



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**La DNA girasa como un blanco de nuevos antibióticos  
contra *Helicobacter pylori***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**ERICK HERNÁNDEZ HIPÓLITO**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. IRMA ROMERO ALVAREZ**

**Ciudad Universitaria, 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DATOS

Sustentante:

HERNÁNDEZ HIPÓLITO ERICK  
Facultad de Ciencias, Biología, UNAM.

Asesora de Tesis:

DRA. IRMA ROMERO ALVAREZ  
Facultad de Medicina, UNAM

Sinodal 1:

DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA  
Instituto de Química, UNAM.

Sinodal 2:

DRA. ALICIA ENRIQUETA BRECHÚ FRANCO  
Facultad de Ciencias, UNAM

Sinodal 3:

M. en C. ROSA MARÍA FONSECA JUÁREZ  
Facultad de Ciencias, UNAM.

Sinodal 4:

DRA. ERIKA GÓMEZ CHANG  
Facultad de Medicina, UNAM

Lugar donde se realizó el proyecto:

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

Datos de la tesis:

La DNA girasa como un blanco de nuevos antibióticos contra *Helicobacter pylori*

104p.

2023

## AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

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

Agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca recibida.

Al proyecto CONACyT, FOINS-PRONACES-307152.

A la *Dra. Erika Gómez Chang* por su ayuda y asistencia académica y técnica en la realización de los experimentos, por apoyarme con mis dudas y animarme a que todo resultado, incluso los negativos, es un buen resultado.

Al *Dr. Raúl G. Enríquez Habib*, al *Dr. William E. Meza Morales*, al *Dr. Yair Alvarez Ricardo* y al *Dr. Marco Antonio Obregón Mendoza* del Instituto de Química de la UNAM por la síntesis y donación de los compuestos curcuminoides utilizados en este trabajo.

Al *Dr. Guillermo Delgado Lamas* del Instituto de Química de la UNAM por facilitarnos los compuestos de 7-hidroxi-cadaleno y 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno.

A los integrantes del jurado, por su tiempo, observaciones y comentarios a este trabajo:

A la *Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava*, por sus valiosas observaciones y enseñar con tanta pasión acerca de los productos naturales.

A la *Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco* por sus valiosas observaciones y por haber cursado plantas II con usted.

A la *M. en C. María Rosa Fonseca Juárez* por sus valiosos comentarios e ilustrarme acerca de las anacardiáceas y sus maravillosos principios activos.

A la *Dra. Irma Romero Álvarez* por confiarme a realizar este proyecto, por tenerme la paciencia necesaria para resolver cada duda y explicarme con detalle el cómo realizar correctamente las técnicas y regañarme al usar la palabra “ocupar”.

## AGRADECIMIENTOS

Comienzo agradeciendo infinitamente a mis abuelos *Susana Arvizu López* y *Juan Hipólito Ojeda*, gracias por ser el soporte de nuestra familia, brindarnos un hogar lleno de amor, por brindarme su apoyo, su saber y su amor incondicional, sin ustedes no sería la persona que soy ahora. No tengo palabras para expresarles lo mucho que les agradezco. Los amo infinitamente.

A mis abuelos *Prisciliana Cruz Rojas †* y *Francisco Hernández Gómez †* gracias por brindarme su amor, por ser unos abuelos cariñosos e inculcarme el amor a su tierra, Oaxaca. Donde sea que se encuentren, los amo, un mezcal por este logro.

A mis padres *Susana Hipólito Arvizu* y *Eduardo Hernández Cruz*, las palabras para agradecerles todo lo que me han dado y enseñado se quedan cortas, agradezco infinitamente que me hayan ayudado a alcanzar y perseguir cada uno de mis sueños, sin ustedes no hubiera logrado nada de lo que soy, cada regaño, cada palabra cuando sentía no poder y el esfuerzo de sacarnos adelante me trajeron hasta aquí, este logro es más de ustedes que mío. Los amo infinitamente.

A mi hermana *Daniela*, gracias por tu compañía, por seguirme en cada paso, en natación, en ser mi compañera, mi risa de diario, gracias por enseñarme lo que es ser hermanos. Te amo mucho.

A mis tías “*Malú*”, “*China*”, *Yolanda* y *Rubén* gracias por darme su cariño, apoyo y compañía y seguirme en cada aventura nueva. Les amo. A mis primos *Ximena*, *David*, *Iván*, *Daniela*, *Luisa*, *Zoé*, *Santiago* y *Mauricio* por ser esa compañía y diversión del día a día. Los quiero.

Al Dr. *Arturo Urrutia †* por confiar en mí y ver mi potencial como estudiante y aunque no haya sido médico como usted quería, este logro va en su memoria donde sea que se encuentre.

A mis amigos *Verónica Rebollo* y *Carlos Rosas*, gracias por ser mi compañía durante toda la carrera, por cada risa, cada enseñanza, cada aventura juntos. Los quiero mucho. A *Carla Chávez*, *Paola De la Rosa*, *Magnolia García*, *Diana Ordaz*, *Nahum Delgado* gracias por ser parte fundamental de mi camino, por darme esa compañía y por apoyarme. A “*Chilitaco*” y mis amigos de *Discord* gracias por su compañía y apoyo. A la Dra. *Vane* por sus palabras, apoyo.

A las profesoras *Rosalba Amaya* y *Dolores Corona* por inculcarme el amor a la Biología durante la preparatoria. Por último, agradezco a cada persona que de alguna u otra forma me influenció a ser quien soy ahora.

*El conocimiento es una herramienta,  
y como todas las herramientas,  
su impacto está en manos del usuario*

El Código Da Vinci, 2003

Dan Brown

<b>ÍNDICE</b>	
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>11</b>
<b>I INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> .....	12
1.2 Taxonomía de <i>Helicobacter pylori</i> .....	12
1.3 Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i> .....	12
1.3.1 Morfología y microbiología.....	12
1.3.2 Epidemiología de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> .....	14
1.3.3 Patologías.....	15
1.4 Terapia actual .....	16
1.5 DNA girasa.....	19
1.5.1 Estructura .....	19
1.5.2 Mecanismo.....	21
1.6 Inhibidores de la DNA girasa.....	25
1.7 Resistencias a antibióticos en la DNA girasa.....	27
1.8 Resistencia de <i>Helicobacter pylori</i> a quinolonas .....	27
1.9 Productos naturales y derivados sintéticos con potencial anti- <i>Helicobacter pylori</i> .....	29
1.9.1 Curcumina de <i>Curcuma longa</i> .....	31
1.9.2 Ácido anacárdico de <i>Amphipterygium adstringens</i> .....	32
1.9.3 Eupatilina de <i>Artemisia ludoviciana</i> .....	33
1.9.4 7-hidroxi-cadaleno y 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno de <i>Heterotheca inuloides</i> .....	35
1.9.5 Extracto metanólico de <i>Cyrtocarpa procera</i> (CpMet).....	36
<b>II JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....</b>	<b>38</b>
<b>III OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
3.1 Objetivo general .....	39
3.2 Objetivos particulares.....	39
<b>IV HIPÓTESIS.....</b>	<b>39</b>
<b>V METODOLOGÍA.....</b>	<b>39</b>

5.1	Alineamiento de secuencias múltiple .....	39
5.2	Compuestos .....	41
5.3	Extracto .....	47
5.4	Inhibición de la actividad de superenrollamiento mediado por la DNA girasa .....	48
5.5	Procesamiento de imágenes y análisis con ImageJ .....	50
5.5.1	Cálculo de la Concentración Inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) .....	51
5.6	Análisis estadístico .....	51
<b>VI</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
6.1	Alineamiento de secuencias .....	51
6.1.1	Sitios importantes para la actividad de superenrollamiento de la DNA girasa.....	53
6.1.2	Región que confiere resistencia a quinolonas.....	57
6.2	Estandarización de la Determinación de la Actividad de la Girasa .....	60
6.3	Efecto de la curcumina, diacetilcurcumina y sus derivados metálicos sobre la DNA girasa	65
6.4	Efecto de la fenilcurcumina y sus derivados metálicos sobre la DNA girasa.....	70
6.5	Efecto de otras moléculas sobre la DNA girasa .....	71
6.6	Efecto del ácido anacárdico sobre la DNA girasa.....	73
6.7	Efecto del extracto metanólico de <i>Cyrtocarpa procera</i> (CpMet) sobre la DNA girasa	77
<b>VII</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>VIII</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>83</b>
<b>IX</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>85</b>
	<b>Anexo 1. Uso del programa ImageJ para realizar mediciones por densitometría.....</b>	<b>94</b>
	<b>Anexo 2. Alineamiento de secuencias .....</b>	<b>103</b>



## **ABREVIATURAS**

3,4CAD: 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno.

CAD: 7-hidroxicadaleno.

CI<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria 50.

CIP: Ciprofloxacino.

CMB: Concentración mínima bactericida.

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

CpMet: Extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera*.

CTD: Del inglés “C-terminal domain”, dominio carboxilo terminal.

DAC: Diacetylcurcumina.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

IBP: Inhibidor de la Bomba de Protones.

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas.

NTD: Del inglés “N-terminal domain”, dominio amino terminal.

PhCur: Fenilcurcumina.

QRDR: Del inglés “Quinolone Resistance-Determining Region”, región determinante de la resistencia a quinolona.

WGO: Del inglés World Gastroenterology Organization (Organización Mundial de Gastroenterología).

WHD: Del inglés “Winged Helix Domain”, dominio de hélice alada

## LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1.** Polimorfismo de *Helicobacter pylori*.
- **Figura 2.** Prevalencia mundial de *Helicobacter pylori*.
- **Figura 3.** Historia natural de la infección de *Helicobacter pylori*.
- **Figura 4.** Estructura de la DNA Girasa.
- **Figura 5.** Mecanismo de acción de la DNA Girasa.
- **Figura 6.** *Curcuma longa*.
- **Figura 7.** *Amphipterygium adstringens*.
- **Figura 8.** *Artemisia ludoviciana*.
- **Figura 9.** *Heterotheca inuloides*.
- **Figura 10.** *Cyrtocarpa procera*.
- **Figura 11.** Ejemplo de los Stocks de los compuestos y extracto a las concentraciones mencionadas.
- **Figura 12.** Secuencia alineada de aminoácidos 108-118 de GyrA.
- **Figura 13.** Secuencia alineada de aminoácidos 556-563 de GyrA.
- **Figura 14.** Secuencia alineada de aminoácidos 2-11 de GyrB.
- **Figura 15.** Secuencia alineada de aminoácidos del subdominio GHKL de GyrB.
- **Figura 16.** Secuencia alineada de aminoácidos 420-510 de GyrB.
- **Figura 17.** Secuencia de aminoácidos 80-100 de GyrA de *Helicobacter pylori*.
- **Figura 18.** Secuencia de aminoácidos 80-100 de GyrA de *Escherichia coli*.
- **Figura 19.** Modelado 3D de las subunidades gyrA de *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori*.
- **Figura 20.** Actividad de superenrollamiento de la girasa a distintas concentraciones de enzima.
- **Figura 21.** Actividad de superenrollamiento de la girasa a dos tiempos de incubación.
- **Figura 22.** Efecto de la DNA girasa en presencia de ciprofloxacino.
- **Figura 23.** Efecto del ciprofloxacino sobre la actividad de superenrollamiento de la Girasa.
- **Figura 24.** Cambio topológico del DNA superenrollado en presencia de DMSO.
- **Figura 25.** Actividad de la DNA girasa en presencia de diferentes concentraciones de curcumina.
- **Figura 26.** Actividad de la DNA girasa en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de curcumina diacetilcurcumina y otros complejos acoplados a metales.
- **Figura 27.** Efecto inhibitorio de la DNA girasa en presencia de diacetilcurcumina-Mn (DAC<sub>2</sub>-Mn) (1-50  $\mu\text{M}$ ).
- **Figura 28.** Actividad de la DNA girasa en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de fenilcurcumina y otros complejos de fenilcurcumina acoplados a metales.

- **Figura 29.** Actividad de la DNA girasa en presencia de diferentes compuestos: Eupatilina (EUP), Ácido anacárdico (ANA), 7-hidroxi-cadaleno (CAD), 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (3,4CAD) y = Extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* (CpMet).
- **Figura 30.** Efecto inhibitorio de la DNA girasa en presencia de ácido anacárdico.
- **Figura 31.** Determinación de la  $CI_{50}$  para el ácido anacárdico.
- **Figura 32.** Efecto inhibitorio de la DNA girasa en presencia del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* (CpMet) (50-200  $\mu\text{g/mL}$ ).
- **Figura 33.** Efecto inhibitorio de la DNA girasa en presencia del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* (CpMet).
- **Figura 34.** Determinación de la  $CI_{50}$  para el ácido anacárdico.

## LISTA DE TABLAS

- **Tabla 1.** Tratamientos para la erradicación de *Helicobacter pylori*.
- **Tabla 2.** Cepas de *Helicobacter pylori* sensibles y resistentes a quinolonas.
- **Tabla 3.** Compuestos con potencial anti-*Helicobacter pylori*.
- **Tabla 4.** Código de color Clustal.
- **Tabla 5.** Comparación de secuencias importantes en la DNA girasa.
- **Tabla 6.** Índice de superenrollamiento de la girasa, dependiendo de la cantidad de girasa.
- **Tabla 7.** Inhibición de la DNA girasa en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de curcumina, diacetilcurcumina y otros complejos acoplados a metales.
- **Tabla 8.** Inhibición de la DNA girasa en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de fenilcurcumina y otros complejos de fenilcurcumina acoplados a metales.
- **Tabla 9.** Inhibición de la DNA girasa en presencia de eupatilina, ácido anacárdico, 7-hidroxi-cadaleno, 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y CpMet.
- **Tabla 10.** Inhibición de la DNA girasa en presencia de ácido anacárdico.
- **Tabla 11.**  $CI_{50}$  de diferentes compuestos reportados en la literatura.
- **Tabla 12.** Inhibición de la DNA girasa en presencia de CpMet.

## RESUMEN

*Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa considerada como el principal agente etiológico de patologías gastrointestinales como la gastritis, úlceras pépticas, cáncer gástrico, entre otras; además, se calcula que alrededor del 40% de la población mundial se encuentra infectada, lo que la convierte en un organismo de importancia médica. En la actualidad los tratamientos de erradicación han disminuido su efectividad debido al aumento en las resistencias bacterianas, por esta razón, el grupo de investigación donde se realizó este proyecto se ha encargado de buscar productos naturales con un efecto anti-*H. pylori*, identificando así extractos y compuestos activos contra la bacteria.

Sin embargo, no se ha logrado identificar el mecanismo por el cual dichos productos inhiben el crecimiento de *H. pylori*, lo cual es muy importante conocer para que las terapias de erradicación sean correctamente elegidas y más efectivas. En este trabajo se propuso investigar si la DNA girasa podría ser el blanco de acción de algunos compuestos y un extracto con actividad anti-*H. pylori*. La DNA girasa es una enzima única de las bacterias que controla la topología del DNA bacteriano mediante la introducción de superenrollamientos negativos durante los eventos de replicación y transcripción del DNA para reducir la tensión molecular producida durante estos procesos. Para evaluar si nuestros productos bioactivos contra *H. pylori* tenían un efecto inhibitorio sobre la DNA girasa se utilizó el kit de la marca TopoGEN el cual mide la actividad de superenrollamiento de la enzima teniendo como sustrato un plásmido relajado. Los resultados mostraron que solo 2 de las muestras estudiadas, el ácido anacárdico y el extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* inhibieron completamente a la DNA girasa. Los datos generados permiten aportar información acerca del mecanismo de acción de estos dos productos y dan pie para continuar con su estudio con el fin de utilizarlos en la terapia contra *H. pylori*.

# I INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Helicobacter pylori*

En 1983 los doctores J. Robin Warren y Barry J. Marshall lograron aislar un bacilo a partir de biopsias de pacientes con gastritis, debido a su morfología bacilar y su similitud con bacterias del género *Campylobacter* inicialmente fue nombrada como *Campylobacter pylori* (Warren & Marshall 1983) Marshall & Goodwin, 1987, reclasificándose años después como *Helicobacter pylori* (Fox *et al.*, 1988) Goodwin *et al.*, 1989. A partir de ese entonces se ha vuelto un organismo de gran importancia científica ya que se considera el principal agente etiológico de patologías como la gastritis y el cáncer gástrico, entre otros (Atherton, 2006).

## 1.2 Taxonomía de *Helicobacter pylori*

En la actualidad, *H. pylori* es una bacteria que se clasifica según el “Manual of Systematic Bacteriology” (On *et al.*, 2015) de la siguiente manera:

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase:  $\epsilon$ -proteobacteria

Orden: Campylobacterales

Familia: Helicobacteraceae

Género: *Helicobacter*

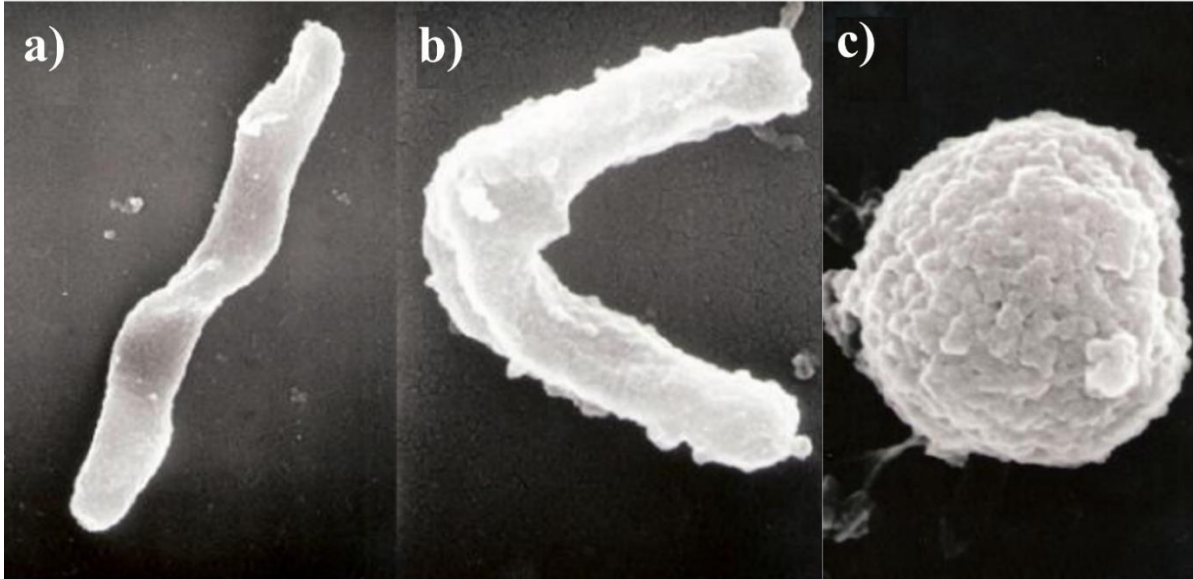
Especie: *H. pylori* (Fox *et al.*, 1988) Goodwin *et al.*, 1989

## 1.3 Generalidades de *Helicobacter pylori*

### 1.3.1 Morfología y microbiología

*Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa, microaerofílica, neutrófila (con aclimatación al medio ácido) y polimórfica, adoptando formas de bacilo helicoidal, curva (forma de “u”) o

cocoide (Fig. 1). Tiene un tamaño de 2.5 a 4  $\mu\text{m}$  de largo y de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho y presenta de 4 a 7 flagelos unipolares de 3  $\mu\text{m}$  de longitud. (Goodwin & Armstrong, 1990).



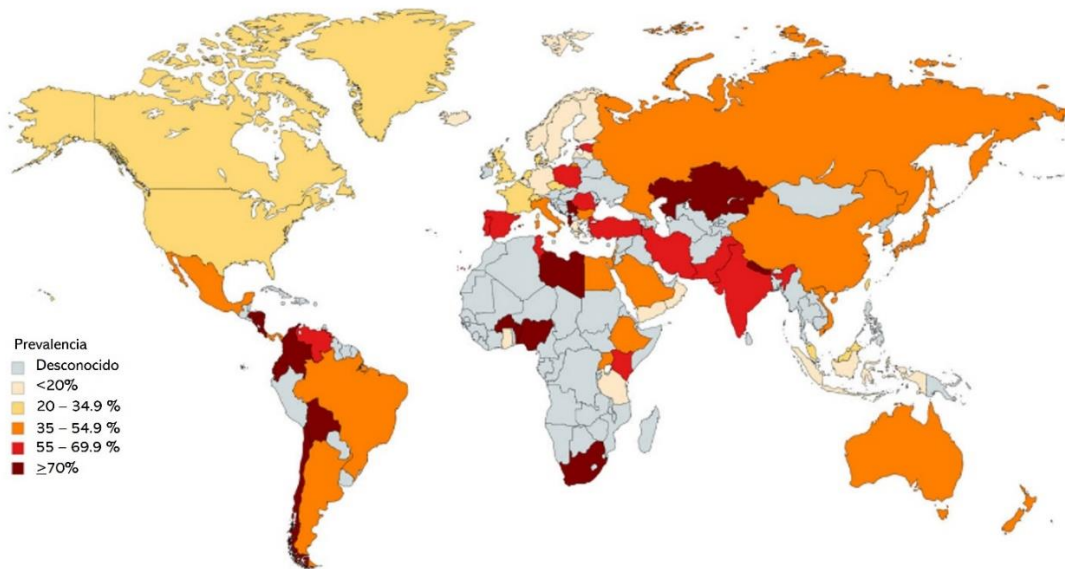
**Figura 1. Polimorfismo de *Helicobacter pylori*.** a) Forma bacilar, b) forma curva (de “u”) y c) forma cocoide. Tomada y modificada de Duš *et al.*, 2013.

El movimiento que le brindan los flagelos, así como el dinamismo de la forma helicoidal permite que en esta forma la bacteria sea considerada más patogénica por su gran motilidad (Worku *et al.*, 1999). Otra adaptación importante es la presencia de una “vaina” lipídica en los flagelos que se especula protegen a estos del medio ácido del estómago (Amieva & El-Omar, 2008).

Para la identificación de *H. pylori* se hacen uso de cuatro pruebas, la primera es una tinción diferencial de Gram, que para *H. pylori* arroja como resultado positivo a Gram negativo (Pandya *et al.*, 2013) y las otras tres son catalasa, oxidasa y ureasa, siendo positivas para *H. pylori*. La primera consiste en la transformación de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno por acción de la enzima catalasa, la siguiente la oxidación del citocromo por el complejo de la citocromo oxidasa y, por último, la alcalinización del medio debida a la hidrólisis de urea por la ureasa (Goodwin & Armstrong, 1990; Bauerfeind *et al.*, 1997).

### 1.3.2 Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*

La transmisión de *H. pylori* sigue siendo un tema incierto, sin embargo, se propone que las rutas de transmisión más aceptadas son la transmisión de persona a persona (Brown, 2000), mediante las vías oral-oral, gastro-oral y fecal-oral (Kusters *et al.*, 2006). Se calcula que alrededor de 40% de la población mundial está infectada con *H. pylori* y este porcentaje se ve en aumento hasta 90% en países en vías de desarrollo, esto implicaría que la infección por *H. pylori* responde a factores socioeconómicos, pero también se relaciona con la edad y la raza (Fig. 2) (Perez-Perez *et al.*, 2004; Zamani *et al.*, 2018).



**Figura 2. Prevalencia mundial de *Helicobacter pylori*.** Tomada y modificada de Zamani *et al.*, 2018.

La prevalencia en México para el 2010, según la Organización Mundial de Gastroenterología (WGO) es de 43% para infantes entre 5 y 9 años y para adultos ésta se eleva de 70-90% (WGO, 2010). Un estudio realizado por Torres *et al.*, (2016) reportó una seroprevalencia del 66% y así menciona como mayores factores de riesgo para el desarrollo de la infección el nivel socioeconómico bajo y pertenecer a regiones demográficamente sobrepobladas.

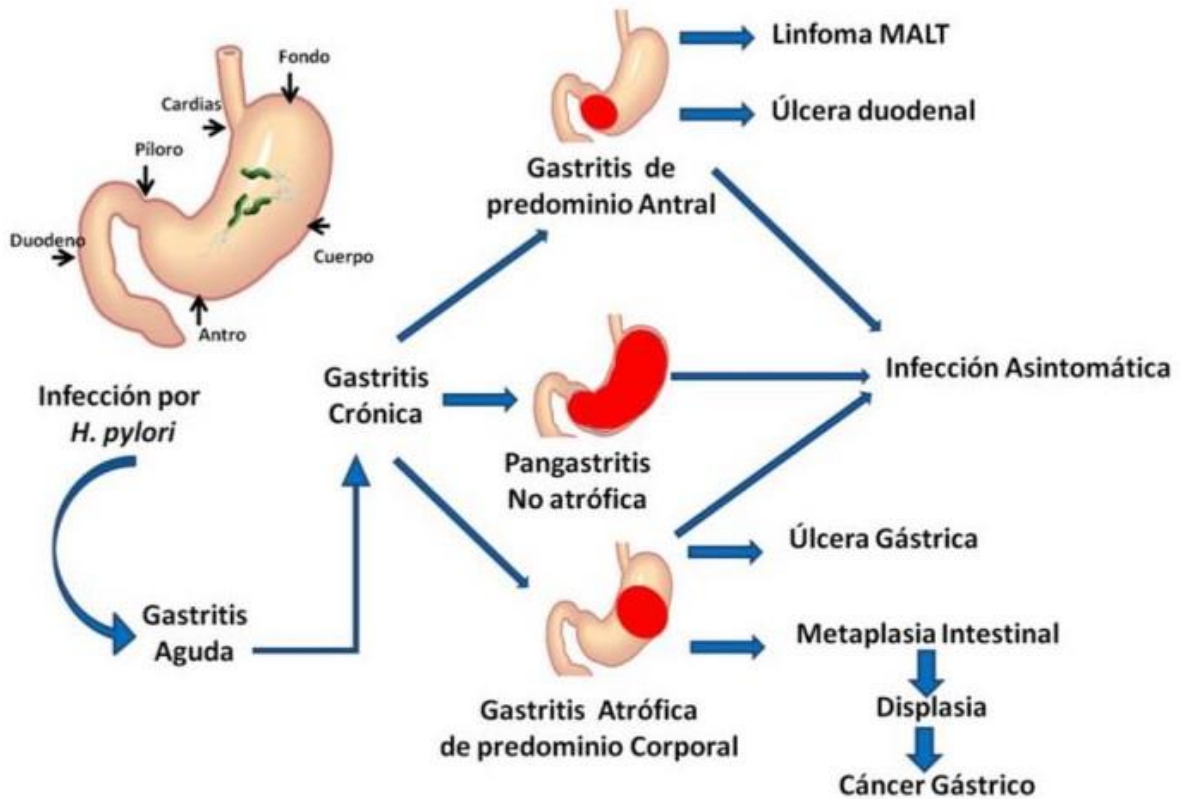
### 1.3.3 Patologías

La infección por *H. pylori* se encuentra asociada a patologías gastrointestinales que pueden ir desde gastritis, úlceras pépticas, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas, hasta cáncer gástrico (Atherton, 2006; Trespalacios *et al.*, 2010, Gisbert, 2013). En 1994, la Organización Mundial de la Salud reconoció a *H. pylori* como un carcinógeno tipo I.

Como se mencionó la prevalencia de esta bacteria oscila entre los 40-50% de la población mundial, sin embargo, en la mayoría de este porcentaje la infección por *H. pylori* permanece asintomática, calculándose que alrededor del 20% de los infectados desarrollan una patología asociada a la infección por *H. pylori*, reportándose que del 10 al 20% evoluciona a úlcera péptica, del 1 al 2% evolucionan a cáncer gástrico y menos del 1% a linfoma tipo MALT (Kusters *et al.*, 2006; Kandulski *et al.*, 2008).

Si bien la mayoría de los infectados con *H. pylori* permanecen asintomáticos, aquellos que desarrollan alguna patología es a consecuencia de la inflamación continua de la mucosa gástrica por la presencia y acción de *H. pylori*. A la secuencia de eventos se le ha denominado como “historia natural de la infección por *H. pylori*”, la inflamación puede evolucionar a gastritis aguda que a su vez puede volverse crónica, la cual es clasificada dependiendo de su ubicación, de predominio antral (antro del estómago), pangastritis (todo el estómago) y de predominio corporal (cuerpo del estómago). Dependiendo de la ubicación de la gastritis, de la inflamación de la mucosa, del secretado estomacal, el ambiente, la genética del huésped y factores genéticos de *H. pylori* (De Falco *et al.*, 2015), la gastritis crónica puede evolucionar a úlcera (gástrica o duodenal), linfoma tipo MALT o cáncer gástrico (Fig. 3) (Gómez-Chang *et al.*, 2017).





**Figura 3. Historia natural de la infección de *Helicobacter pylori*.** Se ilustra la evolución de la infección por *H. pylori*, en rojo se ilustran las áreas de infección. Tomada de Gómez-Chang *et al.*, 2017.

De acuerdo con el anuario de morbilidad (Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, 2021) la gastritis, duodenitis y úlceras representan el quinto lugar en enfermedad a nivel nacional y considerando que *H. pylori* es reconocido como el principal agente etiológico de estas patologías, la infección por la bacteria es considerada un problema de salud pública tanto a nivel nacional como nivel mundial por la alta incidencia de estas patologías.

#### 1.4 Terapia actual

La terapia para erradicar *H. pylori* no está indicada para todas las personas infectadas con *H. pylori*, según consensos internacionales como los consensos de Maastricht V/Florence (Malfertheiner *et al.*, 2007) y de México (Bosques-Padilla *et al.*, 2018), la terapia se indica cuando el agente

etiológico de la patología se ha confirmado como *H. pylori* y además cuando el paciente presenta úlcera gástrica o duodenal, gastritis atrófica, linfoma MALT, dispepsia no ulcerosa, después de resección de cáncer gástrico o si el paciente tiene familiares de primer grado con historial de cáncer gástrico.

