



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto *in vitro* de curcumina, diacetilcurcumina y algunos de sus complejos metálicos sobre la ureasa de *Helicobacter pylori*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLÓGA

P R E S E N T A:

KARLA ARACELI ZAMUDIO BEJARANO



ASESORA DE TESIS:  
DRA. IRMA ROMERO ALVAREZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



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**

<b>Propietaria</b>	Dra. Yolanda López Vidal
<b>Propietario</b>	Dr. Adolfo Andrade Cetto
<b>Propietaria tutora</b>	Dra. Irma Romero Alvarez
<b>Suplente</b>	M. en C. Itzel Guzmán Vázquez
<b>Suplente</b>	M. en C. B. Vanessa Vega García

**Lugar donde se realizó el proyecto:**

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

**Asesora de tesis:**

Dra. Irma Romero Alvarez

**Sustentante:**

Karla Araceli Zamudio Bejarano



## **Agradecimientos**

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA de la UNAM, IN217019 e IN207622.

Agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca recibida.

A la Dra. Erika Gómez Chang por su gran ayuda y asistencia académica y técnica en la realización de los experimentos y en el cultivo y manejo de *H. pylori*.

Al Dr. Raúl G. Enríquez Habib y al Dr. William E. Meza Morales del Instituto de Química de la UNAM por la síntesis y donación de los compuestos utilizados en este trabajo.

A la Dra. Martha L. Macías Rubalcava por el tiempo dedicado en la revisión y seguimiento a este proyecto.

A los integrantes del jurado: Dra. Yolanda López Vidal, Dr. Adolfo Andrade Cetto, Dra. Irma Romero Alvarez, M. en C. Itzel Guzmán Vázquez y M. en C. Vanessa Vega García, por su tiempo, observaciones y comentarios a este trabajo.

## **Agradecimientos**

A mis padres, Dalia y Gustavo, por su amor, trabajo y sacrificio todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y cumplir una meta más. A mi madre, por confiar y creer en mí, por siempre estar pendiente de mi bien, por las palabras de aliento cuando más las necesité, por las virtudes inculcadas que me han llevado a ser quien soy, por haberme apoyado incondicionalmente. Te amo infinitamente.

A mis abuelos, Trini, Salvador y Vicky, por amarme tanto y acompañarme a lo largo de mi vida, por mantenerme siempre presente en sus oraciones. Los amo y sé que cuidaran de mí siempre.

A mis amigos, con los que compartí dentro y fuera de aula. Pero especialmente, a Almanelly, mi amiga fiel de la universidad, que se convirtió en mi compañera de aventuras, contigo nunca faltan las risas y los buenos momentos, gracias por el apoyo, por brindarme tu mano cuando más lo necesite, por motivarme a seguir adelante. Te amo pocho, que las aventuras sigan.

A cada uno de los docentes de la Facultad de Ciencias, por el conocimiento brindado durante mi formación académica profesional.

A la Dra. Irma y a la Dra. Erika, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por tenerme la confianza para realizar este proyecto en su laboratorio, por la paciencia con la que aclararon mis dudas y sobre todo por el conocimiento que me han brindado. Gracias a sus consejos y observaciones hoy puedo culminar este trabajo. Las quiero mucho.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

## Resumen

*Helicobacter pylori* es una bacteria considerada el agente causal de la gastritis, la úlcera péptica y el cáncer gástrico; actualmente, se estima que alrededor del 50% de la población se encuentra infectada con la bacteria, volviéndolo un tema de salud importante. Las terapias actuales para su erradicación han demostrado un descenso en el éxito debido principalmente a la creciente resistencia a los antibióticos por parte de la bacteria, haciendo necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos. Los productos naturales provenientes de plantas y sus derivados son una excelente opción para el desarrollo de terapias novedosas.

La curcumina, compuesto extraído de *Curcuma longa*, es un polifenol que ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional de algunos países para el tratamiento de diversas enfermedades y se han corroborado múltiples actividades biológicas de interés, destacando la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria. Sin embargo, su inestabilidad ha restringido su implementación como terapia, por lo que se ha recurrido a la modificación del compuesto para contrarrestar estos inconvenientes. Uno de los enfoques consiste en la síntesis de compuestos metálicos, como son los derivados de la diacetilcurcumina (DAC): DAC<sub>2</sub>-Cu, DAC<sub>2</sub>-Mg, DAC<sub>2</sub>-Mn y DAC<sub>2</sub>-Zn.

Ya que la actividad anti-*H. pylori* de la curcumina y estos cinco derivados se ha comprobado previamente, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de estos compuestos sobre la actividad de la ureasa para dilucidar su mecanismo de. La ureasa es una enzima central para el metabolismo y patogenicidad de la bacteria, es la encargada de la hidrólisis de la urea, lo que le permite a la bacteria contrarrestar las condiciones ácidas del estómago creando un microambiente neutro a su alrededor; además, se le atribuyen efectos tales como daño al epitelio gástrico, la activación del sistema inmune, la promoción de angiogénesis, entre otros.

El efecto de los compuestos sobre la ureasa se evaluó cuantificando el amonio liberado por la enzima por el método colorimétrico de Berthelot. Los compuestos curcumina y DAC inhibieron alrededor del 30% la actividad de la enzima a una concentración de 125 µg/ml; mientras que DAC<sub>2</sub>-Cu y DAC<sub>2</sub>-Zn inhibieron 79% y 86%, respectivamente, a una concentración de 62.5 µg/ml. Por otro lado, DAC<sub>2</sub>-Mg activó la enzima 24% con 7.8 µg/ml, sin embargo, no es un efecto dosis dependiente como el que se observó con DAC<sub>2</sub>-Mn, que resultó ser un potente activador de la ureasa, presentando una activación del 76% con 62.5 µg/ml. Estos resultados indican que el efecto anti-*H. pylori* de DAC<sub>2</sub>-Cu y DAC<sub>2</sub>-Zn podría involucrar la inhibición de la ureasa de la bacteria, lo cual compromete su sobrevivencia. No obstante, se debe continuar la investigación con estos compuestos para dilucidar a detalle el mecanismo de acción de cada uno de ellos.

## Índice

Abreviaturas.....	9
I. Introducción .....	10
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> .....	10
1.2 Taxonomía de <i>H. pylori</i> .....	11
1.3 Microbiología de <i>H. pylori</i> .....	11
1.4 Epidemiología.....	12
1.5 Vías de transmisión.....	14
1.6 Patologías asociadas .....	14
1.7 Mecanismos de patogenicidad .....	16
1.7.1 Factores de colonización .....	17
1.7.2 Factores de sobrevivencia .....	19
1.7.3 Factores de virulencia.....	20
1.8 Ureasa .....	21
1.8.1 Mecanismo propuesto de aclimatación al ácido.....	22
1.9 Terapia actual.....	24
1.10 Plantas medicinales con potencial anti- <i>H. pylori</i> .....	26
1.10.1 Antecedentes directos.....	26
II. Hipótesis .....	36
III. Objetivos.....	36
3.1 Objetivo general.....	36
3.2 Objetivos particulares .....	37
IV. Metodología .....	37
4.1 Compuestos.....	37
4.2 Cultivo e identificación de <i>H. pylori</i> .....	38
4.3 Extracción y purificación parcial de la ureasa de <i>H. pylori</i> .....	39
4.3.1 Cuantificación de proteína.....	40
4.3.2 Determinación de actividad enzimática .....	40
4.3.3 Efecto de la curumina y de los compuestos derivados de la curcumina sobre la ureasa..	41
4.4 Análisis estadístico .....	42
V. Resultados y Discusión.....	43

5.1 Cultivo <i>e identificación</i> de <i>H. pylori</i> .....	43
5.2 Obtención de la ureasa y determinación de su actividad .....	45
5.3 Efecto de los compuestos sobre la ureasa .....	48
5.3.1. Efecto del ácido acetohidroxámico sobre la ureasa (Control positivo) .....	48
5.3.2 Efecto de la curcumina, diacetilcurcumina y los compuestos metálicos derivados sobre la ureasa.....	49
VI. Conclusiones .....	56
VII. Perspectivas.....	57
Referencias .....	58
Anexo 1 .....	70
Anexo 2 .....	71

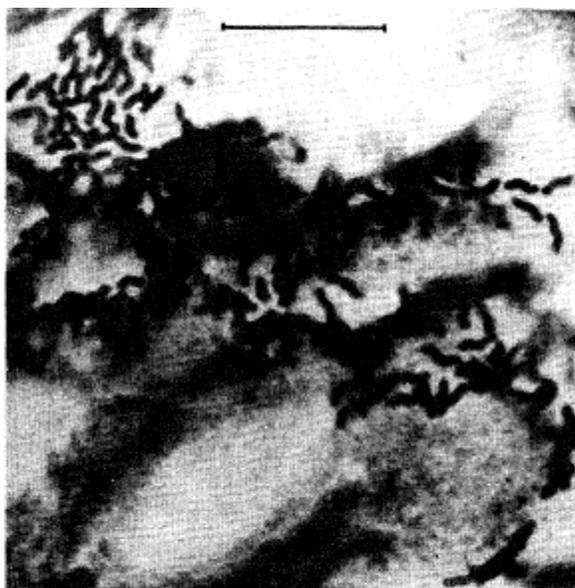
## Abreviaturas

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amonio
A	Absorbancia
AHA	Ácido acetohidroxiámico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
BSA	Albúmina de suero bovino
$\text{C}^{13}$ -UBT	Prueba del aliento con urea marcada con Carbono 13
CMI	Concentración mínima inhibitoria
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
DAC	Curcumina diacetilada
DMSO	Dimetilsulfóxido
$\text{HCO}_3$	Bicarbonato
IARC	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
IBP	Inhibidor de la bomba de protones
$\text{IC}_{50}$	Concentración inhibitoria media
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
n	Número de experimentos
$\text{NH}_4$	Amonio
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto

## I. Introducción

### 1.1 *Helicobacter pylori*

En 1983 J. Robin Warren, patólogo australiano, notó la presencia constante de un bacilo curvo en las biopsias de tejido gástrico que realizaba a pacientes con gastritis, pero las características morfológicas y bioquímicas que presentaba no correspondían a ninguna especie descrita hasta ese entonces (Figura 1). Warren, en conjunto con Barry Marshall, lograron aislar el bacilo a partir de las biopsias de pacientes y dada su morfología semejante a bacterias del género *Campylobacter*, deciden nombrarla *Campylobacter pylori* (Warren y Marshall, 1983; Marshall y Warren, 1984; Marshall y Goodwin, 1987). Tiempo después se demuestra la relación que tiene la bacteria con el desarrollo de gastritis y la úlcera péptica (Marshall *et al.*, 1985). Diferencias notables en la secuencia de ARN, ultraestructura, morfología, perfil de ácidos grasos, capacidad enzimática y características de crecimiento del bacilo con bacterias del género *Campylobacter* hicieron necesaria la reclasificación de la bacteria a un nuevo género llamado, *Helicobacter*; recibiendo así el nombre de *Helicobacter pylori* (Goodwin *et al.*, 1985; Goodwin *et al.*, 1989).



**Figura 1. Fotografía tomada del primer reporte de Warren sobre la presencia de bacilos en epitelio gástrico.** Se observa a las bacterias adheridas a las células del epitelio gástrico, ocupando principalmente las uniones intercelulares (Tinción Wartin-Starry, barra 10  $\mu$ m). Tomado de Warren y Marshall (1983).

## 1.2 Taxonomía de *H. pylori*

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

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Epsilonproteobacteria

Orden: Campylobacterales

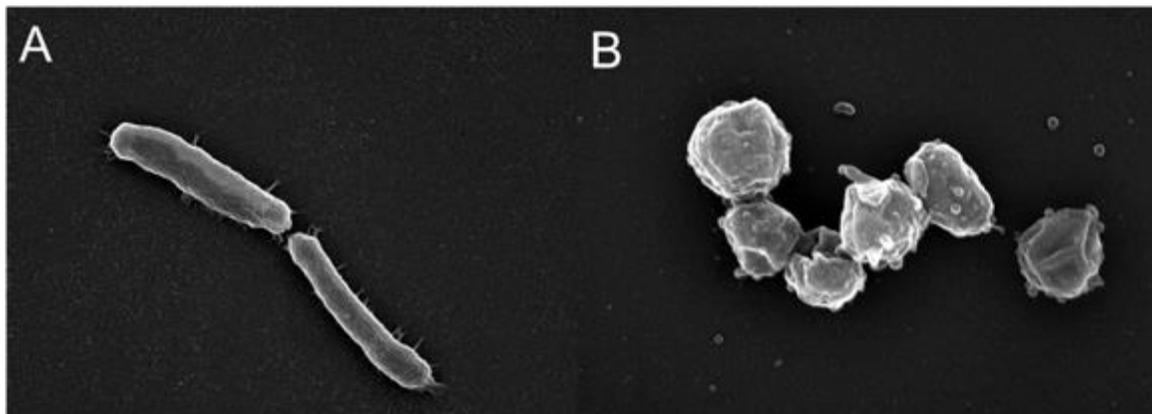
Familia: Helicobacteraceae

Género: *Helicobacter*

Especie: *Helicobacter pylori*

## 1.3 Microbiología de *H. pylori*

La morfología típica de *H. pylori* es la de un bacilo helicoidal (2.5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo por 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho), sin embargo, en condiciones de cultivo puede observarse además en forma de U o en forma de coco (Figura 2), presenta de 5 a 7 flagelos unipolares cubiertos que terminan en bulbo. La estructura de la pared celular corresponde a una bacteria Gram negativa ya que se observan las membranas externa e interna separadas por un periplasma (O'Rourke y Bode, 2001).



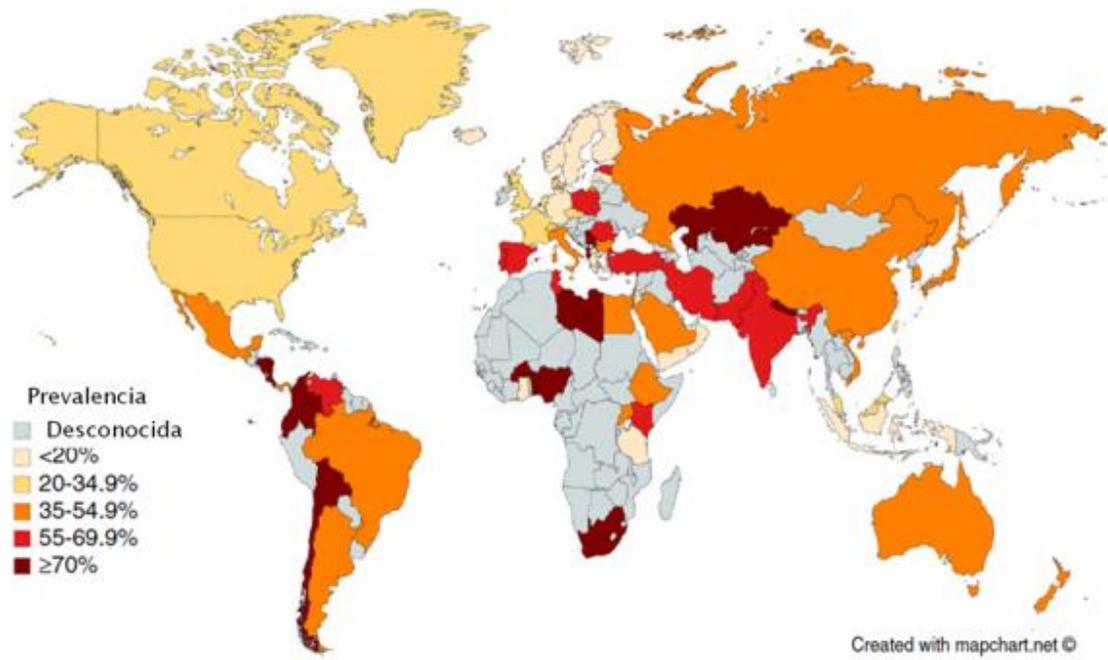
**Figura 2.** Microscopía de barrido donde se observa la morfología de *H. pylori*. A) Forma bacilar y B) forma cocoide. Modificada de Bumann *et al.* (2004).

El hábitat natural de *H. pylori* es el estómago humano únicamente, en particular la zona antral, pese a esto es considerada una bacteria neutrófila, ya que es posible su crecimiento desde pH 5.5 hasta 8, siendo su pH óptimo el neutro. Es capaz de habitar el estómago humano debido a un sistema de aclimatación al ácido que ha desarrollado (Kusters *et al.*, 2006; Ansari y Yamaoka, 2017).

*H. pylori* se cultiva en condiciones microaerofílicas (10% de CO<sub>2</sub>, 2 a 5% de O<sub>2</sub>), el crecimiento óptimo ocurre a 37°C con humedad alta (90 - 95%); y es necesario utilizar un medio enriquecido con suero fetal bovino, sangre, o bien con β-ciclodextrina; las colonias son incoloras y pequeñas (~1 mm) y pueden observarse después de 3 a 5 días de incubación. Debido a su resistencia a los antibióticos puede emplearse un medio de cultivo selectivo adicionado con vancomicina, trimetoprima, anfotericina y polimixina para aislar a la bacteria. La bacteria es catalasa, oxidasa y ureasa positiva, por tanto es posible su identificación mediante estas pruebas bioquímicas (Goodwin y Armstrong, 1990; Andersen *et al.*, 1997; Dunn *et al.*, 1997).

#### **1.4 Epidemiología**

De acuerdo a un meta-análisis se estimó que, para el 2017, el 44.3% de la población mundial en promedio presentó infección por *H. pylori*, siendo del 50.8% para países en desarrollo y del 34.7% para países desarrollados (Figura 3). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la prevalencia entre hombres (46.3%) y mujeres (42.7%) y la prevalencia es mayor en adultos (>18 años) que en niños (Zamani *et al.*, 2018).



**Figura 3. Prevalencia mundial de la infección por *H. pylori*.** Tomado y modificado de Zamani *et al.* (2018).

Para México se ha reportado una seroprevalencia del 66%, así mismo, la prevalencia de la infección aumenta con la edad, partiendo del 20% en niños de un año hasta llegar al 80% en adultos de 25 años (Torres *et al.*, 1998).

Cabe destacar que la prevalencia ha disminuido drásticamente en los países desarrollados debido al nivel de industrialización que estos presentan, que se refleja en un estándar de vida más alto y un saneamiento mejorado; mientras que en países en desarrollo o en vías de industrialización la prevalencia se ha mantenido constante, aunque a un nivel alto (Hooi *et al.*, 2017).

Como se mencionó anteriormente, las diferencias en la prevalencia de la infección se han asociado directamente al nivel socioeconómico de la zona de estudio; algunos factores de riesgo de infección que se han identificado son: bajo ingreso económico, residencias pequeñas con familias numerosas, bajo nivel de urbanización, bajo nivel de educación, composición de la dieta y medidas de higiene deficientes (Eusebi *et al.*, 2014; Sjomina *et al.*, 2018).

