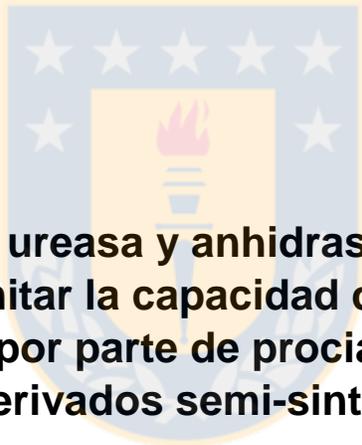




Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia

Facultad de Farmacia
Dpto. de Farmacia
Director de Tesis
Dr. Edgar Pastene N.

Facultad de Ciencias Biológicas
Dpto. de Microbiología
Co-Director de Tesis
Dra. Apolinaria García C.



Inhibición dual de ureasa y anhidrasa carbónica como estrategia para limitar la capacidad de colonización de *Helicobacter pylori* por parte de procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Farmacéuticas

Victor Miguel Parada Contreras
2016

RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) se asocia a enfermedades como la úlcera duodenal y gastritis. *H. pylori* puede colonizar eficazmente la mucosa gástrica de humanos en gran parte debido a su capacidad de neutralizar el entorno de carácter ácido predominante en el estómago. Dicha propiedad está asociada principalmente a la producción de la enzima ureasa y a la acción conjunta con la enzima anhidrasa carbónica (AC) que actúa en forma cooperativa con la ureasa, ayudando a neutralizar el pH del entorno.

El 90% de los casos reportados de cáncer gástrico poseen un historial de infección por *H. pylori*, lo que llevó a la Organización Mundial de la Salud en 1994 a clasificarlo como carcinógeno de nivel I. El tratamiento consensuado de la infección con *H. pylori* combina varios antibióticos, lo cual, conlleva a una eficacia variable debido a la alta prevalencia de resistencia de algunos antibióticos como claritromicina, el tratamiento estándar se asocia además con importantes efectos adversos, por lo tanto existe una necesidad imperiosa de contar con otros tratamientos ya sea de forma preventiva o directamente erradicando a *H. pylori* de la mucosa gástrica. Ya se ha demostrado que algunos polifenoles pueden inhibir la enzima ureasa, lo que los convierte en un interesante complemento natural y de baja toxicidad para prevenir y/o limitar la infección. Dentro de los polifenoles estudiados se ha encontrado que las proantocianidinas (PAC) son las más eficientes, el efecto de estos compuestos depende en gran medida de su tamaño molecular (grado de polimerización) y naturaleza del monómero que los conforma. Particularmente, se estableció que la mínima estructura activa son los dímeros de PAC y que las PAC derivadas de catequina son más efectivas que sus homólogos de epicatequina, En el presente trabajo, una serie de derivados semi-sintéticos de catequinas naturales fueron preparados a partir de proantocianidinas (PACs) poliméricas obtenidas de boldo, mediante el clivaje y depolimerización de dichas PACs, los carbocationes formados en medio ácido fueron atacados con diferentes nucleófilos fenólicos (floroglucinol, resorcinol y pirogalol), para formar tres aductos de catequina, que luego fueron separados mediante CPC y HPLC preparativas. La formación de los

compuestos fue monitoreada y confirmada por HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Además sintetizaron cumarinas y comprobó su identidad y pureza mediante FT-IR, NMR y MS.

A todos los compuestos elaborados (aductos y cumarinas) se les midió su capacidad inhibitoria frente ureasa y AC de *H. pylori*, se testearon en células de adenocarcinoma gástrico (AGS) infectadas con *H. pylori* y se midió el efecto frente al componente inflamatorio, los resultados obtenidos muestran que los aductos de catequina-pirogalol y floroglucinos, además 4-hidroxycumarina y 7-hidroxycumarina presentan una alta capacidad de inhibir AC, son capaces de interferir en la adherencia de *H. pylori* en células AGS y además presentan un efecto inhibitorio del componente inflamatorio, sin embargo estos compuestos no son potentes inhibitorios de ureasa como sí lo son las PACs del extracto de boldo, lo que sugiere que podrían combinarse en un teórico tratamiento preventivo anti-*H. pylori*, lo que llevaría a que se complementen los efectos o incluso a que actúen de forma sinérgica.



Listado de Contenido

RESUMEN	i
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	vi
I. INTRODUCCIÓN	7
1. <i>Helicobacter pylori</i>.	7
1.1. <i>Características microbiológicas (morfología).</i>	7
1.2. <i>Epidemiología y transmisión</i>	8
1.3. <i>Historia natural de la infección por H. pylori y enfermedades asociadas a ésta.</i>	9
1.4. <i>Factores de virulencia y promotores de la infección</i>	10
1.5. <i>Ureasa</i>	11
1.6. <i>Anhidrasa Carbónica</i>	13
1.7. <i>Rol cooperativo entre Ureasa y AC</i>	14
1.8. <i>Diagnóstico de la Infección</i>	15
1.9. <i>Tratamiento</i>	16
2. Productos Naturales con efecto anti-H. pylori	20
2.1 <i>Polifenoles como modelos para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos:</i>	20
2.2. <i>Cumarinas como modelos para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos</i>	22
3. Propuesta de investigación	24
II. HIPÓTESIS	25
III. OBJETIVOS	26
Objetivo General	26
Objetivos Específicos	26
IV. METODOLOGÍA	27
1. <i>Obtención, refinamiento y purificación de extractos vegetales</i>	27
2. <i>Caracterización polifenoles del extracto de Boldo</i>	27
3. <i>Obtención y refinamiento de compuestos naturales y semisintéticos</i>	28
4. <i>Caracterización de compuestos semisintéticos (aductos) mediante RP-HPLC-UV</i>	29
5. <i>Purificación de compuestos semi-sintéticos</i>	29
6. <i>Caracterización compuestos semisintéticos aislados mediante HPLC-DAD-MS/MS</i>	31
7. <i>Síntesis y caracterización de las cumarinas</i>	32

8. Cultivos <i>Helicobacter pylori</i> y extracción de Ureasa.	32
9. Actividad Antiureasa	33
10. Determinación Actividad inhibitoria de Anhidrasa Carbónica	34
11. Ensayo para determinar propiedades Anti-Adherencia de <i>Helicobacter pylori</i> en células de adenocarcinoma gástrico (AGS)	35
12. Determinación del efecto sobre el componente inflamatorio mediante medición de la inhibición de IL-8 mediante un kit ELISA	37
V. RESULTADOS	38
1. Caracterización polifenoles del extracto acuoso de Boldo	38
2. Caracterización compuestos semisintéticos	40
3. Purificación compuestos semisintéticos	40
4. Caracterización compuestos semisintéticos	42
5. Caracterización cumarinas sintéticas	43
6. Actividad anti ureasa	45
7. <i>Actividad inhibitoria de la anhidrasa carbonica</i>	48
8. <i>Ensayos anti-adherencia en células AGS</i>	51
9. Determinación efecto sobre el componente inflamatorio	53
VI. DISCUSION	54
VII. CONCLUSIÓN	63
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Helicobacter pylori</i> .	8
Figura 2. Historia natural de la infección por <i>H. pylori</i> .	10
Figura 3. Conformación aminoácídica del sitio de activo enzima ureasa.	12
Figura 4: Rol de la ureasa y la anhidrasa carbónica en la regulación del pH por <i>H. pylori</i> .	14
Figura 5. Esquema de tratamiento para infección con <i>H. pylori</i> .	18
Figura 6: Sistema preparativo CPC usado para la purificación de los aductos de procianidinas de boldo sinterizados en esta trabajo	31
Figura 7. RP-HPLC-UV para la identificación de polifenoles en el Extracto acuoso. Señal color Negro: 280nm. Rojo 355nm.	38
Figura 8. HILIC-HPLC-UV para la determinación oligomérica de Procianidinas del extracto de Boldo.	38
Figura 9. Purificación y caracterización de procianidinas B3 y C1 de Boldo.	39
Figura 10. RP-HPLC donde se evidencia la formación del aducto catequina-floroglucinol.	40
Figura 11: Ejemplo de purificación de un aducto de catequina-pirogalol en una etapa mediante CPC y su análisis de pureza e identidad mediante LC-MS	41
Figura 12: Cumarinas obtenidas mediante el procedimiento sintético asistido con microondas.	43
Figura 13. Ejemplo de Espectro RMN- ¹ H de la cumarina JSCu7.	44
Figura 14. Gráficos del efecto inhibitorio de ureasa de Jack bean y ureasa de <i>H. pylori</i> por el extracto de Boldo rico en PACs.	45
Figura 15. Ejemplo de gráficos semilog del efecto inhibitorio de ureasa de Jack bean y ureasa de <i>H. pylori</i> por el aducto Catequina-Pirogalol.	45
Figura 16. Gráfico del efecto inhibitorio de anhidrasa carbónica por el aducto Catequina-Floroglucinol.	48
Figura 17. Gráficos del efecto inhibitorio de anhidrasa carbónica por el aducto Catequina-Pirogalol.	49
Figura 18. Gráficos del efecto inhibitorio de anhidrasa carbónica por 4-Hidroxycumarina.	49

Figura 19. Gráficos del efecto inhibitorio de anhidrasa carbónica por 7-Hidroxicumarina.	50
Figura 20. Gráficos del efecto inhibitorio de extracto de boldo (E. Boldo), Aducto catequina-floroglucinol (Ad Cat-Ph), Aducto catequina-pirogalol (Ad Cat.Py), 4-hidroxicumarina (4-HC), 7-hidroxicumarina (7-HC) sobre cultivos de células AGS pretratadas con estos compuestos y luego infectadas con <i>H. pylori</i> .	51
Figura 21. imágenes representativas de microscopia de fluorescencia de la adhesión de <i>H. pylori</i> marcado con FITC sobre células AGS	52
Figura 22: Curva de calibración de estándar de interleuquina humana 8 versus absorbancia.	53
Figura 23: Grafica que muestra el efecto inhibitorio sobre Hu IL-8 en células AGS infectadas con <i>H. pylori</i> luego de ser tratadas con extracto de boldo, Aducto catequina-floroglucinol, Aducto catequina-pirogalol, 4-hidroxicumarina, 7-hidroxicumarina.	53

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1: Catequinas naturales y semi-sintéticas usadas en esta tesis	42
Tabla 2. IC ₅₀ para inhibición ureasa de Jack bean y <i>H. pylori</i>	47
Tabla 3. IC ₅₀ para inhibición anhidrasa carbónica.	50

I. INTRODUCCIÓN

1. *Helicobacter pylori*.

En la actualidad *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria muy conocida principalmente por su asociación a enfermedades gástricas. Pero no fue hasta 1982 cuando Warren y Marshall lograron aislarla desde biopsias gástricas después de cinco días de cultivo, logrando publicar los resultados de su trabajo, sin embargo no lograron convencer a la comunidad científica de la relación existente entre *H. pylori* y las dolencias gástricas, por lo que en 1985, el propio Marshall se sometió a un estudio histológico de su condición gástrica, en el que demostró estar libre de infección y que no poseía enfermedad gástrica alguna, luego se infectó a sí mismo con la bacteria, y después de dos semanas, a partir de una biopsia gástrica, se observó el desarrollo preliminar de una dolencia gástrica benigna que confirmó la relación de esta bacteria con el desarrollo de padecimientos gástricos (1).

Es así como con el paso de los años se ha ido estudiando más en detalle esta bacteria asociándola con gastritis y con enfermedades como las úlceras y el cáncer gástrico, llegándose incluso, en el año 1994 a declararla como agente carcinógeno tipo I para los seres humanos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2).

1.1. Características microbiológicas (morfología).

H. pylori es un microorganismo Gram negativo, presenta forma de espiral, ligeramente curvada, con terminaciones redondeadas, puede tener de dos a seis flagelos localizados en uno de los extremos de la bacteria (fig. 1), mide de 2.5-5.0 μm de longitud por 0.5-1.0 μm de ancho. La medida de los flagelos es 2.5 μm de longitud y alrededor de 30 nm de espesor. *H. pylori* puede cambiar a partir de su apariencia morfológica normal en una gama de formas cocoides, especialmente *in vitro* después del cultivo prolongado o después del tratamiento antibiótico. Las formas cocoides son metabólicamente activas, pero no pueden ser cultivadas *in vitro*. *H. pylori* necesita de un ambiente microaerófilico para su cultivo *in vitro*, una

atmósfera húmeda a 37° C, y una concentración aproximada de CO₂ del 10%, el pH óptimo de crecimiento es alrededor de 7, y es favorecido por la producción de una enzima llamada ureasa. Además, *H. pylori* es catalasa y oxidasa positivo (3, 4).

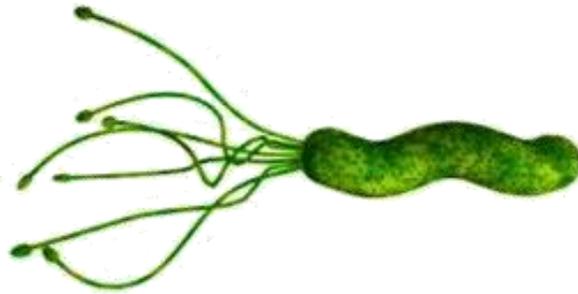


Figura 1. *Helicobacter pylori*.

