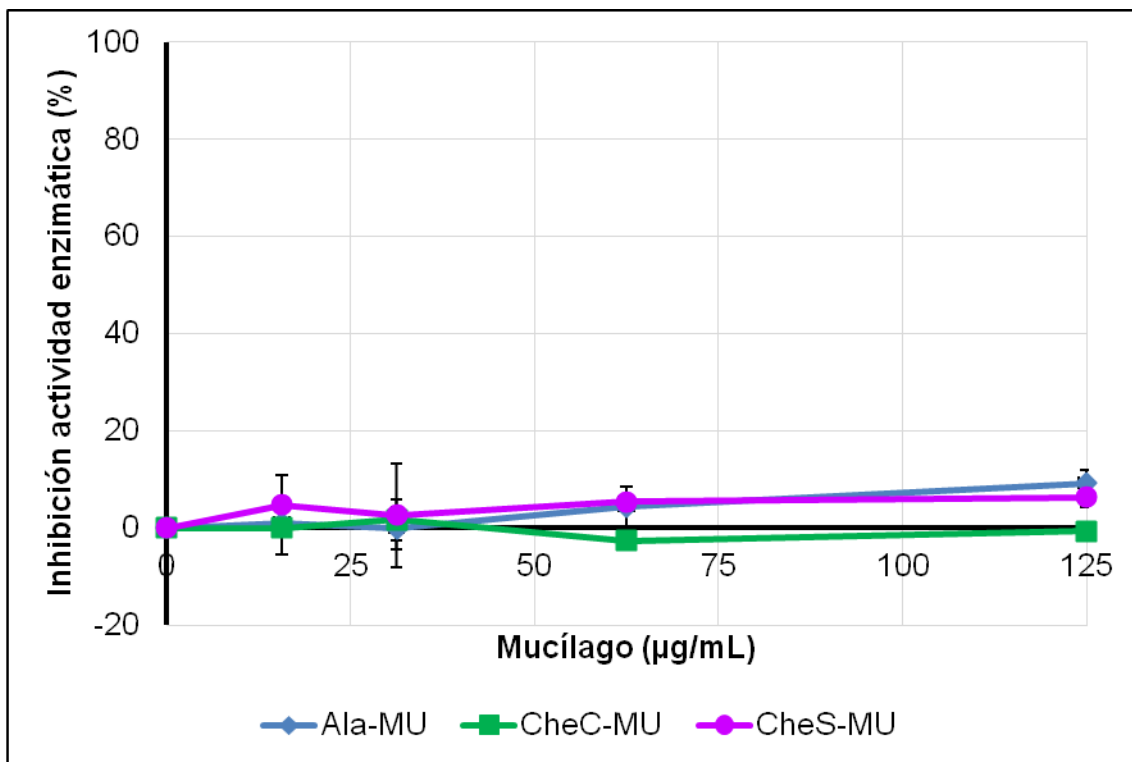


Figura 4.13. Efecto de los mucílagos sobre la actividad enzimática de la ureasa de *H. pylori*

4.5.3 Determinación del efecto de los extractos Diclorometano-metanol de las diferentes especies de quelites

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de los extractos de DM se muestran en la Figura 4.14 e indican que estos extractos tampoco inhiben la actividad enzimática de la ureasa. Los extractos Cha2-DM y CheS-DM, presentan un efecto de inhibición que es dependiente de la concentración hasta 7.8 µg/mL (9.1%) y alcanza el 10% a 125 µg/mL. De acuerdo a la Tabla 2.2 estos extractos tuvieron una buena actividad *anti-H. pylori*.

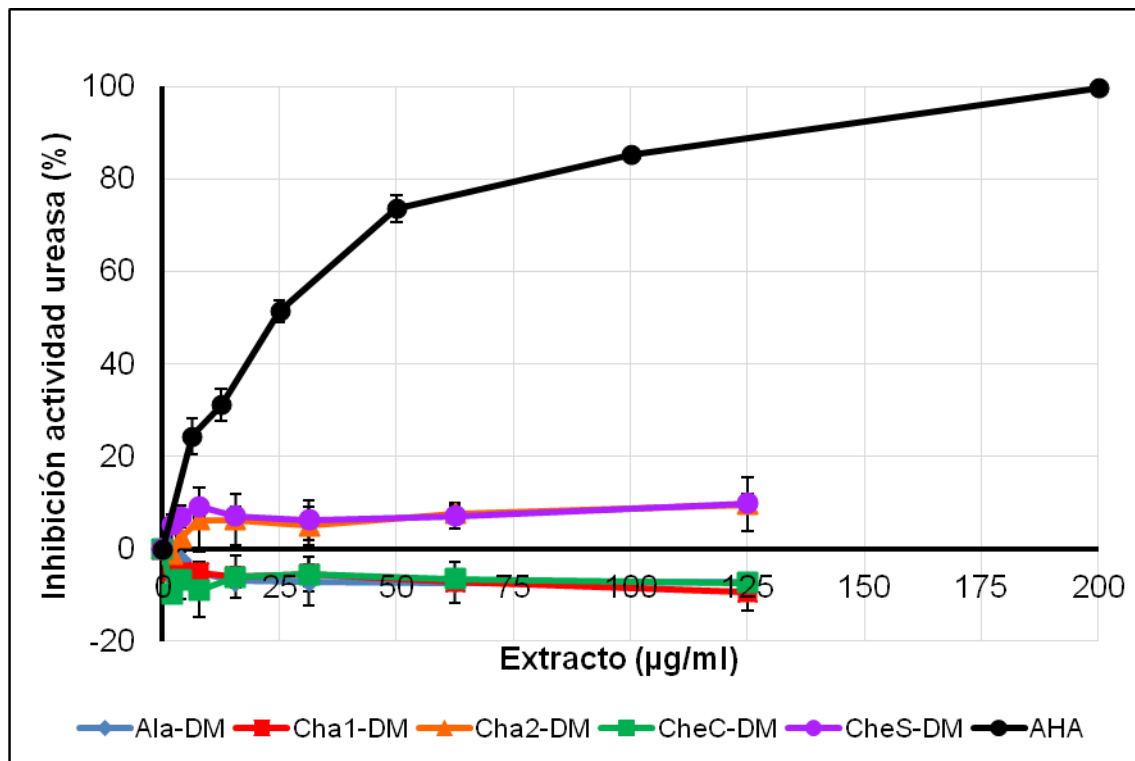


Figura 4.14. Comparación del efecto de los extractos Diclorometano-metanol y del AHA sobre la actividad enzimática de la ureasa de *H. pylori*

Estos resultados podrían indicar que existen algún(os) compuesto(s) que pueden inhibir a la enzima, pero que se encuentren en concentraciones bajas dentro de los extractos, por lo cual no son capaces de lograr un inhibición total. Con base en lo anterior, sería necesario el fraccionamiento de los extractos y la purificación de los compuestos bioactivos para evaluar si es posible aumentar el porcentaje de inhibición de la enzima.

No obstante, comparando la inhibición de estos extractos con otros productos naturales con actividad inhibitoria de la ureasa (Modolo, *et al.*, 2015) y con el AHA, las expectativas de éxito son bajas. En el caso de los extractos de Ala-DM, Cha1-DM y CheC-DM, se observa un ligero efecto de activación que no resulta significativo.

En resumen y de acuerdo a los resultados obtenidos, la inhibición de la enzima ureasa no es el mecanismo por el cual los extractos activos de los quelites estudiados afectan el crecimiento de *H. pylori*. Es por ello que se necesitará ahondar en la investigación de estos extractos para determinar el mecanismo por el cual inhiben el crecimiento de la bacteria y así saber si pueden usarse en la prevención de la infección por *H. pylori*.