## 1.5 Vías de transmisión

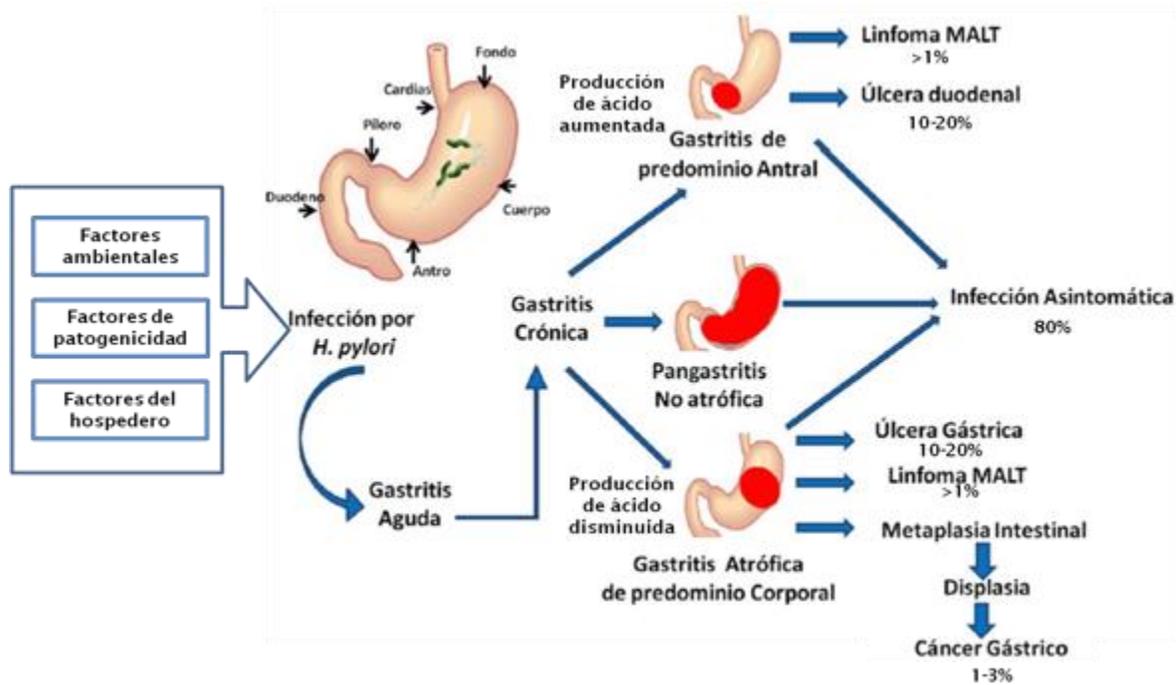
Se ha postulado que *H. pylori* se adquiere generalmente durante la infancia (Brown, 2000) y puede perdurar de por vida si no es tratada, sin embargo, también los adultos pueden infectarse. La vía de transmisión no es clara, parece ser que ocurre de persona a persona, siendo la forma más frecuente la transmisión entre miembros de la familia debido a que comparten predisposición genética similar, tienen el mismo estatus socioeconómico y están expuestos a la misma fuente de infección. Estudios han demostrado la presencia de *H. pylori* en muestras de vómito, jugo gástrico, saliva y heces, por lo que se han establecido tres posibles vías de transmisión: oral-oral, gástrico-oral y fecal-oral (Stefano *et al.*, 2018). Esta última vía presenta cierta controversia puesto que no se ha demostrado la viabilidad de bacterias procedentes de muestras fecales.

## 1.6 Patologías asociadas

La infección por *H. pylori* se encuentra asociada a diversas enfermedades como gastritis, úlcera péptica, cáncer gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). Sin embargo, el 80% de los casos no presenta síntomas, por el contrario, entre el 10 y el 20% de los casos pueden evolucionar en ulceración péptica, del 1 al 3% puede desarrollar cáncer gástrico y menos del 1%, linfoma tipo MALT (Kusters *et al.*, 2006).

En todos los casos la presencia de la bacteria causa inflamación del tejido gástrico, gastritis aguda, que puede resolverse al cabo de un tiempo o bien evolucionar a una gastritis crónica activa como ocurre en la mayoría de los casos. La diferencia principal entre ambos tipos de gastritis es el infiltrado inflamatorio; en la gastritis aguda predominan los neutrófilos, además puede acompañarse de hemorragias y erosiones de la mucosa, por otro lado, en la gastritis crónica ocurre infiltración de linfocitos, células plasmáticas o ambas, y además, se producen cambios metaplásicos de la mucosa gástrica (Valdivia-Roldán, 2011). La persistencia de la infección también se asocia a cambios en la secreción del ácido por las células parietales; de tal forma que pacientes con gastritis crónica con aumento en la secreción del ácido pueden desarrollar gastritis de predominio antral que a su vez puede complicarse en una ulceración duodenal y raramente en linfoma tipo MALT; mientras que otros pacientes con gastritis crónica y disminución de la secreción de ácido pueden

desarrollar gastritis multifocal que se relaciona con el desarrollo de úlceras gástricas, cáncer gástrico y linfoma tipo MALT (Figura 4) (Kusters *et al.*, 2006; Tan y Wong, 2011).



**Figura 4. Historia natural de la infección por *H. pylori*.** El curso de la infección es variable y depende de factores ambientales, de patogenicidad de la bacteria y de factores propios del hospedero. Además, influye la zona de inflamación del tejido gástrico (en rojo) y la secreción de ácido. Se muestran el porcentaje de casos que presentan las diferentes patologías. Tomado y modificado de Gómez-Chang *et al.* (2017).

La úlcera péptica es una lesión abierta (diámetro mayor a 5 mm) en la mucosa gástrica que se presenta en sitios de inflamación severa. De acuerdo al sitio donde se presentan se dividen en: gástricas o duodenales. La úlcera gástrica generalmente se desarrolla a lo largo de la curvatura menor del estómago, mientras que la úlcera duodenal se presenta en el bulbo duodenal, área que está mayormente expuesta al ácido gástrico (Kusters *et al.*, 2006; Malfertheiner *et al.*, 2009).

El cáncer gástrico ocupa el 5° lugar en las neoplasias más comunes que ocurren globalmente, después de los cánceres de mama, pulmón, colon y próstata; y es la cuarta causa de muerte por cáncer (Sung *et al.*, 2021). Además, el diagnóstico generalmente es

tardío ya que la enfermedad es asintomática cuando es potencialmente curable, los síntomas más destacados son la pérdida de peso y dolor abdominal. De acuerdo a la clasificación de Lauren se distinguen dos tipos de cáncer: el tipo intestinal, que se asocia con la gastritis crónica y metaplasia intestinal; y el tipo difuso que tiene origen en mucosa gástrica normal (Cebrián *et al.*, 2016; Sitarz *et al.*, 2018).

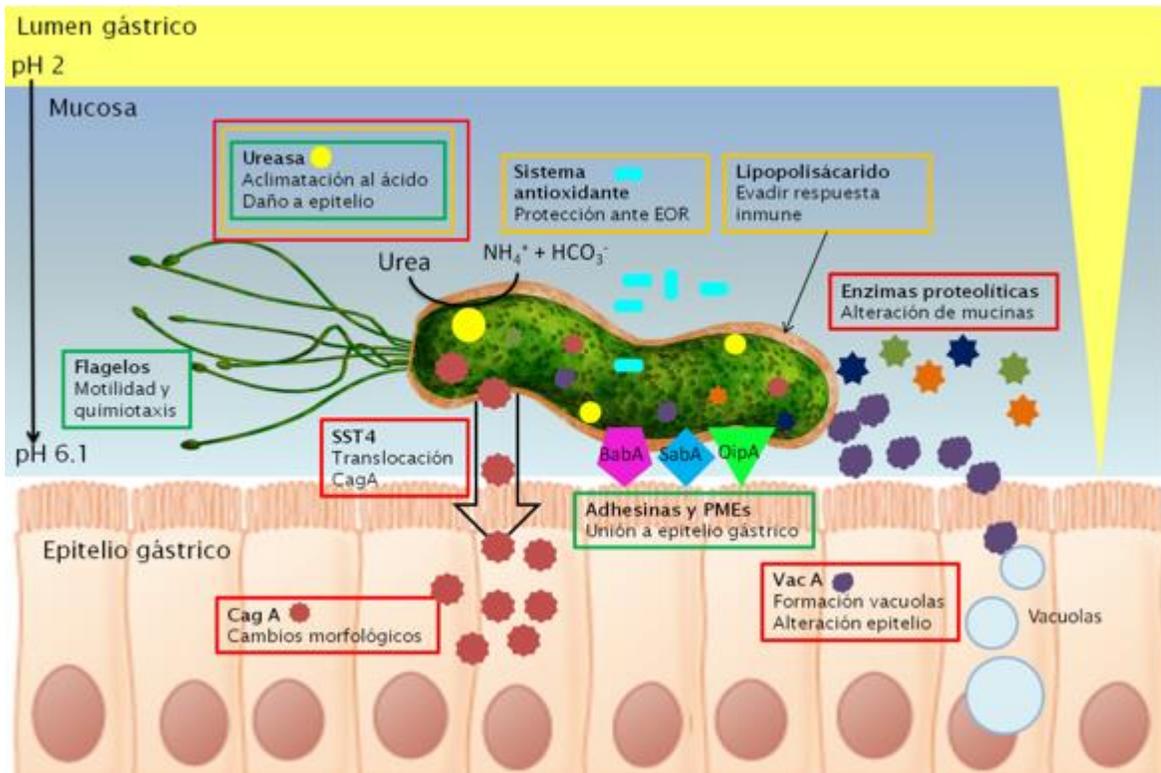
La formación del linfoma MALT se desencadena debido a la infiltración linfoide causada por la infección con *H. pylori*. La proliferación de células B se mantiene activa por estimulación inmunológica directa e indirecta. Por otro lado, es importante la presencia de radicales libres de oxígeno, ya que promueven la adquisición de anomalías genéticas y transformación maligna de las células B (Du e Isaccson, 2002).

Se ha estimado que *H. pylori* es el agente causal del 70 al 85% de las úlceras gástricas y del 90 al 95% de las úlceras duodenales; además se estima que la presencia de la bacteria aumenta el riesgo de padecer cáncer gástrico y el linfoma tipo MALT por lo que es considerado un agente carcinogénico tipo I (Testerman y Morris, 2014; IARC, 1994).

Es importante mencionar que el desarrollo de las diferentes patologías depende de la interacción de diversos factores como: virulencia de la cepa, estilo de vida del hospedero, predisposición genética del hospedero y factores ambientales (Figura 4) (Mishra, 2013; De Falco *et al.*, 2015).

### **1.7 Mecanismos de patogenicidad**

*H. pylori* llega al estómago humano ingresando por la boca y a diferencia de otras bacterias puede subsistir en el ambiente ácido, esto lo logra gracias a una serie de mecanismos de patogenicidad que ha desarrollado. Estos pueden clasificarse en factores de colonización, de sobrevivencia y de virulencia (Figura 5).



**Figura 5. Representación general de algunos mecanismos de patogenicidad de *H. pylori*.** En recuadros de color verde se encierran los factores de colonización, en recuadros naranja los de sobrevivencia y en los rojos los de virulencia. EOR= especies de oxígeno reactivo. SST4= sistema de secreción tipo 4. PMEs = proteínas de membrana externa. Adaptado de Cervantes-García (2016), Torres-Jiménez y Torres-Bayona (2016) y Gómez-Chang (2017).

### 1.7.1 Factores de colonización

Los flagelos que presenta *H. pylori* le permiten desplazarse dentro del estómago humano desde el lumen donde el ácido es abundante, atravesar la capa de moco y llegar hasta la superficie del epitelio gástrico, donde el pH es de entre 4.5 a 6.5; esto también se favorece gracias a su morfología helicoidal que le ayuda a atravesar la barrera de moco. Esta respuesta está mediada por quimiorreceptores propios de la bacteria que se activan de acuerdo con las condiciones del medio (Kao *et al.*, 2016; Camilo *et al.*, 2017).

Pese a la naturaleza neutrófila de *H. pylori*, esta es capaz de sobrevivir las condiciones ácidas del estómago y colonizar el epitelio gástrico gracias a un sistema de aclimatación al

ácido por acción de la enzima ureasa. La ureasa se encarga de realizar la hidrólisis de la urea convirtiéndola en amoníaco y dióxido de carbono, de tal forma que se crea un microambiente neutro alrededor de la bacteria. Las características de la ureasa y el proceso de aclimatación se detallarán en la sección 1.8.

La adherencia de las bacterias al epitelio gástrico está mediada por enzimas denominadas adhesinas o proteínas de membrana externa (PMEs); estas interactúan con receptores presentes en las células epiteliales lo que impide que la bacteria sea eliminada del huésped ya sea por el flujo constante de líquidos, vaciado estomacal, movimientos peristálticos o bien desprendimiento del epitelio por renovación del mismo. Además, se les atribuye funciones como importación de nutrientes, transducción de señales, expresión de factores de patogenicidad e incluso resistencia a antibióticos (Matsuo *et al.*, 2017). Cabe destacar que la adherencia es un factor indispensable para la virulencia, ya que algunos mecanismos requieren del contacto con las células del huésped para efectuar daño.

Hasta el momento se sabe que 4% del genoma de *H. pylori* codifica para PMEs, cerca de 64 diferentes, sin embargo, son pocas las que se han caracterizado y estudiado a fondo (Barragán-Vidal, *et al.*, 2015); ejemplos de estas son la proteína de adhesión a los antígenos de Lewis (BabA), la adhesina de unión a ácido siálico (SabA), la lipoproteína asociada a la adherencia (AlpA/B), la proteína inflamatoria externa A (OipA) y una familia de porinas de membrana externa (Hop) (Tabla 1).

**Tabla 1. Proteínas de membrana externa de *H. pylori* más caracterizadas.**

PME	Sitio de unión	Función	Patología asociada
BabA	Lewis <sup>b</sup> Globo H hexaglicosilceramida Globo A heptaglicosilceramida	Adhesión a célula huésped Favorece la translocación de CagA a través del SST4 Ruptura de ADN Inhibe producción de mucina	Úlcera péptica Cáncer gástrico
SabA	Lewis <sup>x</sup> y Lewis <sup>a</sup> sialicilados	Adhesión a célula huésped Mimetismo ante respuesta inmune Producción de IL-8 y FNκ- B	Atrofia mucosa gástrica Cáncer gástrico
OipA	No conocido	Adhesión Induce producción de citoquinas inflamatorias Asociada con cepas CagA+, BabA+ y VacA+	Úlcera duodenal Cáncer gástrico
HopQ	Moléculas de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM 1, 3, 5 y 6)	Adhesión Translocación de CagA a través del SST4	No establecida
AlpA/B	Colágeno IV Lamininia	Adhesión a matriz extracelular	No establecida

Adaptada de Kusters *et al.*, 2006; Barragán-Vidal, *et al.*, 2015 y Matsuo *et al.*, 2017.

### 1.7.2 Factores de sobrevivencia

La infección por *H. pylori* induce la respuesta inflamatoria del huésped mediada por neutrófilos y macrófagos que resulta en la producción de especies de oxígeno reactivas a las cuales la bacteria es vulnerable, por tanto, necesita de un sistema antioxidante que le permita sobrevivir a la presencia de estas moléculas y para reparar los posibles daños causados por las mismas. Este sistema comprende diversas enzimas como: la catalasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; la superóxido dismutasa, encargada de la transformación del superóxido en peróxido de hidrógeno; la

proteína activadora de neutrófilos, que protege al ADN del daño oxidativo al actuar como una bacterioferritina; y otras proteínas reguladoras del metabolismo del hierro, que ocupan las especies reactivas para oxidar  $\text{Fe}^{3+}$  y a su vez almacenar el  $\text{Fe}^{2+}$  resultante (Kusters *et al.*, 2006).

Otro factor importante en la supervivencia de la bacteria en el estómago humano es el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa que está formado por un lípido A, una estructura de polisacárido central y una región variable de polisacárido, llamada antígeno O. El antígeno O puede presentar carbohidratos de Lewis, ya sea X ( $\text{Le}^x$ ), Y ( $\text{Le}^y$ ) o ambos, así mismo, es similar al presente en las células gástricas del hospedero por tanto, permite que la bacteria pase desapercibida ante la respuesta inmune (Kusters *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, *H. pylori* adopta una forma cocoide cuando las condiciones son desfavorables. De este modo se ha postulado la existencia de dos formas cocoides, una viable y otra no viable. La principal evidencia de que estas formas aún son viables es que la síntesis de ADN sigue activa, lo cual se ha comprobado con ensayos de incorporación de bromodesoxiuridina. Por otro lado, las formas degenerativas presentan pérdida de proteínas y nucleótidos, disminución de la densidad, cambios en la pared celular y cambios ultraestructurales asociados con transformación cocoide (Eaton *et al.*, 1995). Sin embargo, aún está en discusión si las formas cocoides representan una forma de supervivencia de la bacteria o no.

### **1.7.3 Factores de virulencia**

La isla de patogenicidad cagPAI es el factor de virulencia más relevante, es una sección del cromosoma de *H. pylori* que comprende al menos 30 genes diferentes; la expresión de estos está regulada por diversos mecanismos que responden ante las condiciones ambientales. Al menos seis de los genes se encuentran relacionados con la codificación del sistema de secreción tipo 4 (SST4), esta estructura similar a un pili se encarga de translocar hacia el interior de la célula hospedera a la citotoxina asociada al gen A (Cag A), cuyo gen también se encuentra en la isla. Se estima que ~10% de las cepas presentan cagPAI deficiente imposibilitando su función. Por su parte, CagA, que se encuentra entre 50 y 70% de los aislamientos clínicos, promueve la producción de interleucinas tipo 8, el reclutamiento de

leucocitos, reduce la secreción de ácido, induce cambios en el citoesqueleto, afecta la proliferación celular y finalmente, induce la apoptosis celular (Kusters *et al.*, 2006; Kao *et al.*, 2016).

La citotoxina VacA es una proteína que induce la formación de vacuolas en el citoplasma de las células epiteliales. Así mismo, induce cambios conformacionales en el epitelio gástrico, afectando las uniones estrechas entre células, esto permite un mayor flujo de nutrientes que son aprovechados por las bacterias. También se ha observado que puede afectar directamente a la mitocondria alterando los ciclos de proliferación celular y acelerando la apoptosis (Zhang *et al.*, 2016). Esta toxina está presente en todas las cepas, sin embargo, presenta diferencias en los alelos de la región señal (s1/s2), región media (m1/m2) y región intermedia (i1/i2) (Camilo *et al.*, 2017); diferentes combinaciones de estos alelos determinan la virulencia de la cepa. Se ha demostrado que aquellas cepas s1/m1 están relacionadas a una mayor inflamación del tejido e incremento de riesgo de cáncer gástrico, de igual forma se ha observado mayor asociación de cepas i1 con cepas CagA positivas (Kao *et al.*, 2016).

Por otro lado, *H. pylori* afecta la integridad de la mucosa gástrica ya que produce y libera proteínas proteolíticas como fosfatasas y mucinasas (Dunn *et al.*, 1997).