Los esquemas tradicionales para la erradicación de *H. pylori* consisten en la utilización de un inhibidor de la bomba de protones (IBP) y la combinación de dos antibióticos entre los cuales destacan claritromicina, metronidazol y amoxicilina utilizados en la terapia de primera línea conocida como triple terapia (Malfertheiner *et al.*, 2007). La cual ha perdido efectividad debido a la resistencia bacteriana, con un éxito de erradicación de 80% dependiendo de la zona geográfica (Collins *et al.*, 2006, O’connor *et al.*, 2014).

Al fallar esta terapia se recurre por lo general a la terapia cuádruple que añade a su esquema sales de bismuto y la utilización de dos antibióticos que no hayan sido utilizado en la anterior terapia (Bosques-Padilla *et al.*, 2018). Ante el continuo fracaso en las terapias, se recurre a terapias conocidas como “terapias de rescate” (Tabla 1) (Mégraud & Lehorus, 2007; Gisbert, 2011). Para fines del presente trabajo se enfatizan las terapias que involucran a sus esquemas quinolonas, entre las cuales destaca el ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino (Bosques-Padilla *et al.*, 2001; Mori & Suzuki, 2020), estos fármacos han demostrado tener una buena absorción oral y pocos efectos secundarios asociados a su consumo y tienen como mecanismo de acción la inhibición de la DNA girasa, (Shen; *et al.*, 1989; Sharara *et al.*, 2006).

**Tabla 1. Tratamientos para la erradicación de *Helicobacter pylori***

Terapia	Fármacos	Posología	Duración (Días)	
Triple estándar	IBP	Dosis estándar b.i.d.	14	
	Claritromicina	500 mg b.i.d.		
	Amoxicilina o Metronidazol	1000 o 500 mg b.i.d.		
Cuádruple con bismuto*	IBP	Dosis estándar b.i.d.	10-14	
	Bismuto	Dosis estándar q.i.d.		
	Tetraciclina	500 mg q.i.d.		
	Metronidazol	500 mg q.i.d.		
Secuencial	IBP	Día	Dosis estándar b.i.d.	10
	Amoxicilina	1-5	1000 mg b.i.d.	
	IBP		Dosis estándar b.i.d.	
	Claritromicina o <b>Levofloxacino</b>	Día	500 mg b.i.d. o	
	Metronidazol	6-10	250 mg b.i.d. 500 mg b.i.d.	
Concomitante	IBP		Dosis estándar b.i.d.	10
	Claritromicina		500 mg b.i.d.	
	Amoxicilina		1000 mg b.i.d.	
	Metronidazol		500 mg b.i.d.	
Híbrida	IBP	Día	Dosis estándar b.i.d.	14
	Amoxicilina	1-7	1000 mg b.i.d.	
	IBP		Dosis estándar b.i.d.	
	Amoxicilina	Día	1000 mg b.i.d.	
	Claritromicina	8-14	500 mg b.i.d.	
	Metronidazol		1000 mg b.i.d.	
Rescate	IBP		Dosis estándar b.i.d.	10
	<b>Levofloxacino</b>		500 mg b.i.d.	
	Metronidazol		1000 mg b.i.d.	
Triple terapia basada en Rifabutina	IBP		Dosis estándar b.i.d.	14
	Rifabutina		150 mg b.i.d.	
	Amoxicilina		1000 mg b.i.d.	

\*Otras terapias con bismuto incluyen furazolidona o levofloxacino; b.i.d.: lat. *bis in die* (dos veces al día); q.i.d.: lat. *quater in die* (cuatro veces al día). En amarillo se subraya el levofloxacino que es un fármaco del grupo de las quinolonas. Tomada y modificada de Gómez-Chang *et al.*, 2017

## 1.5 DNA girasa

La DNA girasa es parte de un grupo de enzimas conocidas como topoisomerasas, estas enzimas se encargan de mantener la topología del DNA en todos los seres vivos y se subdividen en dos, tipo I y II, donde la principal diferencia entre ellos es el tipo de ruptura que hacen en las hebras de DNA, generando ruptura de una hebra y de dos hebras, respectivamente (Bush *et al.*, 2015). La DNA girasa pertenece al tipo II. Todas las topoisomerasas son capaces de relajar el DNA, pero la DNA girasa es la única capaz de introducir superenrollamientos negativos mediante la energía de la hidrólisis de ATP (Nöllmann *et al.*, 2007).

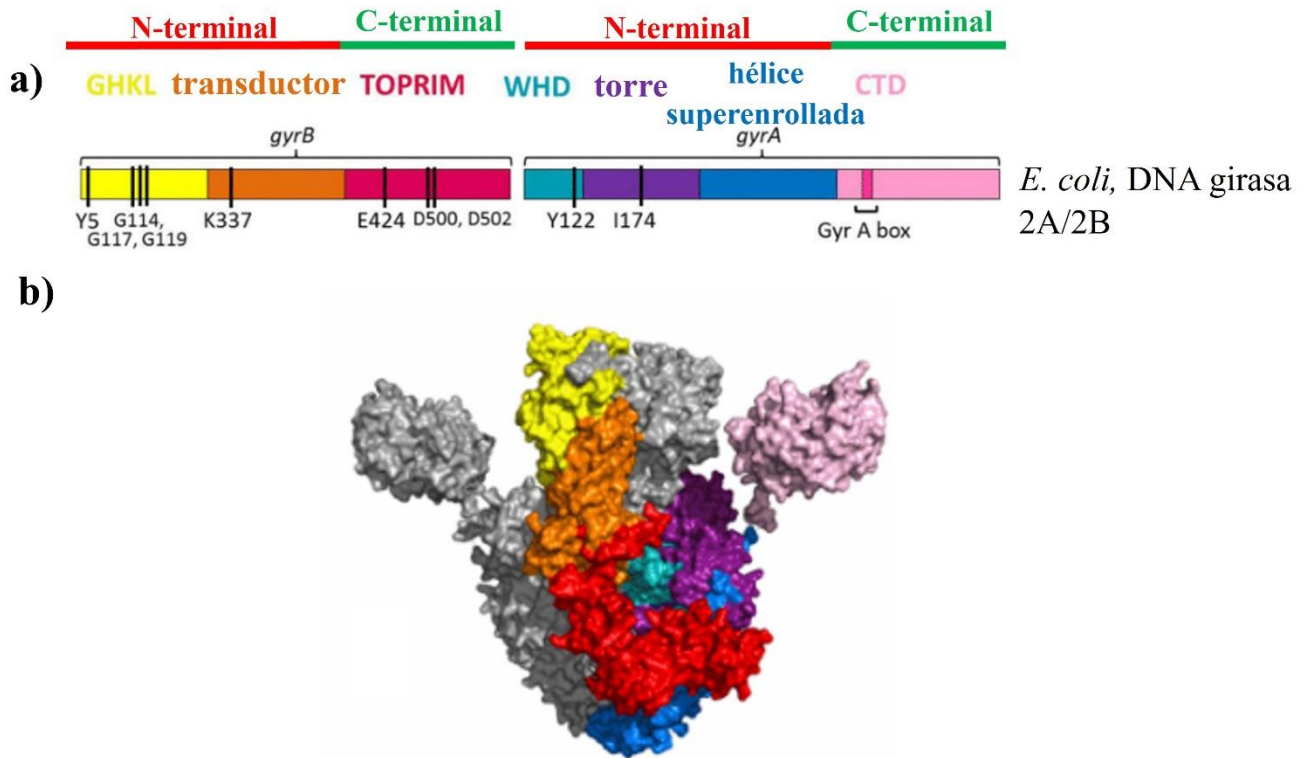
La DNA girasa es una enzima ubicua en las bacterias y se ha reportado su presencia en plantas como *Arabidopsis thaliana* (Wall *et al.*, 2004) y parásitos apicomplexos (Dar *et al.*, 2007), esta es la única evidencia de su presencia en células eucariotas. Forma parte de un mecanismo ancestral que se ha encargado de mantener la topología del DNA en todos los procariontes durante los procesos de replicación y transcripción, estos mecanismos han ido evolucionando junto a los procariontes desde su surgimiento hasta la actualidad (Duprey & Groisman, 2021) y se sugiere que gracias a esto son enzimas altamente conservadas en función y estructura (Champoux, 2001; Bush *et al.*, 2015).

### 1.5.1 Estructura

La DNA girasa es un heterotetrámero formado por 4 subunidades, 2GyrA/2GyrB (Drlica & Zhao, 1997). La enzima más estudiada es la DNA girasa de *E. coli*, en ella la subunidad GyrA y la GyrB tienen un peso molecular de 97-kDa y 90-kDa, respectivamente (Reece & Maxwell, 1991).

Para entender mejor la estructura de la DNA girasa y la función de cada parte de esta enzima se pueden subdividir sus subunidades en dos dominios (C-terminal y N-terminal) cada uno de estos realiza diferentes funciones. La subunidad GyrB (90-kDa) está conformada por un dominio N-

terminal de 43-kDa el cual es responsable de la unión e hidrolisis del ATP y un dominio C-terminal que se puede dividir en dos subdominios, TOPRIM y “la cola”. Y por otro lado la GyrA (97-kDa) se divide en un dominio N-terminal de 59-kDa encargado de la ruptura del DNA y un dominio C-terminal de 35-kDa que se encarga de “envolver” el DNA (Fig. 4) (Bush *et al.*, 2015).



**Figura 4. Estructura de la DNA girasa.** a) Genes de DNA girasa de *Escherichia coli* (*gyrA* y *gyrB*). En la parte superior se muestra las secciones que corresponden a los dominios N-terminal (rojo) y a los dominios C-terminal (verde) de cada una de las subunidades; dentro de cada gen, cada color representa un subdominio, las líneas verticales en negro representan las zonas que codifican para aminoácidos importantes. b) Estructura 3D, los colores se encuentran relacionados con los colores de la figura 4a. Tomado y modificado de Bush *et al.*, 2015.

Para el caso de GyrB, su dominio N-terminal es el encargado de la unión del ATP, específicamente entre los aminoácidos 2-220, del mismo modo esta región tiene residuos que se encargan de la dimerización entre los aminoácidos 2-15 y posteriormente, se presenta un subdominio altamente

conservado clásico de la superfamilia GHKL de ATPasas/quinasas. Por otro lado, los dominios C-terminal de las 2 GyrB al formarse el dímero adoptan una estructura conocida como “forma de cangrejo” la cual es la cavidad por donde pasan las moléculas de DNA, estos mismos dominios se encargan de anclar a las subunidades GyrA y además tienen tres residuos ácidos que unen a los iones  $Mg^{2+}$  necesarios para el proceso de ruptura y religado de DNA (Bush, *et al*, 2010).

Para GyrA se considera que el dominio N-terminal se puede dividir en dos regiones que reciben su nombre por su posición “arriba” y “abajo” estas regiones son encargadas de formar las cavidades o puertas conocidas como “puerta DNA” y “puerta C”, respectivamente. En la región “arriba”, específicamente en el subdominio WHD (Winged Helix Domain), está presente una tirosina, que junto con la tirosina de la otra subunidad A que forma el dímero, forman enlaces de fosfotirosina con la molécula de DNA favoreciendo la ruptura de la doble hebra generando regiones con nucleótidos protuberantes (sin aparear) de 4 pb (Bush *et al.*, 2015; Fois *et al.*, 2020). Mientras que la región C-terminal se presume que es la zona donde se posa el DNA durante los procesos de corte para darle estabilidad a la cadena, además se propone que la carga positiva de esta región podría estar involucrada en los procesos de unión y flexión del DNA (Bush, *et al*, 2010). También, se encuentra una región conocida como GyrA-Box la cual es una región formada por 7 aminoácidos (GRRGGK GK, para el caso de *E. coli*) la cual es considerada como el sitio que le confiere su potencial de superenrollamiento a la DNA girasa ya que se encarga de doblar un segmento del DNA sobre la región C-terminal de la subunidad GyrA y se ha visto que mutaciones en esta región impiden el superenrollamiento (Lanz & Klostermeier, 2012).

### 1.5.2 Mecanismo

La función *in vivo* de la DNA girasa es producir superenrollamientos negativos en la cadena de DNA, los cuales son necesarios para contrarrestar la tensión causada por el superenrollamiento

positivo de la cadena que se produce durante el proceso de replicación (Vos, 2011). *In vitro*, esta función de la girasa se demuestra al producir el superenrollamiento de un plásmido relajado, siendo este el criterio que utilizan las técnicas para medir la actividad de esta enzima (Fisher, 2008).

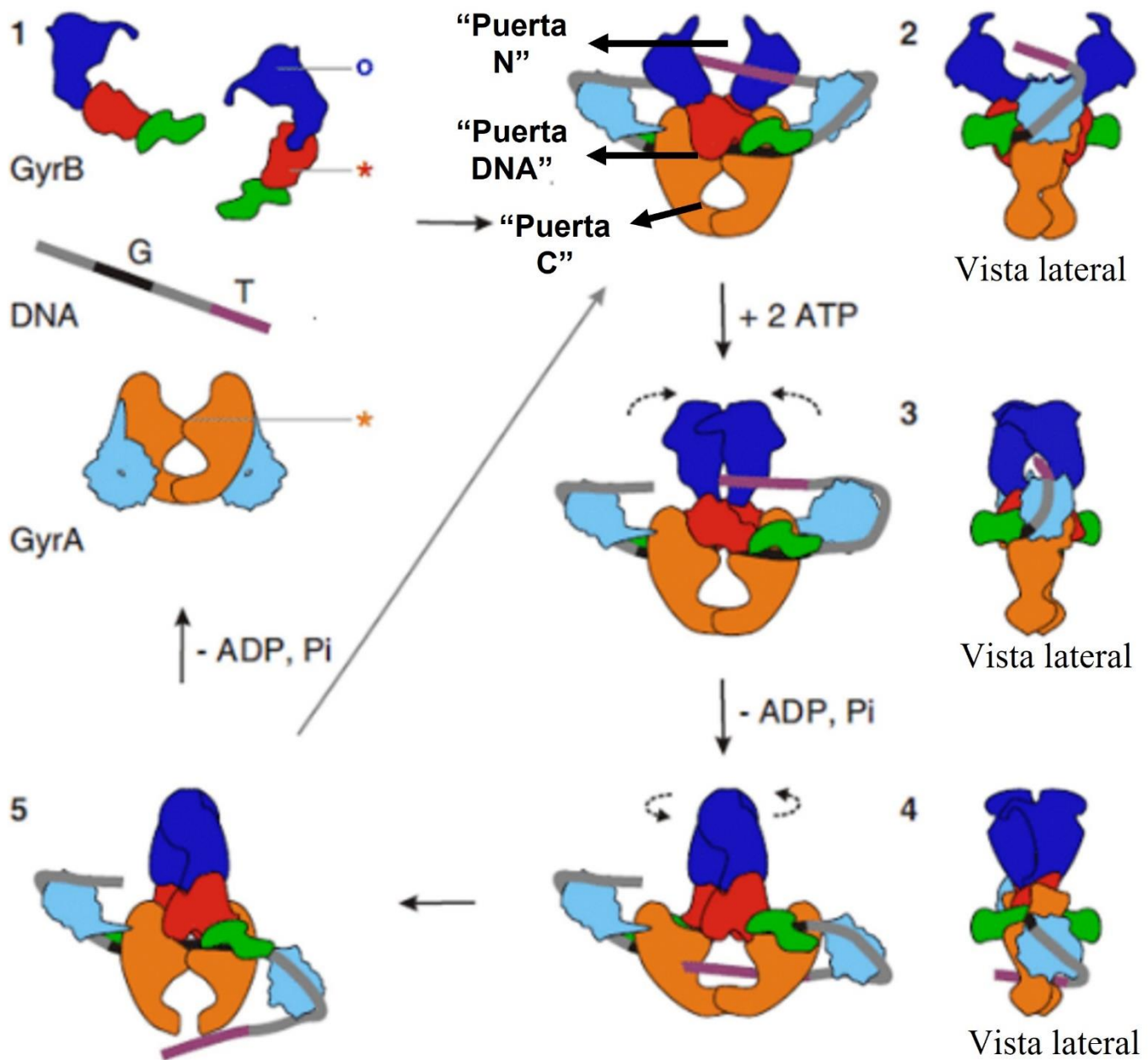
El mecanismo de acción de la DNA girasa es un tema que aún sigue en discusión, el modelo más aceptado, por evidencia bioquímica y estructural, es el “mecanismo de dos puertas” (Fig. 5) propuesto por Roca & Wang, 1992, 1994. Este mecanismo considera que la enzima tiene dos puertas, los dominios N-terminal de las subunidades GyrB forman la “puerta N”, los dominios C-terminal de las subunidades GyrA forman la “puerta C” y un tercer espacio conformado por la unión de GyrA-GyrB-sitio de corte del DNA conocido como “puerta DNA”.

El mecanismo se explica de la siguiente manera y se representa en la Fig. 5.

1. El segmento G (gate segment) de DNA se asocia a la enzima en la región N-terminal de la GyrA y en el dominio TOPRIM de la GyrB.
2. Una vez que el segmento G se encuentra asociado a la enzima, este se “envuelve” alrededor de 130 pares de bases sobre los dominios C-terminal de la GyrA, este envolvimiento permite que el segmento T (transport segment) (perteneciente a la misma molécula de DNA) atraviese el segmento G, esta unión del DNA propicia que el espacio formado por las regiones N-terminal de las subunidades GyrB se estreche. Cabe resaltar que el posicionamiento sobre la región C-terminal de GyrA es crucial para el correcto superenrollamiento de la DNA girasa.
3. La unión del ATP junto con el envolvimiento del DNA provoca el cerrado de la “puerta N” compuesta de las dos subunidades GyrB dejando atrapado al segmento T.

4. Los residuos de tirosina de la subunidad GyrA, auxiliados de los dos iones  $Mg^{2+}$  unidos a TOPRIM forman enlaces fosfotirosina uniendo covalentemente al DNA y a la subunidad. Esto permite la doble ruptura de ambas cadenas del segmento G del DNA.
5. El segmento T pasa a través de la “puerta DNA” y del segmento G roto hasta la salida por la “puerta C”, posteriormente por la carga positiva que existe en la cavidad formada por las subunidades GyrA se lleva a cabo el religado del DNA.
6. La hidrolisis del ATP y la liberación de ADP permite la apertura de la “puerta N” para un nuevo ciclo de superenrollamiento.





**Figura 5. Mecanismo de acción de la DNA girasa.** 1) Estado libre del DNA y de la proteína. 2) Envolvimiento del segmento G del DNA y entrada del segmento T a través de la puerta N. 3) Cierre de puerta N por la hidrólisis del ATP y ruptura del segmento G. 4) Paso del segmento T a través de la puerta DNA. 5) Apertura de la puerta C y liberación del DNA. (GyrA N-terminal: naranja, GyrA C-terminal: cian, GyrB N-terminal: azul, TOPRIM: rojo, “cola”: verde, segmento G: negro, segmento T: morado, estrellas: sitios activos para ruptura de DNA, círculo: sitio de unión ATP) Tomada y modificada de Bush *et al.*, 2015.

## 1.6 Inhibidores de la DNA girasa

Debido a la importancia de esta enzima en procesos como la replicación, transcripción y elongación del DNA, ha sido un blanco atractivo para el desarrollo de fármacos que puedan inhibir su actividad. Se conocen dos tipos de drogas que inhiben a la enzima, las quinolonas que son moléculas sintéticas (Chan *et al.*, 2013) y están dentro del esquema de erradicación de *H. pylori* (e.g. ciprofloxacino y levofloxacino) y las aminocumarinas que son productos de síntesis de cepas de *Streptomyces* (Maxwell & Lawson, 2009).

Otro punto a favor para considerar a la DNA girasa como blanco de inhibición, es el hecho que estas enzimas únicamente se encuentran en las bacterias y solo se ha reportado su existencia en otras células eucariotas de algunas plantas y parásitos (Bush *et al.*, 2015).

### I.6.1.1 Quinolonas

Las quinolonas son los fármacos más utilizados y conocidos que tienen como blanco la DNA girasa y tienen como precursor al ácido nalidíxico, el cual curiosamente fue descubierto por accidente, como un subproducto durante la síntesis de cloroquina (Leshner *et al.*, 1962). Estos antibióticos tienen como mecanismo de acción la inhibición de la DNA girasa, específicamente actuando sobre la subunidad A de esta enzima (GyrA) (Shen *et al.*, 1989).

Las quinolonas son fármacos que llevan a cabo su efecto inhibitorio mediante la formación de un complejo ternario conformado por la unión de enzima-fármaco-DNA, al formar este complejo se inhibe la función completa de la DNA girasa, lo cual se ve reflejado en la muerte celular (Drlica & Malik, 2003).

Cabe destacar que son compuestos sintéticos que están en constante modificación para generar quinolonas con un efecto mayor, por esta razón la primera generación de quinolonas (ácido

nalidíxico y ácido oxolínico) tenían un efecto débil sobre la DNA girasa, posteriormente surgieron quinolonas de nuevas generaciones que actualmente son nombradas como fluoroquinolonas como el ciprofloxacino (segunda generación), el levofloxacino (tercera generación), el moxifloxacino y gemifloxacino (cuarta generación) (Collin *et al.*, 2011). En la actualidad, se siguen haciendo grandes esfuerzos para sintetizar nuevas quinolonas con un efecto mayor que las quinolonas de generaciones pasadas, un ejemplo a destacar y de los pocos que han sido probados en *H. pylori* es la quinolona conocida como Y-904 (Iwao *et al.*, 2003), para la cual se reporta una CMI de 0.025 µg/mL para la cepa ATCC43504, que es mejor que el valor reportado para el levofloxacino (0.39 µg/mL) e igual que la CMI para la amoxicilina.

#### **I.6.1.2 Aminocumarinas**

Las aminocumarinas son poderosos inhibidores de la DNA girasa, con una mayor afinidad que las quinolonas, este tipo de moléculas tienen como sitio de acción la subunidad B de la DNA girasa, específicamente el sitio de unión del ATP (Maxwell, 2003). Sin embargo, estas moléculas no han tenido éxito en su uso clínico debido a varias razones, dentro de las que destacan su toxicidad en células eucariotas por tener efecto sobre la proteína Hsp90, chaperona involucrada en el plegamiento de muchas proteínas, permitiéndoles su actividad biológica. Además, se ha visto un efecto pobre sobre bacterias Gram negativas debido a la dificultad que tienen algunos de estos compuestos por atravesar la membrana externa y por último se ha reportado una solubilidad baja complicando su administración (Heide, 2014).

No hay reportes de que alguna aminocumarina haya sido probada sobre la DNA girasa de *H. pylori*; al ser moléculas que no han sido utilizadas como tratamiento y son “desconocidas” para las bacterias suelen tener un efecto inhibitorio bastante bueno, un ejemplo de esto es el reportado por Alt *et al.*, 2011 quienes encontraron inhibición de varias aminocumarinas (novobiocina,

clorobiocina y coumermicina A) contra la DNA girasa de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, con valores de  $CI_{50} < 0.1$  y  $\leq 0.01 \mu M$ , respectivamente.

### **1.7 Resistencias a antibióticos en la DNA girasa**

Existen quinolonas de nueva generación que han demostrado tener buena acción contra la DNA girasa, sin embargo, existe el riesgo del fracaso de estas por la aparición de nuevas cepas resistentes (Dalhoff, 2012). Las quinolonas son uno de los fármacos utilizados para el tratamiento de *H. pylori*, pero también para la erradicación de otras bacterias, de tal manera que ya se han reportado resistencias bacterianas a ellas, las cuales se encuentran bien ubicadas en la secuencia de la enzima y se conocen como QRDR (Quinolone Resistance-Determining Regions) (Yoshida, *et al*, 1990; González, *et al*, 1998). Para el caso de *E. coli* se ha visto que las mutaciones que confieren resistencia a las quinolonas suelen aparecer entre los aminoácidos 67-106 (Bush *et al.*, 2010), datos que empatan con los reportados por Matsuzaki *et al.*, 2010 que reportan que los aminoácidos particularmente afectados en la resistencia a quinolonas son los aminoácidos 83 y 87 en el caso de *E. coli* y que para *H. pylori* son los 87 y 91.

En cuanto a las aminocumarinas, no hay evidencia de su uso clínico, por esta razón no hay evidencia de resistencias adquiridas por el uso de ellas, sin embargo, se ha reportado que *in vitro* existen cepas de *E. coli* con una mutación en el aminoácido Arg136 que confiere resistencia a estos compuestos (Contreras & Maxwell, 1992).

### **1.8 Resistencia de *Helicobacter pylori* a quinolonas**

Raramente el levofloxacino es utilizado como fármaco de primera línea contra *H. pylori*, no obstante, se ha observado que la terapia con levofloxacino es un régimen efectivo de segunda línea cuando la primera falla (Gisbert & Morena, 2006). Lamentablemente los regímenes con levofloxacino se han visto limitados precisamente por la resistencia bacteriana a estas quinolonas,

reportándose tasas de resistencia de hasta 15% (Kim *et al.*, 2005; Miyachi *et al.*, 2006; Bogaerts *et al.*, 2006; Cattoir *et al.*, 2007; Zullo; *et al.*, 2007). Pocos son los trabajos que se han encargado de estudiar a fondo la resistencia bacteriana de *H. pylori* a quinolonas y solo se conocen algunos estudios regionales que indican la presencia de resistencias como en Italia (Zullo, 2007), Japón (Miyachi, 2006) y Bélgica (Bogaerts, 2006).

En 2007, Cattoir y colaboradores dieron a conocer los lugares en la secuencia de aminoácidos que confieren resistencia para las quinolonas en *H. pylori*. Mediante el estudio de 128 cepas obtenidas por biopsias durante los años 2004-2005 en Francia, se encontraron 22 cepas resistentes a ciprofloxacino (CMI >1 mg/mL), lo que provocaba que también fueran resistentes a otras quinolonas (gatifloxacino, moxifloxacino, levofloxacino). Al estudiar la secuencia de aminoácidos se observó que las 22 cepas resistentes presentaron mutaciones en los aminoácidos 86, 87 y 91. Cuando la combinación en estos aminoácidos era Asp-Thr-Asp o Asp-Asn-Asp, las cepas fueron sensibles al ciprofloxacino (Tabla 2).

En cuanto a las cepas resistentes, la sustitución de aminoácidos permite dividir las en tres categorías, la primera es una sustitución en el aminoácido 87 por lisina, isoleucina o tirosina, la segunda es una sustitución en el aminoácido 91 por asparagina o tirosina y por último la sustitución en el aminoácido 86 por asparagina (Cattoir *et al.*, 2007).

**Tabla 2. Cepas de *Helicobacter pylori* sensibles y resistentes a quinolonas.**

Tipo	Aminoácidos		
	86	87	91
Sensible	Asp	Thr	Asp
	Asp	Asn	Asp
Resistente	Asn	Thr	Asp
	Asp	Lys	Asp
	Asp	Ile	Asp
	Asp	Tyr	Asp
	Asp	Asn	Asn
	Asp	Asn	Tyr

Tomada y modificada de Cattoir *et al.*, 2007.

### 1.9 Productos naturales y derivados sintéticos con potencial anti-*Helicobacter pylori*

Desde hace años el ser humano ha utilizado a las plantas con fines diversos, para su alimentación, su vestimenta y para preservar o recuperar un buen estado de salud. En cuanto a este último punto, el conocimiento de las plantas con propiedades medicinales se ha ido transmitiendo de generación en generación (Fabricant & Farnsworth, 2001) hasta la actualidad.

La medicina tradicional basada en plantas ha tenido rezagos en su conocimiento ya que durante muchos años fue considerada una pseudociencia. Gracias a estudios recientes y debido a la crisis de salud que vivimos en la actualidad, esta rama de la medicina ha ganado peso convirtiéndola en una rama que busca y genera compuestos para ser utilizados como fármacos novedosos (Luna-Nemecio, 2019).

La eficacia de los tratamientos de erradicación de *H. pylori* ha ido en descenso por el aumento en las tasas de resistencia bacteriana (Tshibangu-Kabamba & Yamaoka, 2021), por esta razón la OMS ha colocado a *H. pylori* en la lista de alta prioridad de patógenos resistentes a antibióticos, con la finalidad de guiar y promover la búsqueda y desarrollo de nuevos antibióticos (OMS, 2017). Ante

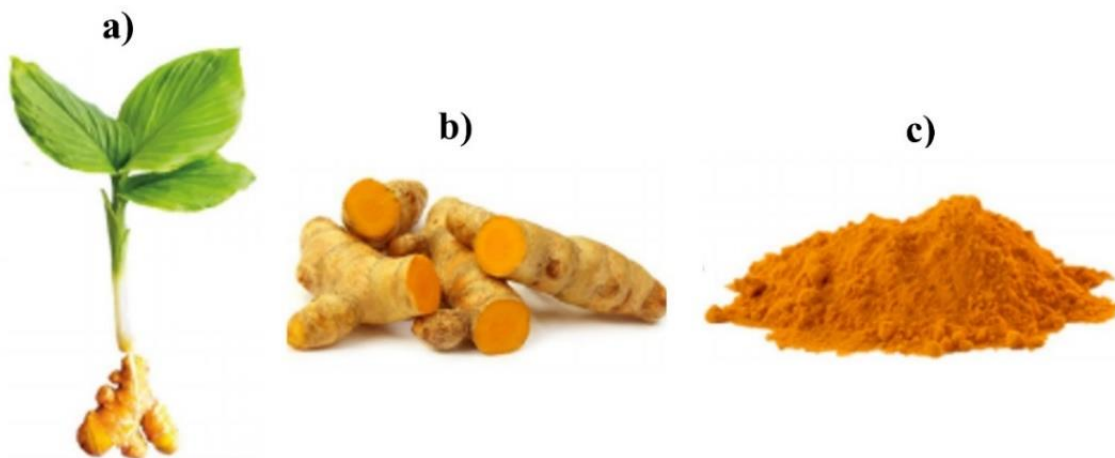
estas premisas se han buscado terapias alternativas que ayuden a contrarrestar este problema (Parreira *et al.*, 2016; Ayala *et al.*, 2014), dentro de estas alternativas destaca la búsqueda de compuestos con actividad anti-*H. pylori* en plantas medicinales.