4.5.4 Efecto de dos de los flavonoides presentes en la especie *Anoda cristata* (Alache) sobre la ureasa

A pesar de que tanto el extracto acuoso, el mucílago y el extracto diclorometano-metanol del Alache no presentaron un efecto inhibitorio sobre la enzima ureasa de la bacteria (Figuras 4.12-4.14), se decidió probar el efecto de los dos flavonoides presentes en el Alache: acacetina y diosmetina (Juárez-Reyes, *et al.*, 2015) ya que poseen una alta actividad inhibitoria del crecimiento de *H. pylori* (CMI= 7.8 µg/mL, Tabla 2.2) y probablemente en estado puro podrían tener un efecto sobre la ureasa. Además, se ha reportado la inhibición de la ureasa por algunos flavonoides como la quercetina, luteolina, genisteina, rutina, meristeina, así como derivados de éstos (Modolo, *et al.*, 2015). En la Figura 4.15 se muestran los resultados obtenidos. Contrario a lo esperado, estos compuestos son capaces de lograr un efecto de activación enzimática.

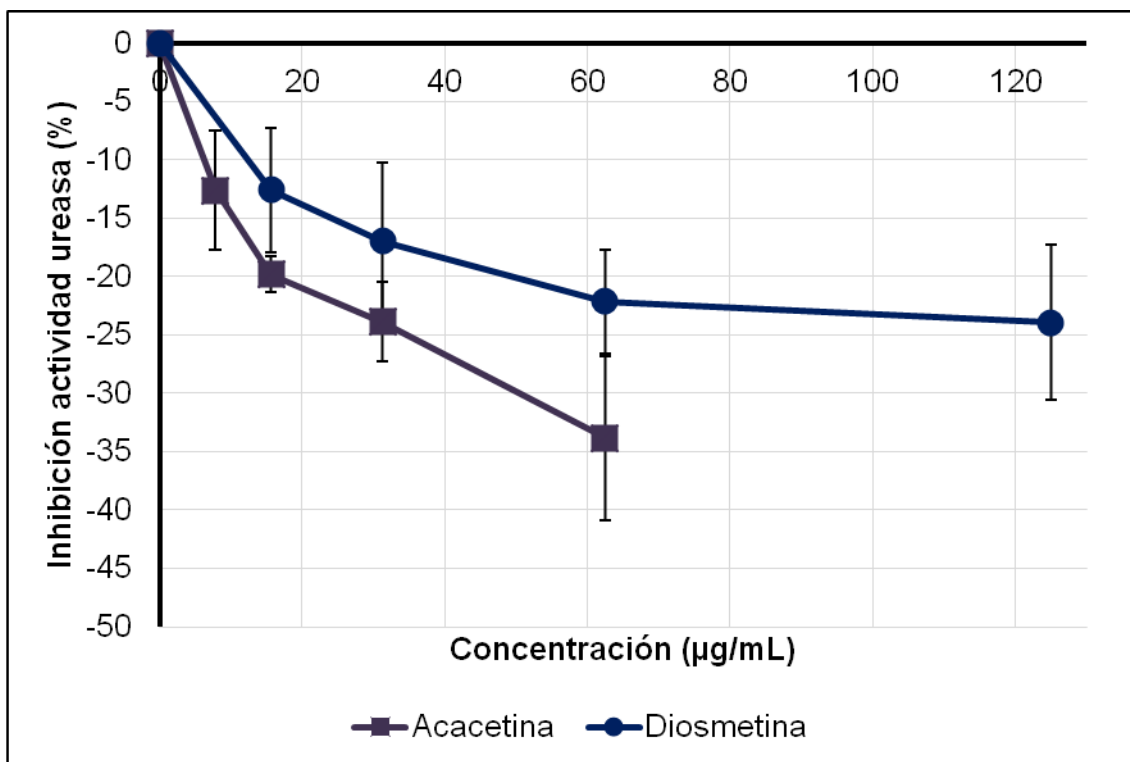


Figura 4.15. Efecto de los flavonoides reportados en el Alache (*Anoda cristata*) sobre la enzima ureasa de *H. pylori*.

La diosmetina activa a la enzima en un 17% con 31.25 µg/mL (102.9 µM), pero al aumentar la concentración se obtiene hasta un 24%, sin embargo, el incremento en la actividad ya no es estadísticamente significativo respecto al obtenido a la concentración antes mencionada.

En el caso de la acacetina se observa el mismo patrón de comportamiento, en este caso, no se pudo determinar el efecto a 125 µg/mL debido a su baja solubilidad. No obstante, la activación de la enzima en presencia de acacetina es mayor, comparado con la diosmetina, pues se logra un porcentaje de activación del 12.6% a una concentración de 7.81 µg/mL (27.5 µM) y un máximo de 34% con 62.50 µg/mL (219.9 µM). Son muy pocos los activadores descritos para la ureasa, Ziarani, *et al.* (2015) reportaron a dos compuestos del tipo anillos espirbicyclos capaces de activar a la enzima ureasa de frijol mungo (*Canavalia ensiformis*) en un 13 y 42% a concentraciones de 1.0 y 1.7 mM, respectivamente.

Sería interesante investigar en el futuro cual es el mecanismo por el que la acacetina y diosmetina activan a la ureasa.

Este es el primer reporte del efecto de la acacetina sobre la ureasa de *H. pylori*. Por su parte, la diosmetina ya había sido reportada como un inhibidor del crecimiento de *H. pylori* y se menciona que el compuesto inhibió débilmente a la ureasa (17% con 300 µg/mL) (Bae, *et al.*, 1999). Este último dato es contrario a lo encontrado en este trabajo que es un efecto activador; esta diferencia podría deberse al método utilizado para la cuantificación del amonio liberado; ya que en el caso de Bae, *et al.*, se utilizó el método descrito por Gutmann y Bergmeyer, 1974, en el que el amoniaco es convertido a glutamato por acción de la glutamato deshidrogenasa en presencia de NADH y cetoglutarato. La reacción se mide cinéticamente a 340 nm a través de la disminución de la absorbancia resultante de la oxidación del NADH a NAD⁺. Sin embargo, este método podría resultar menos preciso, ya que es una medición indirecta del amoniaco.

Considerando que estos resultados no se esperaban, se quiso corroborar el efecto inhibitorio de uno de los flavonoides ya reportados, la quercetina, inhibidor no competitivo de la ureasa (Xiao, *et al.*, 2012) y con estructura similar a la de la acacetina y diosmetina. Los resultados (Figura 4.16) mostraron que efectivamente este flavonoide inhibe a la ureasa con una IC₅₀ =132.1 µg/mL (0.44 mM).