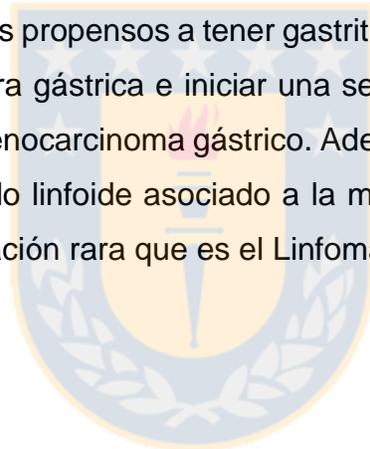
1.2. Epidemiología y transmisión

La infección por *H. pylori* ocurre en casi todo el mundo, pero la prevalencia varía mucho entre países y entre cada grupo de población dentro de un mismo país, relacionándose directamente con el status socioeconómico de la población. La prevalencia entre los adultos de mediana edad es superior al 80 % en muchos países en desarrollo (países de África, Asia y muchas partes de América Central y del Sur), en comparación con 20 % en los países industrializados, (Norte y Oeste de Europa, Norteamérica y Australia). Algunos factores que se asocian con alta incidencia de la infección son hacinamiento en la vivienda y ausencia de agua potable en el hogar. La infección se adquiere por la ingestión de la bacteria y se transmite principalmente dentro de las familias en la primera infancia. Se ha visto que en los países industrializados la transmisión directa de persona a persona se da mayormente por el vómito o la saliva; mientras otras rutas adicionales como el agua contaminada o las heces pueden ser más importante en los países en desarrollo. Actualmente no hay evidencia de zoonosis en la transmisión, aunque *H.*

pylori se encuentra en algunos primates no humanos y, ocasionalmente, en otros animales (5).

1.3. Historia natural de la infección por H. pylori y enfermedades asociadas a ésta.

H. pylori se adquiere normalmente en la niñez. La infección aguda causa hipoclorhidria transitoria y se diagnostica raramente. En las personas en las que persiste la colonización virtualmente se desarrollará gastritis crónica, pero el 80 a 90% de los infectados no presentará síntomas. El curso clínico adicional es altamente variable y depende tanto de factores propios del huésped como de la bacteria. Pacientes con una elevada producción de ácido en el estómago tienen mayor probabilidad de desarrollar gastritis con predominancia antral, esto los predispone a padecer úlceras en el duodeno. Pacientes con una reducida producción de ácido son más propensos a tener gastritis en el cuerpo del estómago, que los puede llevar a úlcera gástrica e iniciar una secuencia de los eventos que, en raros casos, produce adenocarcinoma gástrico. Además la infección por *H. pylori* induce la formación de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT), esto puede llevar a una complicación rara que es el Linfoma (fig. 2) (6).



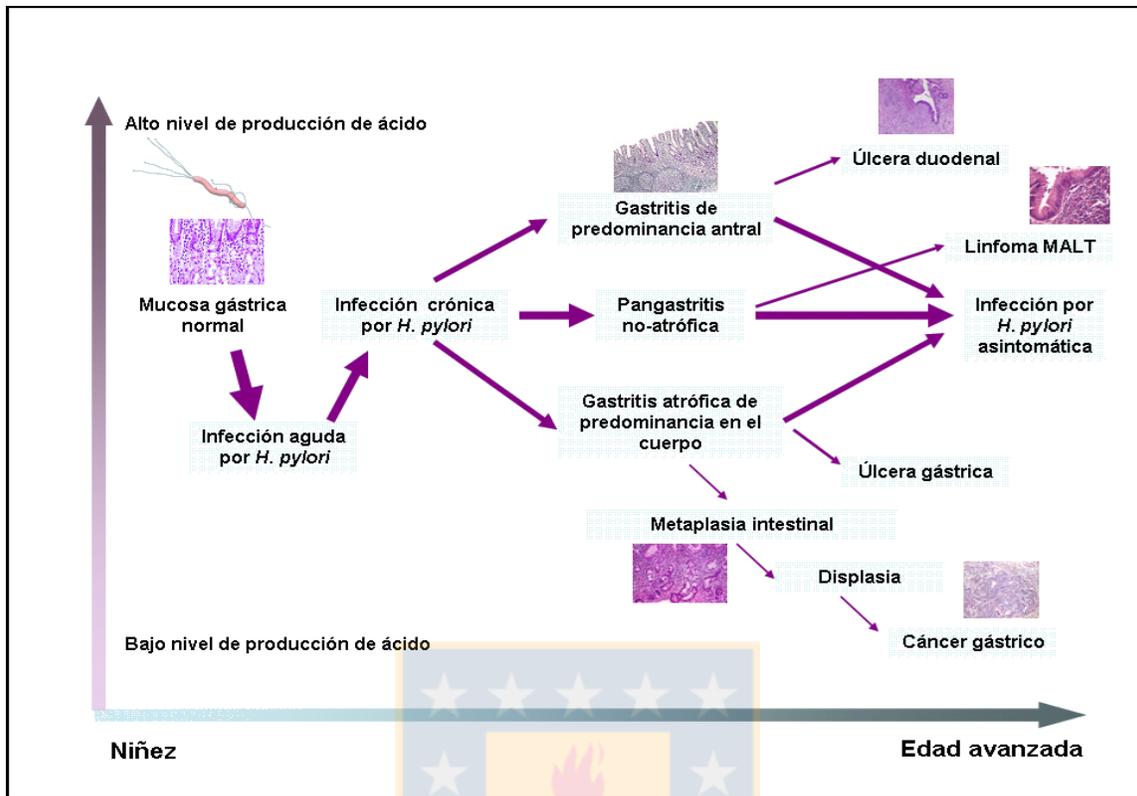


Figura 2. Historia natural de la infección por *H. pylori* (6).

La infección por *H. pylori* también se ha asociado con algunas enfermedades extragástricas, en las que se incluyen diabetes mellitus, reflujo gastroesofágico y trastornos cardiovasculares, respiratorios, ginecológicos (ovario poliquístico y pre-eclampsia), neurológicos (Parkinson idiopático y Alzheimer), de la piel (psoriasis y alopecia), y sanguíneos (anemia ferropénica) (7). Incluso numerosos estudios correlacionan la infección con *H. pylori* con algunas enfermedades autoinmunes como púrpura trombocitopénica idiopática (8).

1.4. Factores de virulencia y promotores de la infección

Entre los factores que modulan la virulencia o supervivencia de *H. pylori* están aquellos que desempeñan un rol para la colonización y permanencia en el epitelio gástrico, como lo son, los flagelos que le dan movilidad al microorganismo permitiéndole penetrar la capa de mucina (9), las enzimas ureasa y anhidrasa carbónica permiten la neutralización del medio ácido del estómago (10), las enzimas catalasa y superóxido dismutasa que previenen la fagocitosis y la muerte de este

microorganismo, y las proteínas de membrana externa, lipopolisacárido y adhesinas (SabA, BabA) (11), que actúan anclando a *H. pylori* al epitelio. Además están los factores de virulencia implicados en el daño tisular provocado por la bacteria, entre estos, las enzimas proteolíticas que degradan la mucina (mucinasas), la fosfatasa A que actúa digiriendo los fosfolípidos en las membranas celulares, la citotoxina vacuolizante (VacA), la isla de patogenicidad (CagA) y la alcohol deshidrogenasa (12).

1.5. Ureasa:

La ureasa es la enzima clave para la infección por *H. pylori* pues es la que le confiere la capacidad de resistir el pH ácido del estómago. La ureasa (urea amidohidrolasa: EC 3.5.1.5) cataliza la hidrólisis de la urea para producir amoníaco y carbamato (13).



Este último compuesto espontáneamente se descompone para formar otra molécula de amoníaco y ácido carbónico.



En soluciones acuosas, el ácido carbónico liberado y las dos moléculas de amoníaco están en equilibrio con sus formas desprotonadas y protonadas, respectivamente. El efecto neto de estas reacciones es un aumento en el pH (14).



El amoníaco generado por la acción de la ureasa puede causar lesiones en el tejido local de la mucosa gastroduodenal, especialmente en las uniones intracelulares. Los niveles de ureasa representan alrededor de un 6% del total de sus proteínas solubles. Se localiza en el citoplasma de la bacteria y en su superficie, aunque esta

última localización puede tratarse de un mecanismo no específico para la exportación de la enzima (15), posee una masa molecular de 600 kDa y está codificada por siete genes denominados *ureA*, *ureB*, *ureC*, *ureD*, *ureE*, *ureF* y *ureG* (16, 17). La estructura cristalina de la ureasa se revela como $[(UreAB)_3]_4$, ensamblaje supramolecular de dos subunidades de componentes, donde cada unidad catalítica UreAB contiene un sitio activo dinuclear que contiene níquel ligado con His134, His136, His246, His272 y Asp360 (18,19). (fig. 3).

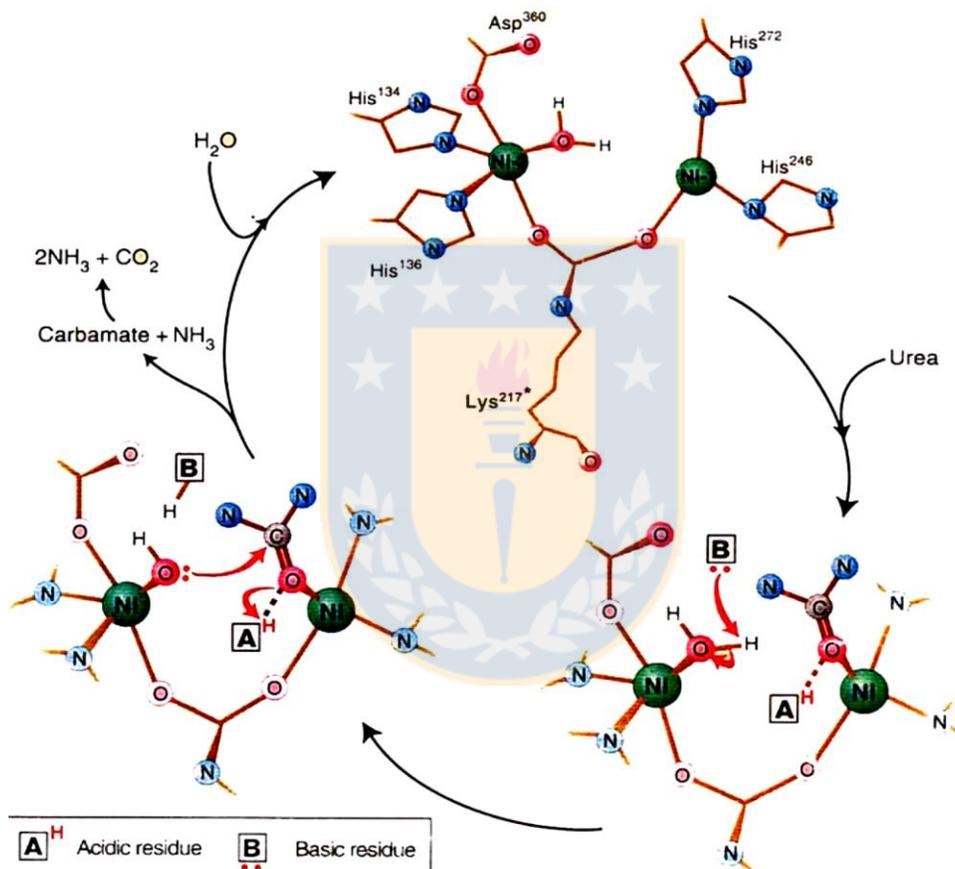


Figura 3. Conformación aminoacídica del sitio de activo enzima ureasa (20).

Además de su papel en la colonización, la ureasa regula las interacciones *H. pylori*-macrófagos. Esta enzima es un quimiotáctico, actúa reclutando a los macrófagos infectados en el estómago y también regula la fagocitosis a través de su capacidad para retardar la opsonización. Aparte de lo anterior esta enzima también se utiliza para la identificación taxonómica, para el diagnóstico y el seguimiento después del

tratamiento (serología), y es un uno de los principales objetivos farmacológicos de las nuevas investigaciones (20, 21).

1.6. Anhidrasa Carbónica:

La anhidrasa Carbonica, (AC) (EC: 2.4.1.1), también conocida como carbonata deshidrogenasa, pertenece a la familia de las metaloenzimas que tienen en su sitio activo un átomo de Zn. (22) Esta enzima se encuentra presente en una gran cantidad de especies incluyendo el humano. La función de esta enzima es catalizar la conversión reversible de dióxido de carbono en agua para producir H⁺ y HCO₃⁻ ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) (23)

El mecanismo de acción de AC se puede separar en dos fases, en la primera un hidroxilo unido al átomo de Zinc del AC reacciona con el carbonilo del CO₂ para formar una molécula de HCO₃⁻ que queda unida al Zinc, el HCO₃⁻ posteriormente es desplazado mediante hidrólisis por un intercambio de enlaces y liberado al medio externo, la segunda etapa, el H⁺ se transfiere al amortiguador externo mediante un transportador para generar la especie catalítica activa, permitiendo al Zinc unirse nuevamente al hidroxilo. (24)

La inhibición de la anhidrasa carbónica tiene aplicaciones en el desarrollo de drogas antiglaucoma, anticonvulsivantes y antitumorales, recientemente se ha descrito su posible aplicación como agentes antifúngicos y antibacteriales. Entre los diversos inhibidores de la anhidrasa carbónica se destacan sulfonamidas, sulfamidas y sulfamatos, utilizados en terapias de patologías del tejido renal, Cardíaco, Hepático, Sistema nervioso central, así como también de los epitelios ocular, oído interno y mucosa nasal. Durante el último tiempo se están investigando compuestos fenólicos que actuarían frente a anhidrasa carbónica de algunas bacterias como *H. pylori*, se cree que estos no se unirían directamente al Zn del sitio activo sino que interactúan con una molécula de agua unida al Zn a través de un enlace puente de hidrógeno (25).

1.8. Diagnóstico de la Infección

Existen diferentes métodos para diagnosticar la infección producida por *H. pylori*. Los métodos pueden diferenciarse según el tipo de muestra que se utiliza, si requieren o no la endoscopia (invasivos o no invasivos) y la forma de detectar el microorganismo (directamente la propia bacteria o de forma indirecta).

Entre los métodos no invasivos están:

- Pruebas en aire espirado (Breath Test) o Test de aliento: Se basa en la capacidad de la ureasa producida por *H. pylori* para hidrolizar una solución ingerida de urea marcada con ^{13}C o ^{14}C y liberar CO_2 . El CO_2 marcado se absorbe, difunde a la sangre, es transportado a los pulmones y de allí excretado a través del aire espirado (33).

- Serología: Consiste en la detección, usualmente mediante ELISA, de anticuerpos como IgG o IgA dirigidas contra varios antígenos específicos del *H. pylori*. Una ventaja de la serología es que no se afecta por el tratamiento reciente con IBP (inhibidor de la bomba de protones) o antibióticos.