En el caso particular de México esta tarea de búsqueda de productos naturales a partir de plantas utilizadas en medicina tradicional ha sido exitoso, por un lado, debido a la inmensa tradición cultural que viene desde tiempo prehispánicos, plasmada por ejemplo en escritos como el código de la Cruz-Badiano (1552) que posteriormente ha sido adquirida a lo largo de los años y por otro lado, debido a la inmensa biodiversidad de nuestro territorio (Mittermeier *et al.*, 1997). Se calcula que el país alberga alrededor de 23,000 especies de plantas vasculares de las cuales 50% son endémicas (Villaseñor, 2016) y aproximadamente 3,000 de ellas son utilizadas de manera tradicional para tratar diversos malestares (Bye *et al.*, 1995).

Un ejemplo de este esfuerzo es el trabajo realizado por el grupo de investigación donde se llevó a cabo esta Tesis, quienes recopilaron 53 plantas utilizadas tradicionalmente para tratar malestares gástricos, de las cuales se evaluó su actividad anti-*H. pylori* (Castillo-Juárez *et al.*, 2009). De este estudio y otros posteriores se han identificado varios extractos y compuestos con potencial anti-*H. pylori*, dentro de los que podemos mencionar el extracto metanólico de la corteza de *Cyrtocarpa procera* (Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2012; 2018) y los siguientes compuestos, la eupatilina obtenida de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* (Palacios-Espinosa *et al.*, 2021), el ácido anacárdico obtenido de *Amphipterygium adstringens* (Castillo-Juárez *et al.*, 2017), los cadalenos obtenidos de *Heterotheca inuloides* (Egas *et al.*, 2018) y la curcumina aislada de *Curcuma longa*. Considerando que estos productos naturales se utilizaron en el presente trabajo, a continuación, se profundizará en cada uno de ellos.

### 1.9.1 Curcumina de *Curcuma longa*.

*Curcuma longa* L. de la familia Zingiberaceae es una hierba perene endémica del sur de Asia (Lim, 2016), su nombre común es cúrcuma o azafrán. De esta planta se obtiene, mediante la pulverización de su rizoma la Cúrcuma (Fig. 6), la cual es utilizada como especia o aditivo, principalmente en la gastronomía de la India; además, se emplea como infusión para tratar malestares gastrointestinales, entre otros usos medicinales. Actualmente, su empleo se ha popularizado por todo el mundo y ha sido objeto de diferentes estudios que han permitido identificar el componente principal que confiere sus propiedades medicinales, la curcumina (Aggarwal *et al.*, 2007).



**Figura 6.** *Curcuma longa*. a) planta de *C. longa*, b) rizoma, c) Cúrcuma obtenida a partir del rizoma triturado. Tomada y modificada de Abdel-Hafez *et al.*, 2020.

Se han descrito muchas propiedades farmacológicas de la curcumina, dentro de las cuales está su potencial anti-*H. pylori* (Münzenmaier *et al.*, 1997; Mahady *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2006; entre otros).

Sin embargo, su uso como fármaco se encuentra limitado ya que se ha reportado que la curcumina es una molécula inestable (descomposición de >90% en un amortiguador de fosfato pH 7.2), es



poco soluble en agua (coeficiente de solubilidad 7.8 mg/L), pobremente absorbida por el cuerpo, es metabolizada y eliminada con rapidez (Wang *et al.*, 1997; Sanphui & Bolla, 2018).

Múltiples han sido los intentos de modificar la estructura de la curcumina para poder ser utilizada como fármaco, entre ellos mencionaremos el realizado por Meza-Morales *et al.*, 2019 quien diacetiló a la molécula, generando a la diacetilcurcumina (DAC), que posteriormente acopló a diversos metales como Cu, Mg, Mn, Zn. Estos complejos han sido probados y han arrojado una buena actividad anti-*H. pylori* (datos aun no publicados).

Por otro lado, el mismo grupo de trabajo sintetizó la fenilcurcumina mediante la eliminación del grupo metoxilo de los fenoles de la molécula de curcumina (Machado, 2019) y posteriormente la acoplaron con metales como Mn, Al, Cu, Zn, Ga e In. Actualmente, en el laboratorio donde se realizó este trabajo se ha determinado el potencial anti-*H. pylori* de estas moléculas, mostrando que algunas de ellas son muy efectivas para detener el crecimiento de la bacteria (datos aun no publicados).

### **1.9.2 Ácido anacárdico de *Amphipterygium adstringens*.**

*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl., de la familia: Anacardiaceae, es un árbol que ronda los 10 m de altura con tronco de corteza grisácea, florece entre los meses de abril y mayo y las flores pueden encontrarse solitarias o en forma de ramillete, produce frutos en forma de nuez abultada (Argueta *et al.*, 1994; CONABIO, 2009).

Este árbol se distribuye en zonas desde los 100 hasta los 3000 msnm, asociado a climas cálidos, semicálidos y templados, es una especie ampliamente distribuida en México asociada a bosques tropicales caducifolios, subcaducifolio, matorral xerófilo y bosque espinoso (Argueta *et al.*, 1994), específicamente en las regiones de Aguas Calientes, Colima, Durango, Oaxaca, Chiapas, Guerrero,

Morelos, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Puebla, Ciudad de México, etc. (Cristina, 2002). En cada región recibe un nombre común, siendo el más popular, Cuachalalate.



**Figura 7.** *Amhipterygium adstringens*. Este árbol forma parte del jardín etnobotánico y del museo de Medicina Tradicional del INAH en Morelos. Imagen tomada del sitio web del Instituto Nacional de Antropología e Historia ([https://lugares.inah.gob.mx/es/museos-inah/museo/museo-piezas/12916-12916-cuachalalate.html?lugar\\_id=389](https://lugares.inah.gob.mx/es/museos-inah/museo/museo-piezas/12916-12916-cuachalalate.html?lugar_id=389)).

Su uso tradicional se basa en la preparación de infusiones de la corteza de esta planta para aliviar malestares gástricos como dolores o infecciones estomacales e intestinales, del mismo modo hay evidencia de su uso para tratar cáncer gástrico (Argueta *et al.*, 1994).

En cuanto a su fitoquímica, se han obtenido diferentes metabolitos, de entre ellos destacan los ácidos anacárdicos por su muy buena actividad anti-*H. pylori*, CMI de 10 µg/mL y una CMB de 16 µg/mL (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

### 1.9.3 Eupatilina de *Artemisia ludoviciana*

*Artemisia ludoviciana* subsp. mexicana (Willd. Ex Spreng.) Fernald, familia Asteraceae, es una hierba aromática perenne de 1-1.5 m de altura que florece en septiembre, con flores color paja y un fruto pequeño (~1 mm) color café claro (Heike, 2009).

Es considerada como una maleza endémica de México, Estados Unidos y Guatemala teniendo una amplia distribución dentro del territorio mexicano, distribuyéndose en zonas ruderales, matorrales y claros de bosque (Villaseñor, 2016).

Recibe un nombre común en cada región, donde se destaca Estafiate, Hierba Maestra, Istafiatl en el Estado de México y Osomiate en Quintana Roo (Argueta *et al.*, 1994).

Tradicionalmente, las partes aéreas se consumen de forma cruda o en decocciones para el tratamiento de malestares gastrointestinales como lo son la diarrea, la disentería, retortijones, dolores, inflamación, contra parásitos, etc. (Argueta *et al.*, 1994).



**Figura 8.** *Artemisia ludoviciana*. Tomada de Ficha Técnica de CONABIO. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisia-ludoviciana/fichas/ficha.htm>

A partir de esta planta y de su estudio fitoquímico se han obtenido diversos compuestos dentro de los cuales están la eupatilina y la estafiatina (Ruiz-Cancino *et al.*, 1993). En 2021, Palacios-Espinosa y colaboradores, aislaron a partir de las partes aéreas, a la eupatilina y reportaron su actividad bactericida y bacteriostática contra *H. pylori* (CMI & CMB = 31.2 µg/mL).

#### 1.9.4 7-hidroxi-cadalenol y 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol de *Heterotheca inuloides*.

*Heterotheca inuloides* Cav. ex Sosa & Gómez Pompa, familia: Asteraceae es una hierba perenne de 1 m de altura con flores dispuestas en cabezuelas con 150 flores, esta planta es endémica de México con una amplia distribución sobre todo en estados del sur y centro como Puebla, Veracruz, Oaxaca, etc. (Standley, 1920; Heike, 2009).

Se distribuye en zonas con alturas desde nivel del mar hasta los 2400 msnm, asociada a climas cálidos, semicálidos, secos y templados, suele ser cultivada por sus usos medicinales y se encuentra en ambientes como bosques de pino encino, matorral xerófilo, pradera semiárida y bosques tropicales (Standley, 1920).



**Figura 9.** *Heterotheca inuloides*. Tomada de ficha técnica de CONABIO. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/heterotheca-inuloides/fichas/ficha.htm>

Tradicionalmente, ha sido consumida como infusiones de las partes aéreas para tratar malestares del aparato respiratorio, también se destaca su uso para aliviar malestares gastrointestinales como analgésico para dolor de úlcera, dolores de estómago y cólicos (Standley, 1920; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017).

Fitoquímicamente, se han aislado muchos metabolitos dentro de los cuales se encuentran el 7-hidroxi-cadaleno y el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno que han mostrado una actividad anti- *H. pylori* muy importante (CMI =1.5 y 3.91 µg/mL, respectivamente) (Egas *et al.*, 2018).

### **1.9.5 Extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* (CpMet)**

*Cyrtocarpa procera* Kunth, familia Anacardiaceae, es un árbol de 6 m o más de altura con corteza gris-rojiza que florece durante la primavera entre los meses de marzo-mayo, con flores pequeñas y blancas produce como fruto una drupa de color amarillo (Standley, 1920; Fonseca & Medina-Lemos, 2012).

Se distribuye en zonas con altitudes de 500-1350 msnm, en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados asociados a bosques tropicales caducifolios, subcaducifolios, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña y bosque de encino y pino (Fonseca & Medina-Lemos, 2012).

Es un árbol endémico de Mesoamérica distribuyéndose en Honduras y ampliamente en México, abarcando sobre todo la región suroeste y centro de nuestro país, como Guerrero, Michoacán, Morelos, Jalisco y Puebla. (Fonseca & Medina-Lemos, 2012). En cada región recibe un nombre común, por ejemplo, Chupandilla en Puebla, Machocote y Palo de Chupandia en Oaxaca (Abundiz *et al.*, 2004).



**Figura 10.** *Cyrtocarpa procera*. Árbol y corteza de Chupandilla. Tomada de Escobedo, 2013.

Tradicionalmente cada región lo consume para aliviar diferentes malestares, uno de ellos es el uso de agua de diario obtenidas por la decocción de corteza, el consumo de esta agua ayuda a reducir enfermedades en la piel, dolor de dientes, asimismo, se utiliza para aliviar malestares gástricos como diarrea, gastritis, úlceras y disentería (Argueta *et al.*, 1994).

El extracto metanólico de la corteza de *C. procera* ha sido el más estudiado. Rodríguez-Canales y colaboradores en 2020, reportan la presencia en este extracto de flavonoides como crisina, naringenina, kaempferol y catequina. Por otra parte, tiene actividad anti-*H. pylori* con una CMI de 62.5 µg/mL, además de efectos antiinflamatorios, gastroprotectores y de resolución de úlcera (Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2012; 2018).

## II JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

En la actualidad es evidente que la efectividad de las terapias para la erradicación de *H. pylori* ha ido en descenso por el aumento en las resistencias bacterianas, por esta razón distintos grupos de investigación se han enfocado en la búsqueda de compuestos de origen natural o sintéticos con efecto sobre *H. pylori*. Esta búsqueda ha sido exitosa ya que se han encontrado diferentes extractos y compuestos que han tenido efecto contra esta bacteria. Sin embargo, para la mayoría de estos aún no se tiene claro el mecanismo de acción o ni siquiera se ha estudiado o propuesto algún mecanismo.

Como ya se mencionó, en el grupo de investigación donde se realizó este trabajo se han identificado compuestos y extractos con actividad anti-*H. pylori* y se han estudiado y propuesto diferentes mecanismos de acción para los mismos, tales como la inhibición de la ureasa, la inhibición de la adhesión de la bacteria a las células del epitelio gástrico o la inhibición de la toxina vacuolizante VacA. También se han hecho esfuerzos, con el fin de conocer su mecanismo de acción al estudiar el efecto de algunos compuestos sobre la expresión proteica y génica de la bacteria.

Con el objeto de probar nuevos mecanismos de acción, se propone estudiar si el efecto de los compuestos o extractos activos sobre la bacteria pudiera ser sobre la DNA girasa, ya que es el mecanismo de algunos antibióticos utilizados en el esquema contra *H. pylori*, como lo son el ciprofloxacino y el levofloxacino.

Por otro lado, son pocos los estudios que se han enfocado a la búsqueda de nuevas moléculas que inhiban a la DNA girasa de *H. pylori* y aún menos, aquellos que han propuesto extractos o compuestos de origen natural. Por lo que encontrar algún producto que inhiba a la DNA girasa implicaría un avance en la búsqueda de inhibidores de esta enzima.

### **III OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de diferentes compuestos y un extracto con actividad anti-*Helicobacter pylori* sobre la actividad de la DNA girasa de *Escherichia coli* para proponer si esta enzima es su blanco de acción.

#### **3.2 Objetivos particulares**

Determinar el porcentaje de identidad y similitud entre la DNA girasa de *Escherichia coli* y de *Helicobacter pylori* a través del alineamiento de sus secuencias.

Estandarizar y adaptar la metodología utilizada para medir la inhibición de la DNA girasa de *Escherichia coli* con el kit “Gyr-Drug Screen Kit”.

Cuantificar el porcentaje de inhibición de la actividad de superenrollamiento de la DNA girasa de *Escherichia coli* en presencia de diferentes compuestos o un extracto, con actividad anti-*Helicobacter pylori*.

### **IV HIPÓTESIS**

Si se tienen varios compuestos y extractos con actividad anti-*Helicobacter pylori* para los cuales no ha sido reportado un mecanismo de acción, alguno de ellos tendrá como blanco de acción a la DNA girasa.

### **V METODOLOGÍA**

#### **5.1 Alineamiento de secuencias múltiple**

El propósito de este trabajo fue determinar si compuestos con actividad anti-*H. pylori* tenían como blanco de acción a la DNA girasa y dado que el kit que se empleó utiliza a la enzima de *E. coli*,



nos pareció pertinente analizar con más profundidad las semejanzas entre las dos enzimas, con el objeto de poder extrapolar los resultados con *H. pylori*.

Se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de las subunidades GyrA y GyrB de *E. coli* K12 (uniprot, número de acceso: P0AES4 y P0AES6, respectivamente) y de *H. pylori* (ATCC 43504) ya que esta es la cepa que se utiliza en nuestro grupo de investigación (uniprot, número de acceso A0A2X5ADG6 y I0ZHC4, respectivamente).

En primer lugar, para corroborar que no hay diferencias entre las secuencias reportadas de diferentes cepas de cada bacteria, se realizó un alineamiento múltiple comparando nuestras secuencias con las secuencias de la base de datos del NCBI, esto se realizó con ayuda del programa BLAST de la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), el cual extrae de manera predeterminada las 100 secuencias más parecidas a la secuencia problema .

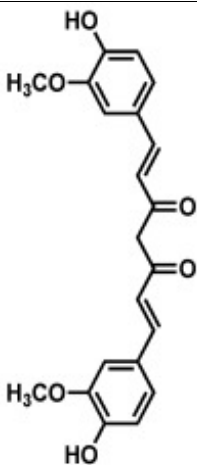
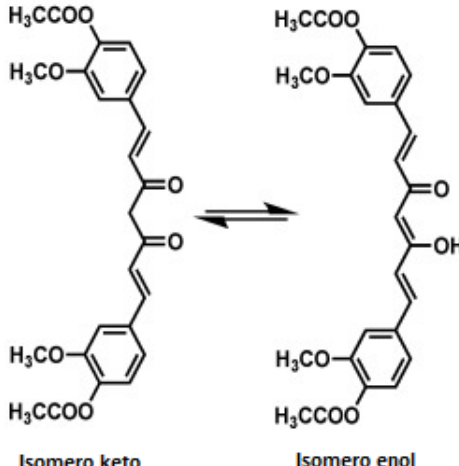
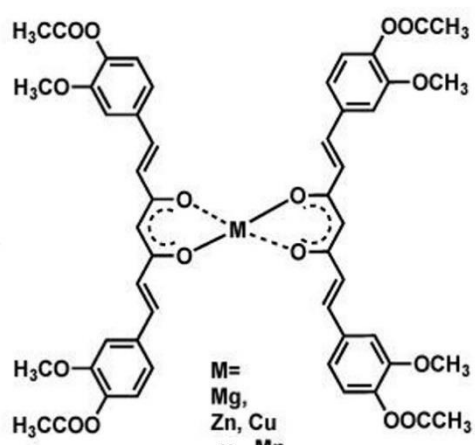
Posteriormente, se realizó un alineamiento solamente de las secuencias de *H. pylori* (ATCC 43504) y *E. coli* K12 con el mismo programa BLAST, estas secuencias se extrajeron alineadas, y posteriormente, se calcularon los porcentajes de identidad y similitud con el sitio web de bioinformatics.org ([https://www.bioinformatics.org/sms2/ident\\_sim.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html)).

Para observar y colorear las secuencias de aminoácidos se hizo uso del programa Jalview (<https://www.jalview.org>) para el cual se ingresaron las secuencias previamente alineadas y se aplicó un coloreado CLUSTAL, el cual colorea a los aminoácidos dependiendo de sus propiedades químicas, de este modo es más fácil observar aquellas zonas con alta similitud.

## 5.2 Compuestos

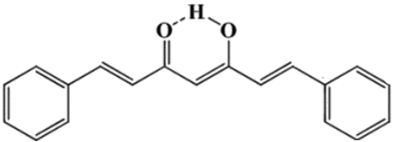
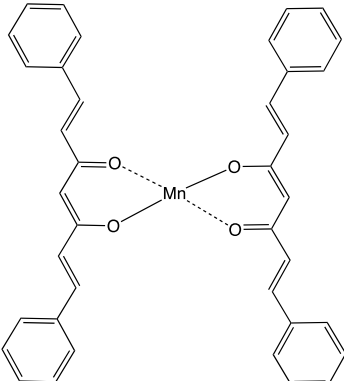
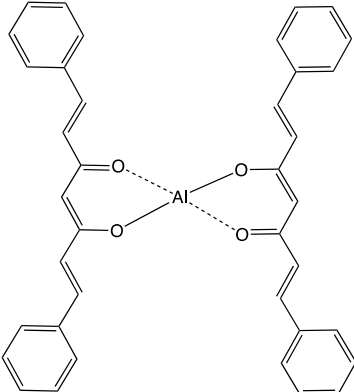
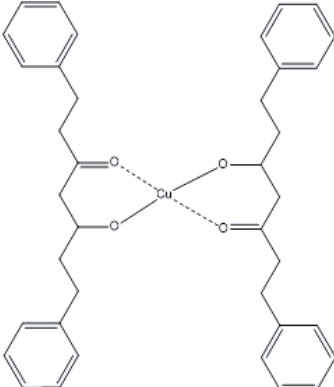
El criterio de inclusión de los compuestos utilizados en la presente Tesis fue que previamente se les haya reportado actividad anti-*H. pylori*. En la Tabla 3, se muestran los nombres, sus pesos moleculares y estructuras de cada uno de ellos.

**Tabla 3. Compuestos con potencial anti—*Helicobacter pylori*.**

Compuesto (Abreviatura) y grupo químico al que pertenece	Peso molecular (g/mol)	Estructura 2D
Curcumina (CUR) <sup>1</sup> Polifenol del grupo de los curcuminoides	368.38	
Diacetilcurcumina (DAC) <sup>1</sup> Sintetizado a partir de Curcumina	452.453	
*DAC <sub>2</sub> -Cu <sup>1</sup>	1039.50	
*DAC <sub>2</sub> -Mg <sup>1</sup>	1083.43	
*DAC <sub>2</sub> -Mn <sup>1</sup>	1114.06	
*DAC <sub>2</sub> -Zn <sup>1</sup>	1046.36	
Sintetizados a partir de Curcumina		

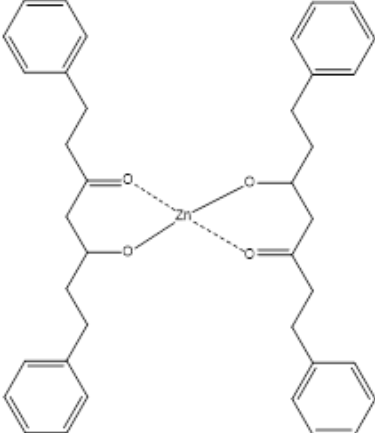
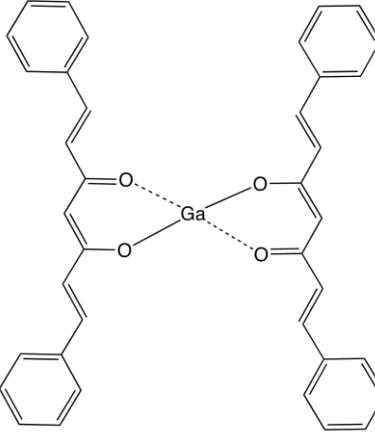
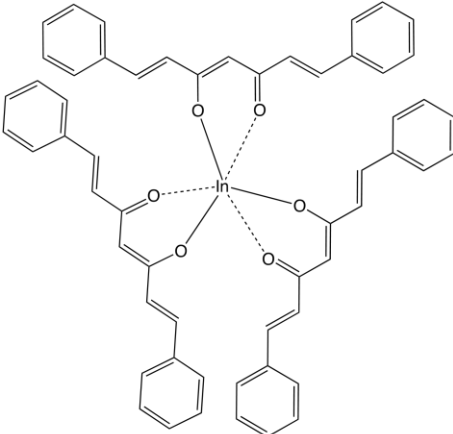
<sup>1</sup>Estructuras recuperadas de Meza-Morales (2019).

**Tabla 3. Compuestos con potencial anti—*H. pylori* (continuación).**

Compuesto (Abreviatura) y grupo químico al que pertenece	Peso molecular (g/mol)	Estructura 2D
Fenilcurcumina (PhCur) <sup>2</sup> Sintetizado a partir de Curcumina	277.46	
Fenilcurcumina-Mn <sup>3</sup> (PhCur <sub>2</sub> -Mn)	607.61	
Fenilcurcumina-Al <sup>3</sup> (PhCur <sub>2</sub> -Al)	577.64	
Fenilcurcumina-Cu <sup>3</sup> (PhCur <sub>2</sub> -Cu)	614.00	

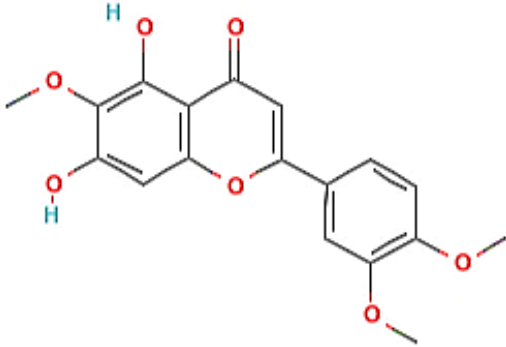
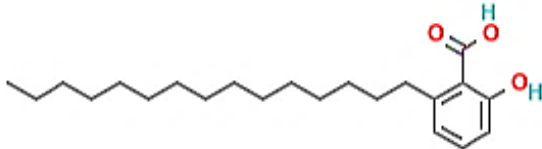
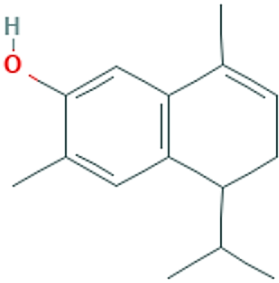
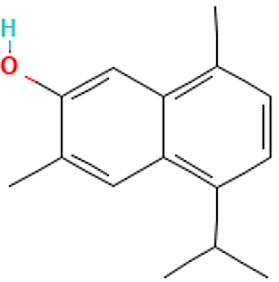
<sup>2</sup>Estructura recuperada de Alejo (2021). <sup>3</sup>Estructuras proporcionadas por Yair Alvarez Ricardo

**Tabla 3. Compuestos con potencial anti—*H. pylori* (continuación).**

Compuesto (Abreviatura) y grupo químico al que pertenece	Peso molecular (g/mol)	Estructura 2D
Fenilcurcumina-Zn <sup>3</sup> (PhCur <sub>2</sub> -Zn)	616.03	
Fenilcurcumina-Ga <sup>3</sup> (PhCur <sub>2</sub> -Ga)	622.39	
Fenilcurcumina-In <sup>3</sup> (PhCur <sub>3</sub> -In)	940.80	
Sintetizados a partir de Curcumina		

<sup>3</sup>Estructuras proporcionadas por Yair Alvarez Ricardo

**Tabla 3. Compuestos con potencial anti—*H. pylori* (continuación).**

Compuesto (Abreviatura) y grupo químico al que pertenece	Peso molecular (g/mol)	Estructura 2D
Eupatilina <sup>4</sup> Flavonoide	344.30	
Ácido anacárdico 6 pentadecil salicílico <sup>4</sup> Compuesto fenólico	384.51	
7-hidroxi-3,4- dihidrocadalenol <sup>4</sup> Sesquiterpeno	216.32	
7-hidroxi-cadalenol <sup>4</sup> Sesquiterpeno	215.30	

<sup>4</sup>Estructuras recuperadas de *PubChem* (2022).

Todos los compuestos curcuminoides fueron donados por el Dr. Raúl Enríquez Habib adscrito al Instituto de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El proceso de obtención y la descripción exacta de diacetylcurcumina (DAC), DAC<sub>2</sub>-Cu, DAC<sub>2</sub>-Mg, DAC<sub>2</sub>-Mn y DAC<sub>2</sub>-Zn se puede consultar en la publicación de Meza-Morales *et al.*, 2019. El proceso de obtención de la fenilcurcumina se puede consultar en la tesis de licenciatura de Machado (2019), por otro lado, la fenilcurcumina-Mn, fenilcurcumina-Al, fenilcurcumina-Cu, fenilcurcumina-Zn, fenilcurcumina-Ga y fenilcurcumina-In aún se encuentran en proceso de estudio (Machado, 2019; Alejo, 2021).

La eupatilina y el ácido anacárdico (6 pentadecil salicílico) utilizados en el presente trabajo fueron productos comerciales, en el caso de la eupatilina de Cayman Chemical con una pureza >98% y en el caso del ácido anacárdico de Calbiochem con una pureza >95%.

El 7-hidroxi-cadaleno y el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno fueron previamente aislados y purificados a partir de las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* de acuerdo con Egas *et al.*, 2018, en el laboratorio del Dr. Guillermo Delgado Lamas del Instituto de Química de la UNAM.

Las concentraciones elegidas para ensayar los compuestos fueron determinadas, con base en las concentraciones a las cuales los fármacos conocidos inhiben a la DNA girasa y que encontramos disponibles en la literatura, de tal manera que fijamos como máximo para ensayar una concentración final de 50 µM. Para el caso del extracto, como no contábamos con estudios previos acerca del efecto de extractos sobre la DNA girasa, decidimos utilizar concentraciones cercanas a la CMI de extractos activos, por lo que fijamos como máximo 200 µg/mL.

Para curcumina, DAC, DAC<sub>2</sub>-Cu, DAC<sub>2</sub>-Mg, DAC<sub>2</sub>-Mn y DAC<sub>2</sub>-Zn se prepararon stocks de cada uno de ellos disueltos en DMSO no estéril con una concentración de 1000 µM con la finalidad de

que, al colocar 1.0  $\mu\text{L}$  de éste en la reacción de 20  $\mu\text{L}$  se tuviera una concentración final de 50  $\mu\text{M}$ . A partir de este stock se prepararon las diluciones necesarias para tener concentraciones en la reacción de: 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Todos los stocks fueron sonicados por 2 min.

Para el resto de los compuestos, eupatilina, ácido anacárdico, 3,4CAD, CAD, PhCur, PhCur<sub>2</sub>-Mn, PhCur<sub>2</sub>-Al, PhCur<sub>2</sub>-Cu, PhCur<sub>2</sub>-Zn, PhCur<sub>2</sub>-Ga y PhCur<sub>3</sub>-In, se prepararon stocks de cada uno de ellos con DMSO no estéril a una concentración de 2000  $\mu\text{M}$  con la finalidad que al tomar 0.25  $\mu\text{L}$  de estos y colocarlos en la reacción de 10  $\mu\text{L}$ , se tuviera una concentración de 50  $\mu\text{M}$ . Las diluciones de PhCur y sus complejos metálicos fueron sonicados por 2 min. En caso de tener un efecto en cualquiera de los compuestos, se realizaron nuevas diluciones para realizar curvas de concentración respuesta.