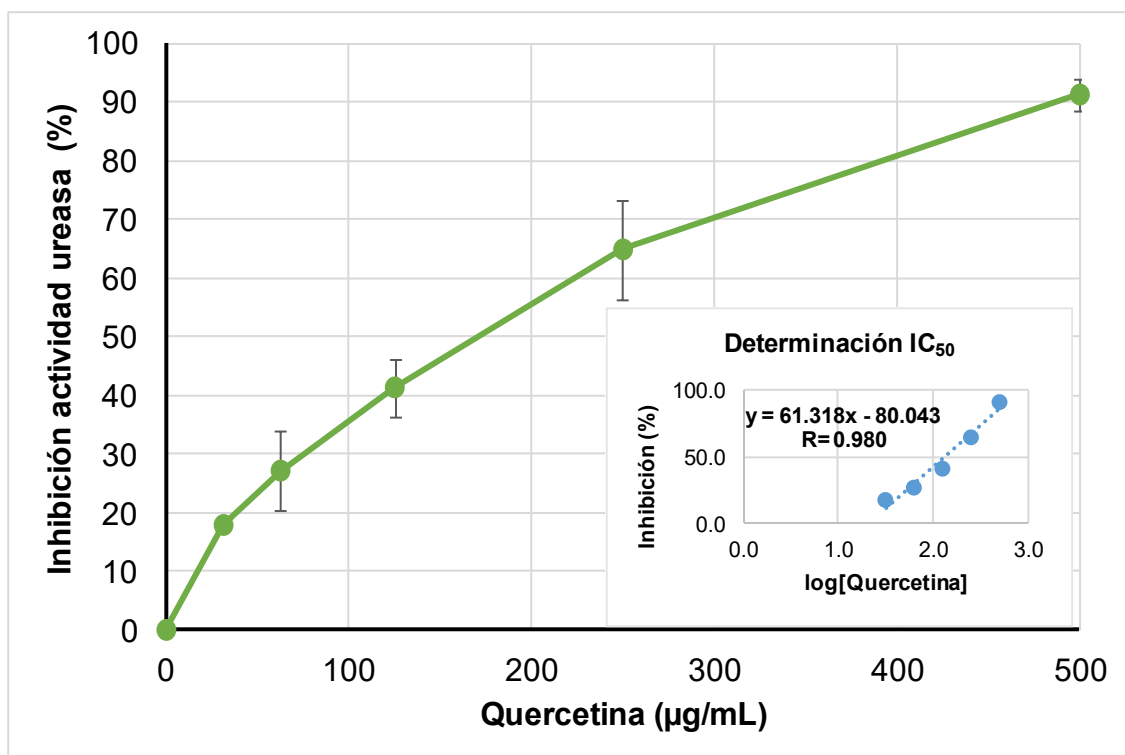


Figura 4.16. Efecto de la quercetina sobre la actividad enzimática de la ureasa de *H. pylori*.

Para explicar el efecto de la acacetina y la diosmetina (Figura 4.17) sobre la enzima ureasa, se trató de comparar con la quercetina (Figura 4.18), ya que ésta molécula ha sido sujeta a análisis de estructura-actividad con la enzima ureasa (Xiao, *et al.*, 2012).

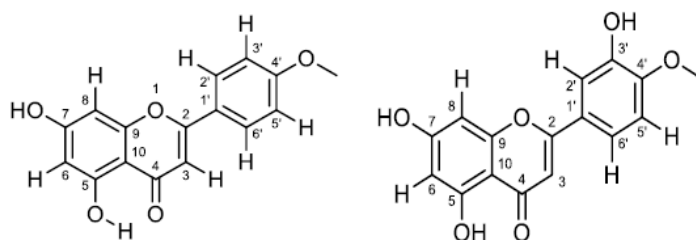


Figura 4.17. Estructura química de la Acacetina (Izq.) y la Diosmetina (Der.)

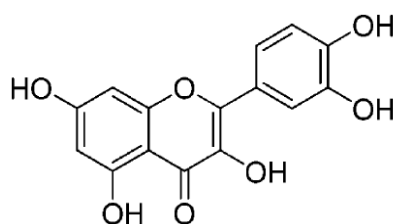


Figura 4.18. Estructura de la Quercetina

Mediante estudios de modelado molecular “docking” se determinó que la presencia de la quercetina en la ureasa, deja a la enzima en una conformación abierta en la que puede entrar la urea, pero sin la coordinación de los residuos de Ala α 365 e His α 322, inactivando así a la enzima (Xiao, *et al.*, 2012). Por otro lado, si se comparan las moléculas de quercetina y acacetina, se tiene que la primera posee cinco donadores para enlace de hidrógeno y solo dos aceptores (Figura 4.17); mientras que la segunda posee tan solo tres donadores para enlaces de hidrógeno y el mismo número de aceptores, es decir dos (Figura 4.18) (Rajesh, *et al.*, 2013).

A diferencia de la quercetina, la acacetina no posee el grupo hidroxilo en la posición 3, ni en la posición 3' además, en la posición 4' se encuentra un grupo metoxi (Fig. 4.25) por lo que le es imposible formar fuertes enlaces de hidrógeno con los residuos que cumplen un papel esencial en la actividad catalítica de la ureasa y de esta manera es incapaz de inhibir a la enzima. Por ejemplo, la ausencia del grupo –OH en la posición 3, le impide la interacción con el extremo CO del residuo Val320, que en conjunto forma un fuerte enlace de hidrógeno con el aminoácido Cys321 el cual al ser modificado covalentemente provoca la pérdida de la actividad enzimática. Por tanto, la acacetina y la diosmetina, son incapaces de interferir con los residuos de importancia para la actividad enzimática dejándolos totalmente libres y de algún modo se favorece una conformación en la cual la enzima es más activa.

4.5.5 Otros productos naturales con actividad anti-*H. pylori*

Como un objetivo adicional y con la idea de evaluar compuestos presentes en especies mexicanas que son usadas tradicionalmente, se midió el efecto del ácido anacárdico 15:0 sobre la enzima ureasa. Este compuesto está presente en la corteza del cuachalalate, *Amphipterygium adstringens* (Mata, *et al.*, 1991; Castillo-Juárez, *et al.*, 2007), ampliamente usada en México para el tratamiento de la gastritis y úlcera (BDMTM, 2009).

El ácido anacárdico 15:0 se ha reportado junto con compuestos similares (ácidos alquil-fenólicos) ya que inhiben el crecimiento de *H. pylori* (Kubo, *et al.*, 1986, Castillo-Juárez, 2007). Asimismo, este tipo de compuestos se encuentran en el fruto y semilla del Cashew o Anacardo (Kubo, *et al.*, 1986), el cual es una ETSS de la India y Brasil. Recibe usos como materia prima para la elaboración de productos alimenticios (Dahanayake, 2015 y Baldermman, *et al.*, 2016), mientras que la semilla (nuez de la India) es consumida una vez seca.

Los resultados (Figura 4.19) muestran que el ácido anacárdico 15:0 fue capaz de inhibir a la enzima en un 65.7% con 250 µg/mL. Con una IC₅₀ de 85 µg/mL.