### 1.8 Ureasa

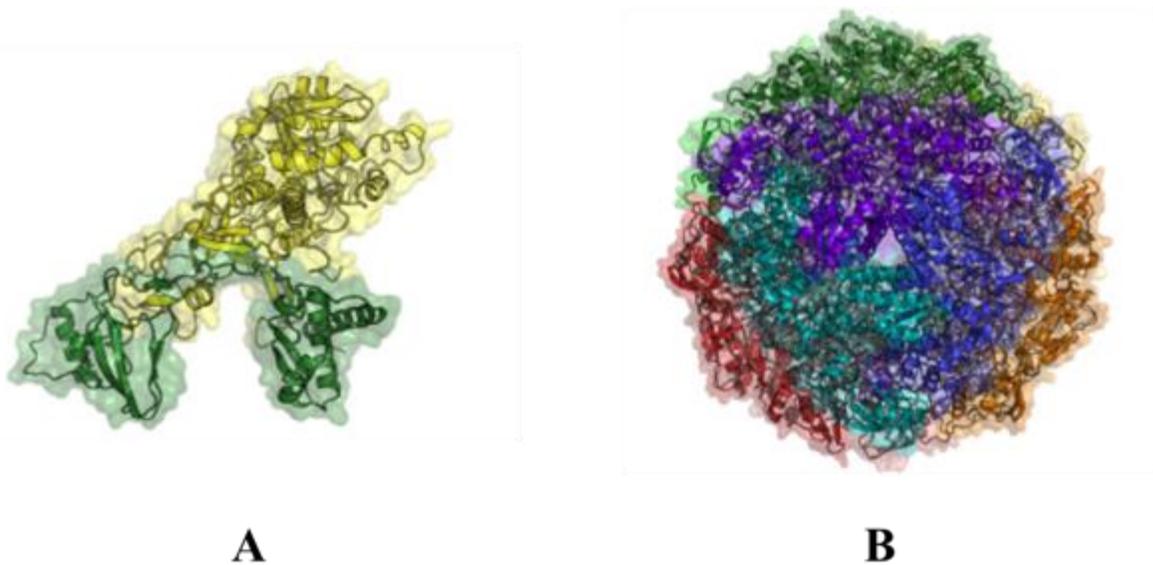
La ureasa es parte de un sistema de aclimatación al ácido de *H. pylori* que le permite sobrevivir al medio hostil que representa el pH ácido del estómago humano. La ureasa es una proteína muy abundante que representa del 10 al 15% del contenido proteico de la bacteria y es una enzima citosólica. Esta enzima pertenece a una superfamilia de amidohidrolasas que necesitan de un ion metálico en el sitio activo para ser funcional, en el caso de la ureasa es el níquel (Krajewska, 2009), y que cataliza la hidrólisis de urea de la siguiente manera:



Los productos iniciales de la hidrólisis de la urea catalizada por la ureasa son carbamato y amoniac, el primero se hidroliza espontáneamente en ácido carbónico y amoniac.

La síntesis de esta enzima se encuentra mediada por 7 genes; *ureA/ureB* que codifican para las subunidades estructurales alfa y beta; *ureE, ureF, ureG* y *ureH* codifican subunidades accesorias encargadas de acomodar 2 núcleos de  $\text{Ni}^{2+}$  en el sitio activo para activar a la enzima; finalmente se encuentra *ureI* que conforma una proteína tipo canal dependiente de pH que permite el paso de urea al citosol (Sachs *et al.*, 2005).

Estructuralmente, está formada por cuatro trímeros alfa/beta  $([\alpha\beta]_3)_4$ , que resulta en un dodecamero esférico (Schoep *et al.*, 2010) (Figura 6).

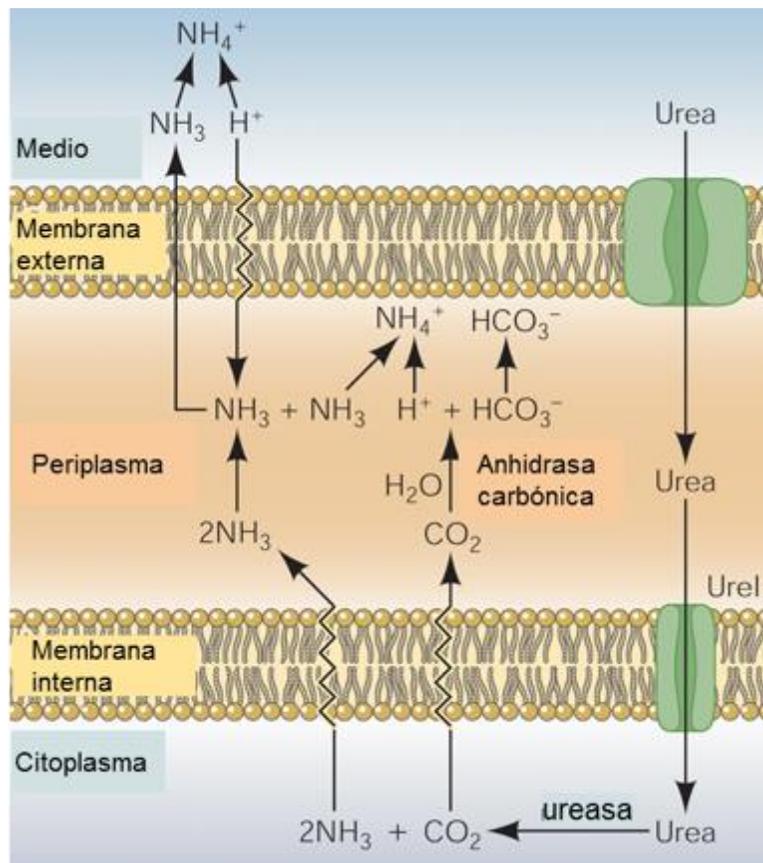


**Figura 6. Estructura cristalina de la ureasa de *H. pylori*.** En A) se observa una unidad funcional conformada por una subunidad  $\alpha$  (amarillo) y una subunidad  $\beta$  (verde); y en B) un oligómero funcional, cada dímero  $\alpha\beta$  se muestra en color diferente. Tomado de Kappaun *et al.* (2018).

### 1.8.1 Mecanismo propuesto de aclimatación al ácido.

De acuerdo con Sachs *et al.* (2005) la membrana externa de *H. pylori* es permeable a urea y a protones; debido a la acidificación del medio UreI, localizado en la membrana interna, es activado y permite el paso de la urea al citosol donde es hidrolizada por la ureasa liberando

$2\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$  que atraviesan la membrana interna hacia el periplasma; por un lado, el  $\text{CO}_2$  junto con una molécula de agua son convertidos en  $\text{HCO}_3^-$  por acción de la anhidrasa carbónica, mientras que el  $\text{NH}_3$  se une a los protones presentes, tanto en el espacio periplásmico como en el exterior más próximo a la bacteria, formando  $\text{NH}_4^+$  y de esta manera la bacteria logra mantenerse en condiciones de neutralidad (Figura 7).



**Figura 7. Modelo de aclimatación al ácido.** Tomado y modificado de Sachs *et al.* (2005).

Se ha demostrado que bacterias carentes de ureasa son incapaces de colonizar estómagos de puercos, aun cuando la secreción de ácido gástrico se encuentra suprimida, esto indica que la ureasa participa en otros procesos diferentes a los involucrados con la aclimatación al medio ácido (Eaton y Krakowka, 1994).

La aclimatación al ácido no es la única función relacionada con la ureasa, por mencionar algunas, se ha reportado que altas concentraciones de amoníaco, producto de la hidrólisis

de la urea por la ureasa, resultan en daño al epitelio gástrico; las alteraciones observadas principalmente son pérdida de vellosidades en sitios de adhesión, disrupción de uniones intercelulares y vacuolización (Rivas-Traverso y Hernández, 2000). También se ha relacionado a la ureasa con la respuesta inmune, ya que se observado que el amonio activa monocitos y linfocitos polimorfonucleares e induce la liberación de citocinas, con lo cual se potencia la respuesta inflamatoria y causa daño al epitelio (Mobley, 1996). Además, el epitelio gástrico infectado por *H. pylori* se caracteriza por la presencia de neutrófilos, mismos que al activarse generan  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , este último reacciona con  $Cl^-$  formando HOCl, que a su vez interacciona con el amonio producido con la ureasa creando  $NH_2Cl$ , este compuesto es altamente reactivo y tóxico para las células del epitelio, ya que debido a su capacidad lipofílica es capaz de penetrar membranas biológicas y oxidar los compuestos intracelulares (Suzuki *et al.*, 1992). Por último, se ha reportado que la ureasa actúa como agente pro-angiogénico (Olivera-Severo *et al.*, 2017).

Así mismo se ha demostrado que el nitrógeno del amonio liberado por la reacción es utilizado en la síntesis de proteínas, de tal forma que la ureasa se relaciona con la nutrición de la bacteria (Mobley, 1996).

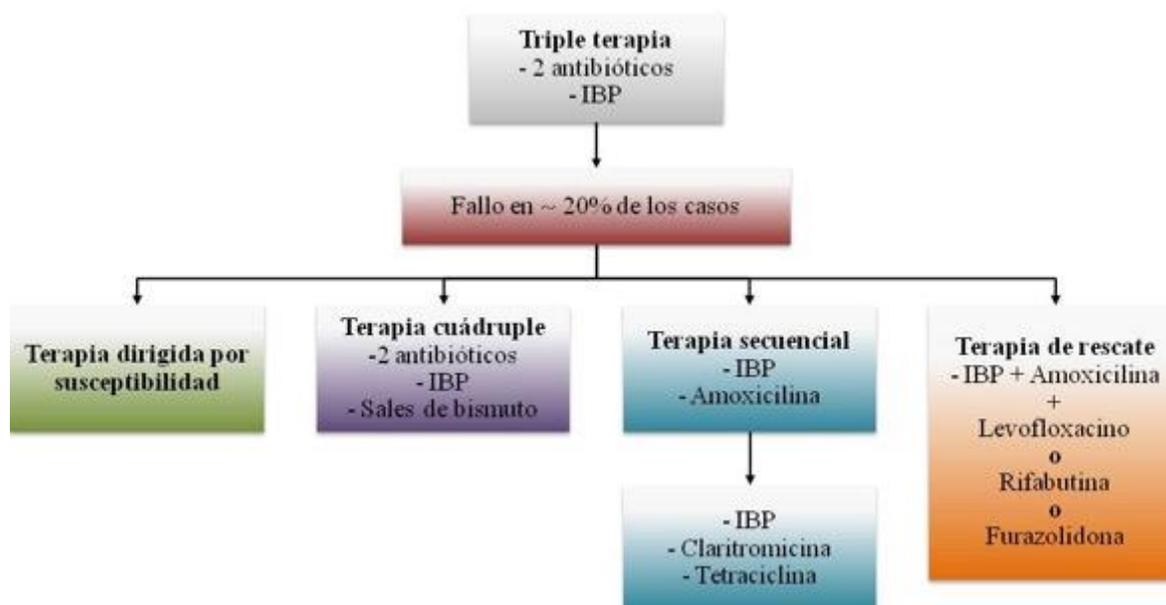
De esta forma, podemos decir que la ureasa es un mecanismo de patogenicidad importante para la bacteria, ya que se involucra en procesos relacionados con la colonización, la sobrevivencia y la virulencia de la misma.

### **1.9 Terapia actual**

De acuerdo con los Consensos de Maastricht V/Florence (Malfertheiner *et al.*, 2017) y de México (Bosques-Padilla *et al.*, 2018) la erradicación de *H. pylori* debe realizarse solamente cuando se ha confirmado la infección y además si el paciente presenta úlcera gástrica o duodenal, gastritis atrófica, linfoma tipo MALT, dispepsia no ulcerosa (zonas donde la prevalencia es  $>10\%$ ), después de la resección de cáncer gástrico o si el paciente tiene familiares de primer grado con historial de cáncer gástrico.

La terapia recomendada es la triple terapia que consiste en la combinación de dos antibióticos a elegir (claritromicina, amoxicilina, metronidazol o tetraciclina) con un inhibidor de la bomba de protones (IBP), sin embargo, se ha observado que solo es eficaz

en ~80% de los casos; en este último caso, se han establecido distintas terapias como segunda línea de tratamiento (Figura 8) en las cuales se cambian los antibióticos, se adiciona un tercer antibiótico y/o sales de bismuto, o bien, se alarga la duración de la prescripción (Vakil y Megraud, 2007; Marcus *et al.*, 2016).



**Figura 8. Terapias alternativas que se utilizan en caso de fallo en la erradicación de *H. pylori* con la triple terapia.** Modificado de Vakil y Megraud (2007).

La ineficacia de la terapia actual se debe principalmente a la creciente resistencia a los antibióticos por parte de *H. pylori*, esto es producto de sus efectos secundarios y adversos que hacen que el paciente no la cumpla correctamente. Otros factores que influyen en la falta de éxito de la terapia son su alto costo, el poco alcance de los antibióticos a los diferentes nichos que habita la bacteria, al desacoplamiento del mecanismo de acción con el ciclo de vida de la bacteria, entre otras razones (Vakil y Megraud, 2007; Marcus *et al.*, 2016; Chey *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta lo anterior, surge la necesidad de establecer terapias que contrarresten estas problemáticas, siendo una excelente opción el uso de compuestos naturales extraídos de plantas con valor medicina y/o nutricional.

## 1.10 Plantas medicinales con potencial anti-*H. pylori*

El uso de plantas para combatir enfermedades se remonta a la antigüedad como se puede observar en la herbolaría mexicana, la medicina tradicional china, la medicina aryaúvedica, la medicina unani, por mencionar algunas. Las plantas constituyen una fuente importante de compuestos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, entre otras, que resultan de interés farmacológico pues son una opción innovadora para el tratamiento de infecciones realizadas por bacterias que presentan resistencia a la terapia convencional como lo es *H. pylori*.

La búsqueda de propiedades contra *H. pylori* en las plantas es relativamente reciente, el primer reporte que se tiene es de Cassel-Beraud *et al.* (1991), y es a partir de entonces que este tipo de estudios ha aumentado considerablemente. Actualmente, existen ya múltiples estudios realizados con plantas a nivel mundial que reportan la actividad anti-*H. pylori* ya sea de extractos o bien de compuestos puros obtenidos a partir de las plantas; tan solo en la revisión realizada por Baker (2020) reporta más de 150 especies vegetales con actividad anti-*H. pylori*; Castillo-Juárez *et al.* (2009) reportan 53 especies de plantas mexicanas (11 incluidas en Baker, 2020), y O'Mahony *et al.* (2005), reportan 17 especies (5 contempladas en Baker, 2020) con esta misma actividad.

### 1.10.1 Antecedentes directos

*Curcuma longa* L. es una hierba perenne perteneciente a la familia Zingiberaceae. Se le conoce comúnmente con el nombre de cúrcuma, azafrán o azafrán de las Indias. Es una planta nativa del Sur de Asia, siendo cultivada principalmente en India y algunas áreas de África (Lim, 2016).

La cúrcuma, especia preparada a partir de la pulverización del rizoma de *C. longa*, se ha utilizado en India como condimento, preservante de alimentos e incluso para teñir textiles, además se ha utilizado ampliamente en medicina de países asiáticos desde hace más de 5000 años para el tratamiento de afecciones relacionadas con piel y con los sistemas pulmonar y gastrointestinal. Diversos estudios permitieron demostrar que la actividad de la cúrcuma está determinada por la presencia del polifenol curcumina (Aggarwal *et al.*, 2007).

En las últimas 3-4 décadas la curcumina ha sido tema de estudio y se ha encontrado que tiene diversas propiedades como antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, antienvjecimiento y antitumoral, entre otras; además se ha establecido que es un compuesto del cual se puede ingerir hasta 8-12 g/día sin efectos tóxicos, en conjunto, esto la hace un compuesto con potencial para el tratamiento de diversas enfermedades (Sanphui y Bolla, 2018).

Con respecto a *H. pylori* y las enfermedades que produce se han reportado algunos estudios con la curcumina.

El primer dato al respecto es de 1997, donde Münzenmaier *et al.* reportaron el efecto de la curcumina sobre la infección de células epiteliales gástricas con *H. pylori*, encontrando que con 20 µmol/l del compuesto se inhibe la activación del factor de transcripción NF-kappaB y por consiguiente la liberación de IL-8.

Mahady *et al.* (2002), reportaron por primera vez, el efecto anti-*H. pylori* tanto de un extracto metanólico elaborado con el rizoma, como de la curcumina. Para evaluar dicho efecto, emplearon el método de dilución en agar utilizando 19 cepas diferentes de *H. pylori* (de las cuales 14 fueron aislados clínicos). En cajas Petri con medio Müeller-Hinton adicionadas con diferentes concentraciones del extracto crudo o con la curcumina inocularon  $1 \times 10^6$  bacterias; después de tres días observaron que ambos inhibieron el crecimiento de la bacteria. En el caso del extracto determinaron un rango de CMI de 12.5 - 100 µg/ml, mientras que para la curcumina fue de 6.25 – 12.5 µg/ml.

En 2005, O'Mahony *et al.* evaluaron el efecto de una infusión del rizoma de *C. longa* sobre el crecimiento y la adherencia de *H. pylori*. Para determinar el efecto bactericida utilizaron el método de recuento de colonias viables, para ello incubaron  $1 \times 10^6$  bacterias en 900 µl de la infusión (100 mg/ml) por diferentes tiempos, a continuación, realizaron diluciones 1:10 y colocaron 100 µl de cada dilución en cajas de agar sangre las cuales fueron incubadas por tres días; sus resultados mostraron que la infusión de *C. longa* eliminó al 100% de las bacterias en solo 15 min. También evaluaron el efecto de la infusión (50 mg/ml) sobre la adherencia de *H. pylori* ( $2 \times 10^7$  bacterias) a células del epitelio gástrico de secciones de estómago, que expresaban únicamente antígenos Le<sup>a</sup> o Le<sup>b</sup>, determinaron que en una hora

la infusión de la planta inhibió la adherencia de las bacterias en 61.9% y 62.3% para secciones con Le<sup>a</sup> y Le<sup>b</sup>, respectivamente; debido a que los porcentajes de inhibición de ambos tipos de antígenos no son significativamente diferentes, ellos proponen que el extracto puede inhibir a la adhesina BabA, cuyo ligando es Le<sup>b</sup>, pero también debe tener efecto sobre otras adhesinas.

En 2006, Han *et al.* miden la actividad antimicrobiana de la curcumina mediante el método de dilución en agar con las cepas de *H. pylori* ATCC43504 y SS1, inoculando 10<sup>8</sup>CFU/ml e incubando las cajas por 3 días obteniendo una MIC = 16 µg/ml.

En un estudio de la India (De *et al.*, 2009) se evaluó el efecto de la curcumina pura sobre el crecimiento de 65 aislados clínicos de la bacteria por el método de dilución en agar; la concentración mínima inhibitoria (CMI) promedio fue de 15 µg/ml con valores máximos de 50 µg/ml y mínimos de 5 µg/ml. Los mismos autores realizaron también un ensayo con un modelo murino para determinar si la curcumina erradicaba a *H. pylori*. Los resultados mostraron que con la administración de 25 mg/kg de curcumina diariamente por 7 días, después de 14 días de la infección se logra la erradicación; esto fue demostrado por la desaparición del gen de *H. pylori* *Vac A* amplificado por la técnica de PCR a partir del tejido gástrico de los ratones experimentales. Por último, reportaron el efecto restaurativo de la mucosa gástrica a nivel histológico del tratamiento con curcumina, ya que en cortes de tejido gástrico de ratones tratados con curcumina no se observó interrupción de la mucosa ni de la submucosa, tampoco había atrofia de glándulas gástricas, ni infiltrado de células inflamatorias en la submucosa como el que se encontró en el epitelio de ratones no tratados.