Entre los métodos invasivos están (34,35):

- Test rápido de la ureasa: Constituye el método más rápido y práctico para detectar *H. pylori* en pacientes sometidos a endoscopia, se basa en la capacidad del *H. pylori* de producir ureasa. Se realiza con una biopsia del antro gástrico, tomada durante la endoscopia, que se coloca en un tubo con urea y un indicador. Si la muestra contiene ureasa aumenta el pH y cambia el color de la solución.

- Estudio histológico de biopsias antrales. Consiste en la observación de los microorganismos en los cortes histológicos de las biopsias. Informa de los cambios existentes en la mucosa gástrica.

- Cultivo y antibiograma: Como técnica de diagnóstico no tiene un papel tan relevante, debido principalmente a su lentitud, este rol actualmente está cambiando, ya que se recomienda este método después del fallo del primer tratamiento, en las

zonas donde hay una alta tasa de resistencia a claritromicina, y es casi una norma obligada la realización de cultivo y test de susceptibilidad bacteriana (antibiograma) cuando el tratamiento de segunda línea no ha logrado la erradicación. Este método es útil para evaluar la sensibilidad a los antimicrobianos y orientar la terapia, la desventaja principal radica en que ni aun conociendo la sensibilidad bacteriana se alcanza una eficacia del 100% pues no hay total correlación entre la sensibilidad antibiótica *in vitro* e *in vivo*.

•Histopatología: Constituye el *Gold-standard* para definir la presencia o ausencia de *H. pylori*, tiñendo la muestra con Giemsa. Debe tomarse la muestra en mucosa antral sana, evitando la región prepilórica y la parte más baja de la curva menor. Es de utilidad en el diagnóstico inicial.

La elección de la prueba utilizada para el diagnóstico de infección por *H. pylori* dependerá, en la mayoría de los casos, de la información clínica que se busca, de la disponibilidad local y el coste de las pruebas.

1.9. Tratamiento

Como la infección con *H. pylori* alcanza a un alto porcentaje mundial antes de hablar de tratamiento es preciso preguntarse a quién y cómo tratar, según el consenso Maastricht en el cual se dan recomendaciones para el tratamiento de la infección por *H. pylori* (36). Se establece que los pacientes a los cuales es necesario tratar, son aquellos que presenten:

- Enfermedad ulcerosa péptica (activa o no activa incluyendo la complicada).
- Linfoma MALT. (Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma)
- Gastritis atrófica.
- Reciente resección de cáncer gástrico.
- Familiares de primer grado de pacientes con cáncer gástrico.
- Deseo del paciente (después de consultar con su médico).

Para el tratamiento hay varios esquemas principalmente basados en terapias triples que surgen de la combinación de 2 antibióticos más un IBP (inhibidor de la bomba de protones) o subsalicilato bismuto.

Terapia de primera línea:

IBP más amoxicilina y claritromicina/metronidazol, por una duración del tratamiento de dos semanas. Debido a la alta resistencia hacia claritromicina que presenta la población infectada, el consenso Maastricht IV a determinado dos grandes grupos; los que presentan baja resistencia a claritromicina y los que presentan alta resistencia a ésta. Para el primer grupo recomiendan como tratamiento de primera línea IBP más amoxicilina y claritromicina/metronidazol o una terapia cuádruple basada en bismuto. Ésta última combina un IBP con una triple terapia basada en bismuto (subsalicilato de bismuto más metronidazol y tetraciclina). Para el segundo grupo, se indica una terapia cuádruple basada en bismuto y si no es viable esa opción se recomienda una terapia secuencial que consiste en un periodo de 5 días con IBP y amoxicilina, seguido por un periodo de 5 días con IBP, claritromicina y metronidazol (o tinidazol).

Terapia de segunda línea:

Estos tratamientos se utilizan cuando la terapia de primera línea ha fallado, para las zonas de baja resistencia a claritromicina, se indica una terapia cuádruple basada en bismuto, o un IBP, levofloxacino y amoxicilina, para una alta resistencia a claritromicina se usa un IBP, levofloxacino y amoxicilina.

Terapia de tercera línea o de rescate:

Esta terapia debe utilizarse después de dos fallos con diferentes tratamientos, se debe hacer una biopsia gástrica, un cultivo bacteriano y ensayar un test de susceptibilidad, lo recomendable es la utilización de antibióticos no usados anteriormente, pero siempre basarse en estudios de sensibilidad antimicrobiana. El tratamiento empírico de tercera línea o de rescate puede ser:

IBP, amoxicilina y rifabutina o también, IBP, bismuto, tetraciclina y furazolidona.

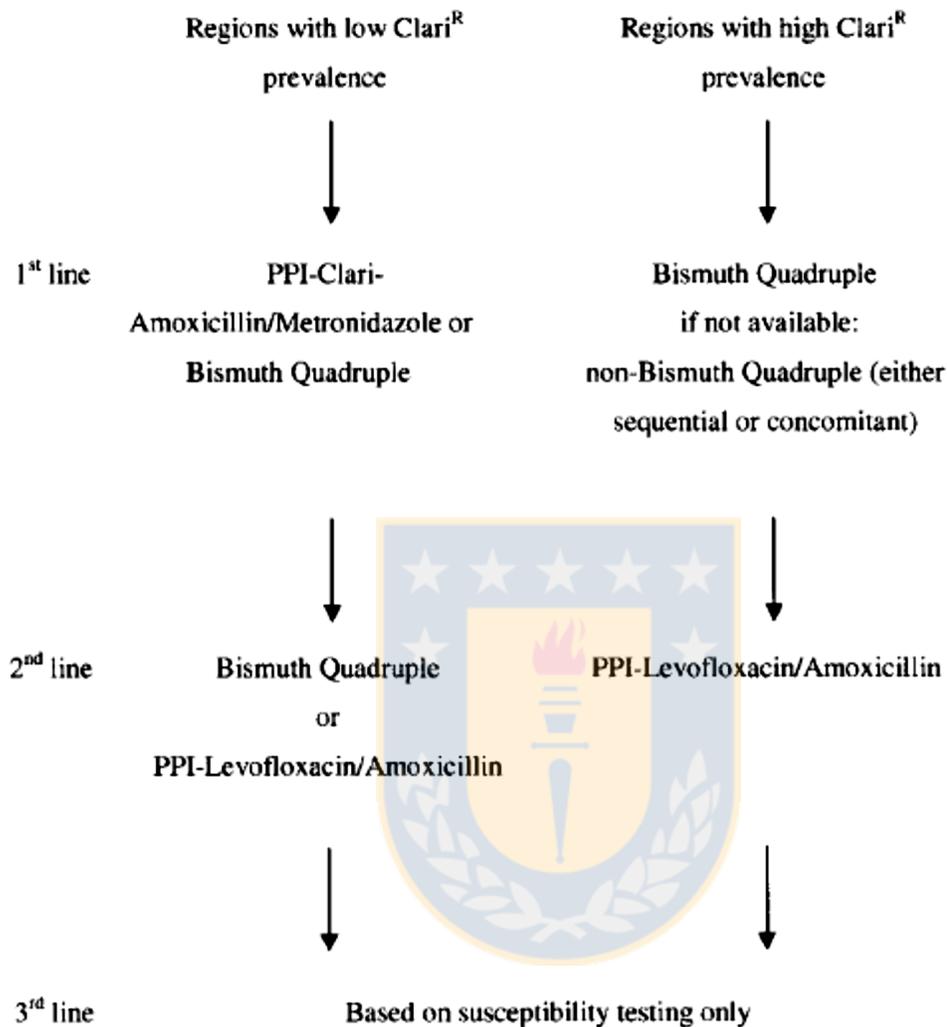


Figura 5. Esquema de tratamiento para infección con *H. pylori* (37).

En la última reunión del consenso Maastricht IV (2012) se llegó a varios acuerdos importantes. La duración del tratamiento es lo que más genera controversia. Se acordó que 14 días de tratamiento eran mejor que 7 días, ya que se aumenta la eficacia en la erradicación en aproximadamente un 14 % y no hay aumentos significativos en los efectos adversos, aunque en algunos países no es conveniente por el alto costo del tratamiento. Se deja en claro que las personas con infección

por *H. pylori* tienen un riesgo significativamente mayor de padecer cáncer gástrico que personas sin esta infección. Más aún, se ha establecido la relación entre infección por *H. pylori* y cáncer gástrico tanto de tipo intestinal como de tipo difuso y está claro que cepas de *H. pylori cagA(+)* aumentan aún más el riesgo de desarrollar cáncer. Diversos estudios han demostrado que la erradicación de *H. pylori* tiene el potencial de disminuir el riesgo de desarrollar cáncer gástrico, evitando la progresión de lesiones precancerosas (gastritis atrófica y metaplasia intestinal), favoreciendo su regresión o al menos disminuyendo la progresión, por lo que el tratamiento erradicador debe administrarse preferiblemente antes de la aparición de estas lesiones precancerosas (38).

Las principales causas del fracaso del tratamiento inicial son resistencia a los antibióticos y poco cumplimiento del paciente, ya sea por lo complicado que resulta ingerir una gran cantidad de medicamentos por un largo periodo de tiempo, o por el alto costo que resulta en algunos casos adquirir la terapia. Es así como se están estudiando nuevos tratamientos antibióticos para las cepas resistentes e incluso varias empresas buscan la posibilidad de una vacuna terapéutica contra *H. pylori*.

El cada vez más acabado conocimiento sobre la colonización, virulencia y supervivencia de *H. pylori*, así como del daño provocado por éste en el organismo ha llevado a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas más eficaces y seguras.

Una de las nuevas posibilidades de tratamiento que se menciona en el consenso Maastricht dice relación con los probióticos. Estos microorganismos pueden ayudar a prevenir y/o tratar la infección por *H. pylori*, ya sea, impidiendo la ocupación de sitios específicos, produciendo sustancias antagónicas o modulando la respuesta inmune, además de disminuir los efectos adversos por el uso de antibióticos, especialmente las diarreas (39,49). Otra estrategia ha consistido en desarrollar anticuerpos monoclonales contra la ureasa de *H. pylori*, (41,42).

Sin embargo, la mayoría de los compuestos estudiados posee elevada toxicidad, alto costo, no sirven para la prevención de la infección, no inhiben el crecimiento *in vivo* de *H. pylori*, o aún no han demostrado eficacia clínica.

2. Productos Naturales con efecto anti-*H. pylori*

2.1 Polifenoles como modelos para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos:

Los preparados naturales pueden constituir una importante herramienta de intervención (no necesariamente farmacológica) en dirección a reducir el riesgo asociado a la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica (43). Éstos pueden ser susceptibles de ser consumidos en forma directa, bajo la forma de nutracéuticos, o bien en forma indirecta, tras su incorporación a determinadas matrices alimentarias. Diversos antecedentes indican que algunos alimentos y productos naturales podrían actuar eficazmente frente a *H. pylori*, ya sea directamente sobre la bacteria o como preventivos de la infección. La composición química de éstos apunta a estructuras tan diversas como alcaloides, terpenos, quinonas y polifenoles (44). Algunos de los productos naturales que se han estudiado frente a *H. pylori* o frente a sus complicaciones en el organismo son los extractos de semilla de *Vitis vinifera*, los que por acción de sus procianidinas poliméricas (fracción de alto PM) tienen un efecto antiulcerogénico (45). *Nostro y colaboradores (2006)* evaluaron *in vitro*, una combinación de claritromicina con extractos de propóleo o *Zingiber officinale* (Jengibre), observando un efecto sinérgico sobre la actividad anti-*H. pylori* del antibiótico (46). *Siddaraju y Dharmesh (2007)* comprobaron que los extractos polifenólicos de *Zingiber officinale* poseen un potente efecto inhibitorio del crecimiento de *H. pylori* y la actividad de la ATPasa, H⁺/ K⁺ aislada de estómagos de oveja (47). En otro estudio *in vitro*, *Lin y colaboradores (2005)*, reportaron que la combinación de cranberry y orégano posee un efecto antimicrobiano y anti-ureasa de naturaleza sinérgica (48). *Pastene y colaboradores (2009)* evidenciaron que los extractos de cáscara de manzana ricos en polifenoles eran capaces de inhibir la ureasa de *H. pylori* (49), efecto más tarde demostrado *in vivo* usando un modelo de infección aguda en ratones C57BL/6. El mismo efecto se observó para los extractos ricos en procianidinas de cáscara de palta (*Persea americana* var. Hass) por *Chávez y colaboradores (2011)* (50). Durante la realización del trabajo de fin de carrera

(Química y Farmacia) de Víctor Parada se encontró que las procianidinas (PACs) de *Peumus boldus* eran las responsables de los efectos inhibitorios de la ureasa y adhesión de *H. pylori*. En dicho estudio se descartó a otros compuestos como los alcaloides (boldina) y aceite esencial (ascaridol). Por otro lado se determinó que las PACs de boldo eran más potentes que sus homólogos extraídos de otras fuentes naturales como las cáscaras de manzana y palta. Al investigar el origen de este hallazgo se encontró que no había diferencia entre las PACs extraídas de diferentes fuentes por lo que se pensó que el grado de polimerización (DPM), debería ser el origen de la diferencia. Sin embargo, aún comparando muestras de PACs con igual DPM, los efectos anti-ureasa del Boldo resultaron superiores. Así, se elaboró una nueva hipótesis, la cual sostenía que el tipo de monómero parece ser clave en los efectos anti-ureasa y anti-adherentes de las PACs. Para investigar esta propiedad (grado de polimerización y la naturaleza del monómero), en el proyecto Fondecyt 11110442 se depolimerizó PACs de diferentes fuentes utilizando diversos agentes nucleofílicos como floroglucinol, pirogalol, cisteamina, etc. Los productos de depolimerización fueron aislados y ensayados sobre la ureasa de *H. pylori* encontrándose que éstos fueron inactivos. Estos hallazgos promovieron la realización de estudios más detallados de la composición de las PACs de Boldo, resultados que serán presentados en esta tesis.