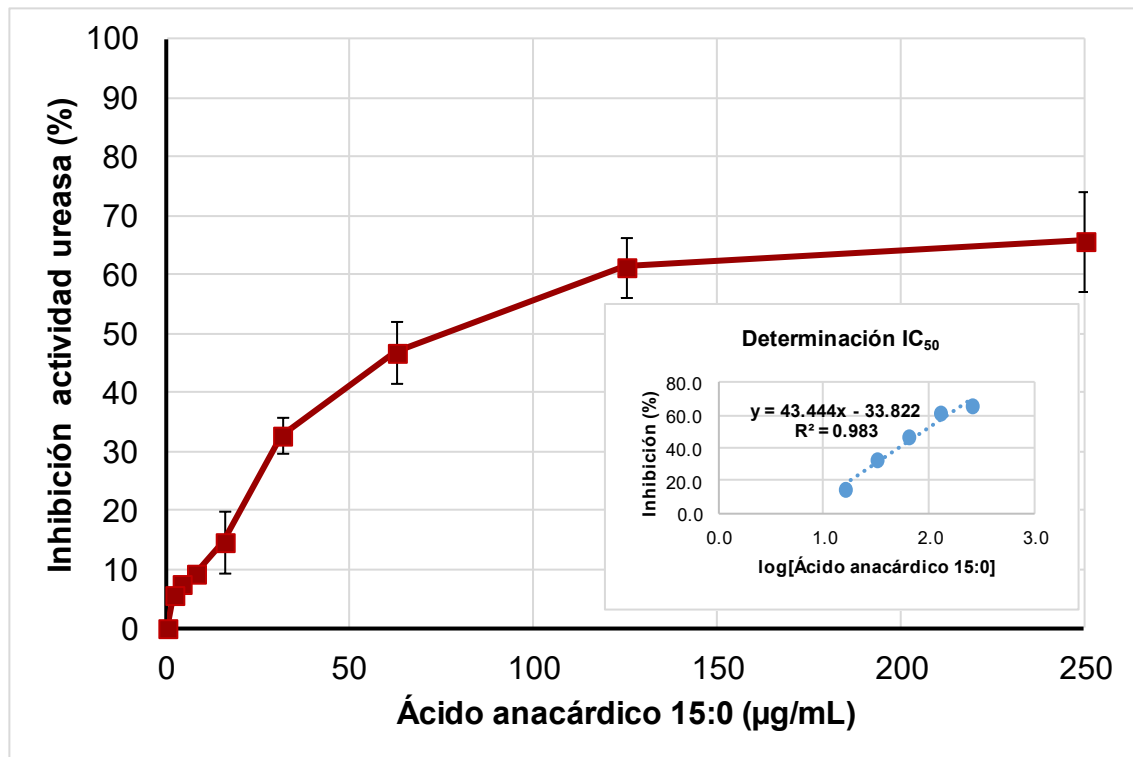


Figura 4.19. Efecto del ácido anacárdico 15:0 sobre la actividad enzimática de la ureasa de *H. pylori*.

Cabe destacar, que la actividad anti-*H. pylori* del ácido anacárdico 15:0 se evaluó anteriormente dentro del grupo de trabajo en que se llevó a cabo la presente investigación, encontrándose que posee una CMI= 5.0 µg/mL, valor que lo posiciona como un compuesto con alta actividad anti-*H. pylori*, por lo que, considerando el resultado sobre la actividad de la ureasa, el ácido anacárdico es un potencial candidato para la prevención y/o eliminación de la infección por *H. pylori* al afectar tanto el crecimiento de la bacteria, como la actividad enzimática de la ureasa, que al verse disminuida, podría afectar la colonización y establecimiento de la bacteria en el estómago (Eaton y Krakowka, 1994).

V. CONCLUSIONES

- El análisis fitoquímico preliminar de los extractos indicó que todas las especies poseen compuestos fenólicos, flavonoides y esteroides.
- Los extractos de Chepil poseen saponinas y cumarinas en su composición.
- Se estableció el método para la extracción y purificación parcial de la enzima ureasa de *Helicobacter pylori*, al obtenerse una fracción enriquecida en ureasa.
- Se establecieron los parámetros óptimos para la medición de actividad enzimática en este trabajo, los cuales fueron T=37°C, t=10 min y cantidad de proteína igual a 2 µg.
- El método para la determinación de la actividad enzimática es adecuado y fue validado con la determinación del efecto inhibitorio del ácido acetohidroxámico (control positivo) sobre la actividad de la ureasa.
- Se determinó que los extractos de las tres especies de quelites no poseen efecto sobre la actividad enzimática de la ureasa de *H. pylori*, desechando la hipótesis de trabajo.
- Los flavonoides acacetina y diosmetina poseen un efecto activador de la enzima. Este es uno de los pocos reportes de activadores de la ureasa independientemente de la fuente de la enzima.
- La inhibición de la enzima ureasa no es el mecanismo por el cual los extractos podrían prevenir la infección por *H. pylori*.
- El ácido anacárdico inhibe la actividad de la enzima ureasa, por lo que su uso podría contribuir en la prevención y tratamiento de la infección por *H. pylori*.

REFERENCIAS

- Andersen L.P. y Wadström T. 2001. Basic Bacteriology and Culture. En: Mobley H.L.T., Mendz G.L., Hazell SL, editores. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press. Capítulo 4.
- Ayala A. F. I. 2016. Perfil sensorial de Especies Tradicionales Subvaloradas y Subutilizadas de México: Quelites. Tesis de Licenciatura. Dependencia: Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bae E.A., Han M.J. Kim D.H. 1999. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Medica*. 65: 442-443.
- Baldermann S., Blagojevic L., Frede K., Klopsch R., Neugart S., Neumann A., Ngwene B., Norkewit J., Schröter D., Schröter A., Schweigert F.J., Wiesner M., y Schreiner M. 2016. Are Neglected Plants the Food for the Future? *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35 (2): 106-119.
- BDMTM (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana). Zolla C., Argueta A., Mata S., Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. [En línea] Actualizado en 2009.
Alache
http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Anoda_cristata&id=7794 [Último acceso el 17 de mayo de 2016]
Chaya
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Chaya&id=7157> [Último acceso el 17 de mayo de 2016]
Chepil
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7512> [Último acceso el 17 de mayo de 2016]
Cuachalalate
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Amphipterygium%20adstringens&id=7945> [Último acceso el 09 de diciembre de 2016]
- Boyanova L. 2011. Microbiology and Characteristics of *Helicobacter pylori*. En: *Helicobacter pylori*. Gran Bretaña, Caister Academic Press. Capítulo 3.
- Brindis H.F.G. 2011. Evaluación de la eficacia antihiperlglicémica de *Ligusticum porteri* Coult, *Hydrangea seemannii* L. Riley y *Anoda cristata* (L) Schldtl. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bye R. 1981. Quelites-ethnoecology of edible greens-past, present and future. *Journal of Ethnobiology*. 1: 109-123.
- Castillo-Juárez, I. y Romero, I. 2007. Plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*: una revisión. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 80: 5-61

- Castillo-Juárez I., Rivero-Cruz F., Celis H., Romero I. 2007. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. Journal of Ethnopharmacology. 114:72-77
- Cirak M.Y., Akyon Y., Megraud F. 2007. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. Helicobacter 12:4-9.
- Clayton C., Kleanthous K., Tabaqchali S. 1990. Detection and identification of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. Short Reports.
- Dahanayake N. 2015. Some neglected and underutilized fruit-crops in Sri Lanka. International Journal of Scientific and Research Publications. 5: 1-7.
- Dávalos J.H., Gutiérrez L.M., Siller L.F., Rodríguez S.A., Morales Del Río A., Guerrero M. P.J., Del Toro S.C.L. 2012. Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Vol. XV, N° 2. 53-60.
- De Falco M., Lucariello A., Iaquinto S., Esposito V., Guerra G., De Luca A. 2015. Molecular Mechanism of *Helicobacter pylori* Pathogenesis. Journal of Cellular Physiology. 230: 1702-1707.
- Diez L.V., González G. A.I., Rodríguez P.M.E., Villar O. R., Yero M.S.1997. Variantes del método de Berthelot. Revista Cubana de Farmacia. 31: 96-101.
- Dus I. Dobosz T., Manzin A., Loi G., Serra C., Radwan-Oczko M. 2013. Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research-new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria. Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online). 67:261-268.
- Eaton K.A., Brooks C.L., Morgan D.R., Krakowka S., 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. Infection and Immunity. 59(7): 2470-2475.
- Eaton K.A., Morgan D.R., Krakowka S. 1992. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. Journal of Medical Microbiology. 37(2): 123-127.
- Eaton K.A. y Krakowka S. 1994. Effect of Gastric pH on Urease-Dependent Colonization of Gnotobiotic Piglets by *Helicobacter pylori*. Infection and Immunity. Vol. 62 N° 9. 3604-3607.
- Espinosa-Rivero J., Rendón-Huerta E., Romero I. 2015. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth and its colonization factor by *Parthenium hysterophorus* extracts. Journal of Ethnopharmacology. 174: 253-260.
- Evans D.J., Jr, Evans D.G., Kirkpatrick S.S., Graham D. Y. 1991. Characterization of the *Helicobacter pylori* urease and purification of its subunits. Microbial Pathogenesis. 10:15-26.