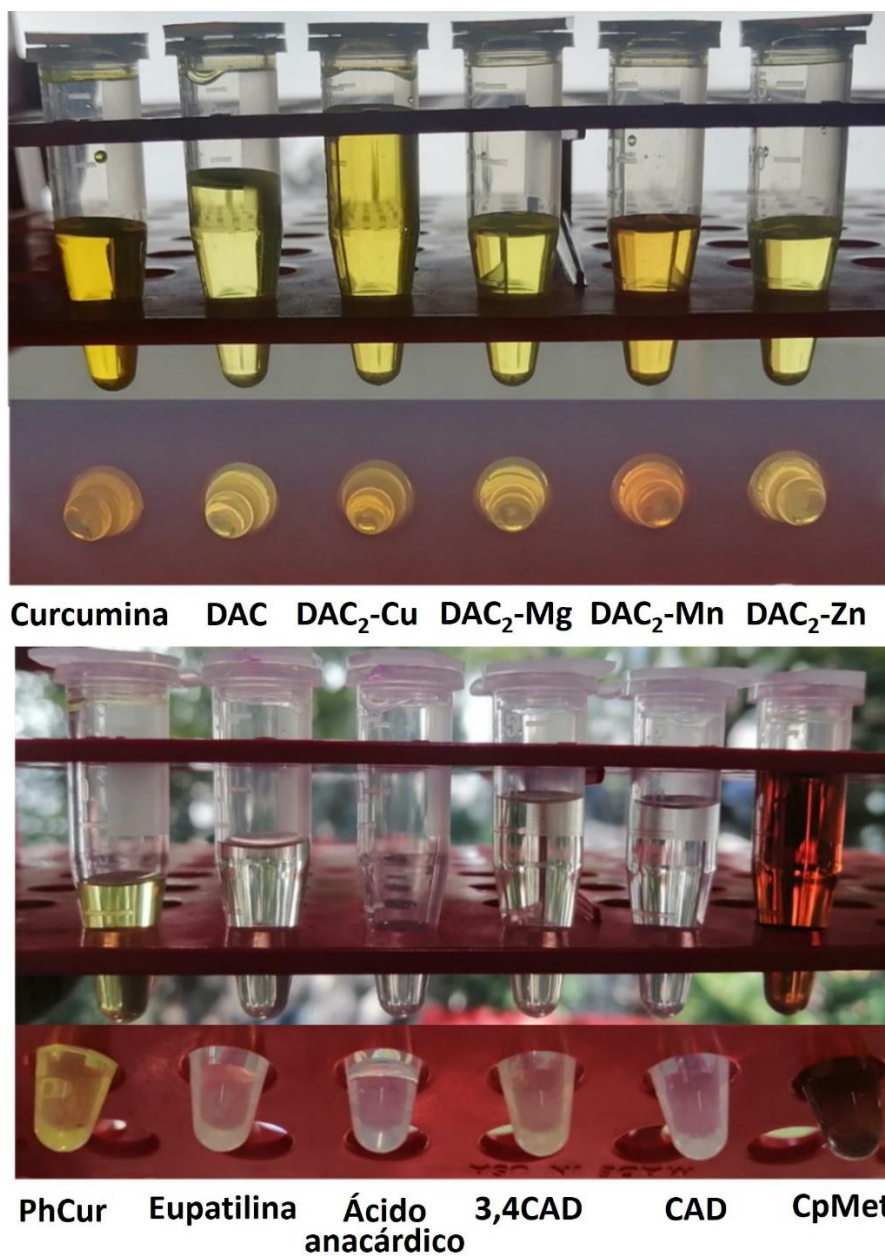
### 5.3 Extracto

Se hizo uso del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* (CpMet), obtenido como parte de trabajos anteriores (Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2018). Se obtuvo por maceración exhaustiva de la corteza con metanol (1:10 m/v), el disolvente se separó por filtración y posteriormente el residuo se evaporó a sequedad a presión reducida. El extracto (polvo rojizo), se mantuvo a temperatura ambiente en la obscuridad hasta su utilización.

Se preparó un stock de CpMet disuelto en DMSO no estéril con una concentración de 8000  $\mu\text{g/mL}$ , para que al colocar 0.25  $\mu\text{L}$  en la reacción de 10  $\mu\text{L}$  se tuviera una concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$ , a partir de este stock se prepararon diluciones para tener concentraciones finales de: 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 y 175  $\mu\text{g/mL}$ .

Todos los stocks preparados fueron perfectamente solubles en DMSO y algunos de ellos se muestran en la Fig. 11.





**Figura 11.** Ejemplo de los Stocks de los compuestos y extracto a las concentraciones mencionadas. Se observa de vista frontal y por debajo de los tubos.

#### 5.4 Inhibición de la actividad de superenrollamiento mediado por la DNA girasa

La actividad de la DNA girasa, así como la inhibición de esta por la adición de los diferentes compuestos y el extracto se realizó con el kit “*E. coli* DNA Gyrase Drug Screening kit” de TopoGEN (Port Orange, USA).

De acuerdo con el fabricante, se recomienda un volumen total de reacción de 20  $\mu\text{L}$ , que contiene: 1 x amortiguador de ensayo (35 mM Tris-Cl pH 7.5, 24 mM KCl, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM ditioneitol, 1.8 mM espermidina, 1 mM ATP, 6.5% glicerol y 0.1 mg BSA/mL), 1  $\mu\text{g}$  de pHOT-1 relajado, 1 U\*/ $\mu\text{L}$  de DNA girasa y agua destilada estéril suficiente para aforar a 20  $\mu\text{L}$ . La reacción se inicia con la adición de la enzima e incubando a 37 °C por 1 h. En el caso de agregar un inhibidor a ensayar se descuenta el volumen añadido del agua de aforo.

El ensayo se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 mL, tanto los reactivos como la reacción deben permanecer a 4 °C hasta el momento en que se inicia la reacción al agregar la enzima. Las reacciones tuvieron un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ , las cuales contenían: agua destilada estéril para aforar, 4  $\mu\text{L}$  de amortiguador de ensayo 5x, 0.5  $\mu\text{L}$  de plásmido relajado (0.497  $\mu\text{g}$ ) y los compuestos a probar se añadieron en 1  $\mu\text{L}$  de DMSO\*, posteriormente se añade 1  $\mu\text{L}$  de DNA girasa (0.15  $\mu\text{L}$  de DNA girasa + 0.85  $\mu\text{L}$  de amortiguador de dilución). Se incubó a 37 °C por 1.5 h. Como control positivo se ocuparon 2  $\mu\text{L}$  de ciprofloxacino (10 mg/mL) el cual se ha reportado como un veneno interfacial que afecta el complejo de escisión conformado por las subunidades GyrA de la enzima (Drlica & Malik, 2008), como controles negativos: 1.0  $\mu\text{L}$  de DMSO y agua destilada estéril.

\*Una unidad (1 U) está definida por el fabricante como aquella cantidad de DNA girasa capaz de superenrollar 500 ng de plásmido en 1 h a 37 °C. La DNA girasa que contiene el kit tiene una concentración de 10 U/mL por lo que se debe tomar la cantidad que se requiere para el ensayo y aforar el volumen con amortiguador de dilución para la enzima (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM ditioneitol, 1 mM EDTA y 50 % glicerol).

\*El proveedor recomienda no utilizar una cantidad alta de disolvente (<0.5% v) para ensayar los inhibidores, ya que se ha observado que un excedente de este (tanto metanol como DMSO) puede provocar una reducción en la actividad de la enzima. Por esta razón, tanto los stocks como las diluciones de cada compuesto se formularon para que al agregar 1.0  $\mu\text{L}$  de estos se tuviera la concentración deseada en el volumen de reacción.

## 5.5 Procesamiento de imágenes y análisis con ImageJ

Las imágenes fueron tratadas con el software de acceso libre ImageJ ® (<https://imagej.nih.gov/ij/>), el cual nos permite realizar un análisis por densitometría, este análisis se realiza mediante gráficos que arroja el programa para medir el área bajo la curva de cada carril, esta área correspondería a los píxeles de cada banda y que para nuestro objetivo correspondería a la cantidad de DNA superenrollada o relajada, el procedimiento más detallado se puede consultar en el **anexo 1**.

Los valores arrojados por el programa indican la densidad de píxeles que equivaldrían a la cantidad de DNA en un área (DNA superenrollado o relajado), para cada condición se obtuvo este valor para poder calcular su índice de superenrollamiento.

El índice de superenrollamiento (IS) está definido como:

$$IS = \frac{\text{Intensidad}_{\text{DNA superenrollado}}}{\text{Intensidad}_{\text{DNA relajado}}}$$

El porcentaje de actividad de la girasa se obtuvo para cada carril del gel, donde el 100% es el índice de superenrollamiento de la reacción sin añadir compuesto (control negativo) y se compara contra las diferentes condiciones experimentales donde se añade una muestra a ensayar, se ejemplifica en la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad de la girasa (\%)} = \frac{IS_{\text{condición}} \times 100}{IS_{\text{control negativo}}}$$

Se consideró a un compuesto con efecto inhibitor cuando la actividad de la girasa es menor que la actividad del control negativo, en este caso se calcularon los porcentajes de inhibición, definidos por la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de la girasa (\%)} = 100 - \text{Actividad de la girasa (\%)}$$

### 5.5.1 Cálculo de la Concentración Inhibitoria media (CI<sub>50</sub>)

Se graficaron las curvas de inhibición teniendo en el eje x los datos de concentración transformados a logaritmo y en el eje y el porcentaje de inhibición, posteriormente se trazó una línea de tendencia lineal, la cual esta es representada por una ecuación de la recta de tipo:

$$y = mx + b$$

Donde  $m$  es el valor de la pendiente y  $b$  el valor de intersección en el eje y. Que al despejar para calcular la CI<sub>50</sub>:

$$x = (50 - b)/y$$

### 5.6 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron al menos por triplicado para cada compuesto o extracto, en el caso que no se tenga por triplicado se indicará en el pie de figura correspondiente. Los porcentajes de inhibición de la girasa se presentan como la media ( $\pm$  desviación estándar).

## VI RESULTADOS

### 6.1 Alineamiento de secuencias

Se ha mencionado que la DNA girasa es parte de un mecanismo ancestral entre las bacterias y que por esto se ha conservado su estructura y función (Champoux, 2001; Bush *et al.*, 2015), sin embargo, no hay evidencia suficiente que permita comprobar la similitud entre las DNA girasas de *E. coli* y *H. pylori*.

Las secuencias de aminoácidos de GyrA de *H. pylori* y *E. coli* tienen una extensión de 828 y 875, respectivamente y para el caso de la subunidad GyrB su extensión de 773 y 804, respectivamente.

Para la secuencia de aminoácidos de la subunidad GyrA de *H. pylori* ATCC 43504 se observó que las 100 secuencias que mejor se alinearon correspondían a secuencias de diferentes cepas de *H. pylori* y tuvieron un porcentaje de identidad >97% comparado con nuestra cepa y para el caso de la subunidad GyrB se observó del mismo modo que tienen un porcentaje de identidad >98%, estos resultados estarían indicando que se podría usar cualquier enzima de cualquier cepa de *H. pylori* y extrapolar los resultados a diferentes cepas.

Por otro lado, para el caso de *E. coli* K12 el programa alineó 94 cepas de *E. coli* y 6 cepas del género *Shigella*. Se obtuvo para la secuencia de aminoácidos de la subunidad GyrA un porcentaje de identidad >99% y para el caso de la subunidad GyrB se obtuvo un porcentaje de identidad >99% contra las 100 cepas analizadas. Cabe resaltar el hecho de que hay una alta identidad con bacterias del género *Shigella*, estos resultados indican que se podría emplear cualquier enzima de otra cepa de *E. coli* e incluso de algunas bacterias del género *Shigella* y tener resultados extrapolables entre sí.

Al comparar nuestra secuencia de *H. pylori* (ATCC 43504) con la de *E. coli* K12, se obtuvieron los siguientes porcentajes de identidad y similitud, para GyrA de 46.82% y 64.94%, respectivamente y para la subunidad GyrB de 43.4% y 61.96%, respectivamente. Estos porcentajes no son tan altos comparados con los obtenidos entre las cepas de una misma especie. Considerando que las secuencias tienen una diferente extensión y analizando el alineamiento por completo (Anexo 2) se pueden observar regiones altamente conservadas que indicarían sitios importantes para el funcionamiento de la enzima, debido a esto, a lo reportado por Matsuzaki en 2010 acerca de la similitud de estas dos enzimas y a la premisa de Champoux (2001) donde se afirma que esta enzima es parte de un mecanismo ancestral y se debe de haber permitido su conservación tanto en estructura como función en las bacterias, se decidió analizar más a fondo el alineamiento.

### 6.1.1 Sitios importantes para la actividad de superenrollamiento de la DNA girasa

Para comparar más a fondo las secuencias y poder establecer qué tan parecidas son nuestras enzimas, se analizaron de manera independiente las secuencias en las regiones importantes para la actividad de la enzima. Para poder visualizar mejor los resultados e identificar aquellas zonas de alta similitud se utilizó el código de color Clustal, el cual se define en la Tabla 4.

**Tabla 4. Código de color Clustal**

Categoría	Color	Aminoácidos
Hidrofóbico	Azul	A, I, L, M, F, W, V, C
Carga positiva	Rojo	K, R
Carga negativa	Magenta	E, D
Polar	Verde	N, Q, S, T
Cisteínas	Rosa	C
Glicinas	Naranja	G
Prolinas	Amarillo	P
Aromáticos	Cian	H, Y
No conservados	Blanco	Ninguno

A= alanina, I= isoleucina, L= leucina, M= metionina, F= fenilalanina, W= triptófano, V= valina, C= cisteína, K= lisina, R= arginina, E= glutámico, D= aspártico, N= asparagina, Q=glutamina, S= serina, T= treonina, G= glicina, P= prolina, H= histidina, Y= tirosina.

Para la subunidad GyrA se identificaron 2 regiones importantes para el funcionamiento de la enzima, en primer lugar, el residuo tirosina encargado de formar enlaces fosfotirosina y llevar a cabo el corte (Bush *et al.*, 2015), este residuo se encuentra conservado para ambas secuencias y se

encuentra en la posición Y122 para *E. coli* y en la posición Y126 para *H. pylori* y que en el alineamiento lo encontramos en la posición 118 (Fig. 12).



**Figura 12. Secuencia alineada de aminoácidos 108-128 de GyrA.** Se observa el residuo tirosina (Y118) encargado de cortar las hebras de DNA (rectángulo rojo sobre el aminoácido).

Se decidió tomar 10 aminoácidos por atrás y delante del residuo tirosina para poder calcular el porcentaje de similitud de esta región, obteniendo un 77.27%.

Continuando con la subunidad GyrA, se puede identificar la región GyrA-box (GRRGGK GK), la cual es sumamente importante ya que confiere a la enzima la habilidad de superenrollamiento (Lanz & Klostermeier, 2012), esta región se identificó para ambas secuencias, 560-566 para *E. coli* y 528-534 para *H. pylori* y que en el alineamiento la encontramos en la posición 556-563 (Fig. 13).



**Figura 13. Secuencia alineada de aminoácidos 556-563 de GyrA.** Se observa la región GyrA-box (rectángulo rojo sobre los aminoácidos).

El porcentaje de similitud calculado de esta región, considerando solo los 7 aminoácidos fue de 85.71%. Se observa que la región gyrA-box se encuentra altamente conservada, sin embargo, existe una sustitución en el segundo aminoácido (N  $\rightarrow$  R), no existe información de esta

sustitución, los únicos cambios reportados son en el aminoácido 2 y 6 donde se han reportado sustituciones de R a K (Lanz & Klostermeier, 2012).

Para la subunidad GyrB se compararon las regiones que llevan a cabo la unión del ATP y de los iones  $Mg^{2+}$ , además de las regiones encargadas de dimerización en la región N-terminal de la subunidad GyrB (Bush *et al.*, 2015).

En primer lugar, la región encargada del cierre de la puerta N ubicada entre los aminoácidos 2-15 en *E. coli* (Fig. 14). Se comparan los primeros 11 aminoácidos del alineamiento ya que en esta zona quedó la región de cierre.



**Figura 14. Secuencia alineada de aminoácidos 1-11 de GyrB.** Se observa la región encargada del cierre de la puerta N (rectángulos rojos), es una región de 14 aminoácidos, sin embargo, para el caso de *H. pylori* los primeros aminoácidos se descartan en el alineamiento.

Para calcular el porcentaje de similitud se consideraron del aminoácido 1 al 11, obteniendo un porcentaje de similitud de 81.82%.

La siguiente región importante es el subdominio GHKL que se encarga de la unión al ATP, para el caso de esta región se identificaron los aminoácidos importantes reportados en la literatura para cada secuencia, para *E. coli* Y5, G114, G117, G119, Q335 y K337 y para *H. pylori* Y4, G112, G115, G117, Q333 y K335 (Fig. 15). Para calcular el porcentaje de similitud de este dominio se decidió dividir en 2 de acuerdo con los aminoácidos de interés.





Los resultados de estas comparaciones se resumen en la Tabla 5.

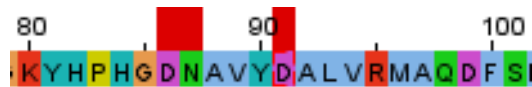
**Tabla 5. Comparación de secuencias importantes en la DNA girasa**

<b>Dominio/ % de similitud</b>	<b>Ubicación (aminoácidos importantes)</b>	<b>Función</b>
GyrA WHD	<i>E. coli</i> Y122 <i>H. pylori</i> Y126	Tirosina encargada de la ruptura del DNA
GyrA-box (85.71%)	<i>E. coli</i> 560-566 <i>H. pylori</i> 528-534	Región encargada de envolver el DNA en la región C-terminal de la GyrA
GyrB N-terminal (1-11: 81.82%)	<i>E. coli</i> 2-15 <i>H. pylori</i> 2-15	Aminoácidos encargados de la dimerización
GyrB GHKL (2-340: 64.90%)	<i>E. coli</i> Y5, G114, G117, G119, Q335 y K337 <i>H. pylori</i> Y4, G112, G115, G117, Q333 y K335	Sitios de unión e interacción con ATP
GyrB TOPRIM (420-510: 81.10%)	<i>E. coli</i> E424 D500 y D502 <i>H. pylori</i> E422 D497 y D499	Residuos encargados de unión a iones Mg <sup>2+</sup>

### 6.1.2 Región que confiere resistencia a quinolonas.

Dado que las resistencias a las quinolonas para *E. coli* y *H. pylori* se encuentran en la misma región de GyrA, las mutaciones que generan resistencia se han reportado en diferentes aminoácidos, se analizaron por separado las secuencias en esa zona.

En primer lugar, se puede definir que para el caso de *H. pylori* ATCC 43504, tenemos una cepa sensible a quinolonas ya que presenta la combinación de aminoácidos Asp-Asn-Asp en la posición 86, 87 y 91 (Fig. 17), lo cual coincide con lo reportado por Cattoir *et al.*, 2007.



**Figura 17. Secuencia de aminoácidos 80-100 de GyrA de *Helicobacter pylori*.** Se observan los aminoácidos 86, 87 y 91 (rectángulos rojos sobre los aminoácidos) que corresponderían a la combinación de aminoácidos de una cepa sensible a quinolonas.

Del mismo modo, para el caso de *E. coli* K12 podemos observar que es una cepa sensible debido a la presencia de los aminoácidos Ser-Asp en la posición 83 y 87 (Fig. 18) lo cual nuevamente coincide con lo reportado por Matsuzaki *et al.*, 2010.

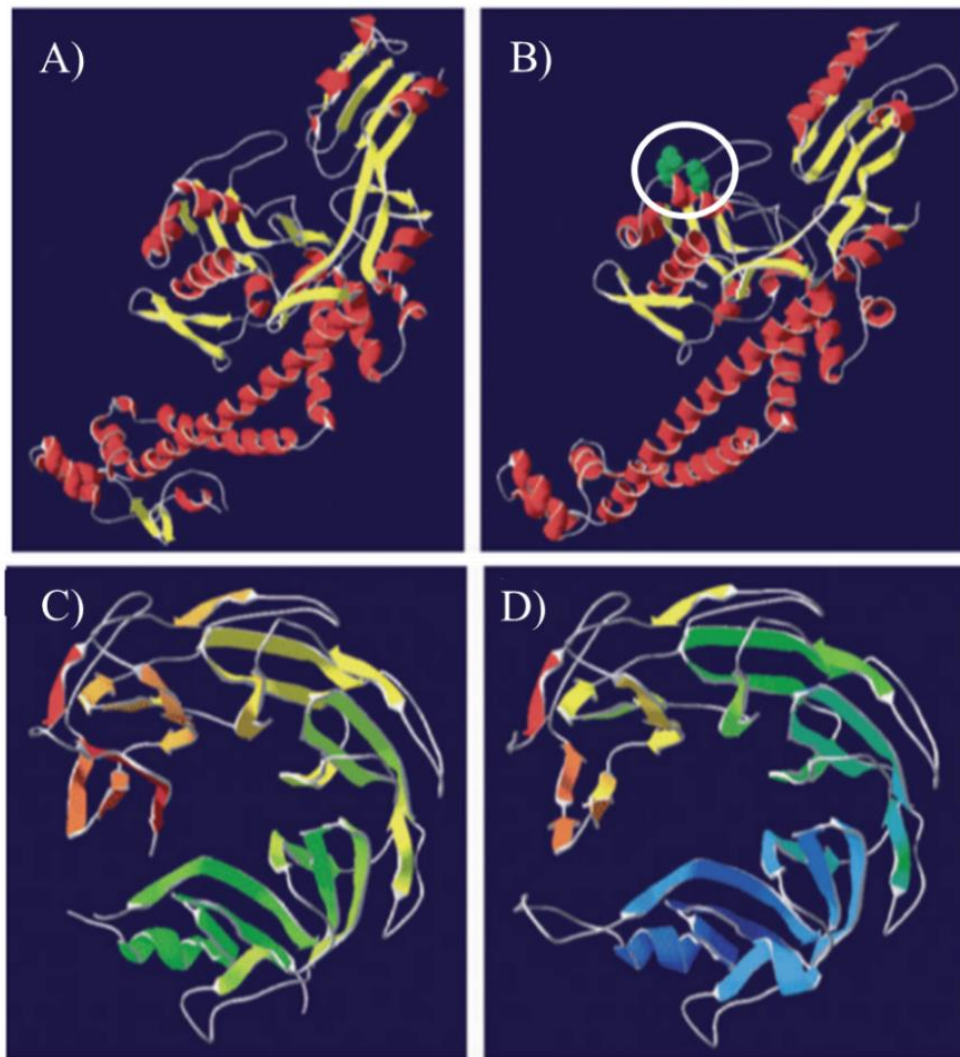


**Figura 18. Secuencia de aminoácidos 80-100 de GyrA de *Escherichia coli*.** Se observan los aminoácidos 83 y 87 (rectángulos rojos sobre los aminoácidos) que corresponderían a la combinación de aminoácidos de una cepa sensible a quinolonas.

Es importante resaltar que se conservan en la secuencia de *H. pylori* la mayoría de los aminoácidos para el funcionamiento de la enzima, como lo son los sitios de unión al ATP, el sitio de corte, los sitios de unión de los iones  $Mg^{2+}$  e incluso la GyrA-box exceptuando la sustitución de una Aspargina (N) (aminoácido hidrofílico) por una Arginina (R) (aminoácido positivo e hidrofílico), de la cual no se ha reportado información.

Para realizar una discusión acerca de nuestros resultados del alineamiento entre las dos DNA girasas, se hizo una revisión de la literatura acerca de comparaciones entre las enzimas de las dos especies. El único estudio publicado acerca de las semejanzas entre las DNA girasas de *E. coli* y *H. pylori*, es una comparación de estructuras 3D por el programa SWISS-MODEL, con las subunidades GyrA de ambas enzimas (Matsuzaki *et al.*, 2010) (Fig. 19). Este trabajo concluye que, en general, ambas enzimas son bastante parecidas tanto en el dominio N-terminal, como en el C-

terminal, en particular resaltan que existe una zona que denominan como: “head-dimer interface” altamente conservada en las dos especies, que es aquella región donde se juntan las subunidades A, se encuentran los sitios activos de tirosina encargados de la ruptura de las cadenas de DNA y además, de acuerdo a las secuencias que usaron como modelo, se presentan las mutaciones puntuales que confieren resistencia a quinolonas (Matsuzaki *et al.*, 2010).

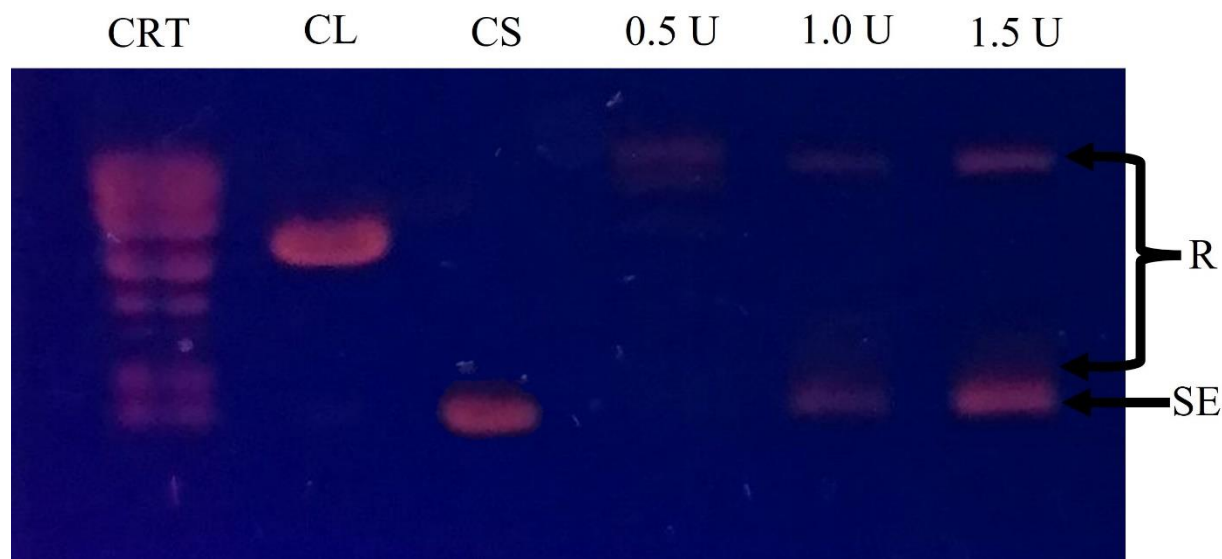


**Figura 19. Modelado 3D de las subunidades gyrA de *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori*.** A) Región N-terminal de *E. coli*. B) Región N-terminal de *H. pylori*, dentro del círculo blanco se señalan las zonas donde se generan resistencias a quinolonas, específicamente los aminoácidos de color verde 87 y 91. C) Región C-terminal de *E. coli*. D) Región C-terminal de *H. pylori*. Tomada y modificada de Matsuzaki *et al.*, 2010.

Con base en nuestro análisis de alineamiento de las secuencias y comparándolo con el estudio de Matsuzaki *et al.*, 2010, podemos concluir que las enzimas de *E. coli* y de *H. pylori* deben de conservar muchas semejanzas en cuanto a función y a estructura, de tal manera que los resultados de inhibición que se encuentren con la enzima de *E. coli* pueden ser extrapolables a la enzima de *H. pylori*. Aunque siempre será necesario corroborar los resultados con la enzima nativa.

## 6.2 Estandarización de la Determinación de la Actividad de la Girasa

**Condiciones experimentales.** Para verificar que el kit funcionaba correctamente y que la enzima tenía una buena actividad, se decidió realizar reacciones bajo las condiciones que el fabricante sugería, con una cantidad de plásmido de 0.497 µg y utilizando 3 concentraciones de enzima (0.5, 1 y 1.5 U). En la Fig. 20 se muestran los resultados obtenidos. Con 0.5 U no se encontró actividad, con 1 U de enzima se presenta actividad de la Girasa lo que se demuestra por la aparición de la banda inferior correspondiente al plásmido superenrollado, pero con 1.5 U la actividad es casi del doble, lo cual se relaciona con un mayor índice de superenrollamiento como se observa en la Tabla 6. Si bien se espera que la girasa superenrolle el 100% del plásmido, esto no sucede siempre, es frecuente (como se verá en algunas muestras) encontrar en los geles bandas intermedias que corresponden a formas intermedias del plásmido relajado, estas bandas son remanentes del plásmido relajado, así como otras formas que probablemente fueron cortadas y no terminaron su proceso de superenrollamiento.



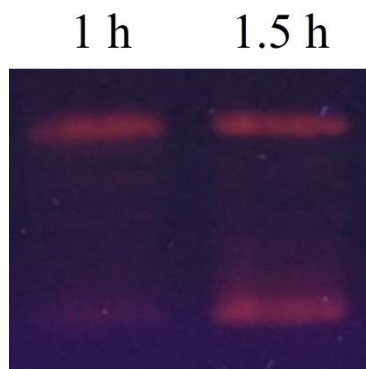
**Figura 20. Actividad de superenrollamiento de la girasa a distintas concentraciones de enzima.** Gel de agarosa al 1% TAE. Volumen final de la reacción 20  $\mu$ L, 0.497  $\mu$ g de pHOT1 relajado, DNA girasa 0.5, 1 y 1.5 U, tiempo de incubación 1 h a 37°C. Teñido con bromuro de etidio 0.5  $\mu$ g/mL. CRT = Control pHOT1 relajado por Topoisomerasa, CL= Control plásmido lineal, CS = Control plásmido superenrollado) En la parte derecha se denota con una llave la distancia que correspondería al plásmido relajado (R) y con una flecha al plásmido superenrollado (SE).