Por otro lado, Santos *et al.* (2015) reportaron que la curcumina tiene efecto sobre la expresión de los genes que codifican para mediadores de la respuesta antiinflamatoria ante la presencia de *H. pylori*. Los autores realizaron el análisis por PCR en tiempo real de la expresión de 84 genes involucrados en la respuesta inflamatoria e inmune de muestras de tejido gástrico de ratones infectados comparados con aquellos que recibieron curcumina (500 mg/kg) durante 6 y 18 semanas posteriores a la infección. Los resultados mostraron que a la 6a semana, en el tejido proveniente de los ratones infectados y no tratados, 69 de los 84 genes se expresaron 3 veces más con respecto al control; mientras que en el tejido de los ratones tratados con curcumina se observó que los genes de citocinas, quimiocinas y

receptores tipo Toll se expresaron 100, 70 y 230 veces menos, respectivamente, que en el epitelio de los no tratados, con una tendencia a volver a los niveles normales a la semana 18. Estos datos indican claramente el potencial antiinflamatorio de la curcumina.

En un estudio realizado en 2017, Judaki *et al.* evaluaron el efecto oxidativo y antiinflamatorio de la curcumina en combinación con la triple terapia en pacientes con gastritis crónica e infección con *H. pylori*. Para ello designaron dos grupos, uno control el cual recibió la triple terapia (omeprazol/20 mg, amoxicilina/1 g, y metronidazol/800 mg) dos veces al día por una semana y un grupo tratamiento que también recibiría el mismo esquema más 1 tableta de curcumina (700 mg) tres veces al día durante 4 semanas. Tomaron muestras de sangre y biopsias de la zona antral del estómago antes y al concluir el tratamiento para medir marcadores de referentes a estrés oxidativo y observar cambios histopatológicos en la mucosa gástrica. Para confirmar la erradicación de la bacteria utilizaron la prueba de urea en aliento ( $C^{13}$ -UBT) cuatro semanas post tratamiento. Los resultados mostraron que con el régimen con curcumina se reducían significativamente los niveles de malondialdeído y glutatión peroxidasa, la capacidad antioxidante total, el daño oxidativo al DNA en comparación con lo observado al inicio del tratamiento y en comparación con los valores finales del grupo tratado únicamente con triple terapia. Esto lo confirman histológicamente, observando que la actividad inflamatoria (infiltración de neutrófilos) y la inflamación crónica (infiltración linfocitos y células plasmáticas) se redujeron según lo establecido en el sistema de Sídney; aunado a esto, en las evaluaciones endoscópicas observaron un mejoramiento de la mucosa gástrica (de acuerdo al estándar de Lanza modificado). Por último, obtuvieron un 86.4% de erradicación de *H. pylori* al adicionar curcumina al régimen, que fue estadísticamente diferente a lo obtenido con la triple terapia (74.5%). Con lo anterior los autores concluyen que la curcumina tiene un efecto antioxidante sobre los marcadores de estrés oxidativo, un efecto antibacteriano sobre *H. pylori* y tasa de erradicación mayor que con la triple terapia sola, un efecto anticancerígeno al reducir el daño oxidativo del ADN, y reparador de los daños causados a la mucosa gástrica; y destacan que el uso del compuesto es apropiado y seguro para el tratamiento de pacientes.

La infección por *H. pylori* se relaciona con un aumento en la expresión de COX-2, proteína involucrada en la inflamación de la mucosa, es por esto que Santos *et al.* (2018) estudiaron el efecto de la curcumina en la inhibición de esta enzima empleando un modelo murino que inocularon con 0.1 ml de *H. pylori* SS1 ( $10^8$  CFU/ml) durante tres días. El régimen de tratamiento se administró tres veces por semana y la duración del tratamiento fue de 6, 18 y 27 semanas post infección. Los grupos experimentales fueron: grupo infectado (IG) que se administró con 0.5 ml de PBS, el grupo infectado + curcumina (IG+C) administrado con 0.5 ml de solución lipídica de curcumina (500 mg/kg) y el grupo control (CG) que no estaba infectado. Los resultados por histoquímica, confirmaron la sobreexpresión de COX-2 tras la infección por la bacteria (IG) y una disminución en sus niveles en el grupo IG+C. Finalmente, mediante PCR demostraron que la expresión de COX-2 fue hasta 50,000 veces mayor en el grupo IG en comparación al grupo CG; mientras que el grupo IG+C presentaba 8,000 veces menos que el grupo infectado (IG). Con base en estos resultados los autores destacan el efecto antiinflamatorio de la curcumina, mencionando que la administración de este compuesto presenta ventajas ante los AINEs y sus efectos secundarios.

Recientemente, Barari *et al.* (2021) evaluaron el efecto coadyuvante de la curcumina junto a la triple terapia (claritromicina, amoxicilina y omeoprazol). Eligieron pacientes infectados con *H. pylori* (biopsias positivas a RUT y suero positivo a IgG-*H. pylori*) y los separaron en dos grupos, ambos recibieron la triple terapia por dos semanas, y el grupo tratamiento recibió además una capsula de curcumina (500 mg) al día, mientras que el grupo control recibió un placebo. Terminado el esquema recibieron IBP por 90 días. Dos semanas después de haber concluido el tratamiento realizaron UBT-13C, encontrando que la tasa de erradicación no era significativamente diferente entre ambos grupos, con lo cual concluyen que la adición de curcumina a la triple terapia no es efectiva para el tratamiento de la infección con *H. pylori*.

Pese al potencial farmacológico y anti-*H. pylori* que la curcumina presenta, se ha encontrado que es un compuesto inestable (se descompone rápidamente en >90% en media hora en un amortiguador de fosfato a pH 7.2), es muy poco soluble en agua (coeficiente de solubilidad en agua de 7.8 mg/l), es pobremente absorbido y rápidamente metabolizado y

eliminado por el organismo (vida media de 30 a 45 min), lo que impide su uso como fármaco (Wang *et al.*, 1997; Sanphui y Bolla, 2018).

Considerando estos problemas se ha optado por realizar modificaciones en la estructura química de la curcumina que podrían ayudar a contrarrestar todos sus inconvenientes (Sanphui y Bolla, 2018). Uno de los tipos de modificaciones que se ha realizado, considerando la naturaleza quelante de la curcumina, corresponde a la síntesis de complejos metálicos; varios estudios ya han reportado propiedades terapéuticas de algunos de estos complejos metálicos y en algunos casos mejores que con respecto a la curcumina sola (Tabla 2). Por ejemplo, Thompson y colaboradores (2004) sintetizan y caracterizan un complejo de curcumina vanadilo ( $\text{VO}(\text{Cur})_2$ ) y estudian la actividad anticancerígena, antiartrítica y anti-proliferativa del mismo. De acuerdo a las  $\text{IC}_{50}$ s que obtienen, concluyen que el compuesto metálico presenta una actividad anti-cancerígena dos veces mejor que la curcumina sola (19  $\mu\text{M}$  y 35  $\mu\text{M}$ , respectivamente); en el caso de la actividad antiartrítica, encuentran que es más del doble de eficaz que la curcumina (4.4  $\mu\text{M}$  y 14  $\mu\text{M}$ , respectivamente), por último, fue más de cuatro veces mejor que la curcumina en la actividad anti-proliferativa (2.9  $\mu\text{M}$  y 13  $\mu\text{M}$ , respectivamente).

**Tabla 2. Resumen de estudios realizados con complejos metálicos de curcumina y los efectos terapéuticos que presentan.**

Referencia	Compuesto	Efecto	Modelo
Sharma <i>et al.</i> , 1987	[Au(Cur) <sub>2</sub> ]Cl	Anti-artritis	Volumen de tejido inflamado. Porcentaje de protección en ratón (30 mg/kg/día)
Thompson <i>et al.</i> , 2004	VO(Cur) <sub>2</sub>	Anticancerígeno Antiartrítico Anti-proliferativo	Viabilidad celular. Ensayo MTT. (IC <sub>50</sub> ) Células de linfoma L1210 (19 μM) Sinoviocitos HIG82 (4.4 μM) Células de musculo liso A7r5 (2.9 μM)
Song <i>et al.</i> , 2009	M(Cur) <sub>3</sub> 1,10-fenantrolina-5,6-diona (M= <b>Eu</b> , <b>Sm</b> , <b>Dy</b> )	Anti-bacterial	Inhibición del crecimiento. Diámetro de halo de inhibición(mm)  <i>Hay bacillus</i> ( <b>Eu</b> = 19, <b>Sm</b> = 20 y <b>Dy</b> = 23) y <i>Escherichia coli</i> ( <b>Eu</b> = 17, <b>Sm</b> = 17 y <b>Dy</b> = 19) Curcumina = 6 mm para las 2 bacterias
Caruso <i>et al.</i> , 2012	( <i>p</i> -Cimeno) <b>Ru</b> (curcuminato)Cl	Anticancerígeno	Viabilidad celular. Ensayo MTT (IC <sub>50</sub> ).  Líneas celulares cancerígenas: HCT116 (13.98 μM), MCF7 (19.58 μM) y A2780 (23.38 μM)
Hussain <i>et al.</i> , 2013	[La(R-tpy)(Cur)(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]	Fotocitotóxico	Viabilidad celular. Ensayo MTT (IC <sub>50</sub> ).  Células HeLa (4.6 μM)
Pucci <i>et al.</i> , 2013	[(bpy-9) <b>Zn</b> (Cur)]BF <sub>4</sub> [(1,10-fenantrolina) <b>Zn</b> (Cur)(Cl)]	Anti-proliferativo	Viabilidad celular. Ensayo MTT (IC <sub>50</sub> ).  Células de neuroblastoma SH-SY5Y (7.9 μM y 8.75 μM)

**Tabla 3. Continuación**

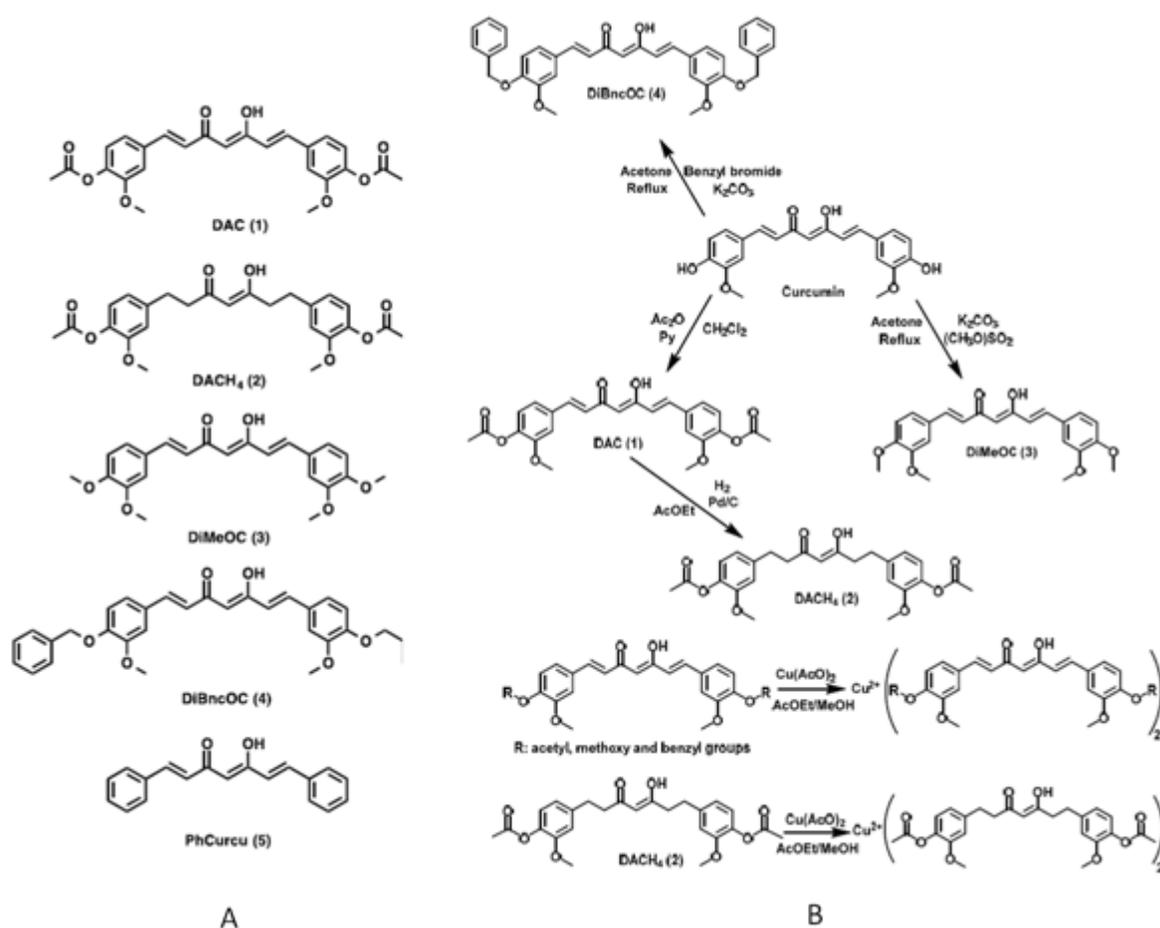
Meza-Morales <i>et al.</i> 2019a	DAC- <b>Cu</b> , DACH <sub>4</sub> - <b>Cu</b> y DiMeOC- <b>Cu</b>	Antioxidante	Cuantificación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (IC <sub>50</sub> )
			DAC- <b>Cu</b> (1.55 μM), DACH <sub>4</sub> - <b>Cu</b> (7.93 μM) y DiMeOC- <b>Cu</b> (9.35 μM)
		Anticancerígeno	Solo 25 μM DiMeOc- <b>Cu</b> inhibió a las siguientes líneas celulares cancerígenas (% inhibición) PC-3 (100%) K 562 (75.8%) HCT-15 (74.5%)
Meza-Morales <i>et al.</i> 2019b	DAC <sub>2</sub> - <b>Cu</b> , DAC <sub>2</sub> - <b>Mg</b> , DAC <sub>2</sub> - <b>Mn</b> y DAC <sub>2</sub> - <b>Zn</b>	Antioxidante	Cuantificación TBARS (IC <sub>50</sub> ) <b>Cu</b> y <b>Zn</b> =1.58 μM; <b>Mg</b> =2.03 μM; <b>Mn</b> = 1.24 μM
		Anticancerígeno	Viabilidad celular. Ensayo de SRB (IC <sub>50</sub> ) Líneas celulares cancerígenas: HCT-15 ( <b>Mg</b> = 11.59 μM, <b>Zn</b> = 7.21 μM y <b>Mn</b> =15.54 μM) MCF-7 15 ( <b>Mg</b> = 5.72 μM, <b>Zn</b> = 4.92 μM y <b>Mn</b> =13.46 μM) SKLU-115 ( <b>Mg</b> = 8.87 μM, <b>Zn</b> = 4.79 μM y <b>Mn</b> =9.23 μM)

En negritas se destaca el ion metálico empleado.

Solo se mencionan los compuestos metálicos con resultados positivos a las actividades mencionadas en cada estudio.

Thompson *et al.* (2004), Hussain *et al.* (2013) y Meza-Morales *et al.* (2019 a y b) son los únicos en comparar la actividad de compuestos metálicos con la actividad de la curcumina sin modificar.

En el 2019, Meza-Morales *et al.* (2019a) sintetizan cinco nuevos complejos homolépticos de curcumina, para ello utiliza cinco diferentes curcuminoides como ligandos que acopla con un ion de Cu (Figura 9).

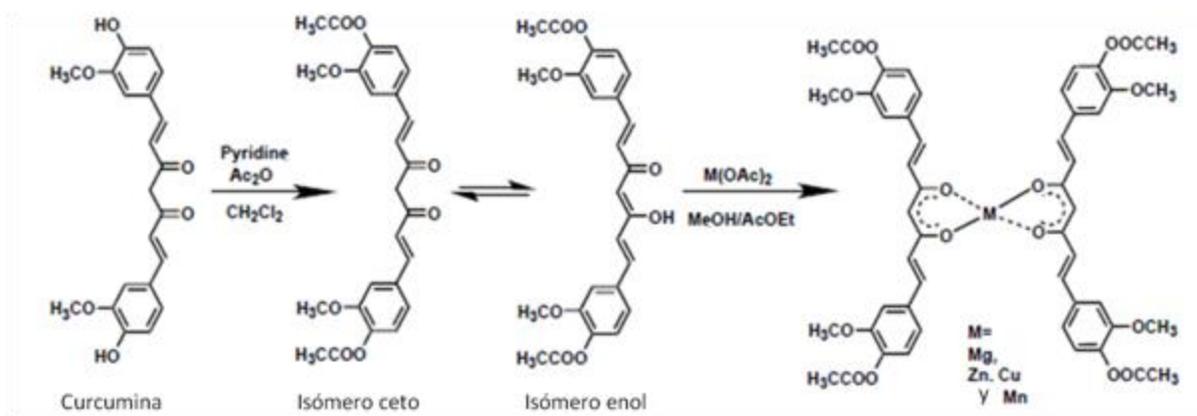


**Figura 9. Esquema de formación de derivados de curcumina.** A) Ligandos utilizados y B) ruta para la síntesis de ligandos y complejos metálicos. Tomado y modificado de Meza-Morales *et al.* (2019a).

Los autores comparan el efecto antioxidante de estos complejos con los ligandos sin acoplar y con la curcumina, cuantificando las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) en homogenizados de cerebro de ratón. Los resultados obtenidos mostraron que la diacetil curcumina (DAC) es el único ligando que presenta una actividad comparable con la curcumina sola; también que la actividad antioxidante se ve afectada al bloquear o

modificar los grupos vinil (fenoles). De los compuestos probados se observó un aumento en la actividad antioxidante de DACH<sub>4</sub>-Cu y DiMeOC-Cu respecto a su ligando (DACH<sub>4</sub> y DiMeOC). De igual forma determinó que de DAC-Cu, DACH<sub>4</sub>-Cu y DiMeOC-Cu presentaron una IC<sub>50</sub> menor que sus respectivos ligandos, indicando un mayor poder antioxidante. Por otro lado, también determinaron el efecto citotóxico de los compuestos en 5 líneas celulares de cáncer; encontrando que los complejos metálicos en general presentan una menor citotoxicidad con respecto a sus ligandos esto resulta contrario a lo reportado para compuestos con Cu, lo cual indicaría que la actividad antitumoral y anticancerígena está relacionada con la disponibilidad de los grupos fenol.

Poco tiempo después, el mismo grupo de trabajo sintetiza complejos homolépticos de curcumina utilizando iones bivalentes de Mg, Zn, Cu y Mn (Meza-Morales *et al.* (2019b); para ello diacetilan una molécula de curcumina que denominan DAC, esta molécula se puede encontrar tanto en su forma ceto como enol. Posteriormente, acoplan dos moléculas de DAC con el ion metálico añadiendo una solución metanólica de acetato de cada metal produciendo los compuestos DAC2-Cu, DAC2-Mg, DAC2-Mn y DAC2-Zn. La formación de los compuestos se facilita por la actividad quelante del enlace β-dicetona que presenta DAC. Por estudios de resonancia magnética nuclear de protones observan que los complejos metálicos se forma con ligandos en su forma enol y estudios de cristalografía hacen evidente que la formación de los compuestos sigue una relación es 1:2 (metal:ligando) para todos los iones utilizados (Figura 10).