- Fischer F. y De Reuse H. 2016. Adaptation of *Helicobacter pylori* Metabolism to Persistent Gastric Colonization. En: Backert S. y Yamaoka Y., editores. *Helicobacter pylori* Research From Bench to Bedside. Japón. Springer. 2016. Capítulo 2.
- Gálvez A. 2016. En entrevista con la Agencia Informativa del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt). Nota publicada [En línea] <http://www.proyecto40.com/noticia/cultura/nota/2016-10-12-17-07/quelites--un-tesoro-escondido-de-los-mexicanos/>
- Gálvez A. y Peña C. 2015. Revaloración de la dieta tradicional mexicana: Una visión interdisciplinaria. *Revista Digital Universitaria*. UNAM. Vol. 16. N° 5.
- Gang J.G., Soon K.Y., y Hwang S. Y. 2009. *Helicobacter pylori* Urease May Exist in Two Forms: Evidence from the Kinetic Studies. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19:1565-1568.
- García-Rodríguez R., Gutiérrez-Rebolledo G., Méndez-Bolaina E. Sánchez-Medina A., Maldonado-Saavedra O., Domínguez-Ortiz M.A., Vázquez-Hernández M., Muñoz-Muñiz O.D., Cruz-Sánchez J.S. 2014. *Cnidocolus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*. 151: 937-943.
- Goodwin C.S., Armstrong J.A., Chilvers T., Peters M., Collins M.D., Sly L., McConnell W., Harper W. E.S. 1989. Transfer of *Campylobacter pylory* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* com. nov., Respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 39, N°4. 397-405.
- Gutmann I., Bergmeyer, H. U. 1974. En: *Methods of enzymatic analysis*, 4: 1791 —1794, Academic Press, New York.
- Ha N-C. Oh S-T., Sung J.Y., Cha K.A., Lee M. H. Oh B-H. 2001. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature Structural Biology*. 8 (6): 505-509.
- Hong W., Sano K., Morimatsu S., Scott D. R., Weeks D. L., Sachs G., Goto T., Mohan S., Harada F., Nakajima N. y Nakano T. 2003. Medium pH-dependent redistribution of the urease of *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 52:211-216.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1994. Live flukes and *Helicobacter pylori*. IARC. Working group on the evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Lyon, 7-14. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 61:1-241.

- Iloki-Assanga S.B., Lewis-Luján L.M., Lara-Espinoza C.L., Gil-Salido A. A., Fernández-Angulo D., Rubio-Pino J.L. y Haines D.D. 2015. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. BMC Research Notes. 8:396.
- Jiménez-Aguilar D.M., Grusak M.A. 2015. Evaluation of Minerals, Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of Mexican, Central American, and African Green Leafy Vegetables. Plants Foods Human Nutrition. 70: 357-364.
- Juárez-Reyes K., Brindis F., Medina-Campos O.N., Pedraza-Chaverri J., Bye R., Linares E., Mata R. 2015. Hypoglycemic, antihyperglycemic and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. Journal of Ethnopharmacology. 161: 36-45.
- Juárez-Reyes. K. 2016. Estudio de la especie *Anoda cristata* (L) Schltld (Malvaceae) como fuente potencial de agentes útiles para el tratamiento de la diabetes Mellitus y Su complicaciones. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Koletzko S. y Mégraud F. 2016. *Helicobacter pylori* Infection in Children. En: Backert S. y Yamaoka Y., editores. *Helicobacter pylori* Research From Bench to Bedside. Japón. Springer. 2016. Capítulo 19.
- Krajewska B. 2009. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 54: 9-21.
- Kubo I., Komatsu S., Ochi M. 1986. Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 34: 970-973.
- Loarca-Piña G., Mendoza S., Ramos-Gómez M., Reynoso R. 2010. Antioxidant, Antimutagenic, and Antidiabetic Activities of Edible Leaves from *Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh. Journal of Food Science. 75 (2): 68-72.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265- 275.
- Manunza, B., S. Deiana, M. Pintore, and C. Gessa. 1999. The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N-(N-butyl)-phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. Soil Biology and Biochemistry 31:789-796.
- Marcus E.A., Moshfegh A.P., Sachs G., y Scott D.R. 2005. The periplasmic α -carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. Journal of Bacteriology. 187: 729–738.
- Marshall B.J., Warren J.R. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1(8390):1311–1315.

- Marshall B.J., Armstrong J.A., McGeachie D.B. y Glancy R.J. 1985. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Medical Journal of Australia* 142(8):436–439
- Martínez M.M. 2016. Estudio del potencial anti-*Helicobacter pylori* de extractos y alimentos preparados a partir de tres especies subvaloradas y subutilizadas de quelites. Tesis de Licenciatura. Dependencia: Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Rio, F., Delgado, G., 1991. Longchain phenols from the bark of *Amphypterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology* 34, 147–154.
- Mitchell H.M. 2001. Epidemiology of Infection. En: Mobley H.L.T., Mendz G.L., Hazell S.L., editores. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press. Capítulo 2.
- Modolo L.V., de Souza A. X. Horta L.P., Araujo D.P., De Fátima A. 2015. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *Journal of Advanced Research*. 6: 35-44.
- Mohan S. y Dutta S. 2013. *Biotechnology of Neglected and Underutilized Crops*. Londres. Springer. Prefacio.
- Moodley Y. 2016. *Helicobacter pylori: Genetics, Recombination, Population Structure, and Human Migrations*. En: Backert S. y Yamaoka Y., editores. *Helicobacter pylori Research From Bench to Bedside*. Japón. Springer. 2016. Capítulo 1.
- Nazari F. A. S., Ferreira V. C.R., Santiago M., Lima C. C. A., Vieira M. C., Valdevuna P. Z. 2014. Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in *Psychotria* Leaf Extracts. *Antioxidants*. 3: 745-757.
- O'Mahony R., Al-Khtheeri H., Weerasekera D., Fernando N., Vaira D., Holton J. y Basset C. 2005. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*. 11: 7499-7507.
- Pellicano R., Ribaldone D.G., Fagoonee S., Astegiano M., Saracco G.M., Mégraud F. 2016. A 2016 panorama of *Helicobacter pylori* infection: key messages for clinicians. *Panminerva Medica*. 58(4):305-17.
- Protein Data Bank. PDB 1E9Z. Imagen: Crystal structure of *Helicobacter pylori* Urease. Ha N-C. Oh S-T., Sung J.Y., Cha K.A., Lee M. H. Oh B-H. 2001. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature Structural Biology*. 8 (6): 505-509. [En línea] <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1e9z> [Último acceso 03/02/2017]