**Tabla 6. Índice de superenrollamiento de la girasa, dependiendo de la cantidad de girasa.**

	0.5 U	1.0 U	1.5 U
Índice de superenrollamiento*	0	0.742	1.338

\*Los índices de superenrollamiento presentados son representativos de un solo experimento.

Con el fin de lograr una mejor actividad de superenrollamiento se llevó a cabo la reacción bajo las mismas condiciones, con 1.5 U de enzima, pero comparando el efecto entre 1 y 1.5 h de incubación (Fig. 21). Los resultados mostraron que la actividad es mayor cuando se incuba por 1.5 h.



**Figura 21. Actividad de superenrollamiento de la girasa a dos tiempos de incubación.** Se utilizaron las mismas condiciones experimentales que la Fig. 15 con 1.5 U de girasa a dos tiempos de incubación, 1 y 1.5 h.

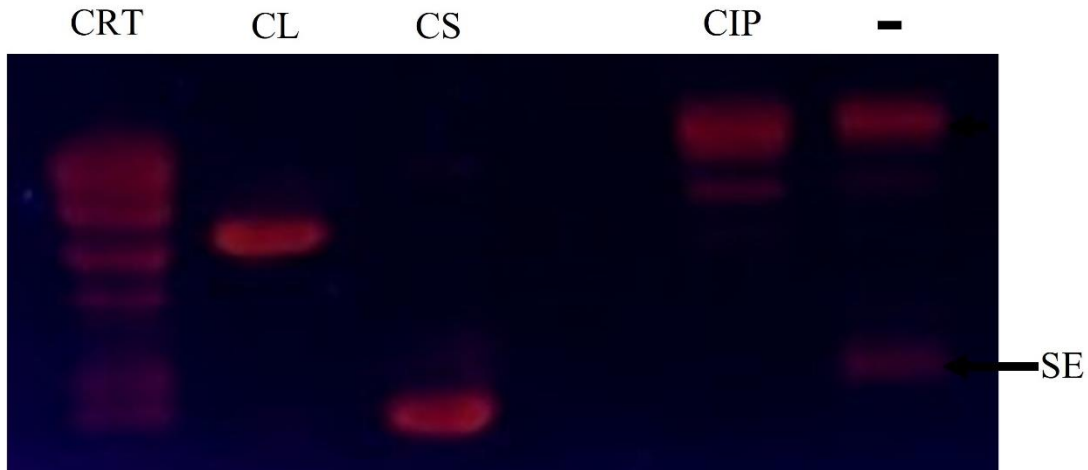
Con base en los resultados anteriores se decidió utilizar en los experimentos siguientes una cantidad de 1.5 U de enzima y un tiempo de incubación de 1.5 h.

**Control Positivo.** Como control positivo se usó ciprofloxacino, quinolona que se ha demostrado que tiene una actividad inhibitoria en la DNA girasa, específicamente como un veneno interfacial que interrumpe la actividad de la DNA girasa provocando que el DNA relajado adquiera una topología de DNA lineal (Drlica & Malik, 2008) y no termine el proceso de superenrollamiento.

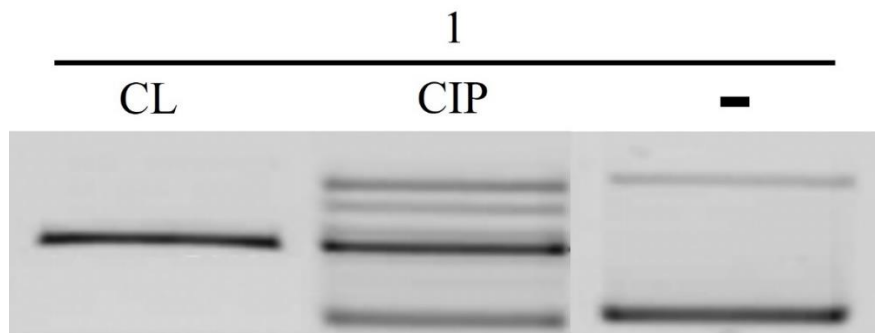
La concentración recomendada para utilizar en el kit es de  $1 \mu\text{g/mL} = 3.01 \mu\text{M}$ , esta concentración es mayor a la  $CI_{50}$  reportada en la literatura,  $0.3 \pm 0.2/0.4 \mu\text{M}$  (Shiriaeve *et al.*, 2021) de tal manera que con la concentración de  $3 \mu\text{M}$  se esperaría una inhibición completa de la enzima.

Como se observa en la Fig. 22 encontramos una total inhibición de la enzima ya que no se observa la banda inferior correspondiente al plásmido superenrollado, validando que nuestro ensayo es capaz de medir la inhibición de la Girasa. Por otra parte, en la imagen se logra observar la banda correspondiente a DNA lineal, sin embargo, esta no migra a nivel de la banda del control de DNA lineal. Comparando nuestro resultado con los geles que reporta el Kit (Fig. 23) en presencia de

este antibiótico, observamos que es posible encontrar bandas de diferentes tamaños del plásmido, de hecho, en algunos reportes se ha encontrado que en presencia de ciprofloxacino incluso no son visibles las bandas de DNA lineal (Shiriaev *et al.*, 2021).



**Figura 22. Efecto de la DNA girasa en presencia de ciprofloxacino.** Gel de agarosa al 1% TAE. Volumen final de la reacción 20  $\mu$ L, 0.497  $\mu$ g de pHOT1 relajado, DNA girasa 1.5 U, tiempo de incubación 1.5 h a 37°C. Teñido con bromuro de etidio 0.5  $\mu$ g/mL. CRT = Control pHOT1 relajado por Topoisomerasa, CL= Control plásmido lineal, CS = Control plásmido superenrollado, CIP = ciprofloxacino [3  $\mu$ M], - = Control negativo (DMSO).



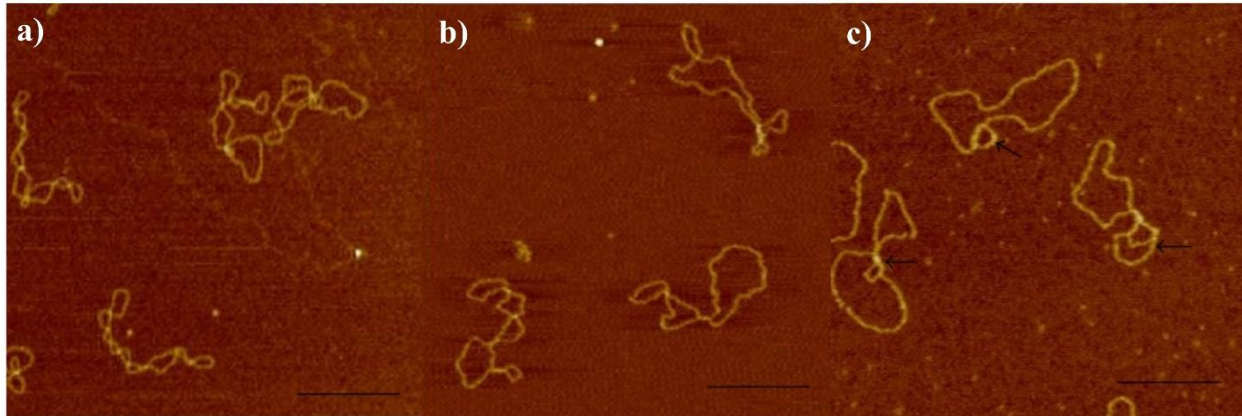
**Figura 23. Efecto del ciprofloxacino sobre la actividad de superenrollamiento de la Girasa.** 1. Imagen del Manual del Kit TopoGEN se presenta el efecto del ciprofloxacino [3  $\mu$ M] y la presencia de plásmido lineal. CL = Control plásmido lineal, CIP = Ciprofloxacino y - = Control negativo.



**DMSO.** El dimetilsulfóxido (DMSO) es un compuesto simple que ha generado controversia en la literatura científica ya que se le han reportado diversos efectos, pero la mayoría de estos siguen sin entenderse del todo (Brayton, 1986). Dentro de sus propiedades se encuentra la de ser un disolvente polar aprótico lo que le permite disolver tanto compuestos polares como no polares, convirtiéndolo en un disolvente importante para probar compuestos en diferentes experimentos con fines biológicos. Para este trabajo el DMSO permitió la correcta disolución de todos nuestros compuestos y extractos. Sin embargo, el proveedor (TopoGEN) comenta que el exceso (>0.5% ) de este disolvente podría afectar a la Girasa y sugiere introducir reacciones controles con la concentración utilizada de DMSO, pero sin el inhibidor, para poder descontar el efecto del solvente.

Debido a las concentraciones que se requerían de las diferentes muestras para realizar los ensayos, se utilizaron dos concentraciones finales de DMSO 5% y 2.5%. El efecto inhibitorio de DMSO al 5% fue muy variable, obteniéndose una inhibición de  $50.61 \pm 25.84$ . En cambio, la adición de DMSO de 2.5% inhibió la reacción de superenrollamiento en un  $8.99 \pm 9.24$ , sin embargo, la desviación estándar obtenida es considerable. Por lo que, aunque algunas reacciones fueron llevadas a cabo con 5% de DMSO, se prefirió el uso de la concentración de 2.5% y por supuesto, el efecto inhibitorio del disolvente fue restado de los resultados en presencia de las muestras.

Existen pocos datos en la literatura acerca del efecto del DMSO sobre la Girasa, se ha reportado que aparentemente el DMSO no actúa sobre la enzima, sino que afecta la topología del DNA específicamente cuando se encuentra superenrollado (Juang & Liu, 1987; Lv *et al.*, 2015). En la Fig. 24 se ilustra de acuerdo con Lv *et al.*, (2015) como el DMSO produce el cambio topológico provocando que aumenten las regiones monocatenarias del plásmido superenrollado.



**Figura 24. Cambio topológico del DNA superenrollado en presencia de DMSO.** Imagen obtenida por microscopia de fuerza atómica. Se muestra la topología del plásmido pBR322 superenrollado en presencia de diferentes concentraciones de DMSO. a) sin DMSO, b) 5% DMSO y c) 10% DMSO, las flechas negras indican las regiones monocatenarias. Tomada y modificada de Lv *et al.*, 2015.

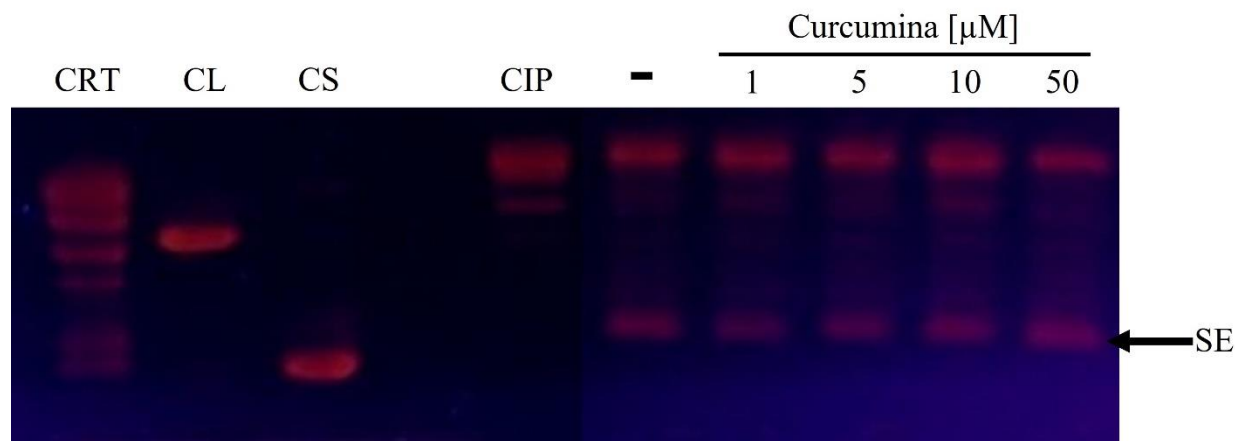
Considerando estos datos, sería posible que, al producirse el plásmido superenrollado en nuestra reacción, en presencia de DMSO se estarían generando las regiones monocatenarias en nuestro producto lo que nos disminuiría su concentración, de tal manera que podría pensarse que “disminuye” la actividad de la enzima. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que el DMSO afecte a la DNA girasa.

### **6.3 Efecto de la curcumina, diacetylcurcumina y sus derivados metálicos sobre la DNA girasa**

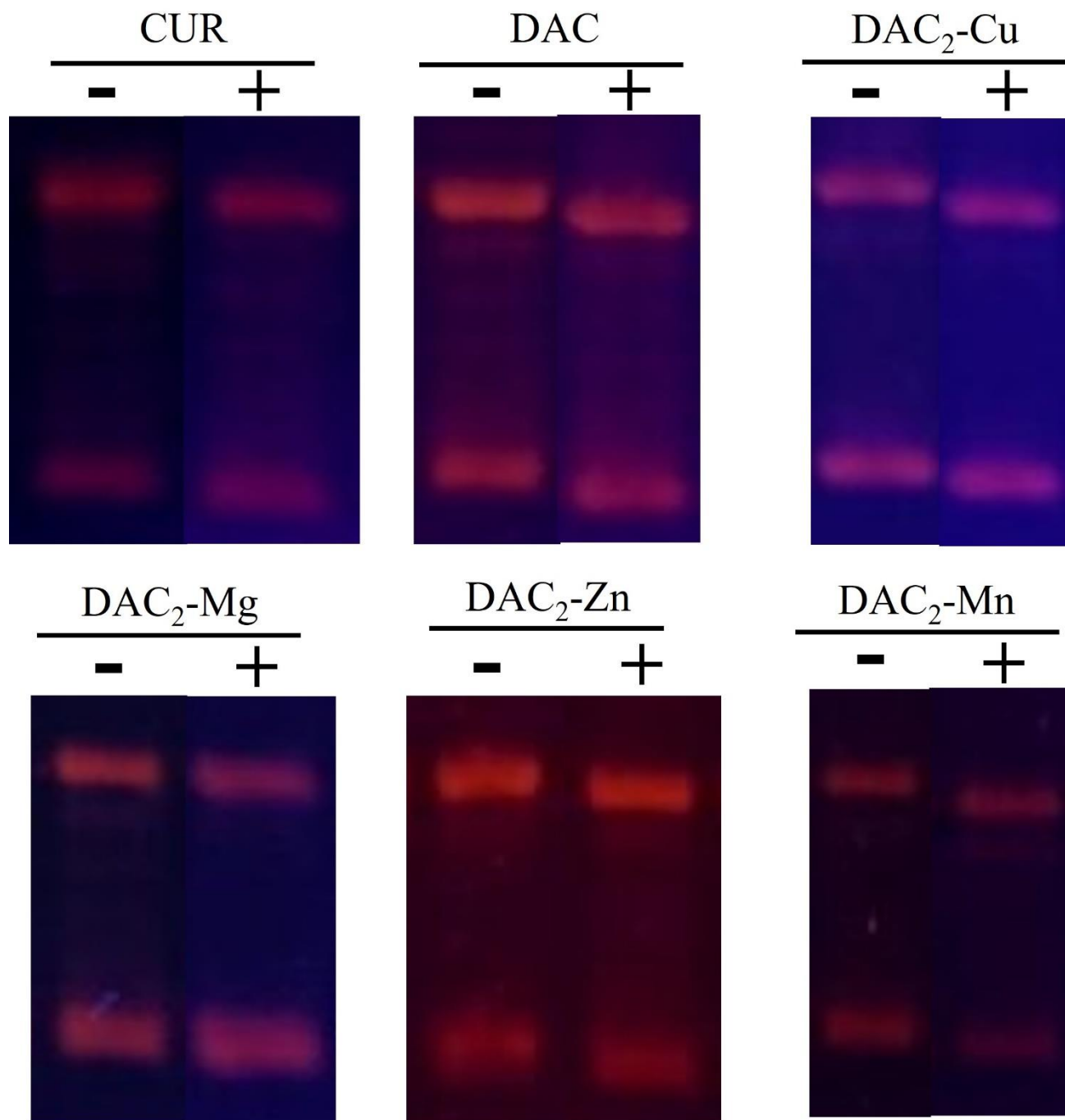
Para la curcumina, DAC, DAC<sub>2</sub>-Cu, DAC<sub>2</sub>-Mg, DAC<sub>2</sub>-Mn y DAC<sub>2</sub>-Zn se ensayaron las concentraciones de 1, 5, 10 y 50  $\mu$ M. En la Fig. 25 se muestra un gel con los resultados obtenidos para el caso de la curcumina, se puede observar que, a pesar de aumentar la concentración de la curcumina, en todos los carriles aparece la banda correspondiente al plásmido superenrollado, al igual que en el carril donde no se añadió el compuesto, lo cual indica que la curcumina no inhibió a la DNA Girasa. En la Fig. 25 también se muestra la inhibición producida por el control positivo,

ciprofloxacino para demostrar que la reacción está funcionando, en este caso, no aparece la banda del plásmido superenrollado.

De la misma manera se evaluó el efecto de DAC y sus derivados metálicos (DAC<sub>2</sub>-Cu, DAC<sub>2</sub>-Mg, DAC<sub>2</sub>-Mn y DAC<sub>2</sub>-Zn), sin embargo, en la mayoría de los compuestos no se observó actividad inhibitoria en concentraciones bajas, de tal manera que en la Fig. 26 y Tabla 7 se presentan solamente los resultados obtenidos para la concentración de 50 μM. Los ensayos se realizaron por triplicado, pero se descartaron aquellos que presentaron algún problema técnico, lo cual se indica en los pies de cada figura.



**Figura 25. Actividad de la DNA girasa en presencia de diferentes concentraciones de curcumina.** Imagen representativa de uno de los experimentos realizados. Gel de agarosa al 1% TAE. Volumen final de la reacción 20 μL, 0.497 μg de pHOT1 relajado, DNA girasa 1.5 U, tiempo de incubación 1.5 h a 37°C. Teñido con bromuro de etidio 0.5 μg/mL. CRT = Control pHOT1 relajado por Topoisomerasa, CL= Control plásmido lineal, CS = Control plásmido superenrollado, CIP = ciprofloxacino [3 μM], - = Control negativo (DMSO) SE = Plásmido superenrollado.



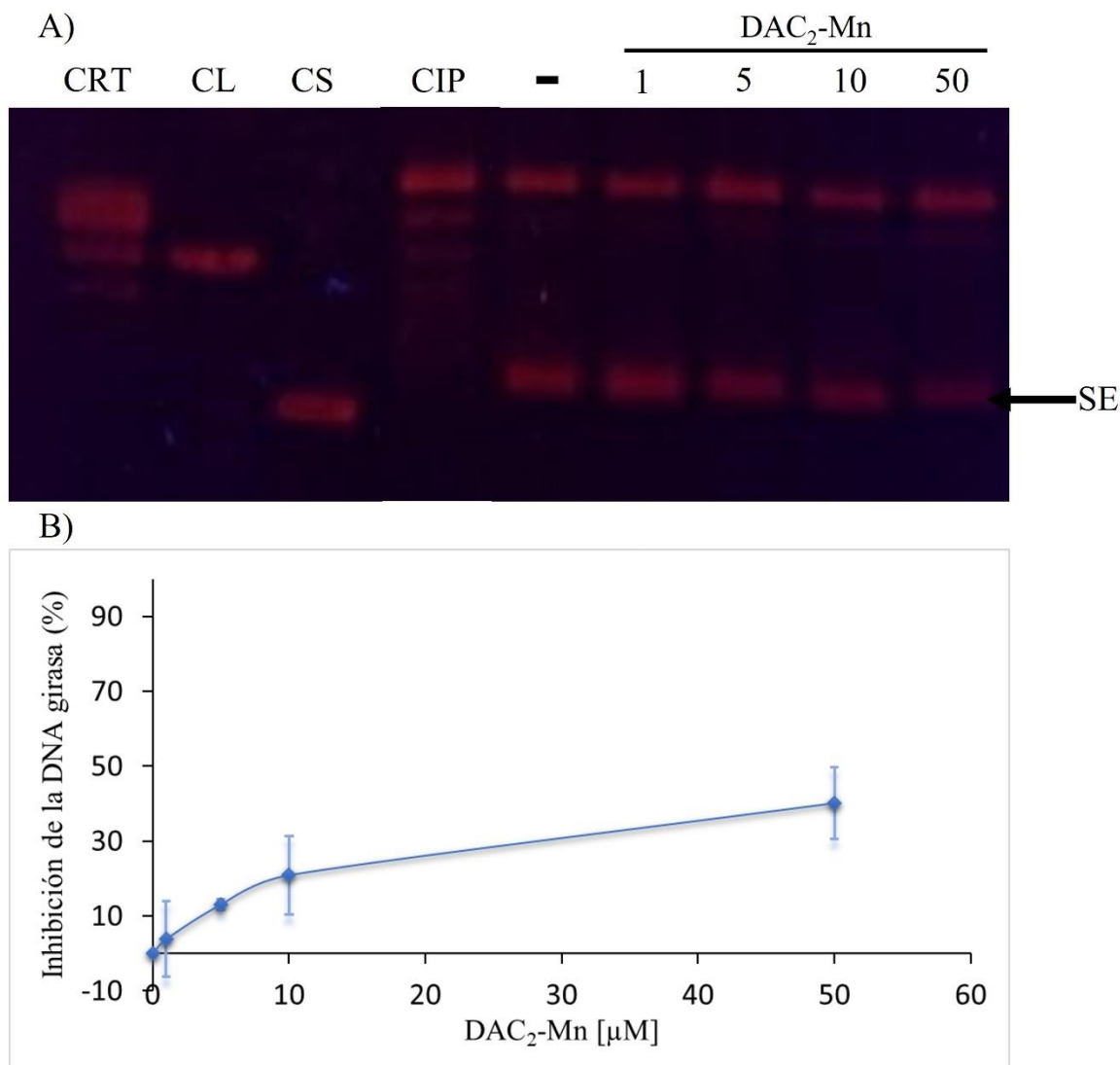
**Figura 26.** Actividad de la DNA girasa en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de curcumina diacetilcurcumina y otros complejos acoplados a metales. Imágenes representativas de uno de los experimentos realizados. Las condiciones experimentales son las mismas que la Fig. 25. Para cada molécula se muestra su control negativo (-) y el compuesto probado (+).

**Tabla 7. Inhibición de la DNA girasa en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de curcumina, diacetilcurcumina y otros complejos acoplados a metales.**

Compuesto	Porcentaje de inhibición
Ciprofloxacino	100 [3.01 $\mu\text{M}$ ]
Curcumina	6.63 $\pm$ 1.37*
DAC	-22.40 $\pm$ 13.31*
DAC <sub>2</sub> -Cu	-4.44 $\pm$ 9.65*
DAC <sub>2</sub> -Mg	-14.58 $\pm$ 8.78*
DAC <sub>2</sub> -Mn	40.11 $\pm$ 9.47
DAC <sub>2</sub> -Zn	26.31 $\pm$ 3.13

Los porcentajes de inhibición negativos se consideraron sin actividad. Se reportan como el promedio de 3 experimentos (\*2 experimentos)  $\pm$  desviación estándar.

La curcumina, la diacetilcurcumina y los complejos metálicos DAC<sub>2</sub>-Cu y DAC<sub>2</sub>-Mg no presentaron un efecto inhibitorio significativo. DAC<sub>2</sub>-Zn llega a una inhibición de 26% con la concentración más alta ensayada, 50  $\mu\text{M}$ , pero no responde al aumento en la concentración (datos no mostrados), sin embargo, DAC<sub>2</sub>-Mn tiene un efecto inhibitorio concentración dependiente alcanzando una inhibición 40.11% a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 27)

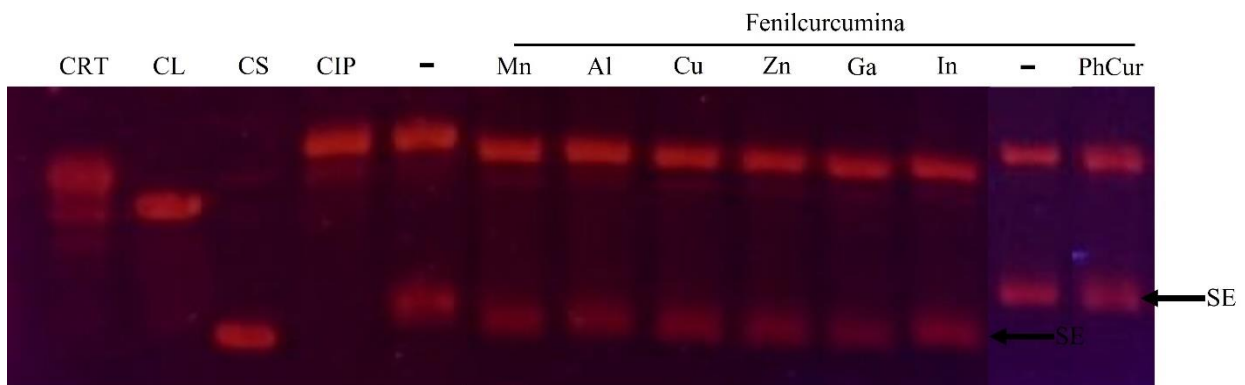


**Figura 27. Efecto inhibitorio de la DNA girasa en presencia de diacetylcurcumina-Mn (DAC<sub>2</sub>-Mn) (1-50 µM).** A) Imagen representativa de uno de los experimentos realizados. Las condiciones experimentales son las mismas que la Fig. 20. CRT = Control pHOT1 relajado por Topoisomerasa, CL= Control plásmido lineal, CS = Control plásmido superenrollado, CIP = Ciprofloxacino, - = Control negativo SE = Plásmido superenrollado. B) Curva de inhibición de DNA girasa en presencia de DAC<sub>2</sub>-Mn. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos (\*2 experimentos) ± desviación estándar.

Considerando los efectos observados para las moléculas anteriores, se decidió probar otras moléculas, pero iniciando su estudio a una concentración final de 50 µM en la reacción, de manera que si observáramos un efecto importante se realizarían curvas de concentración.

#### 6.4 Efecto de la fenilcurcumina y sus derivados metálicos sobre la DNA girasa

Para la serie de la PhCur y sus derivados metálicos: PhCur<sub>2</sub>-Mn, PhCur<sub>2</sub>-Al, PhCur<sub>2</sub>-Cu, PhCur<sub>2</sub>-Zn, PhCur<sub>2</sub>-Ga y PhCur<sub>3</sub>-In, se observó en general un efecto inhibitorio leve sobre la DNA girasa a la concentración de 50  $\mu$ M, en algunos casos con una desviación estándar grande, a excepción del efecto de PhCur-Al que alcanzó un porcentaje de inhibición de 21.84% a la concentración probada, esto se puede observar en la Fig. 28 y Tabla 8.



**Figura 28. Actividad de la DNA girasa en presencia de 50  $\mu$ M de fenilcurcumina y otros complejos de fenilcurcumina acoplados a metales.** Gel de agarosa al 1% TAE. Volumen final de la reacción 10  $\mu$ L, 0.149  $\mu$ g de pHOT1 relajado, DNA girasa 1.5 U, tiempo de incubación 1.5 h a 37°C. Teñido con bromuro de etidio 0.5  $\mu$ g/mL. En los últimos dos carriles de la derecha se encuentra el efecto de la fenilcurcumina (PhCur) y su respectivo control negativo dado que se corrió la reacción en un gel aparte. CRT = Control pHOT1 relajado por Topoisomerasa, CL= Control plásmido lineal, CS = Control plásmido superenrollado, CIP = Ciprofloxacino, - = Control negativo, SE = Plásmido superenrollado.

**Tabla 8. Inhibición de la DNA girasa en presencia de 50  $\mu$ M de fenilcurcumina y otros complejos de fenilcurcumina acoplados a metales**

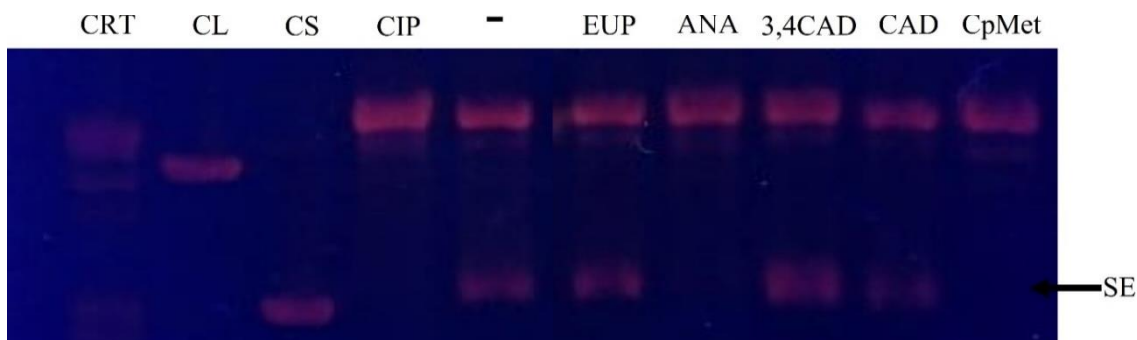
Compuesto	Porcentaje de inhibición
Ciprofloxacino	100 [3.01 $\mu$ M]
PhCur	6.57 $\pm$ 13.06
PhCur-Mn	11.38 $\pm$ 9.87*
PhCur-Al	21.84 $\pm$ 4.48*
PhCur-Cu	11.85 $\pm$ 6.19*
PhCur-Zn	-6.25 $\pm$ 12.00*
PhCur-Ga	7.60 $\pm$ 16.15*
PhCur-In	4.82 $\pm$ 2.86*

Se reportan como el promedio de 3 experimentos (\*2 experimentos)  $\pm$  desviación estándar.