**Figura 10. Ruta de síntesis de DAC y derivados metálicos.** Tomado y modificado de Meza-Morales *et al.* (2019b).

De igual forma evalúan el efecto antioxidante mediante la cuantificación de TBARS y destacan que los cuatro complejos metálicos (DAC<sub>2</sub>-Cu, DAC<sub>2</sub>-Mg, DAC<sub>2</sub>-Mn y DAC<sub>2</sub>-Zn) presentaron mayor efecto que DAC y que los valores de IC<sub>50</sub> son comparables con el obtenido con el control positivo  $\alpha$ -tocoferol. En cuanto a la toxicidad, probaron el efecto citotóxico de los complejos en tres líneas celulares cancerígenas y se observó que también se potencia el efecto al aplicar los complejos metálicos, pero destacan que el compuesto con Cu no presentó efecto; así mismo, realizaron un estudio de toxicidad aguda en ratones, los resultados mostraron que la administración de 3 g/kg de ratón no causó mortalidad o cambios significativos en el peso de los roedores, únicamente los compuestos DAC<sub>2</sub>-Cu y DAC<sub>2</sub>-Mn produjeron que el pelaje se erizara.

Recientemente en nuestro laboratorio se determinó que la diacetilcurcumina (DAC) y estos compuestos metálicos derivados de DAC inhiben el crecimiento de *H. pylori* (datos aún no publicados), por lo que el trabajo realizado en esta tesis da continuidad a estos estudios con el interés de determinar su actividad sobre algunos factores de patogenicidad de la bacteria con la intención de dilucidar su mecanismo de acción y poder así evaluar si es factible su uso como terapia.

## **II. Hipótesis**

El mecanismo de acción por el que se genera la actividad anti-*H. pylori* de los compuestos curcumina, diacetilcurcumina y 4 complejos metálicos de diacetilcurcumina es mediante la inhibición de la ureasa de la bacteria.

## **III. Objetivos**

### **3.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de los compuestos curcumina, diacetilcurcumina y 4 complejos metálicos de diacetilcurcumina sobre la actividad *in vitro* de la ureasa de *Helicobacter pylori*.

### 3.2 Objetivos particulares

Mantener viable un cultivo de *H. pylori* y realizar su identificación.

Obtener una preparación enriquecida de la enzima ureasa por centrifugación diferencial a partir de un cultivo de *H. pylori* para realizar los experimentos de inhibición de los compuestos seleccionados.

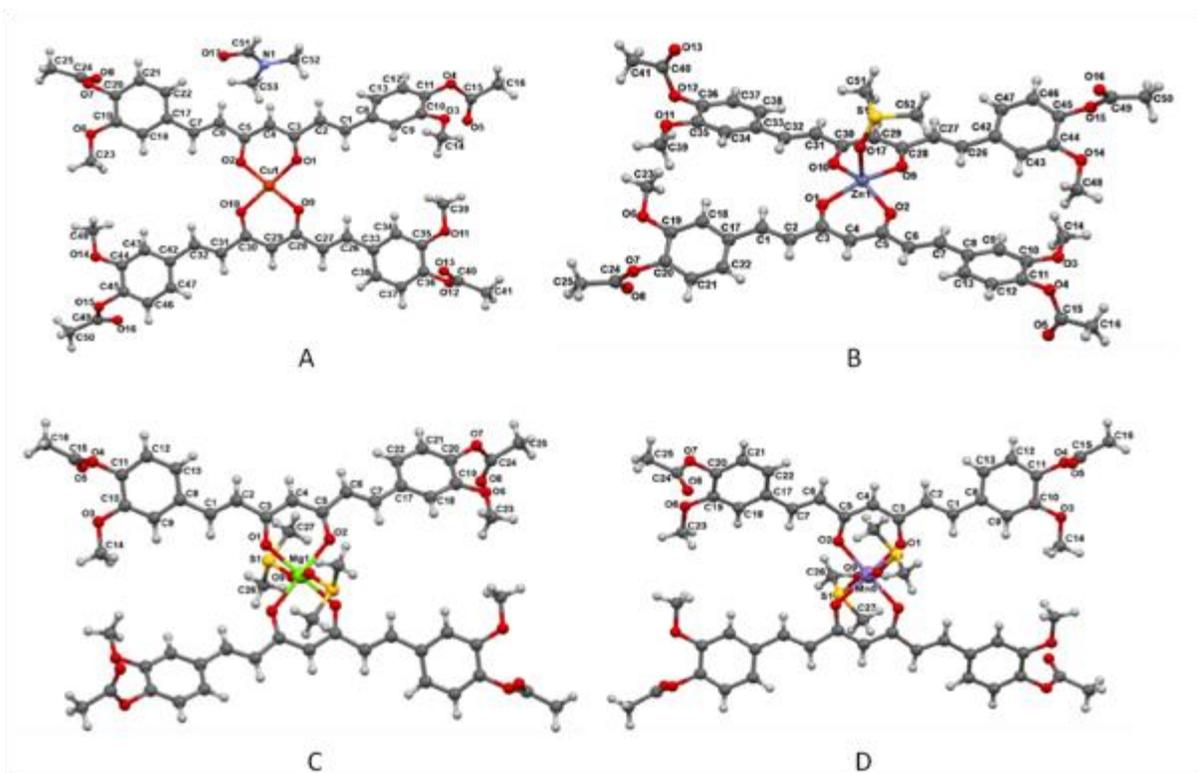
Cuantificar el porcentaje de inhibición de la actividad de la ureasa de *H. pylori* en presencia de curcumina, diacetilcurcumina y 4 complejos metálicos de diacetilcurcumina mediante ensayos colorimétricos.

## IV. Metodología

### 4.1 Compuestos

La curcumina y sus derivados utilizados en este trabajo fueron donados por el Dr. Raúl Enríquez Habib adscrito al Instituto de Química de la UNAM. La descripción de la preparación de los complejos se puede consultar en la publicación de Meza-Morales *et al.* (2019b).

Los compuestos ensayados fueron los siguientes: Curcumina, Diacetilcurcumina (DAC) y 4 derivados metálicos de DAC homolépticos, que se denominan de acuerdo al ion que presentan como DAC<sub>2</sub>-Cu, DAC<sub>2</sub>-Mg, DAC<sub>2</sub>-Mn y DAC<sub>2</sub>-Zn; las estructuras se presentan en la Figura 11.



**Figura 11. Estructura de los compuestos derivados de DAC que se utilizaron.** Se observa cómo cada compuesto está formado por dos moléculas de curcumina diacetilada (DAC) unidas entre sí por un ion metálico. A) DAC<sub>2</sub>-Cu; a la periferia se observa una molécula de dimetilformamida (DMF) que no participa en la coordinación del metal con DAC, B) DAC<sub>2</sub>-Zn, C) DAC<sub>2</sub>-Mg y D) DAC<sub>2</sub>-Mn. En amarillo se representan los átomos de azufre pertenecientes a las moléculas de DMSO utilizado como solvente. Tomadas y modificadas de Meza *et al.* (2019b).

#### 4.2 Cultivo e identificación de *H. pylori*

Se utilizó la cepa ATCC 43504 de *H. pylori* cultivada en agar Casman-sangre suplementado con 10 mg/l de vancomicina, 2 mg/l de anfotericina, 2.5 mg/l de polimixina B y 5 mg/l de trimetoprima, por 24 h a 37°C en condiciones microaerofílicas (10% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>). Las bacterias se recolectan y almacenan en caldo Brucella suplementado con suero fetal bovino (10%), glicerol (10%) y vancomicina (10 mg/l) a -70°C hasta su utilización. Adicionalmente, a cada lote de bacterias se le realizaron pruebas de identificación bioquímica (ureasa, catalasa y oxidasa), tinción de Gram y se verificó su morfología al microscopio óptico.

**Prueba rápida de ureasa.** Se utiliza una solución de urea 6 M a pH 7.0, 0.05% de rojo de fenol, que presenta una coloración amarillo-durazno. Se coloca una gota de la solución sobre un portaobjetos y se añade una pequeña asada de cultivo sólido o una gota del cultivo fresco. La prueba resulta positiva cuando se observa un cambio de coloración a rojo-rosa, dicho viraje de coloración se debe a la alcalinización del medio por el amoníaco liberado de la hidrólisis de la urea por la ureasa (Mobley *et al.*, 1995).

**Prueba de catalasa.** Se colocan unas gotas de peróxido de hidrógeno al 40% (comercial) sobre un portaobjetos y se le adiciona una muestra del cultivo fresco. La prueba resulta positiva si se observa la formación de burbujas debido a la liberación de oxígeno por la descomposición del peróxido de hidrógeno por la catalasa (Wheelis, 2008).

**Prueba de oxidasa.** *H. pylori* presenta una citocromo C oxidasa como parte de su cadena respiratoria, la cual oxida al citocromo C en condiciones normales. En la prueba de oxidasa se utiliza una placa DrySlide Oxidase (DIFCO) que contiene N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina diclorhidrato (TMPPD) reducido e incoloro. En presencia de la bacteria, se observa una coloración azul en la placa, indicando su positividad, esto se debe a que la oxidasa oxida al citocromo C, que a su vez oxida al TMPPD presente en la placa provocando el cambio de color.

**Tinción de Gram.** Se realiza una tinción Gram estándar a un frotis del cultivo previamente fijado en un portaobjetos. Si se observan bacterias rojizas se trata de un microorganismo Gram negativo. Esto se debe a las diferencias en el espesor de la capa de peptidoglicano; en las Gram negativas esta capa es fina lo que permite que el complejo cristal violeta-lugol sean lavados con el etanol para que posteriormente ocurra la tinción con safranina (Smith y Hussey, 2005). Adicionalmente, se verifica al microscopio óptico la morfología típica de la bacteria.

#### 4.3 Extracción y purificación parcial de la ureasa de *H. pylori*

Se cultivaron bacterias en 60 ml de medio Müller-Hinton Broth adicionado con  $\beta$ -ciclodextrina (2 g/l) vancomicina (10 mg/l), trimetoprima (5 mg/l), anfotericina (2 mg/l) y polimixina (2.5 mg/l) en las condiciones microaerófilas descritas en la sección 2.2, con una agitación de 150 rpm, hasta llegar a una  $A_{600nm} = 0.6$  a 0.8, correspondiente a la mitad

de la fase logarítmica de crecimiento. Para colectar las bacterias, el medio se centrifugó a 4,500 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado se lavó dos veces con buffer salino de fosfatos (PBS 1X) a pH 7.3 por centrifugación. Las bacterias se resuspendieron en 4 ml de PBS a 4°C y se añadieron 100 µl de un coctel de inhibidores de proteasas (Roche®) para ser sonicadas a 4°C a una potencia de 40 W (Sonicador Branson 250) en tres intervalos de 30 s con descanso de 30 s entre cada uno de ellos. El lisado producido se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante resultante se utilizó como fuente de ureasa parcialmente pura. Se alicuotó en tubos de microcentrifuga y se almacenó a 4°C, en estas condiciones la enzima mantiene su actividad por 2 semanas.

#### **4.3.1 Cuantificación de proteína**

Para determinar la concentración de proteína en el sobrenadante utilizado como fuente de la ureasa se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) con algunas modificaciones. Este método se basa en la unión del colorante azul de Coomassie G-250 en su forma aniónica a los residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina de las proteínas, esta unión resulta en un cambio de la absorbancia máxima del colorante, pasando de 470 nm a 592 nm (Bradford, 1976; Olson y Markwell, 2007). La reacción se llevó a cabo en tubos de ensayo, se colocaron 5 y 10 µl del sobrenadante, 100 µl de reactivo de Bradford y se ajustó el volumen a 1 ml con agua destilada. Se incubó la reacción por 5 min a temperatura ambiente y se lee la reacción a 595 nm. Como estándar se utilizó una curva de albúmina de suero bovino (BSA).

#### **4.3.2 Determinación de actividad enzimática**

La actividad de la ureasa se determinó cuantificando la cantidad de NH<sub>3</sub> liberado por la hidrólisis de la urea utilizando el método de Berthelot (Weatherburn, 1967) con algunas modificaciones, respecto a una curva patrón de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En este método el amoniaco reacciona con el hipoclorito en medio básico formando monocloramina, la cual en presencia de fenol produce indofenol de un color azul que es posible detectarlo espectrofotométricamente (Díaz-Portillo *et al.*, 1997). El ensayo se realiza en una placa ELISA de 96 pozos, se colocan 100 µl de la fracción enriquecida de ureasa (equivalentes a 3 µg de proteína parcialmente pura en PBS) y se afora a un volumen de 130 µl con PBS a pH 7.3. La reacción se inicia al añadir el sustrato, 20 µl de urea 37.5 M (concentración final

de 5 M), se incubó por 10 min a 37°C. Se detiene la reacción añadiendo los reactivos que darán el color: 50 µl de solución A (fenol 0.714 M) y 100 µl de solución B (NaOH 0.714 M/ NaOCl 0.357 M, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 600 nm en un lector de ELISA Modelo BioRad ® 2550 Como control positivo de la inhibición se utilizó el ácido acetohidroxámico (AHA), compuesto quelante que se une a los iones de Ni<sup>2+</sup> de la ureasa impidiendo la activación de la enzima (Kakkar *et al.*, 2006).

#### **4.3.3 Efecto de la curcumina y de los compuestos derivados de la curcumina sobre la ureasa**

*Preparación de compuestos.* Justo antes de llevar a cabo los experimentos, tanto el AHA, como los compuestos a probar se disuelven en DMSO. De los compuestos a ensayar se prepararon diferentes soluciones en DMSO para obtener concentraciones finales de 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.25 y 62.5 µg/µl. Para AHA se utilizaron las siguientes concentraciones finales 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/µl.

*Ensayo de Inhibición.* Para determinar el efecto de los compuestos problema sobre la enzima se usó como base el ensayo descrito en la sección anterior. En un volumen final de 130 µl se incubaron la ureasa (100 µl) y el compuesto (10 µl del compuesto a probar o 20 µl del control positivo AHA), ajustando el volumen con PBS. La ureasa se preincubó en presencia de los compuestos durante 5 min, posteriormente se inició la reacción enzimática añadiendo 20 µl de urea e incubando por 10 min, para posteriormente añadir los sustratos de la reacción colorimétrica. El efecto de los compuestos sobre la actividad de la ureasa se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de ureasa (\%)} = \frac{Af \times 100}{Ai}$$

donde *Af* es la actividad enzimática específica de la ureasa en presencia del compuesto y *Ai* sin el compuesto, la cual se toma como el 100%.

Si se obtenía una actividad de ureasa por debajo del 100%, se interpretó como un efecto inhibitorio por parte del compuesto probado, de tal forma que se empleó la siguiente ecuación para determinar el porcentaje de inhibición:

$$\text{Inhibición de ureasa (\%)} = 100 - \text{Act. de ureasa (\%)} \text{ del compuesto inhibitorio}$$

Por otro lado, si la se calculaba una actividad por encima del 100%, el efecto era activador y para calcular el porcentaje de activación se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Activación de ureasa (\%)} = \text{Act. de ureasa (\%)} \text{ del compuesto activador} - 100$$

**Cálculo de Concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>).** Para los compuestos que presentaron actividad inhibitoria de la ureasa se determinó la IC<sub>50</sub>, para este fin, se graficó el log de la concentración del compuesto vs el porcentaje de inhibición, la línealización obtenida permite fácilmente el cálculo de la concentración media inhibitoria.

De acuerdo a la ecuación de la recta obtenida, la IC<sub>50</sub> sería:

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

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

donde  $m$  es el valor de la pendiente y  $b$  es el punto de intersección con el eje y.

#### 4.4 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó al menos 3 veces por cuadruplicado en cada ocasión. En los casos en que se realizaron más de 3 repeticiones se indicó en el pie de figura. Los porcentajes de inhibición de la ureasa se presentan como la media ( $\pm$  desviaciones estándar).

Para el efecto de los compuestos se realizó un análisis de varianza (ANOVA, complemento Real Statistics de Excel) de un factor con un nivel de significancia del 0.05%. Si los datos (densidad óptica) no presentaban una distribución normal, se realizaba su equivalente no paramétrico, prueba de Kruskal-Wallis (Real Statistics) con el mismo nivel de significancia. En caso de presentar diferencia significativa se realizó una comparación de medias, para datos con distribución normal se empleó la prueba de Nemenyi (Real Statistics) y para datos sin distribución normal se empleó la prueba de Tukey HSD/Kramer (Real Statistics), utilizando un alfa de 0.05% en cualquiera de los casos.

Por otro lado, para comprobar que los compuestos AHA, DAC<sub>2</sub>-Cu y DAC<sub>2</sub>-Zn presentan porcentajes de inhibición estadísticamente diferentes, se calculó la densidad óptica obtenida al aplicar 62.5 µg/ml de AHA con ayuda de la ecuación de la recta (Excel 2010); posteriormente se corroboró la homocedasticidad y normalidad de los datos de los tres grupos (AHA, DAC<sub>2</sub>-Zn y DAC<sub>2</sub>-Cu) aplicando una prueba de Levene (Excel 2010) y prueba Kolmogorov-Smirnov (GraphPad Prism 8.0.1), respectivamente. Al ser datos homocedásticos y con distribución normal se realizó un ANOVA de un factor (Real Statistics).

## **V. Resultados y Discusión**

### **5.1 Cultivo e identificación de *H. pylori*.**

Para iniciar un cultivo de *H. pylori* es necesaria su reactivación después de haber sido almacenadas a -70°C por un largo periodo, por lo que se sembraron en cajas de agar Casman-sangre y después de 24 h de incubación en condiciones microaerofílicas, se observaron numerosas colonias redondas y translúcidas de borde liso típicas de *H. pylori*, tal como se reporta en la literatura (Andersen y Wadström, 2001). Posteriormente, son recolectadas las bacterias y sembradas nuevamente en el mismo tipo de cajas para su expansión y de esta forma fue posible la creación de un gran lote suficiente para la realización de los experimentos aquí reportados. Estas bacterias se almacenaron en medio de cosecha a -70°C hasta su utilización.

Por otro lado, es muy importante en cualquier laboratorio de investigación verificar rutinariamente que se está trabajando con la bacteria deseada, por este motivo se identificó a la bacteria, aplicando diferentes pruebas bioquímicas, tinción de Gram y se observó la morfología de la bacteria (Figura 12).

De acuerdo a la literatura la prueba bioquímica más importante y utilizada para la identificación de *H. pylori* es la prueba rápida de ureasa debido a la gran actividad que esta enzima presenta y a que es muy abundante en la bacteria. En el presente trabajo, se observó el cambio inmediato de coloración de amarillo a rosa al colocar la muestra del cultivo

líquido debido a la alcalinización del medio por la liberación del amoníaco (Figura 12A); demostrando que la bacteria es ureasa positiva.