Por otro lado, y tal cómo se mencionó anteriormente, la identificación de la AC como un blanco molecular emergente y de gran interés farmacológico para el desarrollo de nuevos antimicrobianos, motivó que en el laboratorio de Farmacognosia se empezara a pesquisar inhibidores de ella. Así, cuando preliminarmente se investigó el efecto de los aductos que resultaron inactivos sobre la ureasa de *H. pylori* en la AC humana, se encontró que en ciertos casos la podían inhibir en forma apreciable. Dicho hallazgo fue la base para la adjudicación del proyecto Fondecyt Regular 1150948 (2015-2017) y la elaboración de la presente propuesta de tesis de Magister en Ciencias Farmacéuticas.

2.2. *Cumarinas como modelos para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos:*

Las cumarinas son un grupo de metabolitos secundarios que se distribuye ampliamente en el reino vegetal (51). Pertenecen a la familia de las benzopirona y están conformados por un anillo de benceno unido a un anillo de pirona, los cuales derivan desde la vía del ácido cinámico. Este grupo se considera como uno de los inhibidores de mayor interés, por ser únicos en su mecanismo de acción, ya que se unen a la enzima en la forma del producto de su hidrólisis. Estos no coordinan directamente con el ión zinc, si no que interactúan con la entrada de la cavidad del sitio activo (52). Este mecanismo de acción se evidenció por primer vez por Maresca et al., (2009), ellos demostraron el tipo de interacción que se generaba con esta molécula. Primero las cumarinas se unen en el sitio activo y se someten a hidrólisis debido a la actividad esterasa de la enzima, obteniendo *cis*-2-hidroxi-ácido cinámico, y luego este producto se reorienta y se une por la superficie de la entrada de la cavidad a través de interacciones polares y puentes de hidrógeno, formando un impedimento estérico y bloqueando la entrada del sustrato. Es producto a esta transformación química, que a las cumarinas se les consideran compuestos de tipo suicida (53,54).

Esto es altamente atractivo debido a que estos compuestos se unen a una región única en relación a otros tipos de compuestos, son capaces de inhibir en rangos nanomolares y, además, como aspecto más notable, es que esta es la región de unión más variable entre las diferentes isoformas de la AC por presentar regiones únicas. Esto tiene consecuencias importantes para el diseño de fármacos que sean capaces de inhibir la AC, ya que los compuestos deben, en principio, interactuar de manera diferente con las distintas entidades. Por otra parte, se ha demostrado que la selectividad y especificidad hacia las distintas isoformas mejora con la adición de sustituyentes químicos a la cumarina. Touisni et al., (2011) (55). incorporaron diversos grupos glicosilo en el sustituyente 7 de las cumarinas y demostraron que estos grupos eran selectivos para hAC IX y XII asociadas a tumores inhibiendo en rangos nanomolares. También Sharma et al., (2014) (56) incorporaron restos de los grupos metilo e hidroxilo en el anillo heterocíclico de las cumarinas, mostrando una

inhibición eficaz a isoformas hAC IX asociada a tumores, al igual que en Nocentini et al., (2015) (57), no así con las hAC I y II. Esto sugiere que es necesario realizar estudios que permitan incorporar distintos motivos a esta estructura, para mejorar la unión específica hacia las distintas ACs. Por otra parte, se ha documentado estudios previos que demuestran el potencial de las cumarinas sobre *H. pylori*. Basile et al., (2009) (58) informó de que aegelinol y su derivado presentaban actividad anti- *H. pylori* con rangos 5-25 $\mu\text{g/mL}$ de inhibición sobre la bacteria. Al igual que Kawase et al., (2003) y Jadhav et al., (2013) (59,60), informaron que la actividad anti- *H. pylori* de 23 y 24 derivados sintéticos de la cumarina, respectivamente, inhibían a la bacteria con rangos de 10 a $> 100 \mu\text{g/mL}$. Además, estos autores concluyen que las cumarinas que incorporan grupos hidroxilos y metilo son dominios esenciales para mostrar una mayor actividad anti- *H. pylori*. Por lo tanto, en vista de que no se ha documentado la actividad de las cumarinas sobre la AC de este patógeno, esto sugiere fuertemente que pueden considerarse como moléculas líderes para el diseño y desarrollo de nuevas estructuras para su inhibición (61). Por lo cual, dentro de las distintas cumarinas que se han caracterizado, 4-hidroxycumarinas es un buen templado para generar nuevos derivados, aún sin explorar. Estos guardan un gran potencial debido a que es un tipo de cumarina sustituidas en el anillo de pirona en la posición 4 con un grupo hidroxilo (62) por lo que presenta un alta potencial sobre *H. pylori*. Además, el grupo 4-hidroxi le confiere propiedades únicas a la molécula como la solubilidad. Las 4-hidroxycumarinas además, representan hoy en día, un importante precursor en el campo de la síntesis orgánica. El interés en que se ha amplificado, ya que, son puntos finales sintéticos significativos (63,64) (Ziarani & Hajiabbasi, 2013; Siddiqui, 2014) y constituyen el núcleo estructural de muchos productos naturales (65,66,67).

3. Propuesta de investigación:

En base a los antecedentes presentados anteriormente en el proyecto se plantea:

- 1) Usar la combinación de inhibidores de ureasa (PACs) y de anhidrasa carbónica (fenoles semi-sintéticos) para lograr una inhibición más efectiva de la infección por *H. pylori*.
- 2) Producir nuevos inhibidores de CA basados en esqueletos de polifenoles conocidos (cumarinas).

Esta tesis se buscará comprobar los resultados preliminares obtenidos con PACs de boldo usando técnicas más específicas (LC-MS, microscopia de fluorescencia, adhesión). Posteriormente se evaluará una serie de aductos semi-sintéticos sobre la AC con el fin de establecer si la introducción de anillos fenólicos adicionales en C-4 tiene una consecuencia en dicha propiedad. Finalmente, dado que las cumarinas aparecen sindicadas en literatura dentro de los inhibidores naturales más potentes de CA, se evaluará el efecto inhibitorio sobre la ureasa y AC de una colección de ellas sintetizadas en conjunto con el laboratorio de productos naturales de la Universidad del Bio Bio (Chillán).

II. HIPÓTESIS

Dado que la actividad de las enzimas ureasa y anhidrasa carbónica son esenciales para la colonización y supervivencia del *H. pylori* en el ambiente gástrico se postula que las procianidinas naturales (formadas por catequina) en combinación con derivados de ellas inhiben ambas enzimas en *H. pylori* limitando su capacidad de infectar y de persistir en un modelo celular (AGS).



III. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la inhibición dual de las enzimas ureasa y anhidrasa carbónica como estrategia para limitar la capacidad infectiva de *H. pylori*.

Objetivos Específicos

1. Desarrollar y optimizar procesos de separación y purificación de procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos mediante cromatografía preparativa en columna (HPLC) y de partición por centrifugación (CPC).
2. Caracterizar los compuestos aislados mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas (RP-HPLC-MS/MS).
3. Determinar las propiedades inhibitorias in vitro de la ureasa y anhidrasa carbónica para los productos aislados y productos sintéticos.
4. Evaluar la actividad anti-*H. pylori*, de los compuestos más activos en cultivos de células AGS y evaluar efecto sobre el componente inflamatorio mediante ensayos ELISA (IL-8).

IV. METODOLOGÍA

1. Obtención, refinamiento y purificación de extractos vegetales:

La obtención del extracto vegetal (Boldo) se realizó mediante el uso de mezclas hidroalcohólicas. Este tipo de extracción posee algunas ventajas, por ejemplo, en ciertos casos los solventes representan un impacto negativo sobre el medioambiente y/o limitan la aplicación final del producto, toda vez que se debe garantizar la ausencia de residuos de aquellos que no son aceptados como sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe = Aceptados Generalmente Como Seguros). En este caso el alcohol si es considerado como GRAS. Posterior a la extracción, se incorporó un proceso de clarificación para remover restos celulares o compuestos no deseados de los extractos. Para ello, el extracto fue filtrado y centrifugado para luego ser aplicado directamente en columnas rellenas con resinas macroporosas reciclables de estireno divinil-benzeno como Amberlite XAD-7 y Sepabeads SP-850. Esta estrategia fue usada para retener todos los compuestos de interés y eliminar gran parte de los azúcares, sales y material proteico. Luego las columnas fueron lavadas profusamente con agua. Posteriormente, se recuperaron los compuestos eluyéndolos con etanol absoluto. La fracción etanólica se concentró a presión reducida y luego fue secada mediante liofilización (49,68).

2. Caracterización polifenoles del extracto de Boldo

Para comprobar que el extracto de boldo obtenido estaba enriquecido en compuestos fenólicos, se utilizó RP-HPLC-UV bajo las siguientes condiciones (68):

Fase móvil (FM) compuesta por: FM A: agua y 0.1% TFA. FM B: acetonitrilo y 0.1% TFA.

Programa de gradiente: de 0 a 25 min. FM B de 10 a 30%; de 25 a 30 min. FM B de 30 a 75%; de 30 a 35 min. FM B de 75 a 10%, para terminar con 5 min. De FM B 10%.

Flujo: 1mL/min.

Detector: UV-Visible ajustado a 280 y 355nm. Esta detección dual permite diferenciar entre flavonoides que presentan una banda de absorción a 280 y otra a 355nm, de las procianidinas que presentan una banda de absorción solo a 280nm.

Además, se realizó HILIC-HPLC-UV para determinación de distribución oligomérica de los polifenoles presentes en el extracto de Boldo (49). Se Utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas:

Columna: Lichospher ®100 Diol, tamaño partícula 5µm; largo 25cm, diámetro: 4mm.

Fase móvil: FM A: acetonitrilo : ácido acético 98: 2 v/v. FM B: metanol: agua: ácido acético 95: 3: 2 v/v.

Programa de gradientes: 0–35 min, 0–40% FM B; 35–55 min, isocrático 40% FM B; 55–60 min, 40–0% FM B; con un periodo de 5 min para re-acondicionamiento de la columna.

Flujo: 0.6 mL/min.

Detector: UV-Visible ajustado a 280 y 355nm.

La asignación del grado de polimerización de los picos se realizó tentativamente mediante comparación con datos de literatura y muestras de procianidinas de manzana purificadas en el laboratorio de Farmacognosia.

3. Obtención y refinamiento de compuestos naturales y semisintéticos:

La purificación de procianidinas B3 y C1 de Boldo se llevó a cabo desde fracciones de boldo ricas en PACs (500 mg) usando columna preparativa de Toyopearl HW40F (2 x 40 cm) y como eluyente 80% etanol. La identidad de estos compuestos se confirmó mediante HPLC-ESI-MS y floroglucinólisis.

Para la semi-síntesis de los aductos, el extracto de Boldo enriquecido en procianidinas obtenido en el punto anterior fue sometido al ataque nucleofílico en medio ácido usando diferentes reactivos (resorcinol, floroglucinol y pirogalol),

mediante la siguiente metodología: un gramo de extracto de Boldo se solubilizó en 125mL de Metanol, se le adicionó 3,5 g de resorcinol o floroglucinol o pirogalol, 2,8 g Vitamina C y 5 mL HCl concentrado (37%). Esta mezcla fue incubada a baño María a 35°C durante 30 minutos, luego de este tiempo la reacción se detuvo mediante la adición de 70 mL de acetato de sodio 40 mM, la mezcla se llevó a rotavapor para eliminar el etanol, los compuestos obtenidos fueron redispersados con agua, y llevados a una columna de amberlita XAD-7 en la que se eliminó el exceso de HCl, las sales y compuestos no deseados mediante el paso de abundante agua hasta neutralidad del eluato. Luego los polifenoles semi-sintéticos fueron eluidos con acetona y concentrados en rotavapor (49,68). El extracto acuoso purificado se almacenó a -20°C hasta su empleo para CPC, técnica que se utilizó para purificar todos los aductos.

4. Caracterización de compuestos semisintéticos (aductos) mediante RP-HPLC-UV (49).

Para evidenciar la formación de aductos se utilizó un sistema cromatográfico similar al descrito en la caracterización de los polifenoles. Como estándar se utilizó catequina y epicatequina (SIGMA-ALDRICH).

5. Purificación de compuestos semi-sintéticos:

Para purificar y aislar los compuestos semisintéticos (aductos) se utilizó un sistema de separación en contra-corriente de alta velocidad, específicamente un aparato de cromatografía de partición por centrifugación (CPC, Figura 6). Estos sistemas en comparación con la cromatografía HPLC preparativa no utilizan columna cromatográfica, minimizan el consumo de solventes (se recuperan en su totalidad) y sirven para procesar una mayor cantidad de compuestos. El primer paso para realizar una cromatografía en contracorriente fue determinar la mejor mezcla de solventes y el mejor sistema para poder separar y purificar los compuestos, para ello se estudió las referencias bibliográficas y se probaron varios métodos, para

optar finalmente por un sistema Arizona C, pero con uso de hexano en remplazo de heptano (69, 70).

El sistema cromatográfico utilizado fue el sistema Arizona C con algunas modificaciones:

Arizona	Hexano	Acetato de Etilo	Metanol	Agua
C	1	9	1	9

El programa de elución fue el siguiente:

Desde el tiempo 0 a los 12 minutos se cargó la fase inferior acuosa (lower) con el rotor a una velocidad de 500 rpm y un flujo de 30mL/min, luego se introdujo la fase superior orgánica (upper) desde los 12 minutos hasta los 35 minutos a 1800rpm a 6 ml/min. Pasado este tiempo de equilibrado se realizó una inyección de los aductos (1-2 g) dispersos en una mezcla de ambas fases y se eluyó con un caudal de 6mL/min durante una hora y media. Finalmente se realizó una extrusión de la fase inferior (material retenido altamente polar) durante 15min con un flujo de 30mL/min y 1000rpm. Para evidenciar la salida de los compuestos se ajustó el detector a una longitud de onda 280 y 350nm y se recolectaron las fracciones mediante un sistema automatizado en tubos de ensayo de 32mL. Las fracciones fueron analizadas por TLC, reunidas por similitud, concentradas en un rotavapor y finalmente secadas en un liofilizador.