### 6.5 Efecto de otras moléculas sobre la DNA girasa

A continuación, se probó el efecto de las siguientes moléculas: eupatilina, ácido anacárdico, 7-hidroxi-cadaleno y 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno a una concentración de 50  $\mu$ M y del extracto metanólico de *C. procera* (CpMet) a una concentración de 200  $\mu$ g/mL los resultados se muestran en la Fig. 29.





**Figura 29. Actividad de la DNA girasa en presencia de diferentes compuestos: Eupatilina (EUP), Ácido anacárdico (ANA), 7-hidroxi-cadalenol (CAD), 7-hidroxi-3,4-dihidroxi-cadalenol (3,4CAD) y = Extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* (CpMet).** Gel de agarosa al 1% TAE. Volumen final de la reacción 10  $\mu$ L, 0.149  $\mu$ g de pHOT1 relajado, DNA girasa 1.5 U, tiempo de incubación 1.5 h a 37°C. Teñido con bromuro de etidio 0.5  $\mu$ g/mL. Para todos los compuestos se utilizó una concentración de 50  $\mu$ M y para CpMet de 200  $\mu$ g/mL. CRT = Control pHOT1 relajado por Topoisomerasa, CL= Control plásmido lineal, CS = Control plásmido superenrollado, CIP = Ciprofloxacino – = Control negativo, SE = Plásmido superenrollado.

En la Tabla 9, se presentan los porcentajes de inhibición calculados para cada compuesto, solo el ácido anacárdico y el CpMet tuvieron un efecto inhibitorio (76.32% y 100%, respectivamente); para el caso de Eupatilina, CAD y 3,4CAD no hay efecto inhibitorio.

**Tabla 9. Inhibición de la DNA girasa en presencia de eupatilina, ácido anacárdico, 7-hidroxi-cadalenol, 7-hidroxi-3,4-dihidroxi-cadalenol y CpMet**

Compuesto [50 $\mu$ M] / Extracto [200 $\mu$ g/mL]	Porcentaje de inhibición
Ciprofloxacino	100 [3.01 $\mu$ M]
Eupatilina	2.65 $\pm$ 8.77
Ácido anacárdico	76.32 $\pm$ 2.43
3,4CAD	-2.24 $\pm$ 8.59
CAD	1.96 $\pm$ 13.97
CpMet	100

Se reportan como el promedio 3 experimentos  $\pm$  desviación estándar.

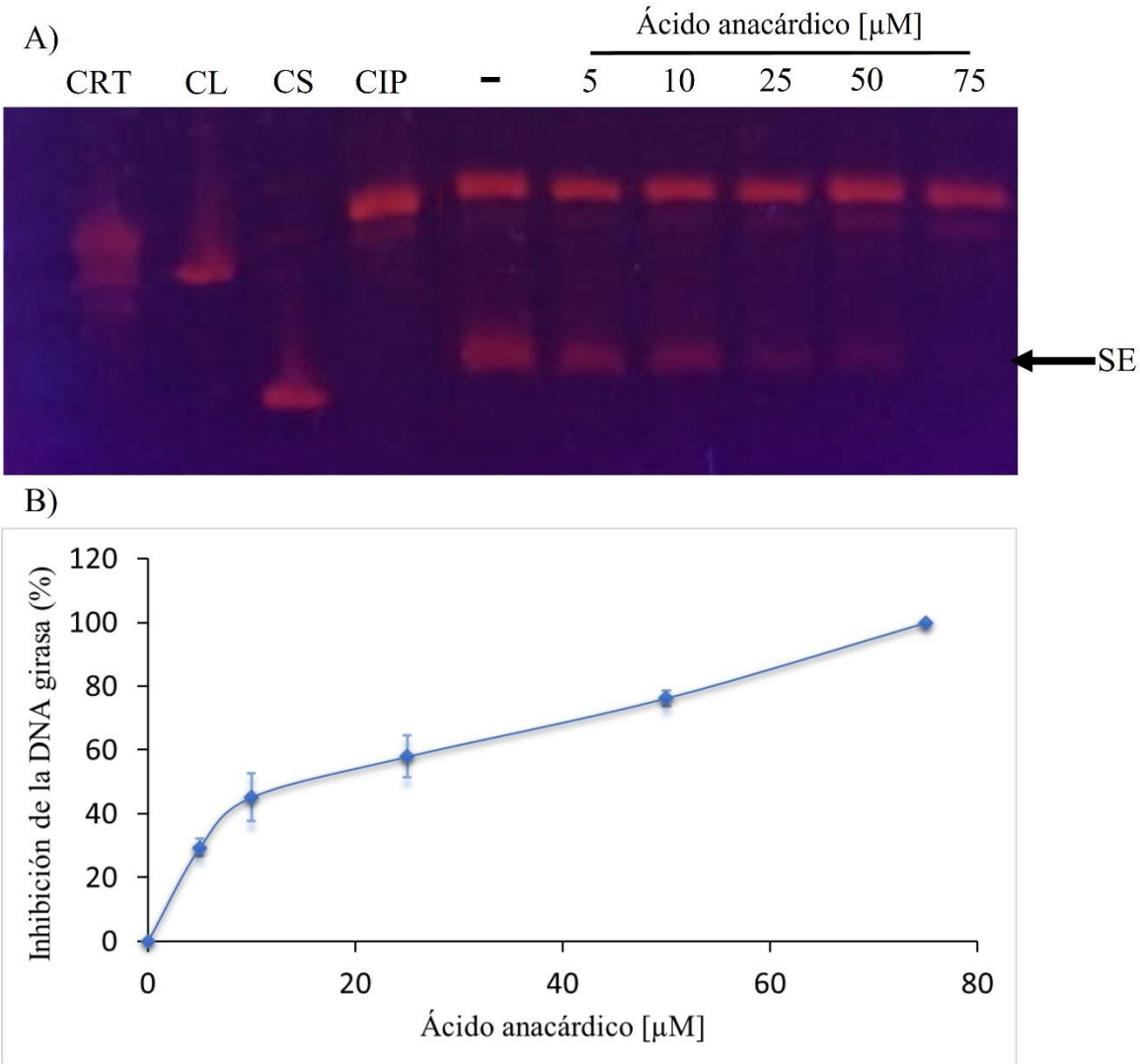
## 6.6 Efecto del ácido anacárdico sobre la DNA girasa

Con base en el considerable efecto inhibitorio del ácido anacárdico observado en el experimento anterior, se procedió a explorar su efecto a otras concentraciones, aumentando la concentración máxima a 75  $\mu\text{M}$ . En la Tabla 10 se presentan los porcentajes de inhibición obtenidos a las diferentes concentraciones de ácido anacárdico y en la Fig. 30, el gel y la curva de inhibición para el compuesto.

**Tabla 10. Inhibición de la DNA girasa en presencia de ácido anacárdico.**

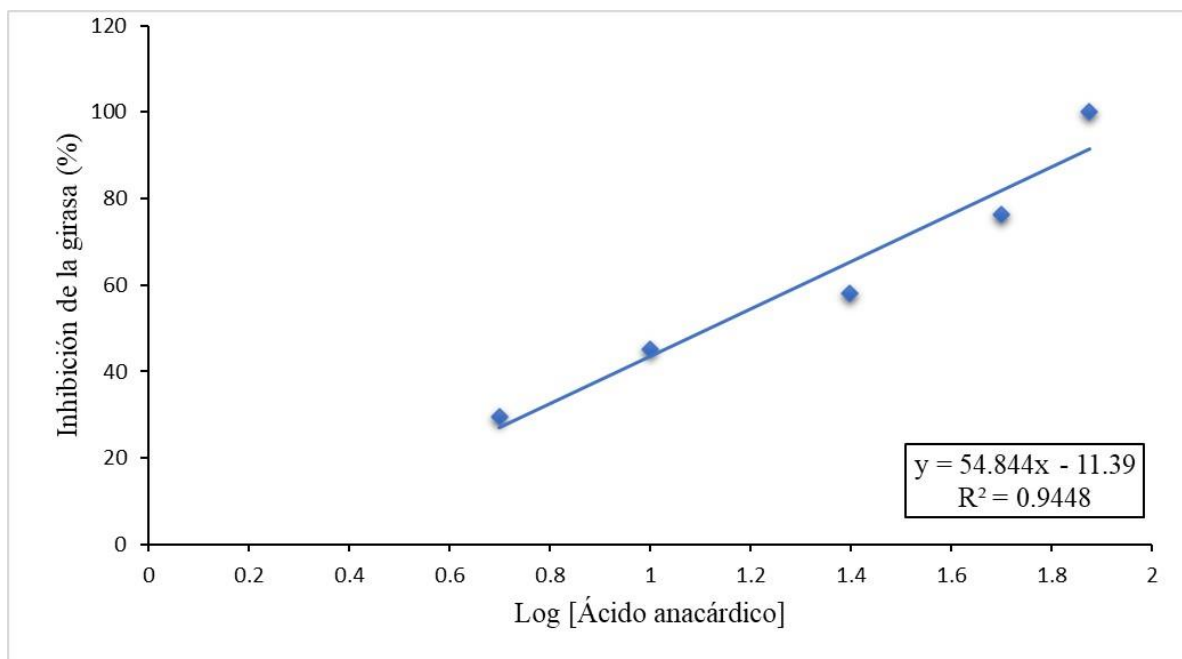
Concentración ( $\mu\text{M}$ )	% de inhibición
Ciprofloxacino	100 [3.01 $\mu\text{M}$ ]
5	29.44 $\pm$ 2.85
10	45.19 $\pm$ 7.36
25	57.95 $\pm$ 6.53
50	76.32 $\pm$ 2.43
75	100

Se reportan como el promedio de 3 experimentos  $\pm$  desviación estándar. Los resultados obtenidos no consideran el porcentaje de inhibición dado por el DMSO debido a un problema en los controles de DMSO, sin embargo, con base en el efecto que ya habíamos determinado en otros experimentos, la variación de los resultados mostrados es de  $\pm 8.9\%$ .



**Figura 30. Efecto inhibitorio de la DNA girasa en presencia de ácido anacárdico.** A) Imagen representativa de uno de los experimentos realizados. Las condiciones experimentales son las mismas que la Fig. 29. CRT = Control pHOT1 relajado por Topoisomerasa, CL= Control plásmido lineal, CS = Control plásmido superenrollado, CIP = Ciprofloxacino, - = Control negativo Gel de agarosa al 1% TAE. Volumen final de la reacción 10  $\mu\text{L}$ , 0.149  $\mu\text{g}$  de pHOT1 relajado, DNA girasa 1.5 U, tiempo de incubación 1.5 h a 37°C. Teñido con bromuro de etidio 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , SE = Plásmido superenrollado. B) Curva de inhibición de la DNA girasa en presencia de ácido anacárdico. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos  $\pm$  desviación estándar.

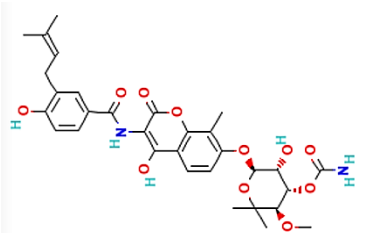
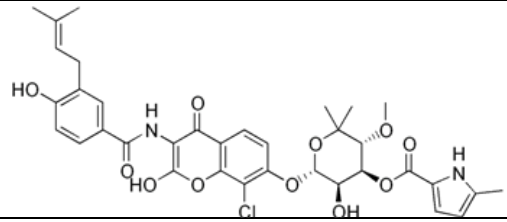
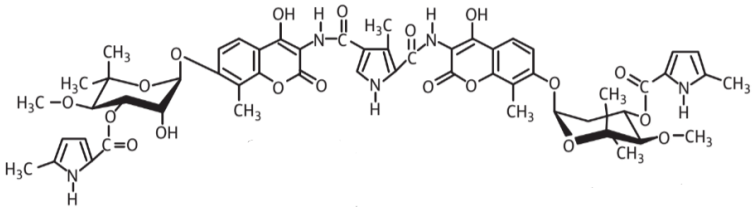
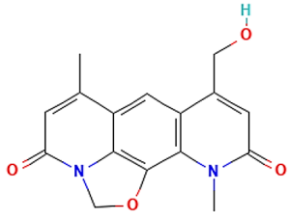
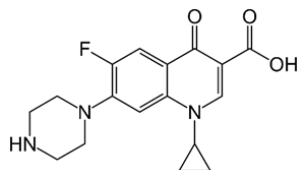
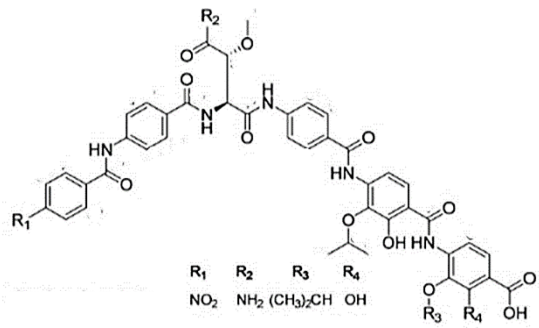
Como se puede observar se encontró un efecto inhibitorio concentración dependiente alcanzando una inhibición de 100% a la concentración de 75  $\mu\text{M}$ .



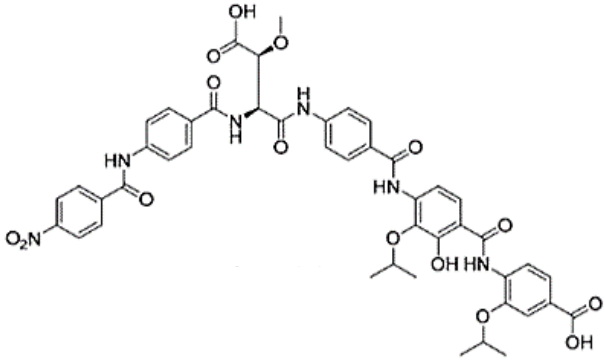
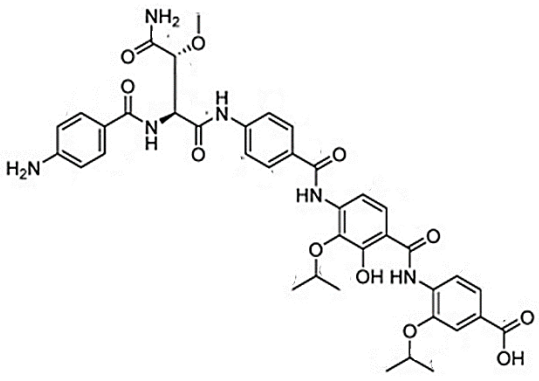
**Figura 31. Determinación de la  $CI_{50}$  para el ácido anacárdico.** Se graficó el promedio de cada concentración, transformando el eje x en escala logarítmica. En el recuadro se muestra la ecuación de la línea de tendencia utilizada para el cálculo.

La  $CI_{50}$  del ácido anacárdico calculada a partir de la gráfica de la Fig. 31 dio un valor de  $13.16 \mu\text{M}$ . Al comparar este valor con la  $CI_{50}$  del ciprofloxacino, reportado para la DNA girasa de *E. coli*,  $0.3 \mu\text{M}$  (Shiriaev *et al.*, 2021) o con el valor de otros compuestos como la Novobiocina,  $0.08 \mu\text{M}$  (Alt *et al.*, 2011), es evidente que la  $CI_{50}$  del ácido anacárdico es mucho mayor, sin embargo, es menor que el valor de la Nybomicina,  $211 \mu\text{M}$  (Shiriaev *et al.*, 2011) (Tabla 11). Independientemente de que el valor del ácido anacárdico sea mejor o peor al de los fármacos actualmente utilizados, el reportar el efecto de este compuesto sobre la DNA girasa por primera vez es información muy relevante, ya que fortalece su potencial uso como antibiótico al cual no se han generado resistencias.

**Tabla 11. CI<sub>50</sub> de diferentes compuestos sobre la DNA girasa de *E.coli* reportados en la literatura.**

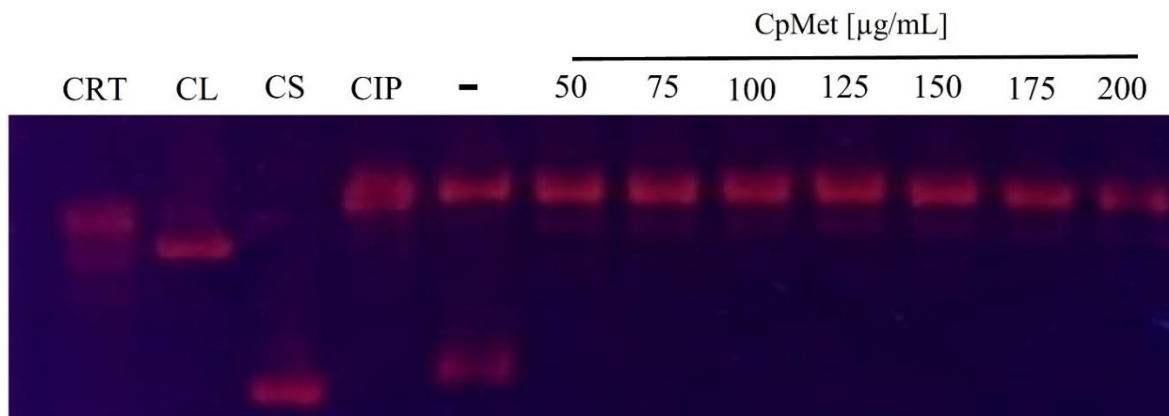
Compuesto	Referencia	CI <sub>50</sub>	Estructura
Novobiocina		<i>E. coli</i> ATCC 2592 – 0.08 μM	
Clorobiocina	Alt, 2011	<i>Escherichia coli</i> ATCC 2592 – 0.03 μM	
Coumermicina		<i>Escherichia coli</i> ATCC 2592 – 0.03 μM	
Nybomicina	Shiriaev, 2021	<i>Escherichia coli</i> Wt – 211 ± 40 μM	
Ciprofloxacino		<i>Escherichia coli</i> Wt – 0.3 ± 0.2/0.4 μM	
Coralmicina A	Kim, 2019	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682 0.08 μM	

**Tabla 11. CI<sub>50</sub> de diferentes compuestos sobre la DNA girasa de *E.coli* reportados en la literatura (continuación)**

Compuesto	Referencia	CI <sub>50</sub>	Estructura
Coralmicina B		<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682 1.07 μM	
	Kim, 2019		
Coralmicina E		<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682 39.1 μM	

### 6.7 Efecto del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* (CpMet) sobre la DNA girasa

En la sección 6.5, encontramos que CpMet, a la concentración de 200 μg/mL inhibió el 100% la actividad de superenrollamiento de la girasa, por lo que se decidió hacer ensayos a concentraciones más bajas con la finalidad de calcular la CI<sub>50</sub> del extracto y obtener una curva de inhibición. Al probar las concentraciones 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 μg/mL (Fig. 32) continuamos obteniendo completa inhibición de la actividad de la DNA girasa.



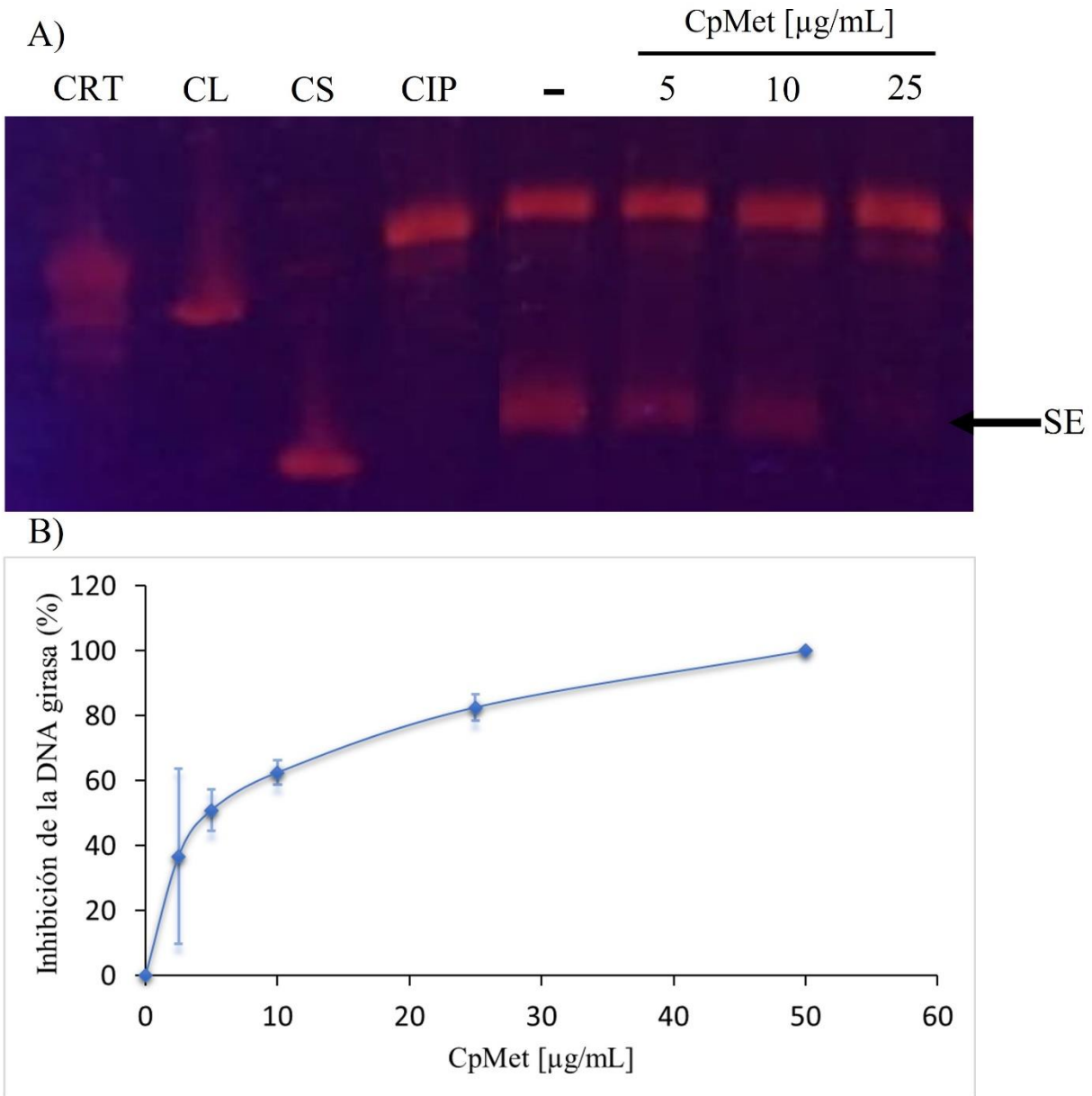
**Figura 32. Efecto inhibitorio de la DNA girasa en presencia del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* (CpMet) (50-200  $\mu\text{g/mL}$ ).** Imagen representativa de uno de los experimentos realizados. Las condiciones experimentales son las mismas que la Fig. X. CRT = Control pHOT1 relajado por Topoisomerasa, CL= Control plásmido lineal, CS = Control plásmido superenrollado, CIP = Ciprofloxacino, - = Control negativo.

En el siguiente experimento, se bajaron aún más las concentraciones a ensayar. Los resultados se pueden observar en la Tabla 12 y Fig. 33 y mostraron un efecto inhibitorio dosis dependiente que alcanzó el 100% de inhibición con 50  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 12. Inhibición de la DNA girasa en presencia de CpMet.**

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de inhibición
Ciprofloxacino	100 [3.01 $\mu\text{M}$ ]
2.5	$36.70 \pm 26.90$
5	$50.94 \pm 6.29$
10	$62.50 \pm 3.68$
25	$82.53 \pm 3.95$
50	100

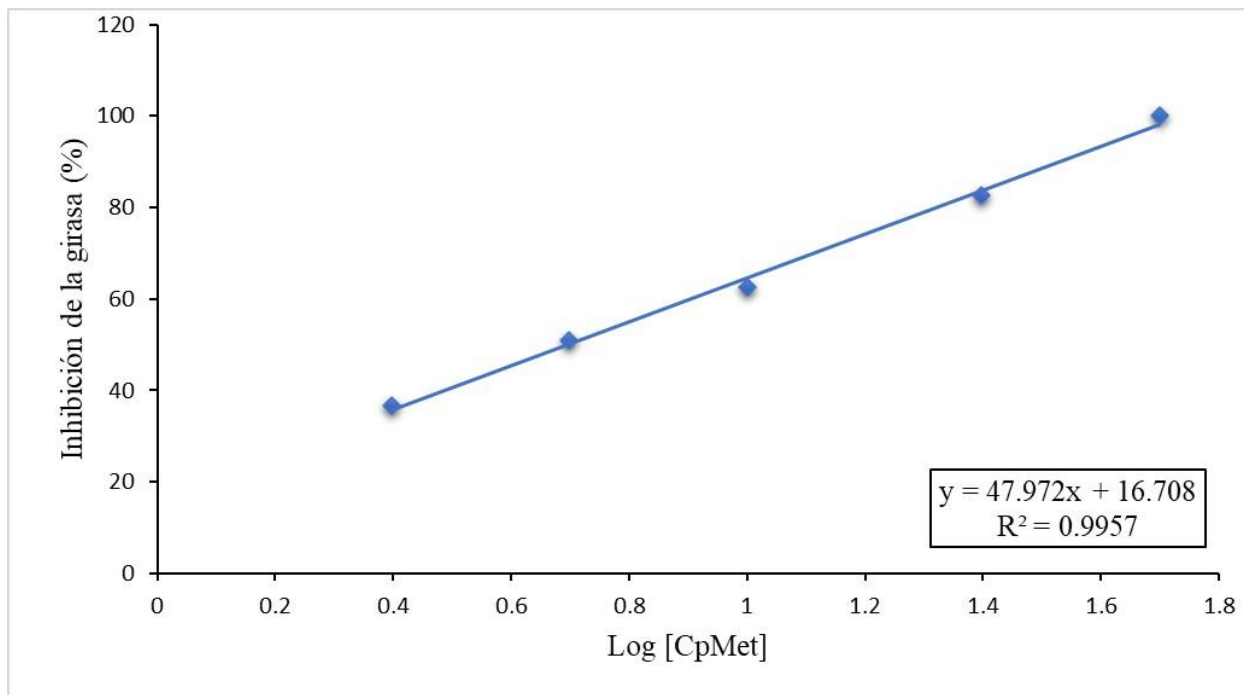
Se reporta el promedio de 3 experimentos  $\pm$  desviación estándar. Los resultados obtenidos no consideran el porcentaje de inhibición dado por el DMSO debido a un problema en los controles, sin embargo, con base en el efecto que ya habíamos determinado en otros experimentos, la variación de los resultados mostrados es de  $\pm 8.9\%$ .



**Figura 33. Efecto inhibitorio de la DNA girasa en presencia del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* (CpMet).** A) Imagen representativa de uno de los experimentos realizados. Las condiciones experimentales son las mismas que la Fig. 29. (CRT = Control pHOT1 relajado por Topoisomerasa, CL= Control plásmido lineal, CS = Control plásmido superenrollado, CIP = Ciprofloxacino, - = Control negativo, SE = Plásmido superenrollado. B) Curva de inhibición de la DNA girasa en presencia de CpMet. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos  $\pm$  desviación estándar.



La  $CI_{50}$  para el CpMet calculada a partir de los resultados fue de  $4.94 \mu\text{g/mL}$ , la gráfica realizada para el cálculo junto con la línea de tendencia se puede observar en la Fig. 34.



**Figura 34. Determinación de la  $CI_{50}$  para el ácido anacárdico.** Se graficó el promedio de cada concentración, transformando el eje x en escala logarítmica. En el recuadro se muestra la ecuación de la línea de tendencia utilizada para el cálculo.

La  $CI_{50}$  calculada para CpMet no puede ser comparada con otro valor reportado previamente, ya que no encontramos en la literatura valores de  $CI_{50}$  de ensayos realizados con extractos sobre la actividad de superenrollamiento de la DNA girasa. El único trabajo al respecto es el de Xu *et al.*, 2013 donde reportan que cuatro extractos metanólicos de origen vegetal (*Lonicera japonica*, *Phellodendri chinensis*, *Taraxacum* sp., *Glycyrrhiza* sp.) presentaron un “fuerte efecto inhibitorio” sobre la actividad de la DNA girasa alcanzando un efecto inhibitorio de 30-46% a la concentración de  $0.2 \text{ g/mL}$  y de 56-75% a la concentración de  $0.4 \text{ g/mL}$ , sin embargo, no reportan los valores de  $CI_{50}$  para ninguno de los extractos y del mismo modo no alcanzan una inhibición

del 100% a las concentraciones probadas a pesar de ser concentraciones mayores a las probadas en este trabajo.

Es importante considerar que CpMet, al tratarse de un extracto está conformado por varios compuestos, existe la posibilidad que alguno de estos compuestos (o varios) tenga un mejor efecto inhibitorio cuando se aíslen y se prueben solos, o bien, que varios de los compuestos presentes tengan efectos antagónicos haciendo que el potencial inhibitorio del CpMet se vea disminuido por la interacción de estos y quizá al separar los diferentes compuestos y probarlos por separado se obtenga un mejor efecto inhibitorio.

El CpMet y el ácido anacárdico son provienen de las cortezas de plantas de la familia Anacardiaceae *C. procera* y *A. adstringens* respectivamente y estas dos fueron las únicas que tuvieron un efecto inhibitorio consistente y que alcanzó una inhibición del 100%, quizá sea una característica de los metabolitos de esta familia de plantas.

## VII CONCLUSIONES

Se concluye que las secuencias de DNA girasa de ambas subunidades de *H. pylori* y *E. coli* son bastante parecidas teniendo un ~60% de similitud, pero este porcentaje de similitud se ve elevado si se comparan regiones que se consideran importantes para el funcionamiento de la enzima como las zonas de corte, las zonas de unión al ATP y a los iones  $Mg^{2+}$ , del mismo modo se pudieron identificar aquellos residuos importantes para ambas secuencias, los cuales se conservan todos exceptuando la región gyrA-box.