Sin embargo, la triada que identifica clásicamente a *H. pylori* es la positividad a las pruebas bioquímicas, ureasa, catalasa y oxidasa (Mégraud y Lehours 2007). De esta forma, se realizó la prueba de catalasa durante la cual se formaron burbujas de oxígeno al colocar la muestra en presencia de  $H_2O_2$  indicando la positividad ante la prueba (Figura 12B). Además de ser una prueba bioquímica necesaria para la identificación de *H. pylori*, esta prueba permite distinguir cultivos viables de los que no lo son, ya que la actividad de la enzima solo se conserva en cultivos con 18 a 24 h de crecimiento, aquellos con mayor tiempo de incubación podrían presentar un actividad disminuida o dar un falso negativo (MacFaddin, 2000).

La última prueba bioquímica fue la de oxidasa, en la cual se observó el cambio inmediato de coloración del TMPPD al ser oxidado por la citocromo oxidasa (Figura 12C). Al igual que en la prueba de catalasa, el tiempo de incubación del cultivo interfiere con los resultados obtenidos, de tal forma que cultivos más antiguos presentaran resultados no fidedignos (Shields y Cathcart, 2010).

La tinción de Gram permitió corroborar que se trataba de una bacteria Gram-negativa, ya que los bacilos se tiñeron de un color rojizo después de ser lavados con etanol. Esta prueba también nos permitió comprobar las diferentes formas de la bacteria que se presentan en un cultivo en su fase exponencial de crecimiento. Como se observa en la Figura 12D, se presentan formas bacilares, formas de V, U y en espiral.



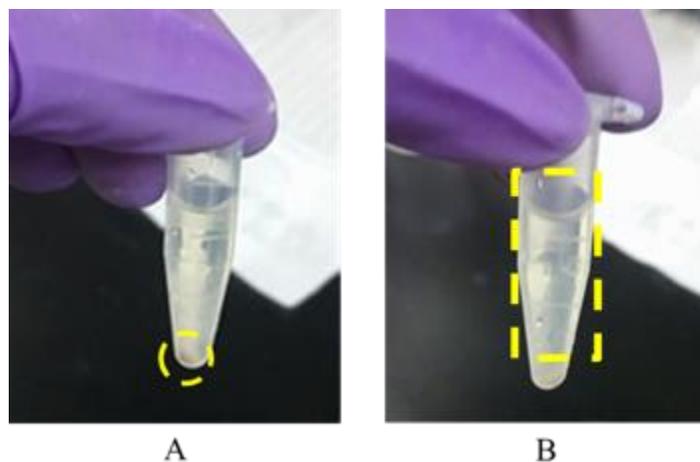
**Cultivo de *H. pylori***



**Figura 12. Ilustración de pruebas bioquímicas y tinción de Gram.** A) Prueba rápida de ureasa positiva (rojo). B) Prueba de catalasa positiva (efervescencia). C) Prueba de oxidasa positiva (morado). D) Prueba negativa para Tinción de Gram; se observan las formas características de la bacteria: bacilos, formas de V y U y la forma espiral. Microscopía óptica de luz a 100X.

## 5.2 Obtención de la ureasa y determinación de su actividad

Debido a que la ureasa es una enzima que se encuentra en el citosol de la bacteria en gran abundancia, 6-10% de las proteínas totales de la bacteria (Krajewska, 2009), es fácil la preparación de un extracto enriquecido de la misma con sólo unos cuantos pasos metodológicos que incluyen la ruptura de la célula y la separación del citosol por centrifugación (Figura 13).



**Figura 13. Microtubo donde se obtiene la fracción enriquecida de la ureasa.** En A se observa encerrado en un círculo el botón de restos celulares formado después de la segunda centrifugación; en B se observa la porción citosólica libre de restos celulares dónde está presente la ureasa.

Una vez obtenido el extracto enriquecido con la ureasa, se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (Anexo 1, Curva Patrón de BSA).

La determinación de la actividad de la ureasa se realizó empleando el método de Berthelot que cuantifica el amonio liberado por la enzima, estandarizado con una curva patrón de amonio (Anexo 2). Para elegir las condiciones óptimas para la reacción y para determinar la inhibición de la actividad, se varió la cantidad de proteína y el tiempo de incubación en presencia del sustrato (urea) y se cuantificó su actividad específica.

Como se puede observar en la Tabla 3, la mayor actividad enzimática específica (29.3.  $\mu\text{mol amonio}/\text{min}/\text{mg}$  proteína) se obtuvo con 3  $\mu\text{g}$  de proteína y con 10 minutos de incubación. Por lo tanto, estas condiciones fueron las que se utilizaron para la realización de los ensayos.

**Tabla 3. Determinación de la cantidad de proteína y el tiempo de incubación a utilizar para la determinación de actividad enzimática.**

Proteína (μg)	Tiempo de incubación (min)	Actividad enzimática específica (μmol amonio/min/mg proteína)
1	17.5	25.3
2	17.5	21.3
1	20.0	19.0
2	20.0	15.8
<b>3</b>	<b>10.0</b>	<b>29.3</b>

El tiempo de incubación concuerda con el empleado por Uribe-Estanislao (2017) quien también descarta la necesidad de incubar la reacción por 20 min y reporta una actividad específica ligeramente mayor de  $34.9 \pm 4.6$  μmol amonio/min/mg proteína. Por otro lado, Yu *et al.* (2015) reportan una actividad específica de 17 μmol amonio/min/mg proteína al incubar la reacción por 20 min a 25°C. Como puede observarse la actividad específica que determinamos está en el orden de magnitud de las reportadas y las diferencias pueden deberse a factores técnicos como el grado de purificación de la muestra o las condiciones específicas del ensayo en las cuales se determinó la actividad (Krajewska, 2009).

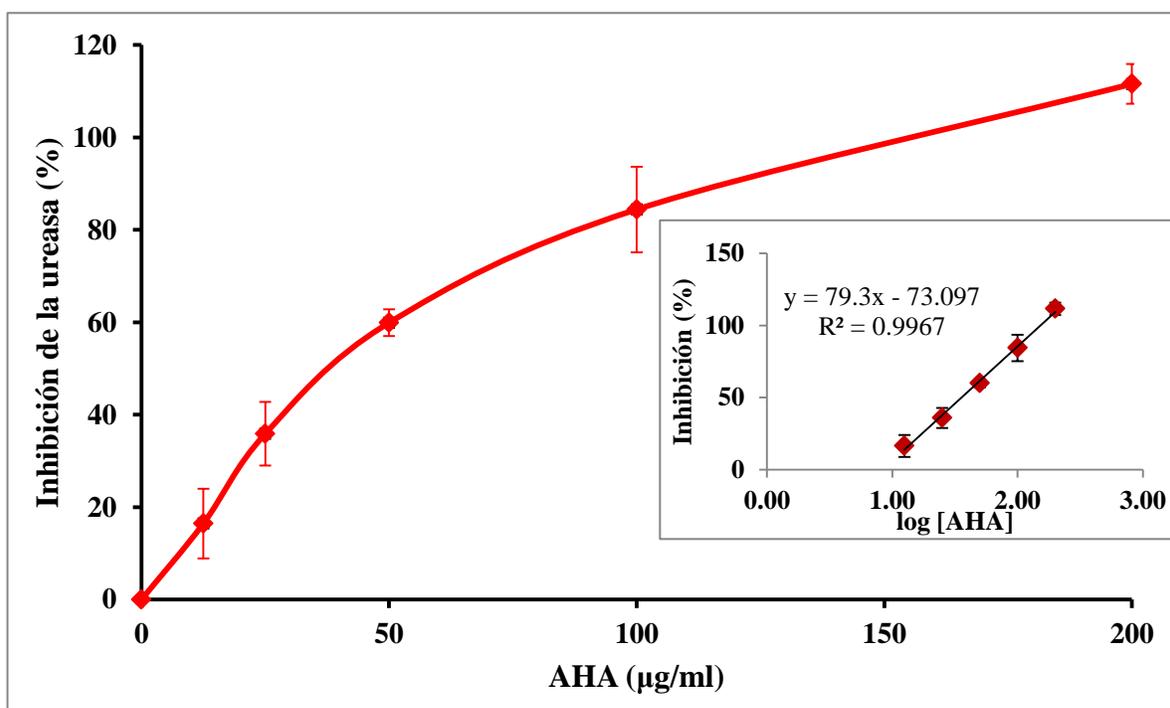
Otra consideración que se tomó en cuenta fue los valores de absorbancia obtenidos, los cuales se trataron de mantener en el rango de 0.6 a 0.8. El objetivo de mantener este intervalo de absorbancia era tener valores suficientemente altos para poder ver inhibiciones y no estuvieran en el límite de detección del método colorimétrico.

Cabe destacar que la metodología utilizada permite obtener una muestra enriquecida de ureasa, esto se ha demostrado anteriormente en el laboratorio mediante análisis proteicos (electroforesis e inmunodetección), los cuales permitieron comprobar la presencia de ambas subunidades que constituyen a la enzima (Uribe-Estanislao, 2017).

### 5.3 Efecto de los compuestos sobre la ureasa

#### 5.3.1. Efecto del ácido acetohidroxámico sobre la ureasa (Control positivo).

Para validar la técnica usada para la determinación de la inhibición de la actividad de la ureasa se utilizó ácido acetohidroxámico (AHA), un inhibidor competitivo de la enzima, conocido por bloquear el sitio activo de la enzima (Kakkar, 2006). Como se muestra en la Figura 14, la actividad de la enzima se inhibe al 100% con 200  $\mu\text{g/ml}$  de AHA; con los datos obtenidos se calculó la concentración a la cual se inhibiría el 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) de la actividad de la ureasa, que para el AHA sería de  $35.67 \mu\text{g/ml} = 488.4 \mu\text{M}$ .



**Figura 14.** Efecto inhibitorio de AHA sobre la actividad de la ureasa de *H. pylori*. En el recuadro se muestra la determinación de  $\text{IC}_{50}$ .  $n = 3$ .

El valor de  $\text{IC}_{50}$  obtenido se encuentra en el mismo orden de magnitud que varios de los valores reportados en la literatura,  $11.7 \mu\text{g/ml} = 155.8 \mu\text{M}$  (Espinosa-Rivero *et. al.*, 2017),  $10.5 \mu\text{g/ml} = 140.0 \mu\text{M}$  (Yu *et al.*, 2015) y  $20.3 \mu\text{g/ml} = 270.4 \mu\text{M}$  (Uribe-Estanislao, 2017); las variaciones encontradas pueden ser debidas a diferencias en las condiciones experimentales. Con base en lo anterior, se valida la metodología utilizada.

### 5.3.2 Efecto de la curcumina, diacetylcurcumina y los compuestos metálicos derivados sobre la ureasa

Todos los compuestos probados mostraron actividad sobre la ureasa de *H. pylori*, ya sea porque inhibieron o porque activaron a la enzima.

DAC<sub>2</sub>-Zn y DAC<sub>2</sub>-Cu presentaron una inhibición máxima considerable 86.3% (Figura 15) y 74.9% (Figura 16), respectivamente, con 62.5 µg/ml, equivalente a 59.8 µM para DAC<sub>2</sub>-Zn y a 60.1 µM para DAC<sub>2</sub>-Cu. Comparando las curvas de inhibición de estos dos compuestos con las del control positivo AHA (Figura 17), ambos resultaron ser más efectivos para inhibir a la enzima, en particular DAC<sub>2</sub>-Zn, ya que, a todas las concentraciones ensayadas de estos compuestos, los valores de inhibición están por encima de los valores de la curva de inhibición con AHA.

El análisis estadístico demostró que los porcentajes de inhibición obtenidos a la concentración de 62.5 µg/ml de cada compuesto son distintos entre sí ( $p < 0.05$ ). Con lo anterior, podemos concluir que la actividad inhibitoria sobre la ureasa de *H. pylori* de los compuestos DAC<sub>2</sub>-Zn y DAC<sub>2</sub>-Cu, a la concentración máxima ensayada, fue superior a la presentada por AHA.

De acuerdo con la tendencia de las gráficas de estos dos complejos, se podría esperar que al aumentar la concentración de DAC<sub>2</sub>-Zn o DAC<sub>2</sub>-Cu se alcanzaran porcentajes de inhibición mayores o incluso llegaran al 100%, sin embargo, cuando se subieron las concentraciones de DAC<sub>2</sub>-Cu se encontraron problemas de solubilidad; al momento de realizar el experimento se observó un precipitado que interfería con la lectura de la absorbancia y por ende los resultados no eran confiables.

Las IC<sub>50</sub>s calculadas para ambos compuestos fueron menores al valor obtenido con el control positivo, AHA (IC<sub>50</sub> = 35.67 µg/ml = 488.4 µM), por un lado, DAC<sub>2</sub>-Zn presenta una IC<sub>50</sub> de 13.02 µg/ml = 12.4 µM (Recuadro Figura 15), mientras que DAC<sub>2</sub>-Cu presenta una de 21.19 µg/ml = 20.4 µM (Recuadro Figura 16). Esto nos indica la potencia de estos compuestos para inhibir a la ureasa de *H. pylori*.

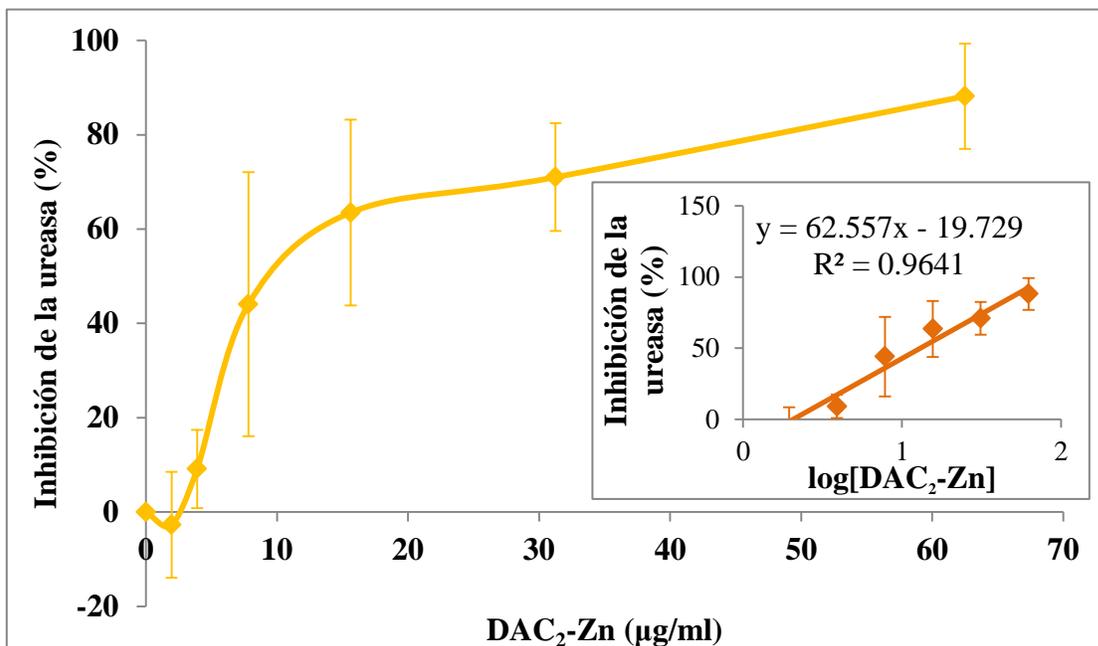


Figura 15. Efecto de DAC<sub>2</sub>-Zn sobre la actividad de la ureasa de *H. pylori*. En el recuadro se muestra la determinación de IC<sub>50</sub>. n = 8.

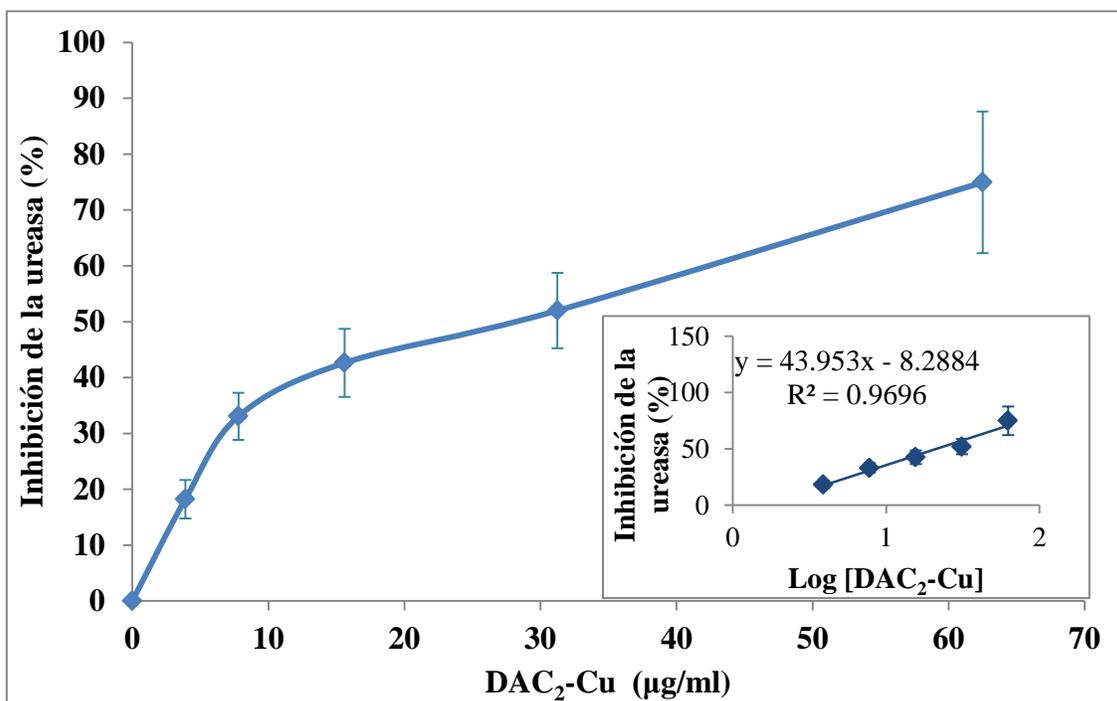
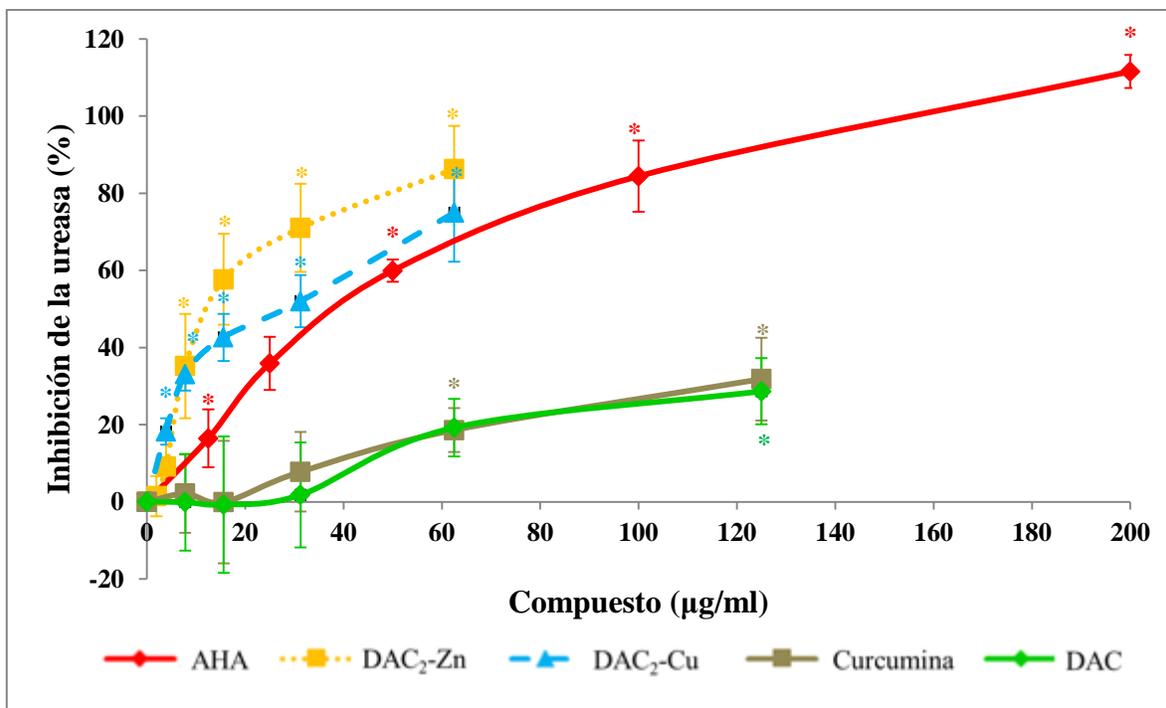


Figura 16. Curva para determinar el valor de IC<sub>50</sub> de DAC<sub>2</sub>-Cu. En el recuadro se muestra la determinación de IC<sub>50</sub>. n = 5.