Figura 6: Sistema preparativo CPC usado para la purificación de los aductos de procianidnas de boldo sinterizados en esta trabajo

6. Caracterización compuestos semisinteticos aislados mediante HPLC-DAD-MS/MS

El extracto y los aductos fueron analizados mediante HPLC-DAD-ESI-MS en un sistema Nexera UHPLC System (Shimadzu, Japan) acoplado a un 3200 QTRAP Mass spectrometer (ABSCIEX, USA, MA). La separación se llevó a cabo en una columna core-shell C18 (Kinetex 150×4.6 mm, 2.6 μ m) con una precolumna UHPLC C18 (4.6 mm, 2.6 μ m) (Phenomenex, USA, CA). Las fases móviles fueron ácido fórmico 0.1% en agua (A) y acetonitrilo (B), con un flujo de 0.5 mL/min. El gradiente de la fase móvil B fue desde 15 a 20% en 1.5 min, luego en forma isocrática a 20% por 5.5 min, desde 20 a 50 en 6 min, y 100% por 3 min seguido por estabilización

por 6 min a 15% B. La detección MS/MS de los compuestos fenólicos se llevó a cabo en las siguientes condiciones optimizadas previamente: electrospray negative ionization mode, -5 V de energía de colisión, -4000 V de voltaje de ionización, y temperatura del capilar a 450 °C. Se usó nitrógeno como gas de nebulización (40 psi) y de secado (50 psi).

7. Síntesis y caracterización de las cumarinas

Para la síntesis de varios tipos de cumarinas se hizo reaccionar sustratos fenólicos con etil-acetoacetona bajo irradiación con micro-ondas (400 W) en presencia ácido p-tolensulfónico como agente catalizador en condiciones libres de solvente. En una típico reacción el sustrato fenólico y el β -cetoester (1:2 relación molar) fueron mezclados junto con el catalizador activado en el vaso de teflón de 100 mL del reactor del micro-ondas a diferentes temperaturas desde 110 a 150°C por 5 a 20 min. Después que la mezcla de reacción caliente fue enfriada el producto fue cristalizado. El producto cristalizado fue filtrado y lavado con éter de petróleo para remover el exceso de reactivos. Posteriormente el producto fue secado y cristalizado lentamente desde una mezcla etanol-agua. Los productos fueron caracterizados por su punto de fusión, FT-IR, NMR y MS. el rendimiento de las cumarinas fue obtenidos de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento (W.\%)} = (\text{peso obtenido de producto/peso teórico de producto}) \times 100$$

8. Cultivos *Helicobacter pylori* y extracción de Ureasa.

Los cultivos de *H. pylori* se realizaron con la cepas ATCC 43504; El medio utilizado fue agar Columbia suplementado con DENT y sangre de caballo al 5%. Las placas fueron incubadas durante 4-5 días a 37° C en condiciones de microaerofilia (10% de CO₂, 5% de O₂, y el 80% de N₂). La ureasa se extrajo de suspensiones bacterianas obtenidas de colonias desarrolladas en las placas anteriormente mencionadas. Se lisaron las bacterias mediante varios ciclos de congelamiento/descongelamiento (7 ciclos) y aplicación de ultrasonido (60 s), luego estos lisados fueron centrifugados y separado el sobrenadante. Los sobrenadantes fueron

colectados y la ureasa presente en estos fue precipitada mediante el proceso *salting out* con sulfato de amonio al 60%, el precipitado fue recuperado mediante centrifugación y resuspendido en un volumen de agua de alrededor de 4 mL y posteriormente la solución de ureasa fue desalada mediante una columna de Sephadex G-25 (2 x 15 cm). Para estabilizar la ureasa se agregó un volumen igual de glicerol y se almacenó a -20°C (49, 68).

9. Actividad Antiureasa

Para estudiar el efecto inhibitor de la ureasa de los compuestos del extracto de Boldo, los aductos y las cumarinas sintéticas se utilizó como control una ureasa vegetal (Jack bean).

Preparación sustrato: se preparó una solución stock de sustrato para poder realizar los ensayos de inhibición de ureasa. Este se hizo según el método de *Tanaka et al* (2004) con algunas modificaciones (71). La solución consistió en una mezcla de tampón fosfato 100 mM a pH 6,8, urea 150 mM y rojo fenol al 0.002%.

Prueba inhibición ureasa de *Jack bean*: se utilizó ureasa de *Canavalia ensiformis* (*Jack bean*) (Sigma-Aldrich). En una cubeta de plástico de 1 mL se adicionó 30 µL de ureasa (4 U), 60 µL de extracto/aducto/cumarina (inhibidor), se incubó durante 30 minutos y posteriormente se agregó a la cubeta y 500 µL del sustrato anteriormente preparado. Se evaluó en primer de forma cualitativa estudiando el cambio de color de la solución de traslucido y levemente amarillo a rosado intenso, los compuestos que presentaron mayor inhibición se probaron en placas de 96 pocillos a las mismas proporciones de las cubetas y a distintas concentraciones, se siguió la cinética de inhibición mediante un lector de placas ajustado a 570nm, finalmente se determinó el IC₅₀ (concentración a la cual el 50% de la enzima se encuentra inhibida)

Prueba inhibición ureasa de *Helicobacter pylori*: estos ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. Se adicionó 25 µL de ureasa de *H. pylori* (4 U), 50 µL de extracto o compuesto (inhibidor), se incubó por un periodo de tiempo de 30 min, posteriormente se agregó el sustrato. Las lecturas se realizaron en un lector de

placas ajustado a 570 nm. Los resultados fueron graficados según sus porcentajes de inhibición y se calculó el IC₅₀ para cada compuesto (68,71,72, 73).

10. Determinación Actividad inhibitoria de Anhidrasa Carbónica.

Para estudiar la potencial actividad inhibitoria de los compuestos frente a anhidrasa carbónica de *H. pylori* se utilizó una anhidrasa comercial (Carbonic Anhydrase II, human recombinant, expressed in *Escherichia coli*) (Sigma- Aldrich).

Se determinó el poder inhibitorio de las procianidinas, los productos de semi síntesis (aductos) y las cumarinas sintéticas a través de la medición en la variación de la absorbancia producida por el cambio de color producto de la acción de anhidrasa carbonica frente a p-nitrofenilacetato (translucido en solución), provocando un cambio a color amarillo, producto de a la formación de p-nitrofenol. La cinética de esta reacción se siguió midiendo los cambios en la absorbancia a una longitud de onda de 348nm. (Protocolo sigma para medir actividad de CA)

Fundamento:



Para poder realizar las mediciones se utilizaron los siguientes reactivos:

Solución A: Tampón Tris ajustado con H₂SO₄ a pH 7,6. (2,423 g de Tris base para 100 mL). Solución B: PNPA (p-nitrofenilacetato). (13,6mg de PNPA en 1mL de Acetona y 24 de Agua). Solución C: CA disuelta en Solución A. (315 U/mL de CA, 0,9 mg en 10 mL de CA 3500unid/g).

Se realizaron pruebas cualitativas en tubos de ensayo con volúmenes de 2mL.

Ensayo	Sol A (mL)	Sol B (mL)	Sol C (mL)	Compuesto. (mL)
Blanco	2,0	1,0	--	--
Control	1,9	1,0	0,1	--
Test	1,4	1,0	0,1	0,5

Se probó el extracto de Boldo enriquecido en procianidinas, los aductos y las cumarinas de forma cualitativa, con aquellos que se evidencio efecto inhibitorio significativo se probaron en placas de 96 pocillos en proporciones equivalentes a las probadas en 2mL y en distintas concentraciones. Se siguió la cinética de inhibición mediante espectrofotometría en un lector de multiplacas ajustado a 348nm.

11. Ensayo para determinar propiedades Anti-Adherencia de *Helicobacter pylori* en células de adenocarcinoma gástrico (AGS). (68)

Protocolo 1:

Las células de adenocarcinoma gástrico (AGS) fueron cultivadas en frascos de cultivo T-75 con filtro, con medio RPMI 1640, con un 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, en condiciones de microaerofilia con un 5% de CO₂ y 37°C, el medio se cambió cada dos días. Se dejó crecer las células hasta confluencia de las de aproximadamente 90%, luego las células fueron lavadas dos veces con PBS y se despegaron con tripsina, se contaron las células y se traspasaron a placas de 24 pocillos a una concentración de 0,4x10⁶ células por

pocillo, estas placas fueron cultivadas según las condiciones anteriores por 24 horas y luego se prosiguió de la siguiente forma:

Tratamiento: se incubó por una hora las células AGS contenidas en las placas de 24 pocillos con 188µL de extracto/aducto/cumarina a distintas concentraciones. Luego se les retiró el medio y se agregó 68 µL de una suspensión bacteriana de concentración igual a Mc Farland N° 4 (1.2×10^9 ufc/mL) y 0,5mL de medio de cultivo sin antibiótico, las placas fueron cultivadas por dos horas, luego se les retiró el medio y se lavó 3 veces con PBS.

Luego de eliminado el medio y lavado de las células, a cada pocillo se les agregó 0,75mL de sustrato que contenía 300 mM de Urea y 0,03 % de rojo fenol como indicador, ajustado a pH 6,8 con tampón fosfato, las placas fueron cultivadas por dos horas a 37° C para ser medidas en un lector de placas a 570 nm. Finalmente se calculó el porcentaje de adherencia de *H. pylori* de las células AGS a distintas concentraciones y se graficaron estos resultados.

Protocolo 2:

Las células de adenocarcinoma gástrico (AGS) se cultivaron según las condiciones nombradas anteriormente. Para el marcaje *H. pylori* cepa ATCC 43504 se preparó una suspensión bacteriana con un asa plástica a Mc Farland N° 2 (6×10^8 ufc/mL) en 1ml de buffer bicarbonato de sodio (NaHCO_3) pH 9, se agregara 10 ul de FITC (10mg/ml DMSO), la mezcla se incubó 1 h. Posteriormente la preparación se centrifuga a 10,000 g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó 2 veces con PBS 1X, finalmente *H. pylori*-FITC se resuspendió en medio RPMI sin antibiótico para el ensayo. Se prepararon diferentes concentraciones de los extractos y compuestos en eppendorf, 20 ul de estas soluciones fueron agregados a las células AGS contenidas en las placas de 96 pocillos (previo a la eliminación del medio de cultivo) y se agregaron 100 uL de la suspensión bacteriana *H. pylori*-FITC. Las placas fueron cultivadas por tres horas y luego se lavaron tres veces con PBS (68). Se agregaron 100 ul del PBS y el resultado se observó en microscopio invertido de fluorescencia Filtro excitación 502-547nm y Filtro emisión 565-625 nm.

12. Determinación del efecto sobre el componente inflamatorio mediante medición de la inhibición de IL-8 mediante un kit ELISA

Para determinar la capacidad de inhibir el componente inflamatorio se utilizó un kit ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) que está diseñado para cuantificar la cantidad de Interleuquina 8 (IL-8), este tipo kit se conoce como sándwich de 4 cuerpos ya que está compuesto por: Antígeno-Anticuerpo-Enzima-Cromógeno.

Las mediciones se realizaron al sobrenadante de cultivos celulares (AGS) tratados con extracto de Boldo/aducto/cumarinas sintéticas y luego infectados con *H. pylori*, se utilizó la siguiente metodología:

Se utilizó una placa de 96 pocillos y sobre cada uno de estos se agregó:

50uL de estándar/control/muestras (extracto/aducto/cumarina) + 50 uL de anticuerpo monoclonal biotinizado, se incubó por 90 minutos a temperatura ambiente y se lavó 4 veces, luego se agregó 100uL de enzima Streptavidin-HRP, se incubó por 30 minutos y se lavó 4 veces, después se agregó 100uL de cromógeno estabilizado y se incubó por 30 minutos más, finalmente se adicionó 100uL de solución stop, se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y protegido de la luz y se midió en un lector de placas a 450nm

V. RESULTADOS

1. Caracterización polifenoles del extracto acuoso de Boldo

En la figura 5 se puede observar el perfil cromatográfico de los polifenoles del extracto de Boldo enriquecido en PACs después de su paso por columnas de Amberlite XAD-7 o Sepabedas SP-850, en donde se ve que está compuesto mayoritariamente por procianidinas (señal negra) y por flavonoides (señal roja).

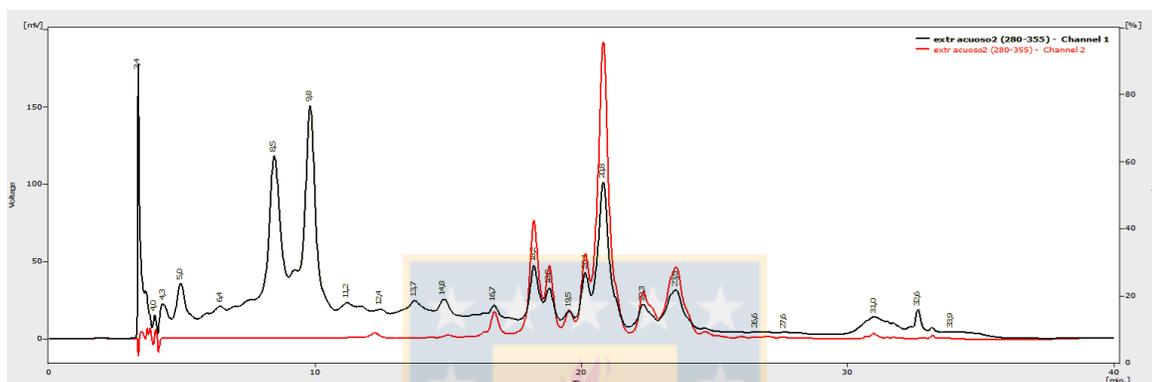


Figura 7. RP-HPLC-UV para la identificación de polifenoles en el Extracto acuoso. Señal color Negro: 280nm. Rojo 355nm.

Mediante HPLC en fase diol se estableció la distribución oligomérica de los polifenoles presentes en el extracto de Boldo (fig. 6).