Se lograron establecer las mejores condiciones experimentales para poder medir la actividad de superenrollamiento utilizando el kit de TopoGEN, como son: la reducción del volumen total (20  $\rightarrow$  10  $\mu$ L), la reducción de la cantidad de plásmido (0.05  $\mu$ g/ $\mu$ L  $\rightarrow$  0.014  $\mu$ g/ $\mu$ L), la reducción en

el volumen de DMSO (1  $\mu\text{L}$   $\rightarrow$  0.25  $\mu\text{L}$ ), el aumento en unidades de DNA girasa (1 U  $\rightarrow$  1.5 U) y por último el aumento en el tiempo de incubación de 1 h a 1.5 h.

Se determinó por primera vez el efecto de curcumina, DAC, DAC<sub>2</sub>-Cu, DAC<sub>2</sub>-Mg, DAC<sub>2</sub>-Mn, DAC<sub>2</sub>-Zn, eupatilina, ácido anacárdico, 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, 7-hidroxi-cadaleno, fenilcurcumina, PhCur<sub>2</sub>-Mn, PhCur<sub>2</sub>-Al, PhCur<sub>2</sub>-Cu, PhCur<sub>2</sub>-Zn, PhCur<sub>2</sub>-Ga y PhCur<sub>3</sub>-In y CpMet sobre la actividad de superenrollamiento de la DNA girasa. De todos ellos, solo CpMet y el ácido anacárdico inhibieron el 100% de la actividad a la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y a 75  $\mu\text{M}$  respectivamente.

Pese a que los demás compuestos probados (curcumina, DAC, DAC<sub>2</sub>-Cu, DAC<sub>2</sub>-Mg, DAC<sub>2</sub>-Zn, eupatilina, ácido anacárdico, 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, 7-hidroxi-cadaleno, fenilcurcumina, PhCur<sub>2</sub>-Mn, PhCur<sub>2</sub>-Al, PhCur<sub>2</sub>-Cu, PhCur<sub>2</sub>-Zn, PhCur<sub>2</sub>-Ga y PhCur<sub>3</sub>-In) no presentan un efecto inhibitorio sobre la DNA girasa, exceptuando el ~40% de inhibición obtenido por DAC<sub>2</sub>-Mn a 50  $\mu\text{M}$ , los resultados obtenidos aportan información relevante para el estudio de estas moléculas, ya que nos permiten descartar a la DNA girasa como su blanco de acción y por tanto dirigir los esfuerzos a buscar otro mecanismo de acción para su actividad anti-*H. pylori*.

Se calculó la CI<sub>50</sub> de CpMet sobre la actividad de superenrollamiento de la DNA girasa siendo de  $5.15 \pm 1.36$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , este dato es de gran valor a la investigación de productos naturales ya que es la primera vez que se reporta un valor de CI<sub>50</sub> de un extracto para la inhibición de la DNA girasa, además este extracto alcanzó un efecto inhibitorio del 100% a la concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lo cual lo convierte en un extracto prometedor para continuar con su estudio con el fin de proponerlo en un futuro como un tratamiento contra *H. pylori*.

Del mismo modo se reportó la  $CI_{50}$  del ácido anacárdico sobre la actividad de superenrollamiento de la DNA girasa siendo esta de  $20.45 \pm 5.26 \mu\text{M}$  que, a pesar de ser mucho mayor que la  $CI_{50}$  reportada para ciprofloxacino el cual es un fármaco indicado para el tratamiento de *H. pylori*, es un dato de gran importancia, ya que no se ha reportado la existencia de algún producto natural con efecto inhibitorio en la DNA girasa. Además, este compuesto alcanza una inhibición del 100% a la concentración de  $75 \mu\text{M}$ , y dado que las bacterias nunca han tenido contacto con él, no han creado resistencia contra el mismo, lo que lo convierte en un compuesto prometedor para continuar con su estudio e integrarse en las terapias de erradicación.

Considerando las similitudes en las regiones importantes de la DNA girasa de *E. coli* y de *H. pylori*, los hallazgos de la inhibición obtenida sobre la enzima de *E. coli*, podrían aplicarse para proponer un tratamiento de erradicación para ambas bacterias.

## VIII PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos, principalmente el efecto inhibitorio del ácido anacárdico y del CpMet dan pie a continuar la investigación para saber el mecanismo exacto de cómo estos inhiben a la DNA girasa.

Por un lado, podrían purificarse los compuestos existentes en CpMet y probarlos sobre la DNA girasa, con la finalidad de conocer si la inhibición de la girasa por la presencia de CpMet es debida a un compuesto en específico o es el efecto sinérgico de varios compuestos.

Por otro lado, el ácido anacárdico al ser un compuesto ya estudiado, el cual se conoce su estructura y además puede adquirirse comercialmente, se podría realizar un estudio de acoplamiento molecular (*docking*) para conocer cómo interactúa con la enzima, así se podría determinar si

funciona como un inhibidor del sitio activo, si modifica algún dominio de la enzima o cualquier otro mecanismo que permita la inhibición de la DNA girasa.

Si bien se ha propuesto que la DNA girasa es parte de un mecanismo ancestral que ha ido evolucionando en las bacterias para mantener la topología del DNA y que gracias a esto se debe haber mantenido similitud en cuanto función y estructura, existe la posibilidad que experimentalmente los resultados varíen al utilizar la DNA girasa de *H. pylori*, por lo que una propuesta a futuro sería la extracción de la girasa de *H. pylori* para probar los compuestos sobre esta enzima y reportar si existe alguna diferencia.

Ya que el ácido anacárdico y el CpMet provienen de plantas de la familia Anacardiaceae y ambos productos tuvieron un efecto inhibitorio del 100% se podría proponer el probar otras plantas de esta familia para identificar si es una característica de los metabolitos de esta familia de plantas.

Se ha reportado la acción del DMSO sobre la topología del DNA superenrollado, sin embargo, es una explicación que no termina de complacer la supuesta “pérdida” de actividad de nuestra enzima en presencia de este compuesto, se propone seguir investigando la acción del DMSO sobre el plásmido superenrollado y por otro lado probarlo sobre la propia enzima para confirmar o descartar un posible efecto sobre esta. Del mismo modo, al tener presente que el DMSO alteran los productos de nuestro experimento se podrían buscar y proponer otros disolventes que no tengan un efecto sobre la DNA girasa.

## IX BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hafez, S. M., Hathout, R. M., & Sasmour, O. A. (2021). Attempts to enhance the anti-cancer activity of curcumin as a magical oncological agent using transdermal delivery. *Advances in Traditional Medicine*, 21(1), 15–29. <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00439-5>
- Abundiz, L., Barajas-Morales, J. y Tenorio, P. (2004). Anatomía de maderas de México. Árboles y arbustos del matorral xerófilo de Tehuacán, Puebla. Instituto de Biología. UNAM. México. 21
- Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N., & Ichikawa, H. (2007). Curcumin, the Indian solid gold. *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, 1–75. Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_1)
- Alejo, Y. (2021). Síntesis y caracterización de análogos de curcumina y sus complejos metálicos con Magnesio. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://132.248.9.195/ptd2021/agosto/0814071/Index.html>
- Alt, S., Mitchenall, L. A., Maxwell, A., & Heide, L. (2011). Inhibition of DNA gyrase and DNA topoisomerase IV of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by aminocoumarin antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 2061–2069. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr247>
- Amieva, M. R., & El-Omar, E. M. (2008). Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*, 134(1), 306–323. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.009>
- Argueta, A., Cono, L., & Rodarte, M., (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. México: Instituto Nacional Indigenista. 1,2. 628-630.
- Atherton, J. C. (2006). The Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1(1), 63–96. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100125>
- Bauerfeind, P., Garner, R., Dunn, B. E., & Mobley, H. L. (1997). Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*, 40(1), 25–30. <https://doi.org/10.1136/gut.40.1.25>
- Bogaerts, P., Berhin, C., Nizet, H., & Glupczynski, Y. (2006). Prevalence and Mechanisms of Resistance to Fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* Strains from Patients Living in Belgium. *Helicobacter*, 11(5), 441–445. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2006.00436.x>
- Bosques-Padilla, F. J., Remes-Troche, J. M., González-Huezo, M. S., Pérez-Pérez, G., Torres-López, J., Abdo-Francis, J. M., Bielsa-Fernandez, M. V., Camargo, M. C., Esquivel-Ayanegui, F., Garza-González, E., Hernández-Guerrero, A. I., Herrera-Goepfert, R., Huerta-Iga, F. M., Leal-Herrera, Y., Lopéz-Colombo, A., Ortiz-Olvera, N. X., Riquelme-Pérez, A., Sampieri, C. L., Uscanga-Domínguez, L. F., & Velarde-Ruiz Velasco, J. A. (2018). IV consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México*, 83(3), 325–341. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.05.003>
- Bosques-Padilla, F., Alanis, A., Garza, G., Maldonado, G., Tijerina, M. (2001). Sensibilidad de *Helicobacter pylori* a ofloxacina y levofloxacina. *Revista de Gastroenterología de México*. 66(2).

- Brayton, C. F. (1986). Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *The Cornell Veterinarian*, 76(1), 61–90.
- Brown, L. M. (2000). *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. *Epidemiologic Reviews*, 22(2), 283–297. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a018040>
- Bush, N. G., Evans-Roberts, K., & Maxwell, A. (2015). DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2014>
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., & Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 402–405. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.021>
- Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H., & Romero, I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(1), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.022>
- Cattoir, V., Nectoux, J., Lascols, C., Deforges, L., Delchier, J.-C., Megraud, F., Soussy, C.-J., & Cambau, E. (2007). Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a *gyrA* polymorphism associated with hypersusceptibility. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(4), 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.11.007>
- Champoux, J. J. (2001). DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1), 369–413. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.369>
- Chan, P. F., Huang, J., Bax, B. D., & Gwynn, M. N. (2013). Recent Developments in Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases. *Antibiotics* 263–297. <https://doi.org/10.1002/9783527659685.ch11>
- Collins, J., Ali-Ibrahim, A., & Smoot, D. T. (2006). Antibiotic Therapy for *Helicobacter pylori*. *Medical Clinics of North America* 90(6), 1125–1140. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2006.07.002>
- CONABIO. 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. *Capital Nat.* México. CONABIO, Ciudad de México.
- Contreras, A., & Maxwell, A. (1992). *gyrB* mutations which confer coumarin resistance also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by *Escherichia coli* DNA gyrase. *Molecular Microbiology*, 6(12), 1617–1624. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00886.x>
- Cristina, G. C. M., & Fortunato, S. A. (2002). Manual para una Producción Sustentable de Corteza de Cuachalalate. (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht). SAGARPA. INIFAP. Publicación especial No. 34. C. E. Zacatepec Mor., México.
- Dalhoff, A. (2012). Global Fluoroquinolone Resistance Epidemiology and Implications for Clinical Use. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012, 1–37. <https://doi.org/10.1155/2012/976273>
- Dar, M. A., Sharma, A., Mondal, N., & Dhar, S. K. (2007). Molecular Cloning of Apicoplast-Targeted *Plasmodium falciparum* DNA Gyrase Genes: Unique Intrinsic ATPase Activity and ATP-Independent

Dimerization of PfGyrB Subunit. *Eukaryotic Cell*, 6(3), 398–412. <https://doi.org/10.1128/EC.00357-06>

- De Falco, M., Lucariello, A., Iaquinto, S., Esposito, V., Guerra, G., & de Luca, A. (2015). Molecular Mechanisms of *Helicobacter pylori* Pathogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 230(8), 1702–1707. <https://doi.org/10.1002/jcp.24933>
- Dirección General de Epidemiología (17 de octubre de 2022). Anuario de Morbilidad. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/anuarios-de-morbilidad-1984-a-2020>.
- Drlica, K., & Malik, M. (2003). Fluoroquinolones: Action and Resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(3), 249–282. <https://doi.org/10.2174/1568026033452537>
- Drlica, K., & Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(3), 377–392. <https://doi.org/10.1128/mmbr.61.3.377-392.1997>
- Duprey, A., & Groisman, E. A. (2021). The regulation of DNA supercoiling across evolution. *Protein Science*, 30(10), 2042–2056. <https://doi.org/10.1002/pro.4171>
- Duś, I., Dobosz, T., Manzin, A., Loi, G., Serra, C., & Radwan-Oczko, M. (2013). Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research – new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67, 261–268. <https://doi.org/10.5604/17322693.1044005>
- Escobedo, W. I. (2013) Estudio del potencial anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotector y antiinflamatorio de *Cyrtocarpa procera*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://132.248.9.195/ptd2013/agosto/0699177/0699177.pdf>
- Escobedo-Hinojosa, W. I., del Carpio, J. D., Palacios-Espinosa, J. F., & Romero, I. (2012). Contribution to the ethnopharmacological and anti-*Helicobacter pylori* knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 143(1), 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.001>
- Escobedo-Hinojosa, W. I., Gómez-Chang, E., García-Martínez, K., Guerrero Alquicira, R., Cardoso-Taketa, A., & Romero, I. (2018). Gastroprotective Mechanism and Ulcer Resolution Effect of *Cyrtocarpa procera* Methanolic Extract on Ethanol-Induced Gastric Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/2862706>
- Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(s1), 69-75. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s169>
- Fisher, L. M., & Pan, X. S. (2008). Methods to assay inhibitors of DNA gyrase and topoisomerase IV activities. *Methods in molecular medicine*, 142, 11–23. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-246-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-246-5_2)
- Fois, B., Skok, Ž., Tomašič, T., Ilaš, J., Zidar, N., Zega, A., Peterlin Mašič, L., Szili, P., Draskovits, G., Nyerges, Á., Pál, C., & Kikelj, D. (2020). Dual *Escherichia coli* DNA Gyrase A and B Inhibitors with Antibacterial Activity. *ChemMedChem*, 15(3), 265–269. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900607>



- Fonseca R. M. & Medina-Lemos R. 2012. Anacardiaceae, Flora de Guerrero No. 52.: Diego Pérez, N. & R.M. Fonseca (eds.) Flora de Guerrero. Prensas de Ciencias, México. 84 pp.
- Gisbert, J. P. (2011). Tratamientos de rescate ante el fracaso erradicador de. *Gastroenterología y Hepatología*, 34(2), 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2010.10.013>
- Gisbert, J. P. (2013). Linfoma gástrico MALT. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 105(5), 303–303. <https://doi.org/10.4321/S1130-01082013000500011>
- Gisbert, J. P., & Morena, F. (2006). Systematic review and meta-analysis: levofloxacin-based rescue regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 23(1), 35–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02737.x>
- Gómez-Chang, E., Escobedo Hinojosa, W., & Romero Álvarez, I. 2017. Tratamiento de la úlcera péptica asociada a *Helicobacter pylori*. Una perspectiva desde los productos naturales. Memoria del 44° Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM. Mensaje Bioquímico.41:9-20
- González, I., Georgiou, M., Alcaide, F., Balas, D., Liñares, J., & de la Campa, A. G. (1998). Fluoroquinolone Resistance Mutations in the *parC*, *parE*, and *gyrA* Genes of Clinical Isolates of Viridans Group Streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(11), 2792–2798. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.11.2792>
- 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), 397-40
- Goodwin, C. S., & Armstrong, J. A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/BF01969526>
- Han, C., Wang, L., Yu, K., Chen, L., Hu, L., Chen, K., Jiang, H., & Shen, X. (2006). Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from *Helicobacter pylori*. *FEBS Journal*, 273(20), 4682–4692. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05469.x>
- Heide, L. (2014). New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(1), 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.013>
- Heike, V. (2009). Malezas de México. *Artemisia ludoviciana* Nutt. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisia-ludoviciana/fichas/ficha.htm>.
- Heike, V. (2009). Malezas de México. *Heterotheca inuloides*. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/heterotheca-inuloides/fichas/ficha.htm>.
- Identificador PubChem: CID 167551. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/167551#section=2D-Structure>

- Identificador PubChem: *CID 5273775*. URL:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5273755#section=2D-Structure>
- Identificador PubChem: *CID 608115*. URL:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/608115#section=2D-Structure>
- Identificador PubChem: *CID 9837310*. URL:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9837310#section=2D-Structure>
- INAH. (s/f). Cuachalalate. Jardín Etnobotánico del Centro INAH Morelos. [Sitio web]. Disponible en:  
[https://lugares.inah.gob.mx/es/museos-inah/museo/museo-piezas/12916-12916-cuachalalate.html?lugar\\_id=389](https://lugares.inah.gob.mx/es/museos-inah/museo/museo-piezas/12916-12916-cuachalalate.html?lugar_id=389)
- Iwao, E., Yokoyama, Y., Yamamoto, K., Hirayama, F., & Haga, K. (2003). In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of Y-904, a new fluoroquinolone. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 9(2), 165-171. <https://doi.org/10.1007/s10156-003-0240-Z>
- Juang, J.-K., & Liu, H.-J. (1987). The effect of DMSO on natural DNA conformation in enhancing transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 146(3), 1458-1464. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)90813-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)90813-8)
- Kandulski, A., Selgrad, M., & Malfertheiner, P. (2008). *Helicobacter pylori* infection: A clinical overview. In *Digestive and Liver Disease*. 40(8), 619-626. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.02.026>
- Kim, B.-M., Minh, N. van, Choi, H.-Y., & Kim, W.-G. (2019). Coralmycin Derivatives with Potent Anti-Gram Negative Activity Produced by the Myxobacteria *Coralloccoccus coralloides* M23. *Molecules*, 24(7), 1390. <https://doi.org/10.3390/molecules24071390>
- Kim, J. M., Kim, J. S., Kim, N., Jung, H. C., & Song, I. S. (2005). Distribution of fluoroquinolone MICs in *Helicobacter pylori* strains from Korean patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(5), 965-967. <https://doi.org/10.1093/jac/dki334>
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449-490. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>
- Lanz, M. A., & Klostermeier, D. (2012). The GyrA-box determines the geometry of DNA bound to gyrase and couples DNA binding to the nucleotide cycle. *Nucleic Acids Research*, 40(21), 10893-10903. <https://doi.org/10.1093/nar/gks852>
- Lim, T. K. (2016). *Curcuma longa*. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. 241-362. Springer, Cham.
- Luna-Nemecio, J. (2019). La doble disyuntiva histórica de la producción antropogénica de la salud y la enfermedad en el siglo XXI. *Revista Antrópica*, (9), 137-155.
- Lv, B., Dai, Y., Liu, J., Zhuge, Q., & Li, D. (2015). The Effect of Dimethyl Sulfoxide on Supercoiled DNA Relaxation Catalyzed by Type I Topoisomerases. *BioMed Research International*, 2015, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/320490>

- Machado, J. (2019). Síntesis y caracterización de análogos de curcumina y sus complejos metálicos de cobre. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://132.248.9.195/ptd2019/agosto/0793894/0793894.pdf>
- Mahady, G. B., Pendland, S. L., Yun, G., & 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.
- Malfetheriner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N., Kuipers, E. J., Andersen, L., Atherton, J., Asaka, M., Bazzoli, F., Bytzer, P., Chan, F., Coelho, L. G. V., de Wit, N., Delchier, J. C., Xiao, S. (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: The maastricht III consensus report. *Gut*, 56(6), 772-781. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.101634>
- Marshall, B. J., & Goodwin, C. S. (1987). Notes: Revised Nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(1), 68–68. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-1-68>
- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Rio, F., & Delgado, G. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 34(2–3), 147–154. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90032-9)
- Matsuzaki, J., Suzuki, H., Tsugawa, H., Nishizawa, T., & Hibi, T. (2010). Homology model of the DNA gyrase enzyme of *Helicobacter pylori*, a target of quinolone-based eradication therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25, S7-S10. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06245.x>
- Maxwell, A., & Lawson, D. (2003). The ATP-Binding Site of Type II Topoisomerases as a Target for Antibacterial Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(3), 283–303. <https://doi.org/10.2174/1568026033452500>
- Mégraud, F., & Lehours, P. (2007). *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. In *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 280-322. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-06>
- Meza-Morales, W., Estévez-Carmona, M. M., Alvarez-Ricardo, Y., Obregón-Mendoza, M. A., Cassani, J., Ramírez-Apan, M. T., Escobedo-Martínez, C., Soriano-García, M., Reynolds, W. F., & Enríquez, R. G. (2019). 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. <https://doi.org/10.3390/molecules24081598>
- Mittermeier, R., Goettsch, C., & Robles Gil, P. (1997). Megadiversidad. Los países biológicamente más ricos del Mundo. *CEMEX*.
- Miyachi, H., Miki, I., Aoyama, N., Shirasaka, D., Matsumoto, Y., Toyoda, M., Mitani, T., Morita, Y., Tamura, T., Kinoshita, S., Okano, Y., Kumagai, S., & Kasuga, M. (2006). Primary Levofloxacin Resistance and gyrA/B Mutations Among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter*, 11(4), 243–249. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2006.00415.x>

- Mori, H., & Suzuki, H. (2020). Update on quinolone-containing rescue therapies for *Helicobacter pylori* infection. In *World Journal of Gastroenterology*, 26(15), 1733-1744. <https://doi.org/10.3748/WJG.V26.I15.1733>
- Münzenmaier, A., Lange, C., Glocker, E., Covacci, A., Moran, A., Bereswill, S., Baeuerle, P. A., Kist, M., & Pahl, H. L. (1997). A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 159(12), 6140–6147.
- Nöllmann, M., Crisona, N. J., & Arimondo, P. B. (2007). Thirty years of *Escherichia coli* DNA gyrase: From in vivo function to single-molecule mechanism. *Biochimie*, 89(4), 490–499. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.02.012>
- O'Connor, A., Vaira, D., Gisbert, J. P., & O'Morain, C. (2014). Treatment of *Helicobacter pylori* Infection 2014. In *Helicobacter*, 19, 38-45. <https://doi.org/10.1111/hel.12163>
- Okuda, J., Okamoto, S., Takahata, M., & Nishino, T. (1991). Inhibitory effects of ciprofloxacin and sparfloxacin on DNA gyrase purified from fluoroquinolone-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(11), 2288–2293. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.11.2288>
- OMS. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.
- On, S. L. W., Lee, A., O'Rourke, J. L., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Fox, J. G., & Vandamme, P. (2015). *Helicobacter*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01073>
- Palacios-Espinosa, J. F., Núñez-Aragón, P. N., Gómez-Chang, E., Linares, E., Bye, R., & Romero, I. (2021). Anti-*Helicobacter pylori* Activity of *Artemisia ludoviciana* subsp. mexicana and Two of Its Bioactive Components, Estafiatin and Eupatilin. *Molecules*, 26(12), 3654. <https://doi.org/10.3390/molecules26123654>
- Perez-Perez, G. I., Rothenbacher, D., & Brenner, H. (2004). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. In *Helicobacter*, 9(s1), 1-6. <https://doi.org/10.1111/j.1083-4389.2004.00248.x>
- Rasband, W.S., ImageJ. [Software]. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Matryland, USA. Disponible en: <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Reece, R. J., & Maxwell, A. (1991). DNA Gyrase: Structure and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26(3–4), 335–375. <https://doi.org/10.3109/10409239109114072>
- Rodriguez-Canales, M., Martinez-Galero, E., Nava-Torres, A. D., Sanchez-Torres, L. E., Garduño-Siciliano, L., Canales-Martinez, M. M., Terrazas, L. I., & Rodriguez-Monroy, M. A. (2020). Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanolic Extract of *Cyrtocarpa procera* Bark Reduces the Severity of Úlcerative Colitis in a Chemically Induced Colitis Model. *Mediators of Inflammation*, 2020, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/5062506>

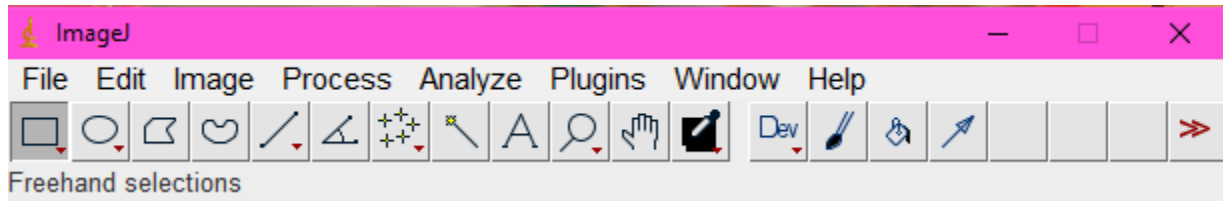
- Ruiz-Cancino, A., Cano, A. E., & Delgado, G. (1993). Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. mexicana. *Phytochemistry*, 33(5), 1113–1115. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85032-M](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85032-M)
- Sanphui, P., & Bolla, G. (2018). Curcumin, a Biological Wonder Molecule: A Crystal Engineering Point of View. *Crystal Growth & Design*, 18(9), 5690–5711. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00646>
- Sato, K., Inoue, Y., Fujii, T., Aoyama, H., Inoue, M., & Mitsuhashi, S. (1986). Purification and properties of DNA gyrase from a fluoroquinolone-resistant strain of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30(5), 777–780. <https://doi.org/10.1128/AAC.30.5.777>
- Shiriaev, D. I., Sofronova, A. A., Berdnikov, E. A., Lukianov, D. A., Komarova, E. S., Marina, V. I., Zakalyukina, Y. v., Biryukov, M. v., Maviza, T. P., Ivanenkov, Y. A., Sergiev, P. v., Osterman, I. A., & Dontsova, O. A. (2021). Nybomycin Inhibits both Fluoroquinolone-Sensitive and Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.00777-20>
- Standley, P. (1920-1926). Trees and Shurbs of Mexico. Contributions from the United States National Herbarium 23.
- Taxon Abstract for the species *Helicobacter pylori* (Fox et al. 1988) Goodwin et al. 1989. NamesforLife, LLC. Recuperado el 10 de agosto de 2022. <https://doi.org/10.1601/tx.3833>.
- TopoGEN (s.f.). *E. coli* DNA Gyrase Drug Screening Manual. <https://topogen.com/product/e-coli-dna-gyrase-drug-screening-kit/>
- Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gomez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Conyer, R., & Muñoz, O. (1998). A Community-Based Seroepidemiologic Study of *Helicobacter pylori* Infection in Mexico. *The Journal of Infectious Diseases*, 178(4), 1089–1094. <https://doi.org/10.1086/515663>
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Revisado el 21 de abril de 2023. URL: <https://tropicos.org/name/34500029>
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Revisado el 21 de abril de 2023. URL: <https://tropicos.org/name/16800004>
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Revisado el 21 de abril de 2023. URL: <https://tropicos.org/name/2700144>
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Revisado el 21 de abril de 2023. URL: <https://tropicos.org/name/2732943>
- Tshibangu-Kabamba, E., & Yamaoka, Y. (2021). *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance — from biology to clinical implications. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(9), 613-629. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00449-x>

- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559–902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Wall, M. K., Mitchenall, L. A., & Maxwell, A. (2004). *Arabidopsis thaliana* DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20), 7821–7826. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400836101>
- Wang, Y.-J., Pan, M.-H., Cheng, A.-L., Lin, L.-I., Ho, Y.-S., Hsieh, C.-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. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(96\)02024-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(96)02024-9)
- Warren, J. R., & Marshall, B. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet (London, England)*, 1(8336), 1273–1275.
- WGO. 2010. *Helicobacter pylori* in developing countries. Global Guidelines
- Xu, H., Chen, H., Yao, P., Lin, G., & Chen, W. (2013). In-Vitro Inhibitory Effect of Methanol Extracts of Chinese Herbal Drugs on Supercoiling Activity of Bacterial DNA Gyrase. *Chinese Medicine*, 04(01), 19–23. <https://doi.org/10.4236/cm.2013.41004>
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., & Nakamura, S. (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(6), 1271–1272. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.6.1271>
- Zamani, M., Ebrahimtabar, F., Zamani, V., Miller, W. H., Alizadeh-Navaei, R., Shokri-Shirvani, J., & Derakhshan, M. H. (2018). Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. In *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 47(7), 868-876. <https://doi.org/10.1111/apt.14561>
- Zullo, A., Pern, F., Hassan, C., Ricci, C., Saracino, I., Morini, S., & Vaira, D. (2007). Primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated in northern and central Italy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 25(12), 1429–1434. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03331.x>

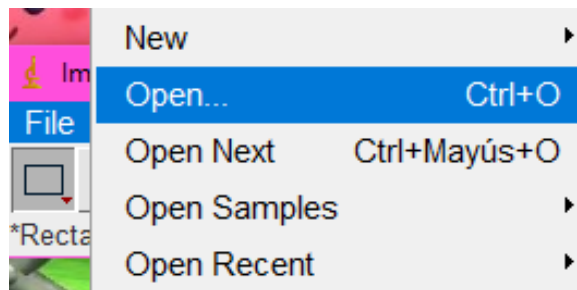
## Anexo 1. Uso del programa ImageJ para realizar mediciones por densitometría.