**Figura 17. Comparación del efecto inhibitorio de los compuestos probados y del AHA sobre la actividad de la ureasa de *H. pylori*.** Datos presentados como media  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0.05$  con respecto al 0.  $n = 3$  (AHA), 8 (DAC<sub>2</sub>-Zn), 5 (DAC<sub>2</sub>-Cu) y 7 (Curcumina y DAC).

En el caso de los compuestos Curcumina y DAC su solubilidad permitió probar hasta la concentración de 125  $\mu\text{g/ml}$ , equivalente a 339.3  $\mu\text{M}$  para Curcumina y a 276.2  $\mu\text{M}$  para DAC; como puede observarse en la Figura 17, ambos compuestos presentan una menor actividad inhibitoria sobre la ureasa (31.8% y 28.6% de inhibición, respectivamente) comparada con los complejos anteriores. Los porcentajes de inhibición son estadísticamente significativos con respecto al 0 ( $p < 0.05$ ) partir de la concentración de 62.5  $\mu\text{g/ml}$  hasta 125  $\mu\text{g/ml}$  en el caso de Curcumina, y para DAC únicamente a la concentración de 125  $\mu\text{g/ml}$ .

La curcumina está conformada químicamente por dos o-metoxifenoles unidos simétricamente por una  $\beta$ -dicetona  $\alpha,\beta$  insaturada, responsable del tautomerismo ceto-enol; de tal forma que la inhibición que se observa por parte de este compuesto puede deberse a la habilidad quelante que presenta este enlace, mismo que suele atraer y unirse a metales de transición (Prywer y Torzewska, 2011). En la literatura se ha reportado la interacción de la curcumina con el níquel debido a su habilidad quelante (Prasad *et al.*, 2021); recordando

que la ureasa presenta este metal de transición en el sitio activo podría inferirse que la curcumina estaría formando un enlace estable con el sitio activo de la proteína, de tal forma que podría estar inactivándola al impedir el acceso a los iones metálicos o bien impidiendo la unión de la urea al sitio. En el caso de DAC, podemos proponer una explicación similar ya que, de acuerdo a su estructura, este enlace queda libre incluso después del proceso de diacetilación (2019b). No obstante, nuestros resultados demuestran que ni la curcumina, ni el DAC inhiben completamente la actividad de la ureasa (~30% inhibición máxima), lo cual nos hace pensar que, si existe esta interacción con el sitio activo de la enzima, ésta no es tan fuerte como para inhibir completamente la entrada del sustrato, o que el efecto, no es precisamente en el sitio activo de la enzima.

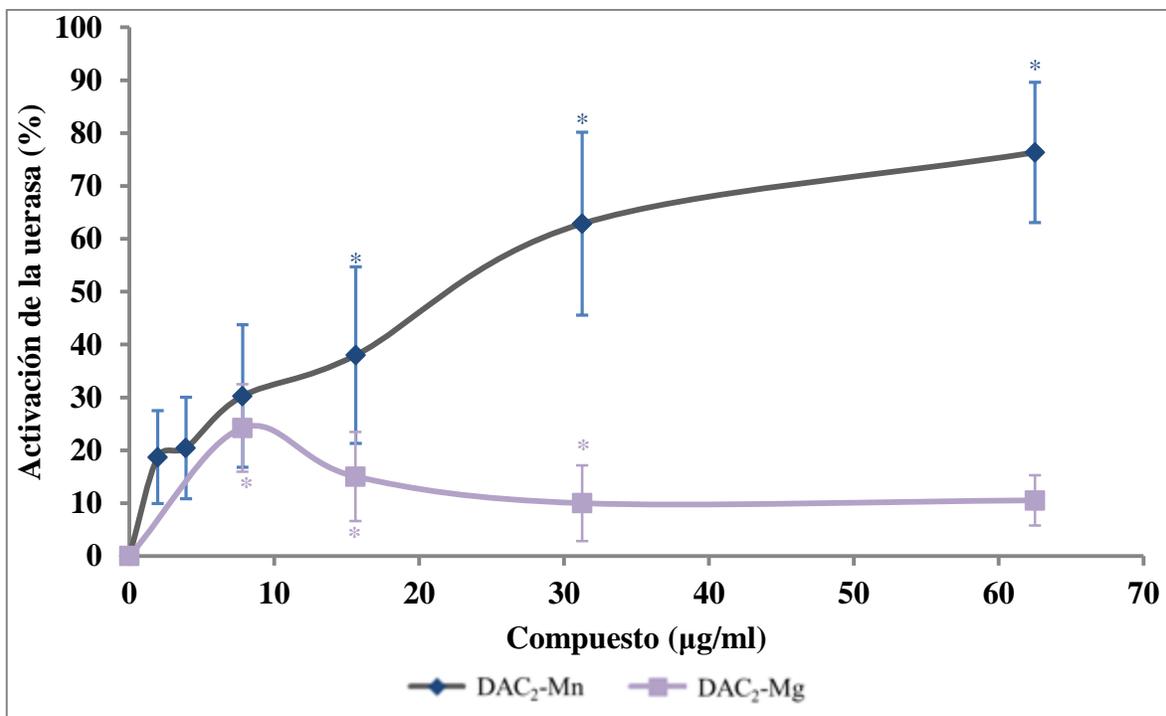
Durante la realización de esta tesis Darmani *et al.* (2020) evaluaron el efecto de la curcumina sobre la actividad de la ureasa reportando la inhibición del 100% de la actividad con 50 µg/ml del compuesto. Cabe mencionar que la metodología que emplean es diferente a la reportada en este trabajo; por destacar algunos aspectos, en ese artículo miden la actividad de la ureasa en cultivos de bacterias intactas, mientras que los resultados aquí reportados son sobre la enzima parcialmente purificada, por otro lado, emplean el método de rojo de fenol e incuban con el sustrato durante 30 min y posteriormente leen la absorbancia a 550 nm, en cambio, aquí se emplea el método de Berthelot. Así mismo, mencionan que disuelven la curcumina en DMSO, pero no indican cuánto volumen utilizan en el ensayo; previamente en nuestro laboratorio se determinó que el volumen de DMSO añadido inhibe la actividad de la ureasa, siendo 10 µl el volumen máximo que puede usarse sin interferir con la reacción, es decir que, mientras no se añada más DMSO el efecto observado se atribuye directamente al compuesto problema. Estas diferencias experimentales nos impiden comparar los resultados reportados por Darmani *et al.* (2020) con los que aquí se presentan.

Las diferencias encontradas en la inhibición de los derivados metálicos de DAC podrían atribuirse a los diferentes iones metálicos utilizados, se ha reportado que diversos metales pesados inhiben a la ureasa al interactuar con los grupos sulfhidrilo de la proteína (Shaw y Raval, 1961). Sin embargo, no es posible asegurar la interacción directa del ion con estos

grupos ya que en las estructuras que reporta Meza-Morales (2019b) pareciera que el ion queda atrapado entre los dos ligandos.

A diferencia de los resultados inhibitorios de la actividad de la ureasa encontrados con la curcumina, la DAC y los complejos DAC<sub>2</sub>-Cu y DAC<sub>2</sub>-Zn, en el caso del complejo DAC<sub>2</sub>-Mg, se encontró un efecto activador de la ureasa, del 24.2% con 7.8 µg/ml = 7.2 µM (valor estadísticamente significativo; p<0.05), sin embargo, este efecto disminuye al incrementarse la concentración del complejo (Figura 18). Por otra parte, DAC<sub>2</sub>-Mn, presenta una respuesta dosis dependiente y activa un máximo de 76.3% con 62.5 µg/ml = 56.1 µM (Figura 18).

Actualmente, son pocos los compuestos conocidos por tener un efecto activador de la ureasa, por ejemplo, los flavonoides acacetina que activa a la enzima 34% con 62.5 µg/ml = 219.9 µM y la diosmetina que activa 17% con 31.25 µg/ml = 102.9 µM (Uribe-Estanislao, 2017), por otro lado, Ziarani reporta dos compuestos del tipo anillos espiribicíclicos derivados del ácido barbitúrico que activan a la ureasa de *Canavalia ensiformis* 42% y 13% a una concentración de 1700 µM y 1000 µM, respectivamente. De tal manera que el efecto que encontramos aquí con DAC<sub>2</sub>-Mn (76.3% con 62.5 µg/ml) es uno de los más altos reportados. Revisando la estructura de éstos pocos compuestos reportados con acción activadora, tampoco encontramos alguna similitud entre ellos que nos permita hacer alguna inferencia de su mecanismo activador, es necesario hacer un análisis químico más profundo para poder proponer la forma en que podrían llevar a cabo dicha acción.



**Figura 18. Efecto activador de los compuestos sobre la ureasa de *H. pylori*.** Datos presentados como media  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0.05$  con respecto al 0.  $n = 7$  (DAC<sub>2</sub>-Mn) y 5 (DAC<sub>2</sub>-Mg).

Si bien para el tratamiento de *H. pylori* un efecto activador de la ureasa no resulta útil, sí podría ser útil en otras aplicaciones tecnológicas como su empleo en el tratamiento de aguas que resultan con alto contenido de nitrógeno total debido a la producción de fertilizantes como lo sugieren Pérez *et al.* (2007). El nitrógeno total comprende la suma de nitrógeno inorgánico derivado del amoníaco y el nitrógeno orgánico derivado de la urea, sin embargo, éste último no puede eliminarse por los métodos fisicoquímicos convencionales, de tal forma que la aplicación de microorganismos capaces de hidrolizar urea o la adición de enzimas que los degraden, son clave para la remediación.

De acuerdo a la literatura, la ureasa es una enzima muy importante para el metabolismo y patogenicidad de *H. pylori* lo que la convierte en un blanco terapéutico muy prometedor para controlar la infección por la bacteria, sin embargo, a la fecha, pese a la caracterización de varios inhibidores de la enzima no ha sido posible su uso como terapia. Por ejemplo, en el caso del AHA, uno de los más potentes inhibidores de la ureasa, no ha sido posible su utilización debido a los efectos tóxicos que presenta su consumo. Dada la capacidad

quelante del AHA se cree que este compuesto podría intervenir con el metabolismo de iones metálicos; en el caso del hierro podría afectar el proceso de hematopoyesis o bien causar un efecto teratógeno (Griffith y Musher, 1975). Así mismo, cuando se ha administrado como terapia para enfermedades renales se han reportado efectos secundarios debido al consumo prolongado del compuesto (2 años), los más recurrentes son náuseas, dolor de cabeza, temblor y anemia hemolítica (Griffith et al., 1978 y 1988). Es por esto que es necesario continuar con la búsqueda de moléculas o compuestos con actividad inhibitoria de la ureasa que puedan emplearse como tratamiento de la infección con *H. pylori*.

En este trabajo se encontraron dos compuestos derivados de la curcumina que tienen el potencial de inhibir a la enzima ureasa de *H. pylori*; no obstante, es necesario continuar su estudio antes de poder proponerlos como posible terapia de erradicación.

## VI. Conclusiones

Fue posible el establecimiento y mantenimiento de un cultivo viable de *H. pylori* en condiciones microaerofílicas (10% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>) y empleando tanto medio sólido como medio líquido suplementado, lo cual permitió la realización de los ensayos aquí reportados.

Se obtuvo, a partir de los cultivos viables de *H. pylori*, una preparación enriquecida de la ureasa que tuvo una actividad específica suficientemente buena para la determinación del efecto inhibitor de los compuestos problema: curcumina, diacetilcurcumina (DAC) y los cuatro derivados metálicos de DAC. Esta determinación fue validada por la inhibición del control positivo AHA, que inhibió a la enzima a las concentraciones reportadas en la literatura.

Se reportó por primera vez el efecto de curcumina, DAC, DAC<sub>2</sub>-Cu, DAC<sub>2</sub>-Mg, DAC<sub>2</sub>-Mn y DAC<sub>2</sub>-Zn sobre la actividad de la ureasa de *H. pylori*. Al respecto, se destacan los efectos inhibitorios de DAC<sub>2</sub>-Cu y DAC<sub>2</sub>-Zn, que resultarían útiles en la terapia anti-*H. pylori* y por otra parte, el efecto activador de DAC<sub>2</sub>-Mn, el cual podría aprovecharse en biotecnología.

También, reportamos efectos de poca inhibición de la curcumina y de DAC, y un efecto activador bajo de DAC<sub>2</sub>-Mg a una sola concentración que nos sugieren que la ureasa no es un blanco determinante para estos compuestos.

## VII. Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo dan pie para continuar el estudio de estos compuestos derivados de la curcumina desde diferentes enfoques para así validar su uso como posibles terapias alternativas o para implementar su uso como coadyuvante.

Por otra parte, se podría realizar acoplamiento molecular (*docking*) para determinar el sitio de unión de los compuestos con la ureasa de *H. pylori*, si afecta el sitio activo de la enzima, modifica la estructura de la enzima o bien si se une a residuos cercanos al sitio activo, y así poder dilucidar el efecto inhibitorio o activador sobre esta.

Otra vertiente de estudio sería evaluar el efecto de la curcumina y sus derivados sobre otros mecanismos de patogenicidad de la bacteria como lo son la adherencia, la motilidad, la actividad vacuolizante, etc.; incluso si tienen efectos gastroprotectores.

Por último, debe explorarse la toxicidad *in vitro* e *in vivo* (toxicidad subaguda y crónica) de la curcumina y sus derivados para validar o no su aplicación como terapia.

## Referencias bibliográficas

- Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N., e Ichikawa, H. (2007). Curcumin: the Indian solid gold. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 595:1-75.
- Andersen, A. P., Elliott, D. A., Lawson, M., Barland, P., Hatcher, V. B., y Puszkín, E. G. (1997). Growth and morphological transformations of *Helicobacter pylori* in broth media. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2918-2922.
- Andersen, L. P., y Wadström, T. (2001). Basic bacteriology and culture. *Helicobacter pylori: physiology and genetics*, 25-38.
- Ansari, S., y Yamaoka, Y. (2017). Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. *Helicobacter*, 22(4), e12386.
- Baker, D. A. (2020). Plants against *Helicobacter pylori* to combat resistance: An ethnopharmacological review. *Biotechnology Reports* (Amsterdam, Netherlands), 26, e00470.
- Barari, M., Sharifi, P., Yousefinejad, V., Babahajian, A., Ghaderi, B., Ataee, P., ... y Sheikhesmaeili, F. (2021). Effect of curcumin on eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, 25(6), 57-67.
- Barragán-Vidal, C. E., Gutiérrez-Escobar, A. J., y Castiblanco-Robayo, L. P. (2015). Membrana externa de *Helicobacter pylori* y su papel en la adhesión al epitelio gástrico. *Universitas Médica*, 56(1), 44-62.
- Bosques-Padilla, F. J., Remes-Troche, J. M., González-Huezo, M. S., Pérez-Pérez, G., Torres-López, J., Abdo-Francis, J. M., ... y Velasco, J. V. R. (2018). IV consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México*, 83(3), 325-341.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Brown, L. M. (2000). *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic Reviews*, 22(2), 283-297.
- Bumann, D., Habibi, H., Kan, B., Schmid, M., Goosmann, C., Brinkmann, V., ... y Jungblut, P. R. (2004). Lack of stage-specific proteins in coccoid *Helicobacter pylori* cells. *Infection and Immunity*, 72(11), 6738-6742.
- Camilo, V., Sugiyama, T., y Touati, E. (2017). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 22, e12405.
- Caruso, F., Rossi, M., Benson, A., Opazo, C., Freedman, D., Monti, E., ... y Pettinari, C. (2012). Ruthenium–arene complexes of curcumin: X-ray and density functional theory structure, synthesis, and spectroscopic characterization, in vitro antitumor activity, and DNA docking studies of (p-cymene) Ru (curcuminato) chloro. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(3), 1072-1081.
- Cassel-Beraud, A. M., Le Jan, J., Mouden, J. C., Andriantsoa, M., y Andriantsiferana, R. (1991). Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive, Madagascar and the antibacterial activity *in vitro* of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. *Archives de L'institut Pasteur de Madagascar*, 59(1), 9-23.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., y Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of ethnopharmacology*, 122(2), 402-405.
- Cebrián, A., De la Concha, G., y Fernández-Urién, I. (2016). Cáncer gástrico. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(3), 118-127.
- Cervantes-García, E. (2016). *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 63(2), 100-109.
- Chey, W. D., Leontiadis, G. I., Howden, C. W., y Moss, S. F. (2017). ACG clinical guideline: treatment of *Helicobacter pylori* infection. *American Journal of Gastroenterology*, 112(2), 212-239.