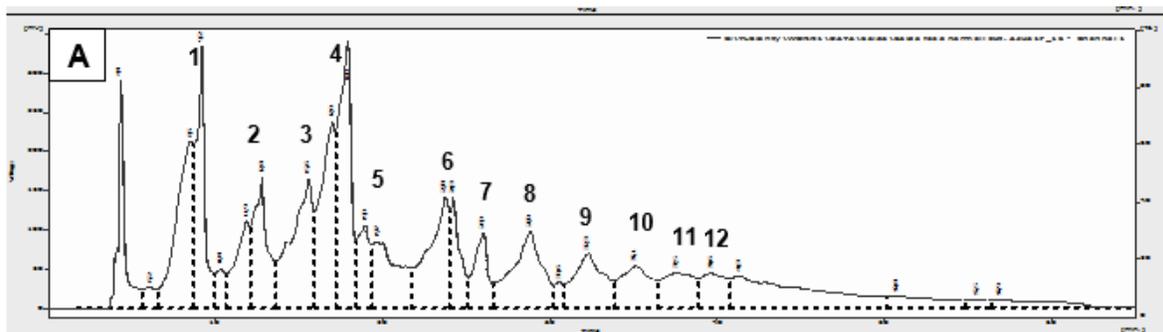


Figura 8. HILIC-HPLC-UV para la determinación oligomérica de Procianidinas del extracto de Boldo. Los números sobre los peaks indican el grado de polimerización de las procianidinas de cada cluster, por ejemplo, 1: monómeros, 2: dímeros, 3: trímeros.

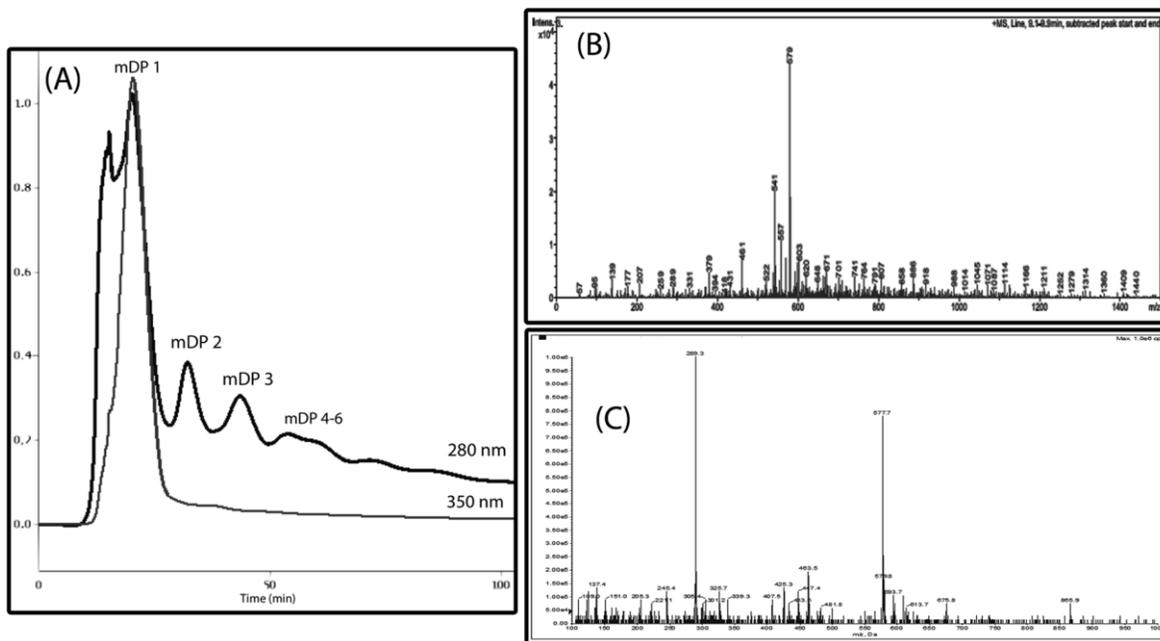


Figura 9. Purificación y caracterización de procianidinas B3 y C1 de Boldo. (A) fraccionamiento del extracto de boldo mediante columna de Toyopearl HW40F. (B) Espectro de masas en modo positivo para la procianidina B3 aislada de Boldo. (C) Espectro de masas en modo negativo de procianidinas C2 aislada desde Boldo.

2. Caracterización compuestos semisintéticos

Mediante ataque nucleofílico, se degradó las procianidinas contenidas en el extracto de Boldo. El análisis mediante RP-HPLC de las soluciones resultantes luego del ataque nucleofílico demuestra la formación de los compuestos semisintéticos, mezcla de catequina-nucleofilo, como por ejemplo lo que se ve en la figura 7, donde se observa la presencia del compuesto semisintético (aducto) catequina-floroglucinol (peak N° 2).

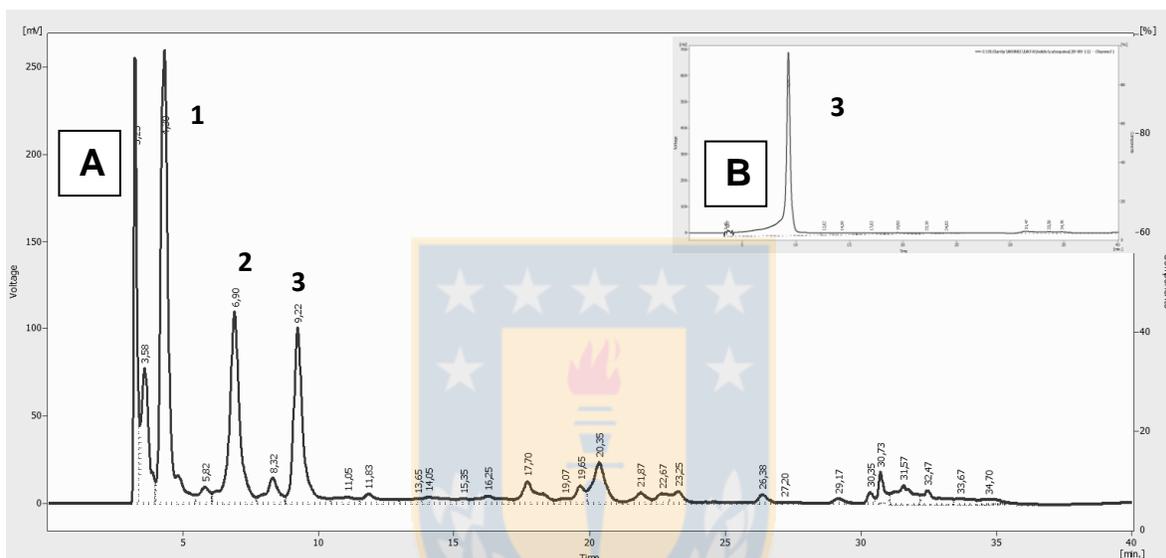


Figura 10. RP-HPLC donde se evidencia la formación del aducto catequina-floroglucinol.; A: Perfil cromatografico extracto Acuoso, B: Estándar de catequina; 1: exceso floroglucinol, 2: Aducto catequina-floroglucinol, 3: catequina.

3. Purificación compuestos semisintéticos:

En la Figura 11 se aprecia un ejemplo de purificación por CPC de un aducto de pirogalol-catequina en una sola etapa (inyección de 2 gramos) . El sistema Arizona C en modo ascendente permite la eliminación del exceso de nucleófilo y la retención del material polimérico que no reacciona (extruido después de los 120 min). El peak de aducto se observa a los 90 minutos, después del peak de catequina (trazado a 280 nm)

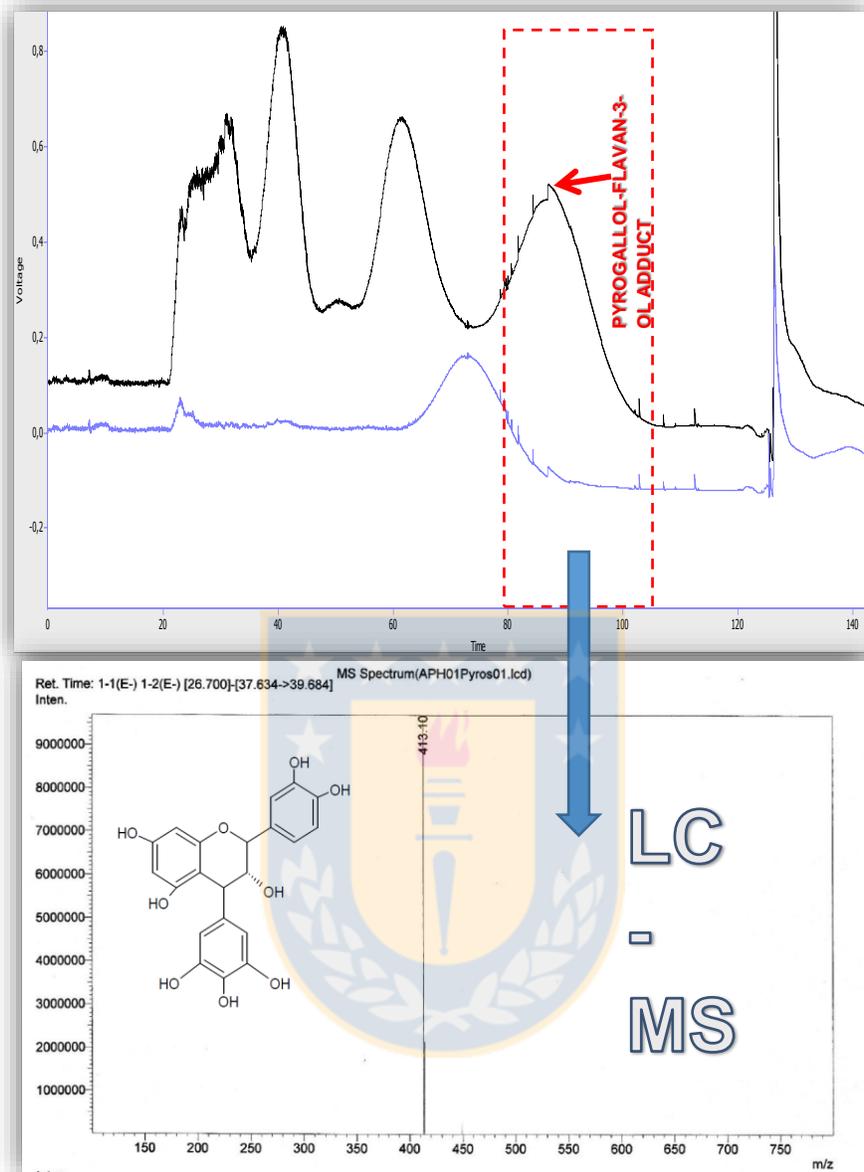


Figura 11: Ejemplo de purificación de un aducto de catequina-pirogalol en una etapa mediante CPC y su análisis de pureza e identidad mediante LC-MS (Panel inferior, modo negativo, $m/z = 413,10$).

La técnica CPC permitía la purificación de todos los aductos usando una sola etapa y varias inyecciones secuenciales de muestras de hasta 2 gramos. Los compuestos liofilizados posteriormente fueron sometidos a LC-MS (Figura 11, panel inferior) para confirmar su identidad, tal como se muestra en la Tabla N° 1.

4. Caracterización compuestos semisintéticos

El análisis por LC-MS permitió comprobar la introducción de los diferentes nucleófilos mediante la observación de los principales iones moleculares a m/z 414 y 398.

Tabla N° 1: Catequinas naturales y semi-sintéticas usadas en esta tesis

Compuesto	m/z
Catequina	290
Epicatequina	290
PH-Catequina	414
PH-Epicatequina	414
PG-Catequina	414
PG-epicatequina	414
RES-Catequina	398
RES-Epicatequina	398

PH: Floroglucinol

PG: pirogalol

RES: resorcinol

5. Caracterización cumarinas sintéticas

Las siguientes cumarinas sintéticas fueron obtenidas (Figura 12) utilizando el procedimiento descrito en el cual se empleó microondas: JS-CU-3 (98%), JS-CU-4 (89%), JS-CU-6 (96%), JS-CU-7 (96%), JS-CU-11 (89%), 4-hidroxicumarina, 7-hidroxicumarina (97%), 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina (83%).

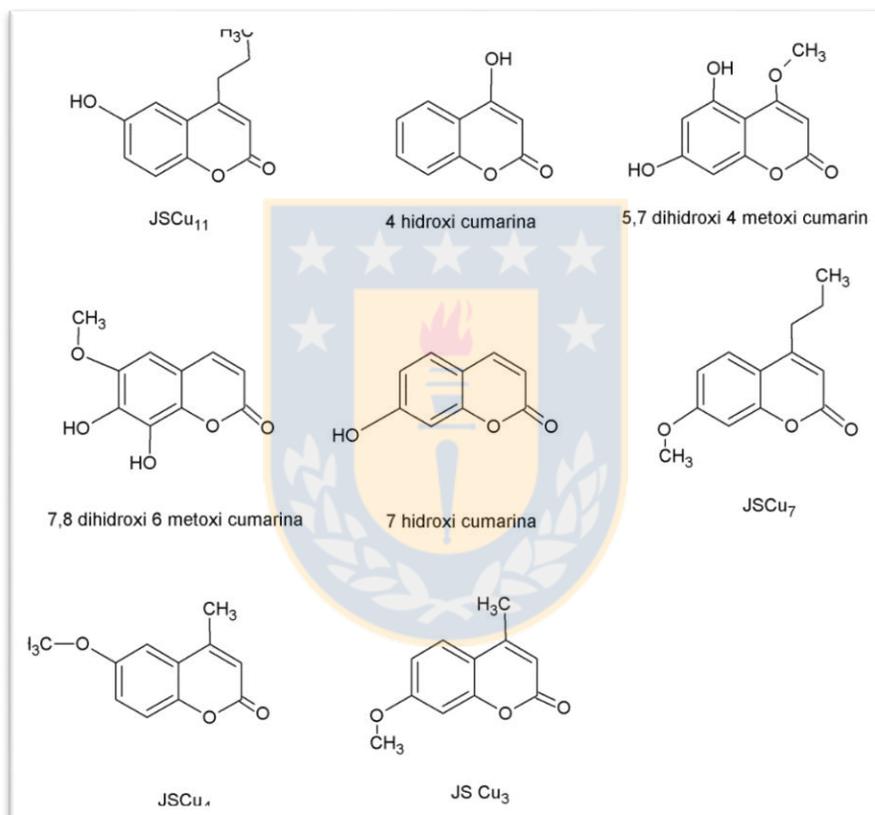


Figura 12: Cumarinas obtenidas mediante el procedimiento sintético asistido con microondas.