- Rajesh K P-G., Manjunatha H., Bharath B. R. 2013. Simulated screening of flavonoids as probable anti-*Helicobacter pylori* drug. *Medicinal Chemistry Research*. 22: 4537-4546.
- Ramírez-Hernández E. 2015. Revisión taxonómica del género *Crotalaria* L. (Leguminosae) para el estado de Guerrero, México. Tesis de Licenciatura. Dependencia: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional autónoma de México.
- Rendón B., Bye R., Núñez-Farfán J. 2001. Ethnobotany of *Anoda cristata* (L.) Schk. (Malvaceae) In Central Mexico: Uses, Management and Population Differentiation in the Community of Santiago Mamalhuazuca, Ozumba, State of Mexico. *Economic Botany*. 55 (4): 545-554.
- Sachs G., Weeks D. L., Wen Y., Marcus E. A., Scott D.R. Melchers K. 2005. Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology*. 20: 429-438.
- Santini A., Tenore G.C., Novellino E. 2016. Nutraceuticals: A paradigm of proactive medicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 96 (2017) 53-61.
- Solnick J.V. y Vandamme P. 2001. Taxonomy of the *Helicobacter* Genus. En: Mobley H.L.T., Mendz G.L., Hazell S.L., editores. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press. Capítulo 5.
- Srikanta B.M. y Dharmesh S.M. 2012. Anti-*H. pylori*, proton pump inhibitory and antioxidant properties of selected dietary/medicinal plant. *International Journal of Phytomedicine*. 4: 573-581.
- Todd M.J., Hausinger R.P. 1989. Competitive Inhibitors of *Klebsiella aerogenes* Urease. Mechanism of Interaction with the Nickel Active Site. *The Journal of Biological Chemistry*. 264 (27): 15835-15842.
- Torres J., Leal-Herrera Y., Pérez-Pérez G., Gómez A., Camorlinga-Ponce M., Cedillo-Rivera R., Tapia-Conyer R. y Muñoz O. 1998. A Community-Based Seroepidemiologic Study of *Helicobacter pylori* Infection in Mexico. *The Journal Infectious Diseases*. 178:1089-1094.
- Universal Protein Resource (UniProt). Urease of *Helicobacter pylori* [En línea] Actualizado al 10/01/2017
Urease Subunit alpha: <http://www.uniprot.org/uniprot/P14916> [Último acceso 03/02/17]
Urease Subunit Beta: <http://www.uniprot.org/uniprot/P69996> [Último acceso 03/02/2017]
- Villaseñor, J.L. y Espinosa G., F.J. 1998. Catálogo de Malezas de México. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. X p.
- Wagner H. y Bladt S. 2009. *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. Berlín. Springer. Segunda edición.

- Wang F., Meng W., Wang B., Qiao L. 2014. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Letters*. 345: 196–202.
- Weatherburn, M. 1967. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. *Analytical Chemistry*. 39 (8): 971-974.
- Xiao Z-P., Wang X-D., Peng Z-Y., Huang S., Yang P., Li Q-S., Zhou L-H., Hu X-J., Wu L-J., Zhou Y., Zhu H-L. 2012. Molecular docking, Kinetics Study, and Structure-Activity Relationship Analysis of Quercetin and Its Analogous as *Helicobacter pylori* Urease Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 10572-10577.
- Yu X-D., Zheng R-B., Xie J-H. Su J-Y., Huang X-Q., Wang Y-H., Zheng Y-F., Mo Z-Z., Wu X-L., Wu D-W., Liang Y-e., Zeng H-F., Su Z-R., Huang P. 2015. Biological evaluation and molecular docking of baicalin and scutellarin as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology*. 162: 69-78.
- Ziarani G.M., Asadi S., Faramarzi S., Amanlou M. 2015. Green Synthesis and Urease Inhibitory Activity of Spiro-Pyrimidinethiones/Spiro-Pyrimidinones-barbituric Acid Derivatives. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 14 (4): 1105-1114.

ANEXO

CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES

Para la cuantificación de compuestos fenólicos se usó Ácido gálico como estándar. La curva de calibración utilizada se muestra en la Figura A1.

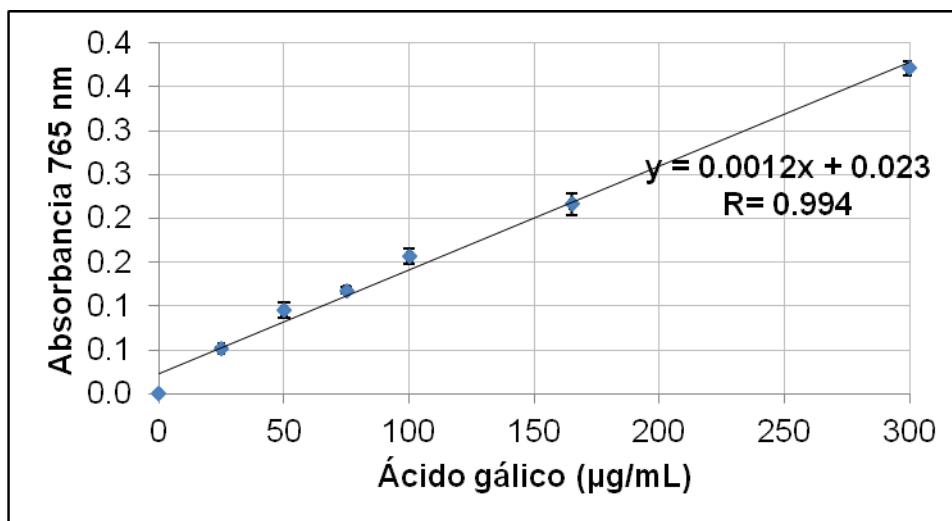


Figura A1. Curva para fenoles totales usando Ácido gálico como estándar

Para la cuantificación de flavonoides se usó Quercetina como estándar. La curva de calibración se presenta a continuación (Figura A2).

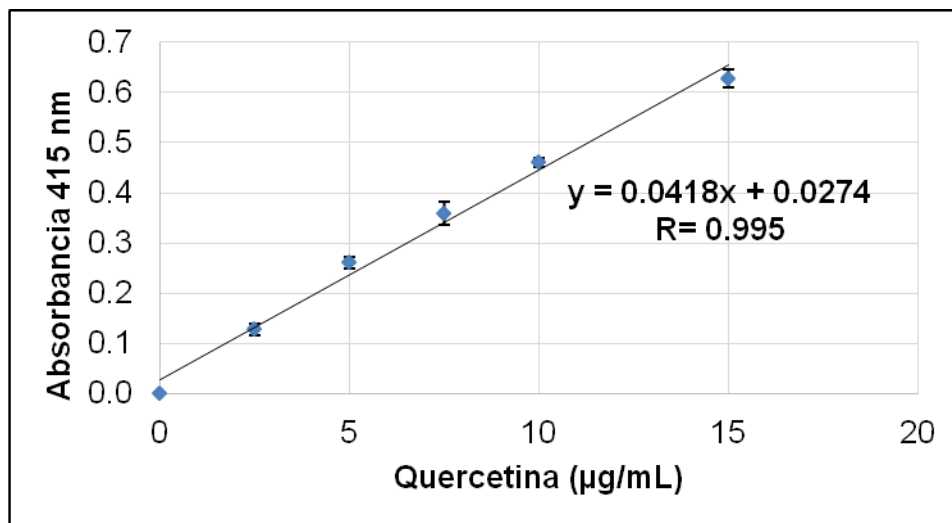


Figura A2. Curva de calibración para flavonoides usando quercetina como estándar.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA Y DE AMONIO

Se estandarizaron los métodos de cuantificación de proteína (Lowry) y el de determinación de la cantidad de amonio (Reacción de Berthelot), mismos que se utilizaron a lo largo del trabajo para cuantificar la cantidad de proteína presente al extraer la ureasa y de la actividad de la misma, respectivamente. En las Figuras A3 y A4, se presentan dos Curvas Patrón representativas, en donde se observa que se obtuvo la correlación suficiente para realizar las determinaciones.