El programa es un software de acceso libre que se puede descargar gratuitamente del siguiente enlace: <https://imagej.nih.gov/ij/>

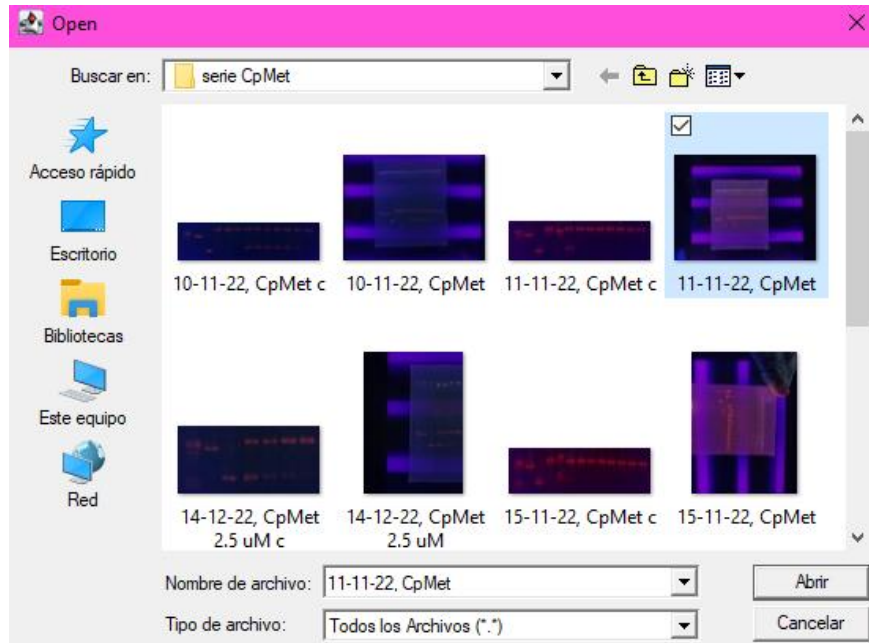
Se abre el programa y se muestra un menú con varias funciones




1. Para seleccionar la imagen que necesitamos analizar se selecciona la pestaña “File” y posteriormente la opción “Open...”

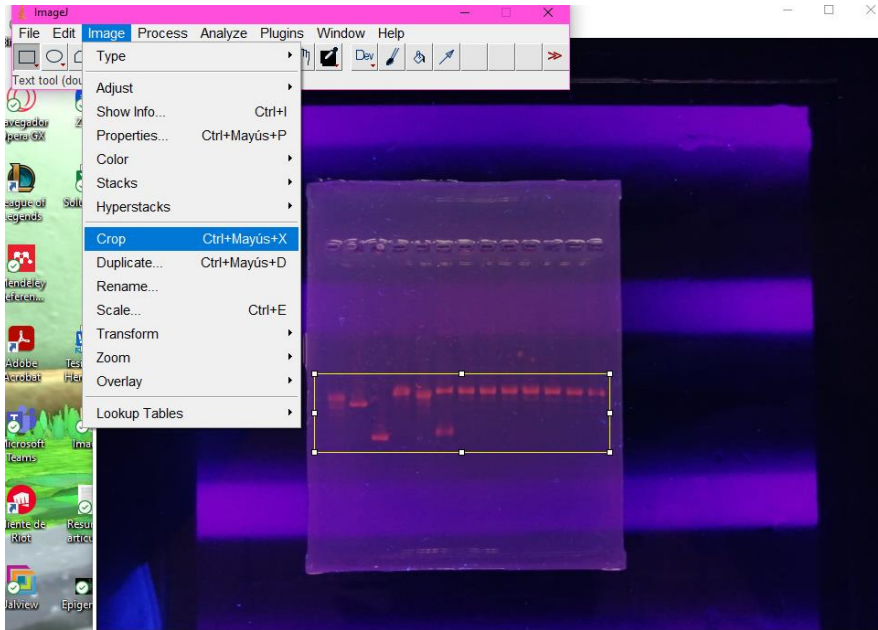


2. El programa abrirá una nueva ventana que contiene todos los documentos con formato de imagen (.jpeg, .png, .jpg, etc.), se selecciona la ubicación de nuestra imagen y se da clic en “Abrir”. Esto hará que la imagen se presente en una nueva ventana del programa. Cabe recalcar que el programa no tiene una interfaz completa, hace uso de su barra de herramientas y de ventanas emergentes.



3. Las imágenes pueden ser trabajadas “en crudo” o se les puede aplicar ajustes de brillo, contraste, convertirlas en imágenes “negro sobre fondo blanco” o “blanco sobre fondo negro”, para el análisis de los geles era necesario que toda la información de las bandas fuera visible y no se perdiera ninguna banda después de ajustarlas. Por esta razón se decidió solo substraer el valor del fondo de cada imagen y trabajar con ellas tal cual se cargan al programa. Para substraer el valor del fondo es necesario primeramente recortar las imágenes, seleccionando el área que se desea recortar con ayuda de la herramienta “Rectangle” , una vez que se tiene seleccionada el área se da clic en la pestaña “Image” y posteriormente en la opción “Crop”.



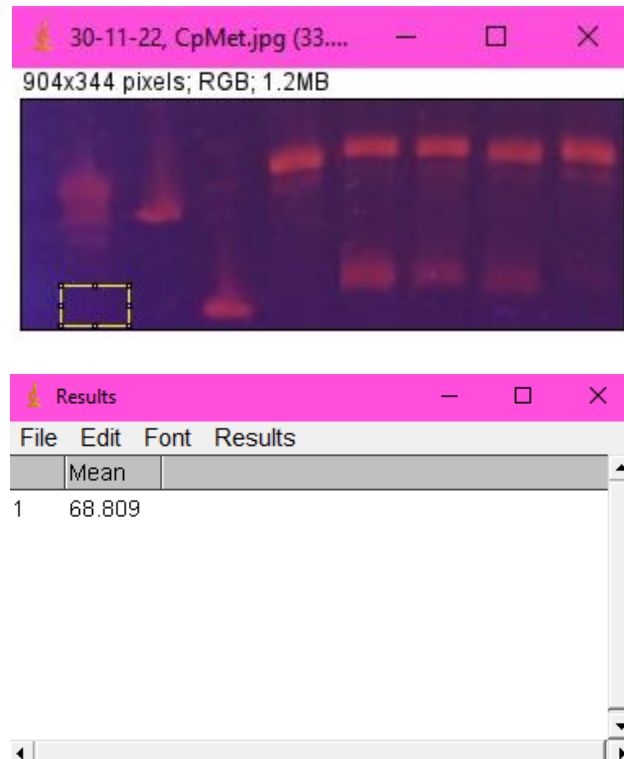


4. Antes de abstraer el valor del fondo, es necesario saber qué información nos está arrojando el programa, para esto en la pestaña “Analyze” hay que seleccionar los parámetros que queremos medir, se da clic en “Set Measurements...” y se desplegará un menú.



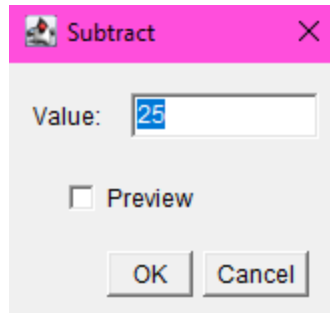
En este menú es necesario que se encuentre únicamente señalada la opción de “Mean gray value”.

5. Para substraer el valor del fondo se debe usar la herramienta “Rectangle” y se debe trazar un pequeño cuadro en cualquier parte de la imagen, procurando que el área seleccionada sea el fondo de la imagen y no se interfiera con ninguna banda.

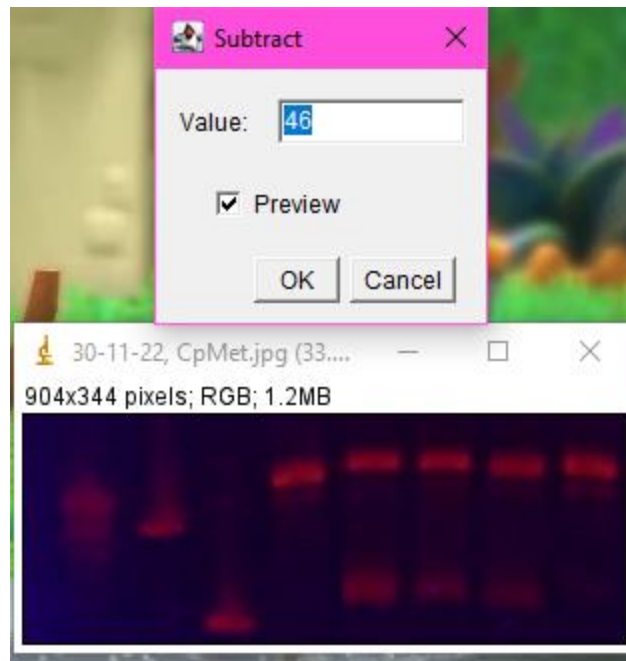


Posteriormente en la pestaña “Analyze” se da clic en la opción “Measure” o con el comando “Ctrl+M”, lo cual nos arrojará una medición del valor de gris del área seleccionada, el cual se anota ya que es el valor del fondo.

6. Se deselecciona el cuadro anteriormente trazado dando clic en cualquier parte de la imagen y dentro del menú “Process”, se selecciona la opción “Math” y después en “Subtract”, el cual nos arrojará un menú que automáticamente tiene el valor de “25”.

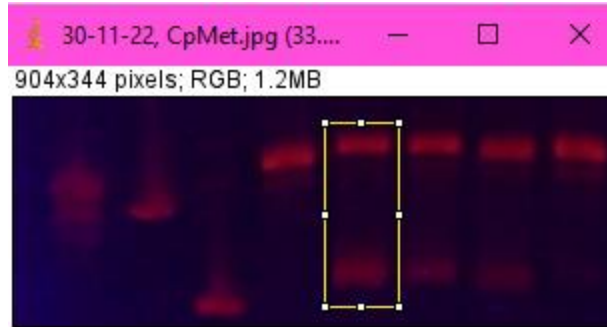


Aquí se coloca el valor antes obtenido correspondiente a el valor del fondo y se puede seleccionar la opción “Preview” para observar cómo varia la imagen, el objetivo es colocar un valor que no cambie la intensidad de las bandas conservando incluso las bandas más claras.



Depende de cada imagen el que tanto se debe substraer, en general, con el valor anteriormente obtenido es suficiente, pero a veces se pierden algunas bandas y es necesario ocupar un valor menor.

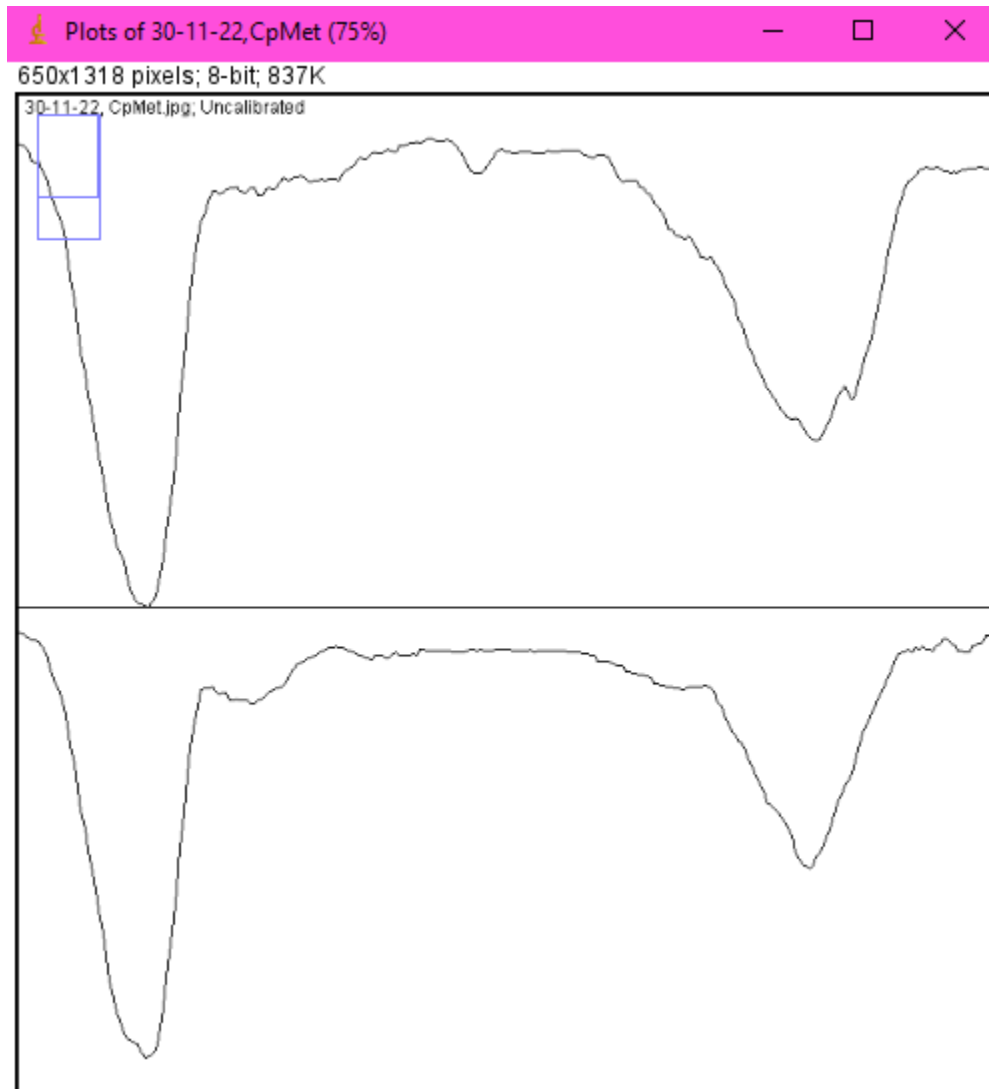
7. Para comenzar el análisis es necesario ocupar la herramienta “Rectangle” y seleccionar un carril, este debe ser lo suficientemente ancho y alto para que quepa en todos los carriles



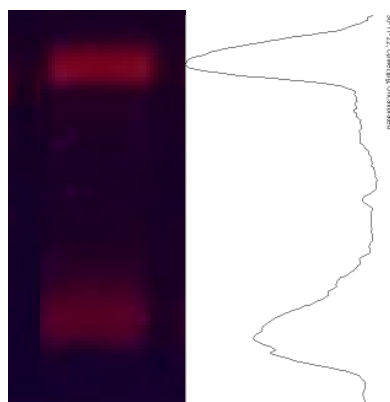
Se selecciona el primer carril (estos pueden ser analizados de 1 en 1 o seleccionar varios), para esto se utiliza la pestaña “Analyze” después en la opción “Gels” y por último en la opción “Select First Lane” del mismo modo se puede ocupar el comando “Ctrl+1”, esto hará que se ponga un número al centro de la selección y el rectángulo trazado se puede arrastrar al siguiente carril. Se realiza lo mismo solo que esta vez la opción “Select Next Lane” o el comando “Ctrl+2”, este paso se repite hasta seleccionar los carriles que se requiere analizar.




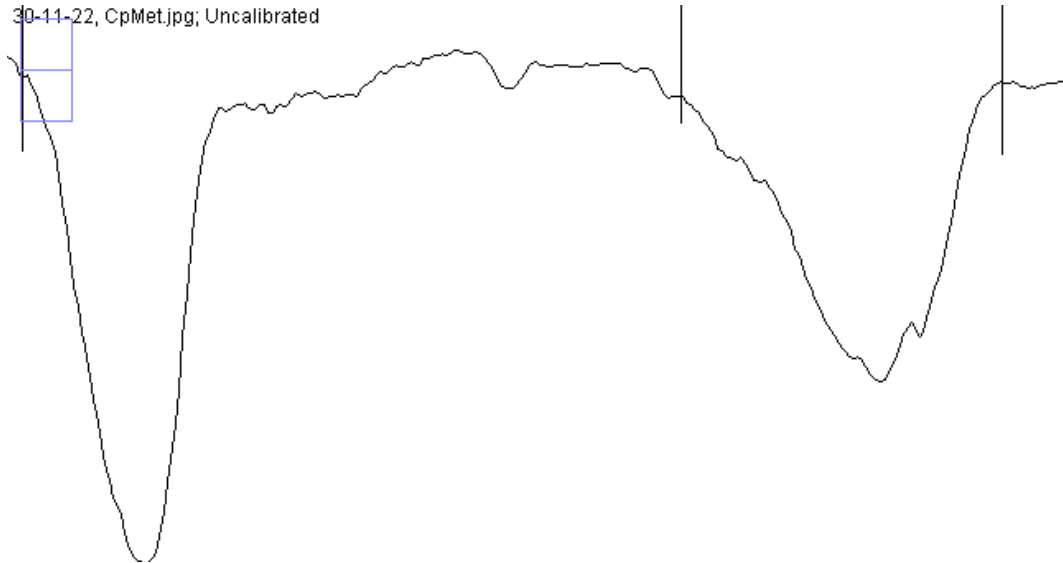
8. Posteriormente en la misma opción de “Analyze”>”Gels” se da clic en la opción “Plot Lanes” o el comando “Ctrl+3”, esto nos arrojará un gráfico para cada carril como el que se muestra a continuación.




Este grafico es una representación del carril y los picos son aquellas bandas con mayor intensidad. Visto de otra manera:

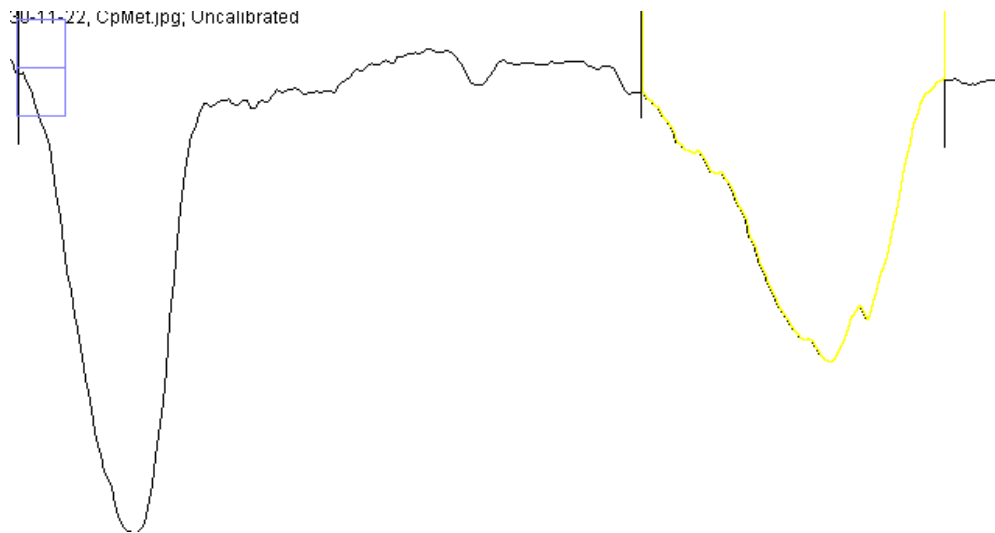


9. Para poder medir el valor de cada carril es necesario trazar líneas rectas para delimitar la medición, esto con ayuda de la herramienta “Straight” , se debe delimitar dependiendo del carril ya que a veces por la captura de datos o por el propio gel algunas bandas no quedan a la misma altura, se debe trazar una línea recta en cada pico de la siguiente forma.



De esta manera se delimitará un pico, en este caso, que representa al DNA superenrollado (derecha) y el resto del perfil a la izquierda, que corresponde al DNA relajado, las líneas pueden ser las mismas para todos los gráficos o ir las ajustando, dependiendo del carril.

10. Por último, se obtuvo el área de cada pico lo que nos indican la densidad de cada banda (densitometría), para esto es necesario utilizar la herramienta “Wand (tracing) tool” , la cual al dar clic a cualquiera de los picos nos arrojará un valor de densidad de píxeles en una nueva ventana, esto se debe hacer para cada carril tanto para el pico de DNA superenrollado como la zona de DNA relajado.



Results			
File	Edit	Font	Results
	Area		
1	37029.848		
2	27628.108		

11. Los datos de cada medición junto con las imágenes tratadas se depositaron en un documento de Excel que se puede consultar en el Laboratorio donde se realizó la Tesis.

## Anexo 2. Alineamiento de secuencias

El alineamiento de secuencias obtenido por el BLAST del NCBI, se muestra en las siguientes imágenes. El renglón “Query” corresponde a la secuencia de *H. pylori* y el renglón “Subject” a la de *E. coli*. En el renglón de medio se muestran las zonas de identidad y similitud, cuando aparece una letra significa una identidad mientras que si aparece “+” significa similitud para los aminoácidos comparados.

### GyrA

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
769 bits(1986)	0.0	Compositional matrix adjust.	398/850(47%)	578/850(68%)	42/850(4%)
Query 9		TKNIVEVIGIDSSIEESYLAYSMSVIIGRALPDARDGLKPVHRRILYAMHELGLTSKVAYK			68
		+ I V I+ ++ SYL Y+MSVI+GRALPD RDGLKPVHRR+LYAM+ LG AYK			
Sbjct 5		AREITPVNIEEELKSSYL DYAMSVIVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNWKNKAYK			64
Query 69		KSARIVGDVIGKYHPHGDNAVYDALVRMAQDFSMRLELVGQGNFGSIDGDNAAAMRYTE			128
		KSAR+VGDVIGKYHPHGD+AVYD +VRMAQ FS+R LVGQGNFGSIDGD+AAAMRYTE			
Sbjct 65		KSARVVGDVIGKYHPHGDNAVYDITVRMAQPFSLRYMLVGGQGNFGSIDGDSAAAMRYTE			124
Query 129		ARMTKASEEILRDIDKDTIDFVFNYYDTLKEPDILPSRLPNLLVNGANGIAVGMATSIPP			188
		R+ K + E++ D++K+T+DFV NYD T K PD++P+++PNLLVNG++GIAVGMAT+IPP			
Sbjct 125		IRLAKIAHELMADLEKETVDFVNDYDGTTEKIPDVMPTKIPNLLVNGSSGIAVGMATNIPP			184
Query 189		HRIDEIIDALVHVLNPNELDEILEFVKGPDPFTGGIYGKAGIIEAYKTGRGRVKVRA			248
		H + E+I+ + +++ + ++ ++E + GPDFPT II G+ GI EAY+TGRG+V +RA			
Sbjct 185		HNLTEVINGCLAYIDDEDISIEGLMEHIPGPDFPTAAIINGRRGIEEAYRTGRGKVYIRA			244
Query 249		K--VHVEKTKNKEIIVLDEMPFQTNKAKLVEQISDLAREKQIEGISEVRDESREGIRV			306
		+ V V+ +E I++ E+P+Q NKA+L+E+I++L +EK++EGIS +RDES++G+R+V			
Sbjct 245		RAEVEVDAKTGRETIIVHEIPYQVKNKARLIEKIAELVKEKRVEGISALRDESDDGMRIV			304
Query 307		IELKRDAMSEIVLNHLYKLTMTTFSIILLAIYNKEPKIFTLLELLRFLNHRKTIIR			366
		IE+KRDA+ E+VLN+LY T ++ +F I ++A+++ +PKI L +++ F+ HR+ ++ R			
Sbjct 305		IEVKRDAVGEVLLNLYSQTQLQVSFGINMVALHHGQPKIMNLDIIAAFVRRHREVTR			364
Query 367		RTIFELEKAKARAHILEGYLIALDNIDGIVRLIKTSPSPAAKNAL-----M			413
		RTIFEL KA+ RAHILE +AL NID I+ LI+ +P+P AK AL +			
Sbjct 365		RTIFELRKARDRAHILEALAVALANIDPIELIRHAPTAEAKTALVANPWQLGNVAAML			424
Query 414		ER-----FTLSEIQSKAILEMRLQRLTGLERDKIKEEYQNLLEL			452
		ER + L+E Q++AIL++RLQ+LTGLE +K+ +EY+ LL+			
Sbjct 425		ERAGDDAARPEWLEPEFGVRDGLYYLTEQQAQAILDLRLQKLTGLEHEKLLDEYKELLDQ			484
Query 453		IDDLNGILKSEDRLNGVVKTELELVKEOFSSPRRTEIOESYENIDIEDLIANEPMVVMS			512
Query 513		YKGYVVRVGLKAYEKQNRGGKGLSGSTYEDDFIENFFVANTHDILLFITNKGQLYHLKV			572
		++GYVK L YE Q RGGK + E+DFI+ VANTHD +L +++G++Y +KV			
Sbjct 545		HQGYVKYQPLSEYEAQRGGKGSAAARIKEEDFIDRLLVANTHDHILCFSSRGRVYSMKV			604
Query 573		YKIPEASRIAMKAIIVNLISLAPDEKIMATLSTKDFSDERSLAFFTKNGVVKRNLSEFG			632
		Y++PEA+R A G+ IVNL+ L DE+I A L +F + + T NG VK+T L+EF			
Sbjct 605		YQLPEATRARGRPIVNLPLEQDERITAILPVTEFEEGVKVFMATANGTVKTLVTEFN			664
Query 633		SNRSYSGIRAIIVLDEGDELVSQVVDKNAKHLLIASHLGIFIKFPLEDVREIGRNARGVI			692
		R+ +G AI L +GDEL+ + +L ++ G ++F VR +G N GV			
Sbjct 665		RLRT-AGKVAIKLVGDDELIGVDLTSGEDEVMLFSAE-GKVVRFKESVVRAMGCNTTGV			722
Query 693		GIKLNENDFVVGAVVISDDSNKLLSVSENGLKQTLAEAYREQSRGGKGVIGMKITQKTG			752
		GI+L E D VV +V D +L+ ++NG GK+T Y +SR KGV I +K+T++ G			
Sbjct 723		GIRLGEQKVVSLIVPRGDG-AILTATQNGYKRTAVAEYPTKSRATKGVISIKVTERNG			781
Query 753		NLVGVISVDENLDLMLTASAKMIRVSIKIDIRETRRNASGVKLINTA--DKVYVNSCP			810
		+VG + VDD + +M++T + ++R + +I RN GV LI TA + VV +			
Sbjct 782		LVVGAVQVDDCD-QIMMITDAGTLVTRTRVSEISIVGRNTQGVILIRTAEDENVVGLQVVA			840
Query 811		KEEEPENLET 820			
		+ + E+L+T			
Sbjct 841		EPVDEEDLDT 850			



# GyrB

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
630 bits(1624)	0.0	Compositional matrix adjust.	354/815(43%)	519/815(63%)	58/815(7%)
Query 3		NYQSHSIKVLKGLGVRKRPGMYIGDNTVG -GLHHMVVEVDNAVDES MAGFCDTINITL			61
Sbjct 4		+Y S SIKVLKGL+ VRKRPGMYIGDT+ G GLHHMV+EVVDNA+DE++AG C I +T+			63
Query 62		TEEGSCIVEDNGRGPVDIHPTEKIPACTVVLTI LHAGGKFDNDTYKVS GGLHGVGVSVV			121
Sbjct 64		+ S V+D+GRGIP IHP E + A V++T+LHAGGKFD+++YKVS GGLHGVGVSVV			123
Query 122		NALS KRLIMTIKKEGQIYRQEF EKGIPTSELEIIGKTKSAKESGTTIEFFPD -ESVMEV			180
Sbjct 124		NALS++L + I++EG+I+RQ +E G+P + L + G+T+ ++GT + F+P E+ V			180
Query 181		EFQAGILQKRFKEMAYLNDGLKISFKEEKTQLQETYFYEDGLKQFVKDSAKKELLTPIVA			240
Sbjct 181		EF+ IL KR +E+++LN G+ I +++++ ++ + YE G+K FV+ K + TPI			238
Query 241		--FKSMDEETRISIEVALAYTDDYNNENTLSFVNNIKTSEGGTHEAGFKMGLSKAILQYID			298
Sbjct 239		F E+ +EVAL + D + EN F NNI +GGTH AGF+ +++ + Y+D			298
Query 299		NNIKTKDSR--PISEDIKEGLIAVVS LKMSEPLFEGQTKSKLGSYARALVSKLVYDKIH			356
Sbjct 299		+K ++ +D +EGLIAVVS+K+ +P F QTK KL SS ++ V + + + +			358
Query 357		QFLEENPNEAKIIANKALLAAKAREASKKARELTRKKNL SVGLPGKL ADCQSKDPLES			416
Sbjct 359		++L ENP +AKI+ K + AA+AREA+++ARE+TR+K L + LPGKL ADCQ +DP S			418
Query 417		EIFLVEGDSAGGSAKQGRDRVFQAILPLK GKILNVEKSHLSKILKSEEIKNMITAFGCGI			476
Sbjct 419		E++LVEGDSAGGSAKQGR+R QAILPLK GKILNVEK+ K+L S+E+ +ITA GCGI			478
Query 477		-QESFDIERLRYHKIIIMTDADVDGSHIQTL LMTFFRYRLRPLIEQGHVYIAQAPLYKYK			535
Sbjct 479		++ ++ ++LRYH IIMTDADVDGSHI+TLL+TFFYR + ++E+GHVYIAQ PLYK K			538
Query 536		KGKTEIYLKDSVALDHLIEHGINSVDIE-----GIGKNDLMNLLKVARHYRYV LLELE			589
Sbjct 539		KGK E Y+KD A+D + I ++ + + L L+ + ++ +E			598
Query 590		KRYNLEILRFLIETKDALS LDMKVLEKSILEKLEGLNYQILRSFATEESLHLHAQTPKG			649
Sbjct 599		+RY +L+ LI D+ E+++ + L ++ H K			649
Query 650		LVEFNLDNLFKEVLFEEAN-----CT----YQKLM EYN--LDF			682
Sbjct 650		V N + NLF+ ++ + CT + L+E + ++			709
Query 683		LENKDILAFLEEVENY---AKKGANIQRYKGLGEMNPNDLWETTMHKENRSLIKLKIED			738
Sbjct 710		E + +A E+ ++ +++G +IQRYKGLGEMNP LWETTM E+R ++++ ++D			769
Query 739		LEKTDVAFSLCMGDEVEPRRAFIQAHAKDVKQLDV 773			
Sbjct 770		D +F+ MGD VEPRRAFI+ +A +D+ AIAADQLFTTLMGDAVEPRRAFIENALKAANIDI 804			