- De Falco, M., Lucariello, A., Iaquinto, S., Esposito, V., Guerra, G., y De Luca, A. (2015). Molecular mechanisms of *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 230(8), 1702-1707.
- De, R., Kundu, P., Swarnakar, S., Ramamurthy, T., Chowdhury, A., Nair, G. B., y Mukhopadhyay, A. K. (2009). Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1592-1597.
- Díaz-Portillo, J., Fernández del Barrio, M. T., y Paredes-Salido, F. (1997). *Aspectos Básicos de Bioquímica Clínica*. Ediciones Díaz de Santos. 83
- Du, M. Q., y Isaccson, P. G. (2002). Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. *The Lancet Oncology*, 3(2), 97-104
- Dunn B. E., Cohen H., Blaser M. J. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4):720-741.
- Eaton, K. A., Catrenich, C. E., Makin, K. M., y Krakowka, S. (1995). Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Journal of Infectious Diseases*, 171(2), 459-462.
- Eaton, K. A., y Krakowka, S. (1994). Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 62(9), 3604-3607.
- Espinosa-Rivero, J., Rendón-Huerta, E., y Romero, I. (2015). Inhibition of *Helicobacter pylori* growth and its colonization factors by *Parthenium hysterophorus* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 253-260.
- Eusebi, L.H., Zagari, R.M. y Bazzoli, F. (2014), Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 19: 1-5. doi:[10.1111/hel.12165](https://doi.org/10.1111/hel.12165)

- Gómez-Chang, E., Escobedo-Hinojosa, W., y Romero-Álvarez, I. (2017). Tratamiento de la úlcera péptica asociada a *Helicobacter pylori*. Una perspectiva desde los productos naturales.
- Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M. D., Sly, L., McConnell, W. y Harper, W. E. S. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(4), 397-405.
- Goodwin, C. S., R. K. McCulloch, J. A. Armstrong, y S. H. Wee. (1985). Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *Journal of Medical Microbiology*, **19**:257–267.
- Goodwin, C. S., y Armstrong, J. A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9(1), 1-13.
- Griffith, D. P., Gibson, J. R., Clinton, C. W., y Musher, D. M. (1978). Acetohydroxamic acid: clinical studies of a urease inhibitor in patients with staghorn renal calculi. *The Journal of Urology*, 119(1), 9-15.
- Griffith, D. P., Khonsari, F., Skurnick, J. H., James, K. E., y Veterans Administrations Cooperative Study Group. (1988). A randomized trial of acetohydroxamic acid for the treatment and prevention of infection-induced urinary stones in spinal cord injury patients. *The Journal of Urology*, 140(2), 318-324.
- Griffith, D. P., y Musher, D. M. (1975). Acetohydroxamic acid: Potential use in urinary infection caused by urea-splitting bacteria. *Urology*, 5(3), 299-302.
- Han, C., Wang, L., Yu, K., Chen, L., Hu, L., Chen, K., ... y Shen, X. (2006). Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from *Helicobacter pylori*. *The FEBS journal*, 273(20), 4682-4692.

- Hooi, J. K., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., ... y Chan, F. K. (2017). Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*, 153(2), 420-429.
- Hussain, A., Somyajit, K., Banik, B., Banerjee, S., Nagaraju, G., y Chakravarty, A. R. (2013). Enhancing the photocytotoxic potential of curcumin on terpyridyl lanthanide (III) complex formation. *Dalton Transactions*, 42(1), 182-195.
- IARC. (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lion, France: IARC Sci Publ. pp 1–241.
- Judaki, A., Rahmani, A., Feizi, J., Asadollahi, K., y Hafezi Ahmadi, M. R. (2017). Curcumin in combination with triple therapy regimes ameliorates oxidative stress and histopathologic changes in chronic gastritis-associated *Helicobacter pylori* infection. *Arquivos de gastroenterologia*, 54, 177-182.
- Kakkar, R., Grover, R., y Gahlot, P. (2006). Metal ion selectivity of hydroxamates: a density functional study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 767(1-3), 175-184.
- Kao, C. Y., Sheu, B. S., y Wu, J. J. (2016). *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal*, 39(1), 14-23.
- Kappaun, K., Piovesan, A. R., Carlini, C. R., y Ligabue-Braun, R. (2018). Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties—A review. *Journal of advanced research*, 13, 3-17.
- Krajewska, B. (2009). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1-3), 9-21.
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H., y Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449-490.
- Lim, T. K. (2016). *Curcuma longa*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants* (pp. 241-362). Springer, Cham.

- MacFaddin JF. (2000) Catalase-Peroxidase Tests. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 78-97.
- Mahady, G. B., Pendland, S. L., Yun, G., y Lu, Z. Z. (2002). Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. *Anticancer Research*, 22(6C), 4179-4181.
- Malfertheiner, P., Chan, F. K., y McColl, K. E. (2009). Peptic ulcer disease. *The Lancet*, 374(9699), 1449-1461.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A. T., ... y Hunt, R. (2017). Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut*, 66(1), 6-30.
- Marcus, E. A., Sachs, G., y Scott, D. R. (2016). Eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Current Gastroenterology Reports*, 18(7), 33.
- Marshall, B. J., Armstrong, J. A., McGeachie, D. B., y Clancy, R. J. (1985). Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter. *Medical Journal of Australia*, 142(8), 436-439.
- Marshall, B. J., y Goodwin, C. S. (1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(1), 68-68.
- Marshall, B., y Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet*, 323(8390), 1311-1315.
- Matsuo, Y., Kido, Y., y Yamaoka, Y. (2017). *Helicobacter pylori* outer membrane protein-related pathogenesis. *Toxins*, 9(3), 101.
- Mégraud, F., y Lehours, P. (2007). *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clinical microbiology reviews*, 20(2), 280-322.

- Meza-Morales, W., Estévez-Carmona, M. M., Alvarez-Ricardo, Y., Obregón-Mendoza, M. A., Cassani, J., Ramírez-Apan, M. T., ... y Enríquez, R. G. (2019b). Full Structural Characterization of Homoleptic Complexes of Diacetylcurcumin with Mg, Zn, Cu, and Mn: Cisplatin-level Cytotoxicity in Vitro with Minimal Acute Toxicity in Vivo. *Molecules*, 24(8), 1598.
- Meza-Morales, W., Machado-Rodriguez, J. C., Alvarez-Ricardo, Y., Obregón-Mendoza, M. A., Nieto-Camacho, A., Toscano, R., ... y Enríquez, R. G. (2019a). A New Family of Homoleptic Copper Complexes of Curcuminoids: Synthesis, Characterization and Biological Properties. *Molecules*, 24(5), 910.
- Mishra, S. (2013). Is *Helicobacter pylori* good or bad?. *European Journal of Clinical Microbiology y Infectious Diseases*, 32(3), 301-304.
- Mobley, H. L. (1996). The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 10 (Sup1), 57-64.
- Mobley, H. L., Island, M. D., y Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological Reviews.*, 59(3), 451-480
- Münzenmaier, A., Lange, C., Glocker, E., Covacci, A., Moran, A., Bereswill, S., ... y Pahl, H. L. (1997). A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *The Journal of Immunology*, 159(12), 6140-6147.
- 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(47), 7499
- Olivera-Severo, D., Uberti, A. F., Marques, M. S., Pinto, M. T., Gomez-Lazaro, M., Figueiredo, C., ... y Carlini, C. R. (2017). A new role for *Helicobacter pylori* urease: contributions to angiogenesis. *Frontiers in microbiology*, 8, 1883.
- Olson, B. J., y Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science*, 48(1), 3-4.

- On, S. L., Lee, A., O'Rourke, J. L., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Fox, J. G., y Vandamme, P. (2015). Helicobacter. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-1.
- O'Rourke, J., y Bode, G. (2001). Morphology and Ultrastructure. En: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001. Capítulo 6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2452/>
- Pérez, S. A., Niño, Z. M., Hernández, V., y Hernández, C. (2007). Uso de Enzimas de Tipo Ureasa en el Tratamiento de Aguas Residuales con Alto Contenido en Nitrógeno Orgánico. *Información Tecnológica*, 18(5), 41-48.
- Prasad, S., DuBourdieu, D., Srivastava, A., Kumar, P., y Lall, R. (2021). Metal–Curcumin Complexes in Therapeutics: An Approach to Enhance Pharmacological Effects of Curcumin. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7094.,
- Prywer, J., y Torzewska, A. (2012). Effect of curcumin against *Proteus mirabilis* during crystallization of struvite from artificial urine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Pucci, D., Crispini, A., Mendiguchía, B. S., Pirillo, S., Ghedini, M., Morelli, S., y De Bartolo, L. (2013). Improving the bioactivity of Zn (II)-curcumin based complexes. *Dalton Transactions*, 42(26), 9679-9687.
- Rivas-Traverso, F., y Hernández, F. (2000). *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Revista Biomedica*, 11(3), 187-205.
- Sachs, G., Weeks, D. L., Wen, Y., Marcus, E. A., Scott, D. R., y Melchers, K. (2005). Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology*, 20(6), 429-438.
- Sanphui, P., y Bolla, G. (2018). Curcumin, a Biological Wonder Molecule: A Crystal Engineering Point of View. *Crystal Growth & Design*, 18(9), 5690-5711.

- Santos, A. M., Lopes, T., Oleastro, M., Gato, I. V., Floch, P., Benejat, L., ... y Guerreiro, A. S. (2015). Curcumin inhibits gastric inflammation induced by *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. *Nutrients*, 7(1), 306-320.
- Santos, A. M., Lopes, T., Oleastro, M., Pereira, T., Alves, C. C., Seixas, E., ... y Guerreiro, A. S. (2018). Cyclooxygenase inhibition with curcumin in *Helicobacter pylori* infection. *Nutrire*, 43(1), 1-7.
- Schoep, T. D., Fulurija, A., Good, F., Lu, W., Himbeck, R. P., Schwan, C., ... y Marshall, B. J. (2010). Surface properties of *Helicobacter pylori* urease complex are essential for persistence. *PLoS One*, 5(11).
- Sharma, K. K., Chandra, S., y Basu, D. K. (1987). Synthesis and antiarthritic study of a new orally active diferuloyl methane (curcumin) gold complex. *Inorganica Chimica Acta*, 135(1), 47-48.
- Shaw, W. H., y Raval, D. N. (1961). The inhibition of urease by metal ions at pH 8.9. *Journal of the American Chemical Society*, 83(15), 3184-3187.
- Shields, P., y Cathcart, L. (2010). Oxidase test protocol. *American Society for Microbiology*, 1-9.
- Sitarz, R., Skierucha, M., Mielko, J., Offerhaus, G. J. A., Maciejewski, R., y Polkowski, W. P. (2018). Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Management and Research*, 10, 239.
- Sjomina, O., Pavlova, J., Niv, Y., y Leja, M. (2018). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 23, e12514.
- Smith, A. C., y Hussey, M. A. (2005). Gram stain protocols. In *American Society for Microbiology-ASM Conference for Undergraduate Educators* (Vol. 2005).
- Song, Y. M., Xu, J. P., Ding, L., Hou, Q., Liu, J. W., y Zhu, Z. L. (2009). Syntheses, characterization and biological activities of rare earth metal complexes with curcumin

and 1, 10-phenanthroline-5, 6-dione. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(3), 396-400.

Stefano, K., Marco, M., Federica, G., Laura, B., Barbara, B., y Gioacchino, L. (2018). *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: state of the art. *Acta Biomedica: Atenei Parmensis*, 89 (Suppl 8), 72.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., y Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.

Suzuki, M. Miura, S., Suematsu, M., Fukumura, D., Kurose, I., Suzuki, H., ... y Tsuchiya, M. (1992). *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 263(5), G719-G725.

Tan, V. P., y Wong, B. C. (2011). *Helicobacter pylori* and gastritis: Untangling a complex relationship 27 years on. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26, 42-45.

Testerman, T. L., y Morris, J. (2014). Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(36), 12781.

Thompson, K. H., Böhmerle, K., Polishchuk, E., Martins, C., Toleikis, P., Tse, J., ... y Orvig, C. (2004). Complementary inhibition of synoviocyte, smooth muscle cell or mouse lymphoma cell proliferation by a vanadyl curcumin complex compared to curcumin alone. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(12), 2063-2070.

Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gomez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Conyer, R. y Muñoz, O. (1998). A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *The Journal of Infectious Diseases*, 178(4), 1089-1094.

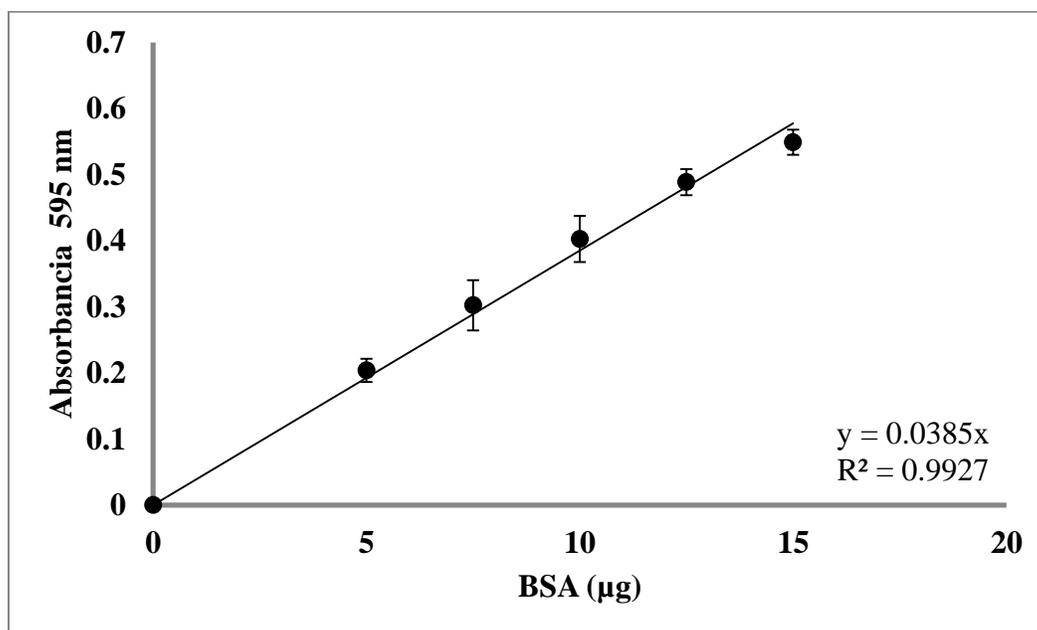
- Torres-Jiménez, F., y Torres-Bayona, C. (2016). Molecular pathophysiology in infection by *Helicobacter pylori*. *Revista Salud Uninorte*, 32(3), 500-512.
- Uotani, T., y Graham, D. Y. (2015). Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. *Annals of translational medicine*, 3(1).
- Uribe-Estanislao, G. V. (2017). Efecto de extractos de tres especies de quelites sobre la actividad de la enzima ureasa de *Helicobacter pylori*. Tesis de licenciatura. Recuperado de: [https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/NF9NLQRF8M2TJUMGHE7FKF9Q4ITJP74J8X59UXBELCX7AFN4A1-39107?func=full-set-set&set\\_number=464873&set\\_entry=000032&format=999](https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/NF9NLQRF8M2TJUMGHE7FKF9Q4ITJP74J8X59UXBELCX7AFN4A1-39107?func=full-set-set&set_number=464873&set_entry=000032&format=999)
- Vakil, N., y Megraud, F. (2007). Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 133(3), 985-1001.
- Valdivia-Roldán, M. (2011). Gastritis y gastropatías. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 31(1), 38-48.
- Wang, Y. J., Pan, M. H., Cheng, A. L., Lin, L. I., Ho, Y. S., Hsieh, C. Y., y Lin, J. K. (1997). Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15(12), 1867-1876.
- Warren, J. R., y Marshall, B. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet*, 321(8336), 1273-1275.
- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39(8), 971-974.
- Wheelis, M. 2008. *Principles of modern microbiology*. Jones y Bartlett Publishers, Inc., Sudbury, MA, 207.
- Yu, X. D., Zheng, R. B., Xie, J. H., Su, J. Y., Huang, X. Q., Wang, Y. H., ... y Huang, P. (2015). Biological evaluation and molecular docking of baicalin and scutellarin as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology*, 162, 69-78.

- Zamani, M., Ebrahimitabar, F., Zamani, V., Miller, W. H., Alizadeh-Navaei, R., Shokri-Shirvani, J., y Derakhshan, M. H. (2018). Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology y Therapeutics*, 47(7), 868-876.
- Zhang, R. G., Duan, G. C., Fan, Q. T., y Chen, S. Y. (2016). Role of *Helicobacter pylori* infection in pathogenesis of gastric carcinoma. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 7(1), 97.
- Ziarani, G. M., Asadi, S., Faramarzi, S., y Amanlou, M. (2015). Green synthesis and urease inhibitory activity of spiro-pyrimidinethiones/spiro-pyrimidinones-barbituric acid derivatives. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 14(4), 1105.

## Anexo 1

### Curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA)

Para realizar la determinación de proteína por el método de Bradford, se utilizó BSA como estándar. A continuación, se muestra una gráfica representativa, en la que se puede observar la linealidad de los resultados y que se alcanza un nivel de correlación adecuado.



**Figura A1. Curva patrón de BSA utilizada como estándar para el método de Bradford.**

## Anexo 2

### Curva de Calibración de amonio.

Para la cuantificación de amonio por el método de Berthelot se realizaron curvas patrón con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y calculando la concentración de amonio en la reacción, que es lo que se grafica. A continuación, se muestra un gráfico representativo en el cual se observa que se alcanza el nivel de correlación adecuado.

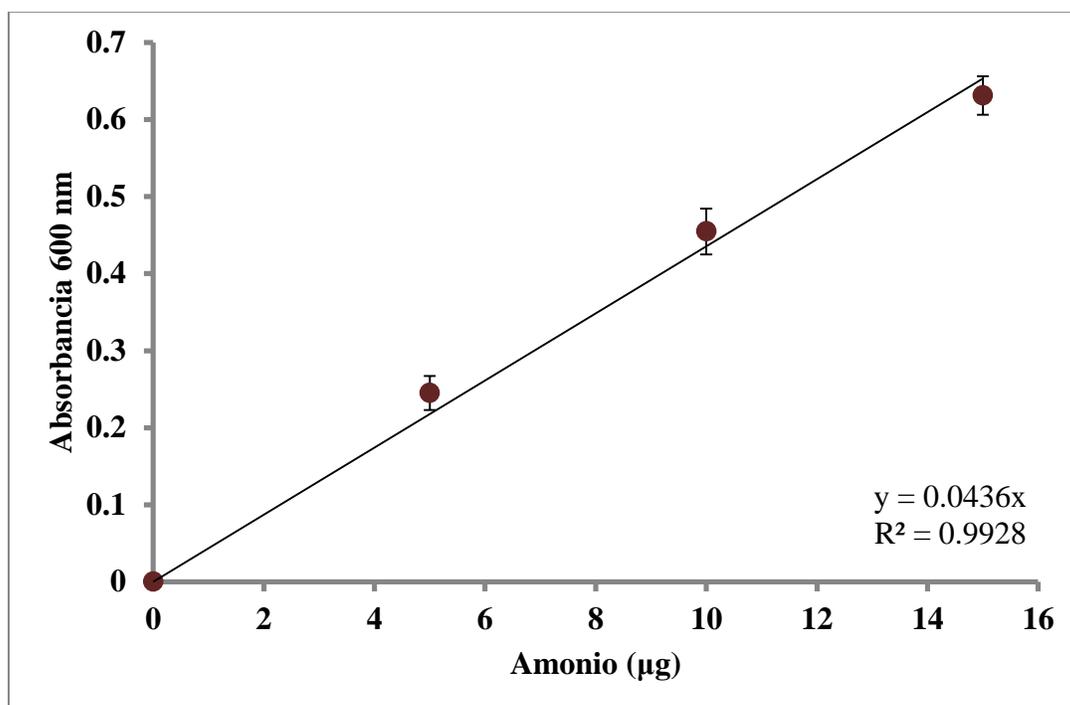


Figura A2. Curva patrón de amonio utilizada como estándar para el método de Berthelot.