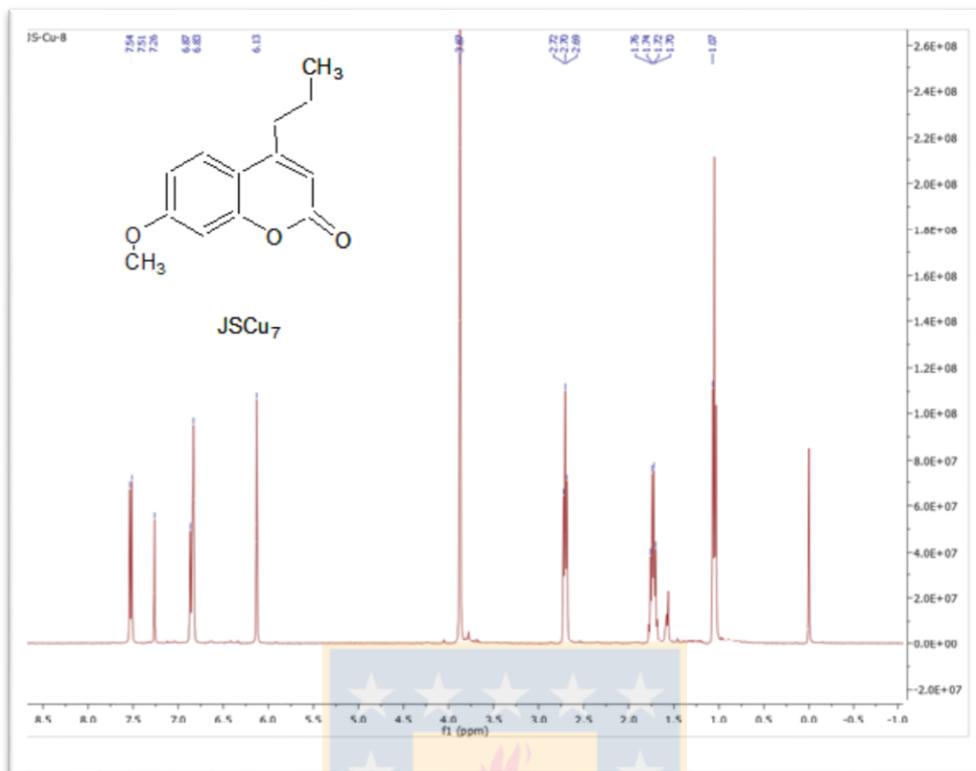


Figura 13. Ejemplo de Espectro RMN-¹H de la cumarina JSCu7.

6. Actividad anti ureasa

Se probaron los siguientes compuestos frente a ureasa de Jack bean de forma cualitativa a concentraciones aproximadas de 10 mg/mL en el caso del extracto y de 5 mg/mL en el caso de los compuestos:

Extracto de Boldo, aductos de catequina con floroglucinol, resorcinol y pirogalol, y las cumarinas JS-CU-3, JS-CU-4, JS-CU-6, JS-CU-7, JS-CU-11, 4-hidroxicumatina, 7-hidroxicumatina, 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina. Adicionalmente se probó algunas PACs aisladas desde Boldo (B3 y C2) y desde cáscara de manzana (B2 y C1). Los controles usados fueron los inhibidores específicos de ureasa ácido acetohidroxámico y tetracloroquinona.

Del estudio anterior sólo mostraron resultados prometedores:

Extracto de Boldo enriquecido en PACs, PACs aisladas de Boldo (B3, C2), Aducto Catequina-Floroglucinol, Aducto Catequina-Pirogalol, 4-hidroxicumatina y 7-hidroxicumatina. Por lo tanto, dichos compuestos fueron evaluados en un rango más amplio de concentraciones. La evaluación se hizo frente a ureasa de Jack bean y ureasa extraída de *H. pylori* en placas de 96 pocillos y medidas las cinéticas de inhibición. Se graficó las curvas de inhibición y obtuvo los porcentajes para cada concentración, usando los controles sin inhibidor para establecer el 100%. Dichos porcentajes de inhibición se utilizaron para elaborar gráficos semilog de concentración-efecto. Utilizando el paquete de software GraphPad se obtuvo desde las gráficas el valor exacto de las IC₅₀. En las Figuras 8 y 9 se presenta ejemplos de curvas semilog obtenidas para el extracto de Boldo rico en PACs y el aducto catequina-pirogalol preparada desde las mismas PACs de Boldo usando las dos enzimas. La tabla 2 resume los resultados de la evaluación del resto de los compuestos.

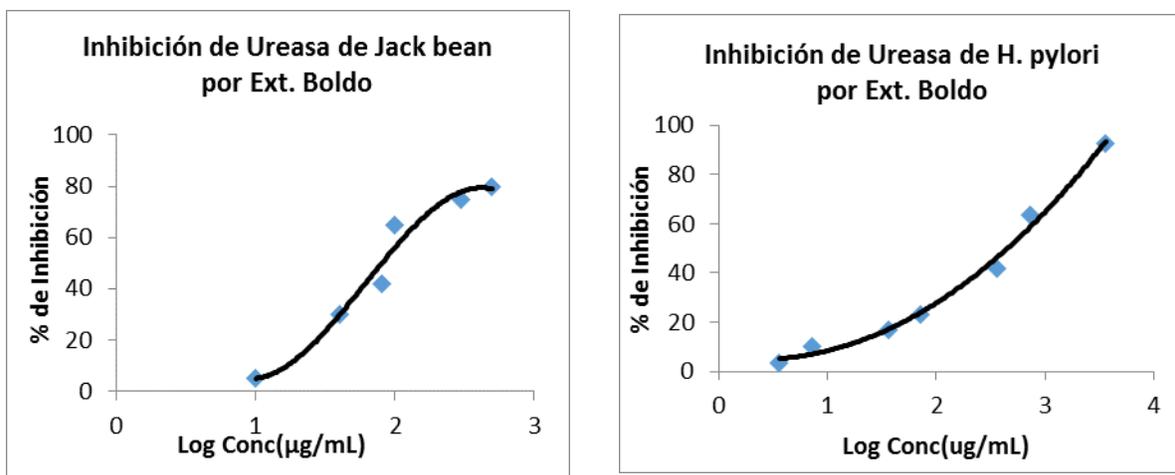


Figura 14. Gráficos del efecto inhibitorio de ureasa de Jack bean y ureasa de *H. pylori* por el extracto de Boldo rico en PACs.

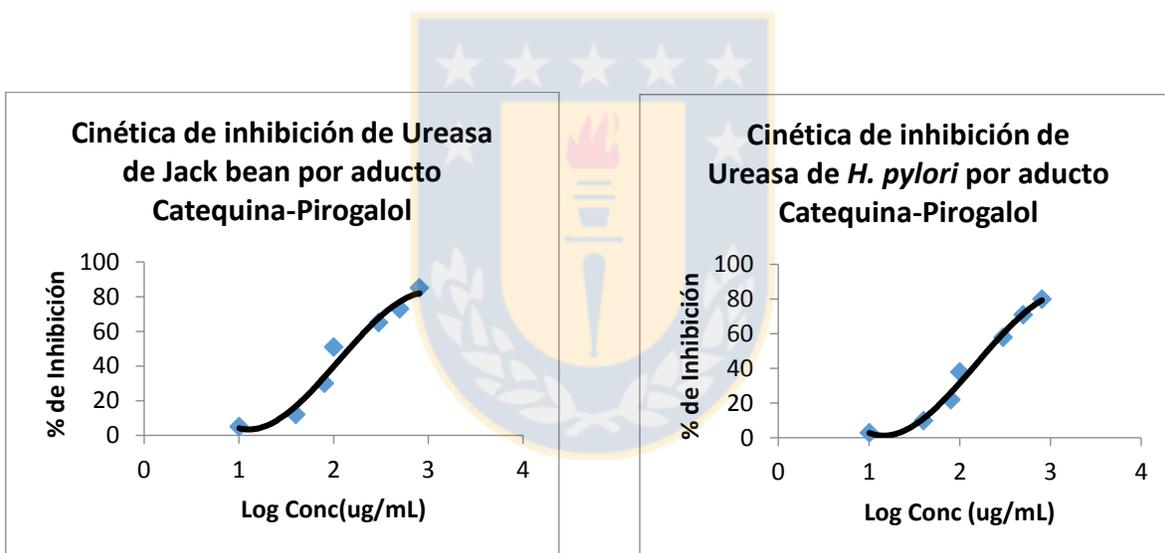


Figura 15. Ejemplo de gráficos semilog del efecto inhibitorio de ureasa de Jack bean y ureasa de *H. pylori* por el aducto Catequina-Pirogalol.

Tabla 2. IC₅₀ para inhibición ureasa de Jack bean y *H. pylori*

Compuesto	IC₅₀ (µg/mL) ureasa Jack bean	IC₅₀ (µg/mL) ureasa <i>H. pylori</i>
Ext. Boldo total	80,5	117,0
Aducto Catequina-floroglucinol	208,1	287,0
Aducto Catequina-Pirogalol	171,8	240,0
4-Hidroxicumarina	60,5	81,2
7-Hidroxicumarina	80,0	129,9
Ext. Boldo enriquecido PAC (control)	6,26	21,4
Procianidina B2	100,12	165,2
Procianidina B3	69,98	117,3
Procianidina C2	60,13	112,1
Procianidina C1	33,17	66,6
Ácido acetohidroxámico	1,44	5,60
Tetracloroquina	0,09	0,31

7. Actividad inhibitoria de la anhidrasa carbonica

Se probaron los siguientes compuestos frente a anhidrasa carbónica: Extracto de Boldo, aductos de catequina con floroglucinol, resorcinol y pirogalol, y las cumarinas JS-CU-3, JS-CU-4, JS-CU-6, JS-CU-7, JS-CU-11, 4-hidroxicumatina, 7-hidroxicumatina, 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina.

De los anteriores sólo mostraron resultados prometedores:

Aducto Catequina-Floroglucinol, Aducto Catequina-Pirogalol, 4-hidroxicumatina, 7-hidroxicumatina.

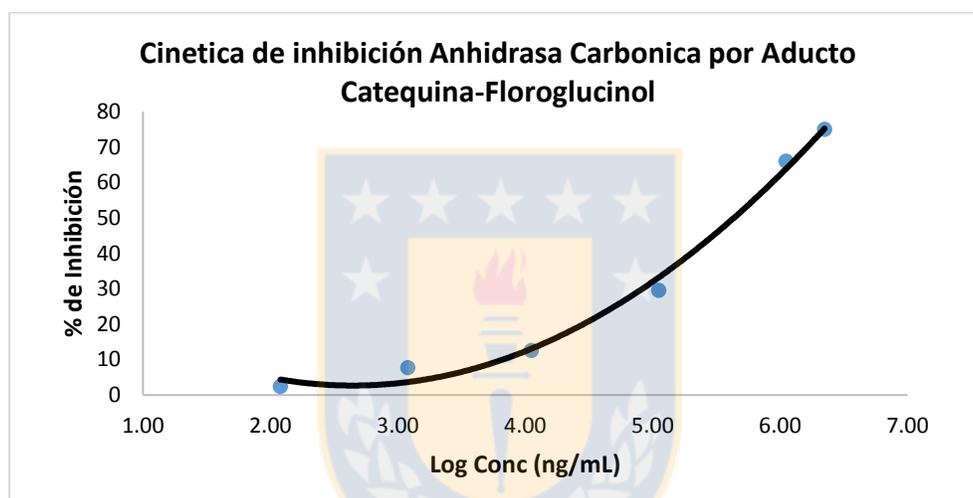


Figura 16. Gráfico del efecto inhibitorio de anhidrasa carbónica por el aducto Catequina-Floroglucinol.

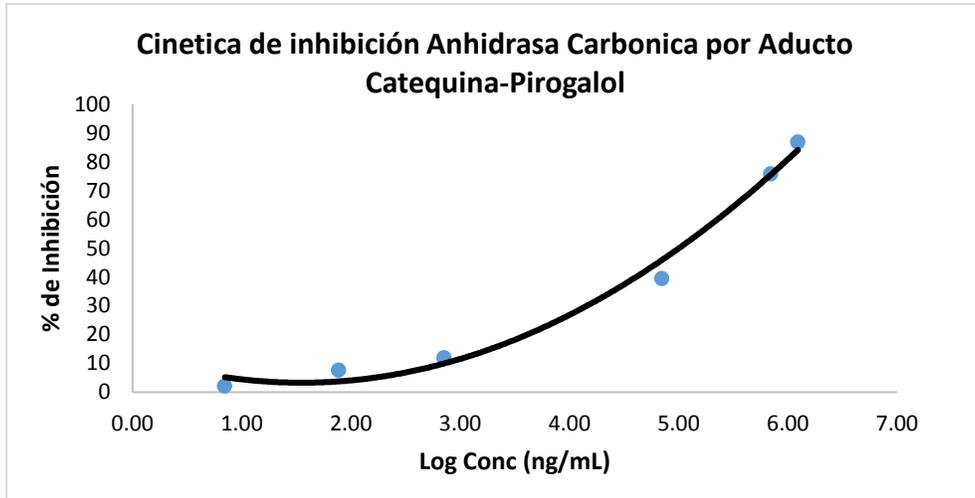


Figura 17. Gráficos del efecto inhibitorio de anhidrasa carbónica por el aducto Catequina-Pirogalol.