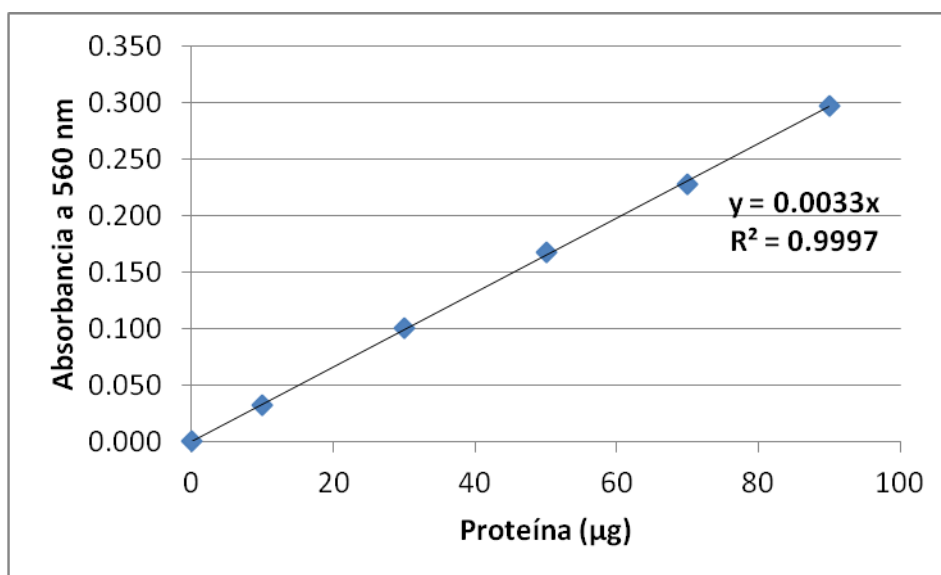


Figura A3. Curva patrón de BSA para la determinación de proteína por el método de Lowry

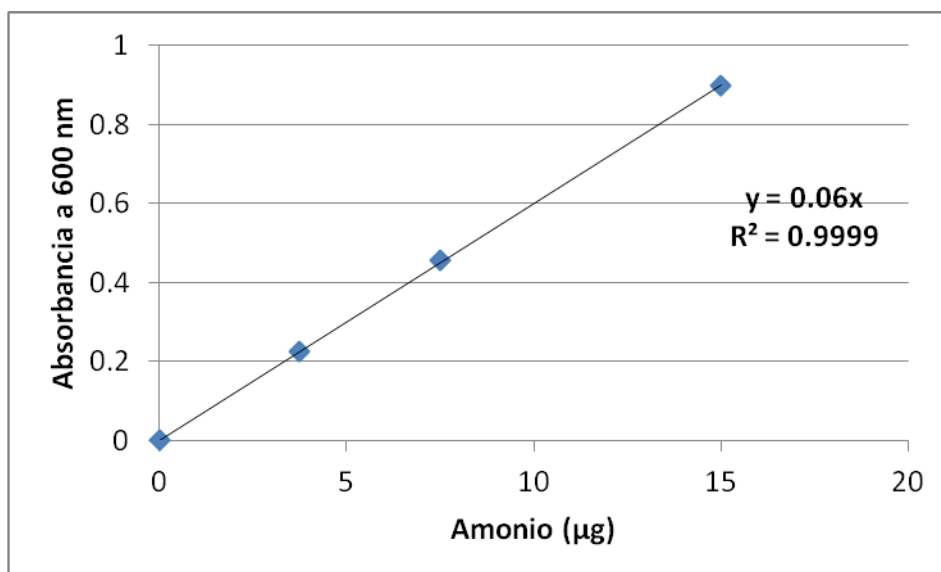


Figura A4. Curva estándar de amonio, resultante de la reacción de Berthelot

ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR EN GEL DE ELECTROFORESIS

Se realizó el cálculo del peso molecular de las subunidades estructurales de la ureasa, tomando como referencia la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en el gel de electroforesis.

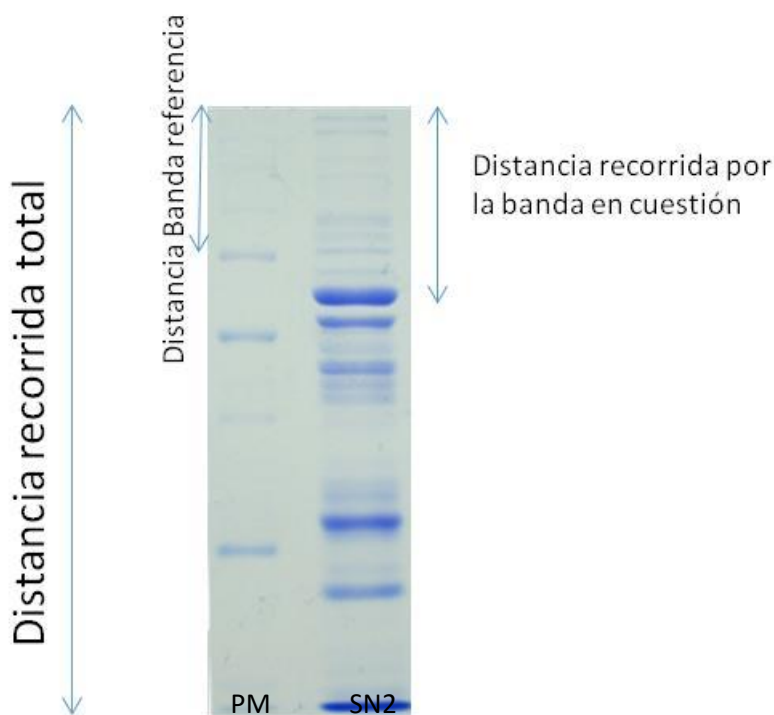


Figura A5. Gel de electroforesis en el que se ilustra las distancias a medir para el cálculo de la movilidad relativa.

Se calculó el Rf de cada una de las bandas de los marcadores de peso molecular. El Rf se obtiene al dividir la distancia recorrida por cada banda (desde el inicio del frente de corrida hasta el lugar en dónde se encuentra la banda) sobre la distancia recorrida total.

Con los valores de Rf obtenidos se construyó una curva de referencia de peso molecular, graficando el Rf vs log PM, como se muestra a continuación:

Marcador de PM	Rf	Log PM
100	0.155	2.00
75	0.233	1.88
50	0.366	1.70
37	0.500	1.57
25	0.722	1.40

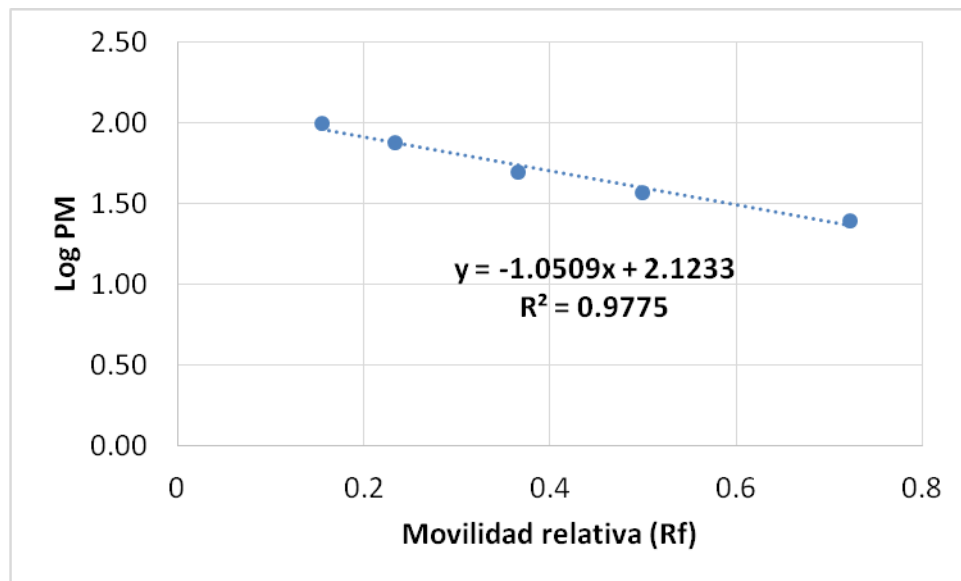


Figura A6. Curva de referencia para la estimación del peso molecular en gel de electroforesis.

Con la ecuación de la recta obtenida:

$$\log PM = -1.0509 Rf + 2.1233$$

Se calculó el peso molecular de las bandas de interés:

Ejemplo:

Rf de la tentativa subunidad β de la enzima ureasa= 0.310

$$\log PM = -1.0509(0.310) + 2.1233 = 1.797$$

$$PM = 10^{1.797} = 62.6$$

Se realizó de la misma forma para estimar el peso de la subunidad alfa.

CÁLCULO DE LA IC₅₀

En el caso de los tratamientos que presentaron un efecto inhibitorio sobre la enzima, se realizó el cálculo de la concentración de inhibición media de la actividad enzimática de la ureasa. Para ello se llevó a cabo una linealización de los datos obtenidos.

Para ejemplificar se muestra el cálculo de la IC₅₀ del Ácido Acetohidroxámico sobre la actividad de la ureasa de *H. pylori*.

Se construyó una recta al graficar el log[AHA] vs la Inhibición de la actividad enzimática.

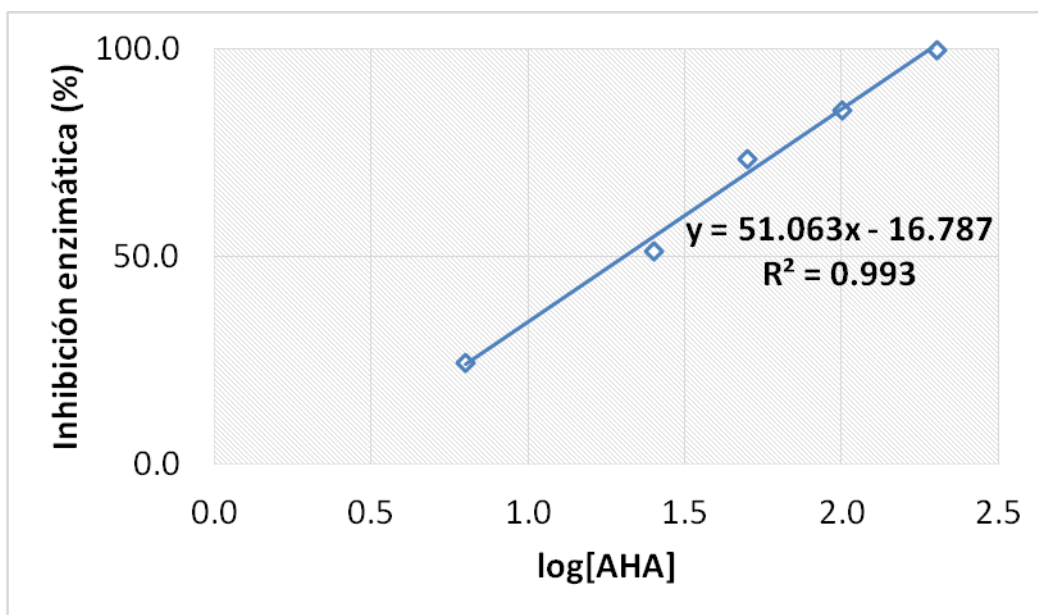


Figura A7. Curva para la determinación del valor de IC₅₀

De acuerdo a la ecuación de la recta obtenida, la IC₅₀ sería:

$$\log IC_{50} = \frac{50 + 16.787}{51.063} = 1.30$$

$$IC_{50} = 10^{1.30} = 20.3 \frac{\mu g}{mL}$$

DETERMINACIÓN DEL Rf EN COMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Dado que la cromatografía realizada bajo el sistema de elución Acetato de etilo: Ác. Acético: Ác. Fórmico: Agua (12:1:1:1.5) permitió una diferenciación entre extractos y se obtuvieron puntos que pueden ser medidos, se cálculo del Rf de los distintos puntos separados en cada extracto.

En el caso de los extractos de Chaya y Chepil, se presentan las mediciones para una sola muestra de extracto, ya que el patrón es el mismo.

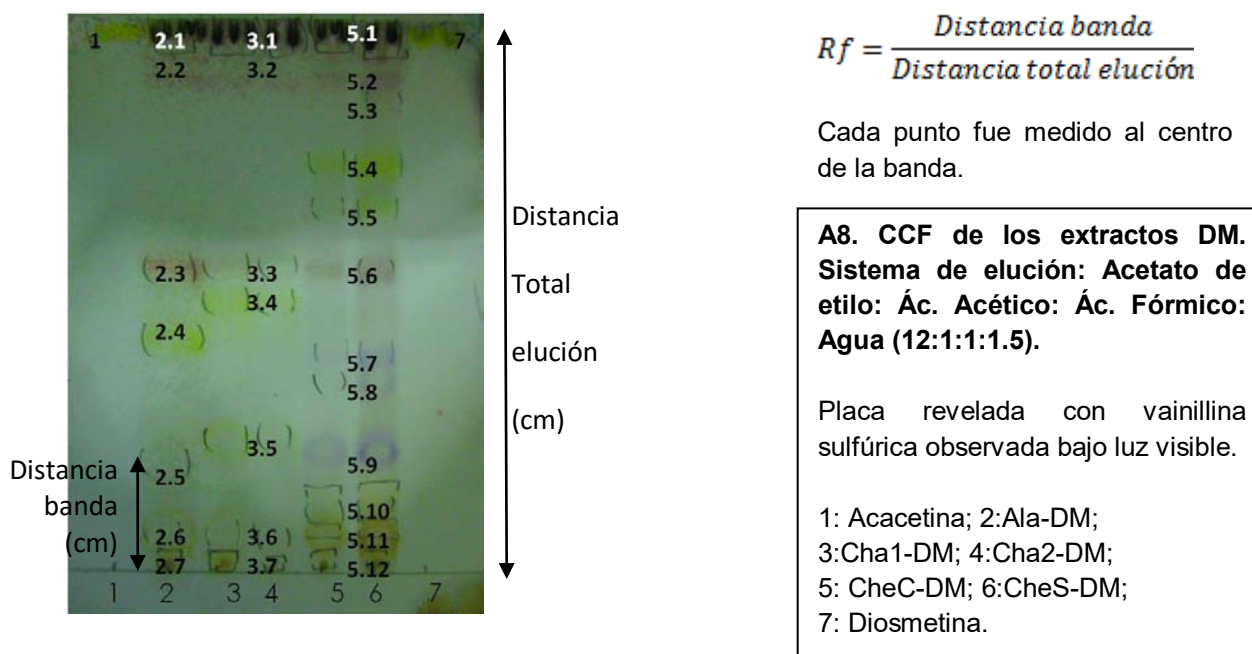


Tabla A1. Valor de Rf de las bandas resueltas en la CCF

Punto	Rf	Punto	Rf	Punto	Rf	Punto	Rf
1	0.956	3.1	0.956	5.1	0.956	5.9	0.205
2.1	0.956	3.2	0.912	5.2	0.912	5.10	0.117
2.2	0.912	3.3	0.544	5.3	0.838	5.11	0.073
2.3	0.54	3.4	0.470	5.4	0.735	5.12	0.029
2.4	0.397	3.5	0.235	5.5	0.676	7	0.956
2.5	0.176	3.6	0.073	5.6	0.544		
2.6	0.073	3.7	0.029	5.7	0.382		
2.7	0.029			5.8	0.338		

Los valores más pequeños indican mayor polaridad de los compuestos, mientras que los valores altos indican una menor polaridad.