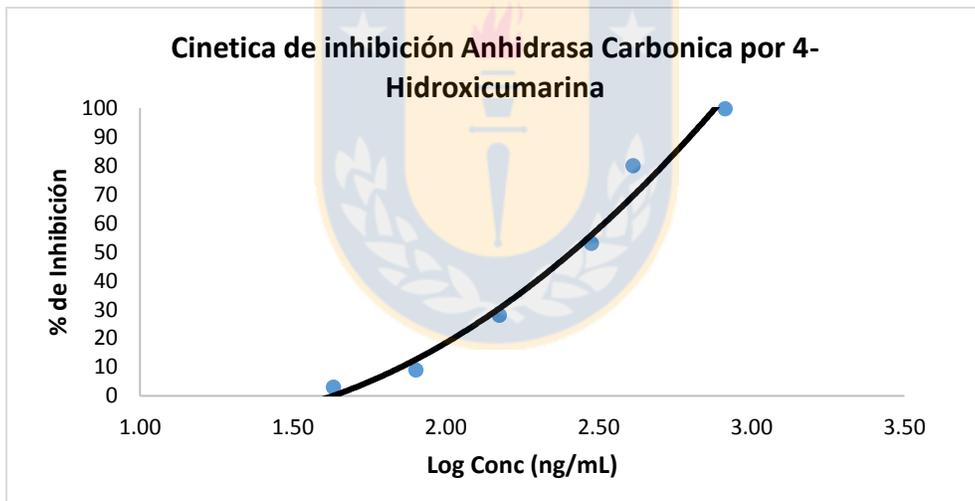


Figura 18. Gráficos del efecto inhibitorio de anhidrasa carbónica por 4-Hidroxicumarina.

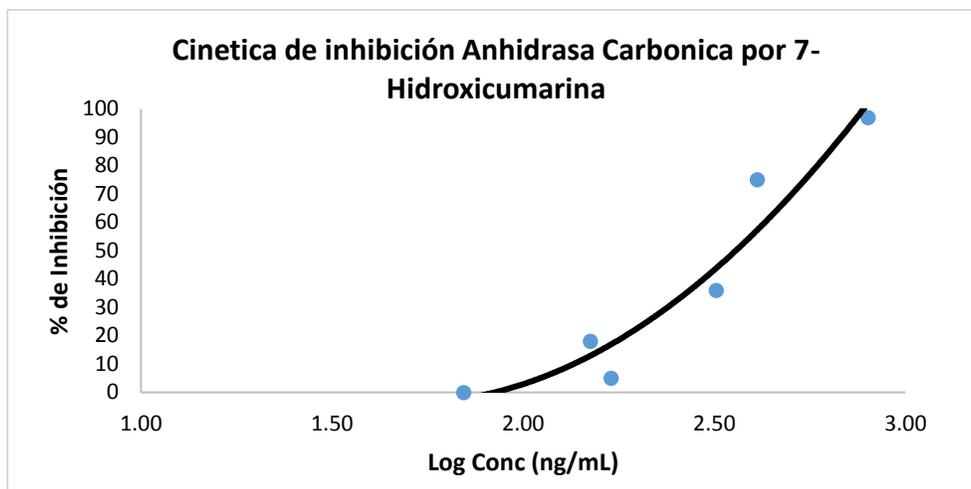


Figura 19. Gráficos del efecto inhibitorio de anhidrasa carbónica por 7-Hidroxicumarina.

Tabla 3. IC₅₀ para inhibición anhidrasa carbónica.

Compuesto	IC₅₀ (µg/mL) Anhidrasa Carbónica
Aducto Catequina-floroglucinol	100,20
Aducto Catequina-Pirogalol	431,31
4-Hidroxicumarina	0,25
7-Hidroxicumarina	0,36
Acetazolamida	0,17

8. Ensayos anti-adherencia en células AGS

En la figura 20 se muestra el gráfico de inhibición de la adhesión de *H. pylori* en cultivos de células AGS del extracto de Boldo, los aductos de catequina-floroglucinol, catequina-pirogalol y las cumarinas sintéticas hidroxiladas en las posiciones 4 y 7.

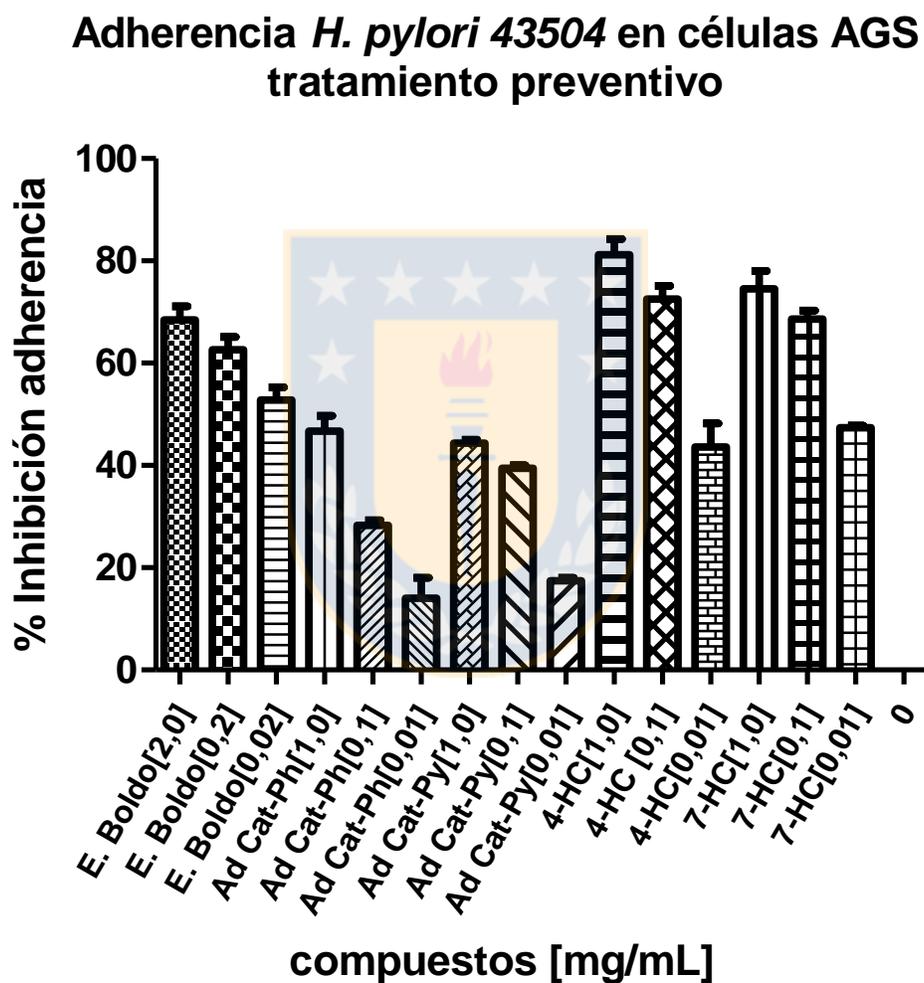


Figura 20. Gráficos del efecto inhibitorio de extracto de boldo (E. Boldo), Aducto catequina-floroglucinol (Ad Cat-Ph), Aducto catequina-pirogalol (Ad Cat.Py), 4-hidroxycumarina (4-HC), 7-hidroxycumarina (7-HC) sobre cultivos de células AGS pretratadas con estos compuestos y luego infectadas con *H. pylori*.

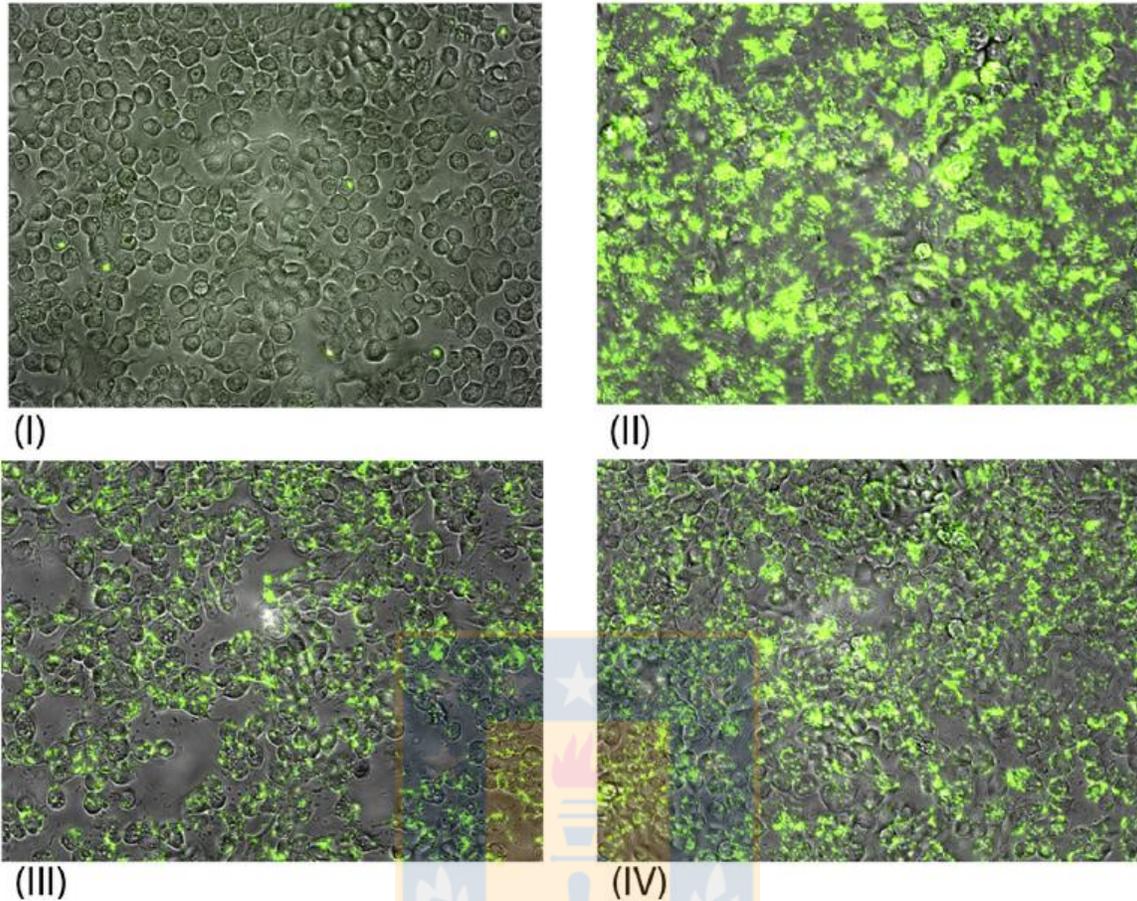


Figura 21. En los paneles I-IV se muestran imágenes representativas de microscopia de fluorescencia de la adhesión de *H. pylori* marcado con FITC sobre células AGS y el efecto del extracto de Boldo y sus PACs. (I) Control con células AGS no infectadas (II) células AGS infectadas con *H. pylori* marcado con FITC. (III) Células AGS infectadas con *H. pylori* marcado con FITC y tratadas con 0.2 mg/mL de polifenoles de Boldo. (IV) Células AGS infectadas con *H. pylori* marcado con FITC y tratadas con 0.25 mg/mL de PACs de Boldo.

9. Determinación efecto sobre el componente inflamatorio

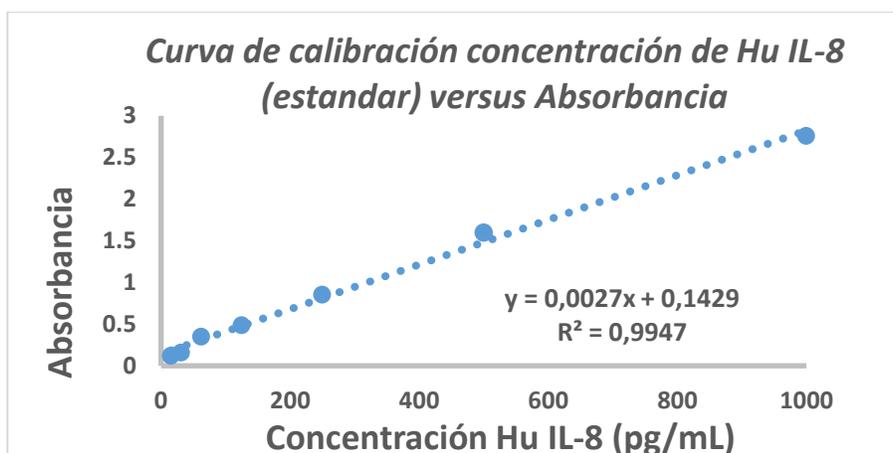


Figura 22: Curva de calibración de estándar de interleuquina humana 8 versus absorbancia, esta curva permite calcular el valor de referencia de la IL-8 de las muestras y controles de los cultivos de *H. pylori*.

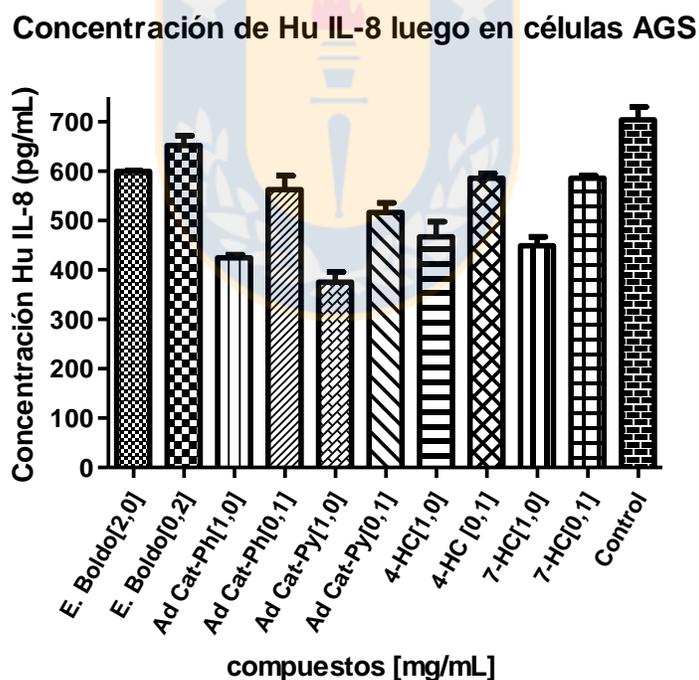


Figura 23: Grafica que muestra el efecto inhibitorio sobre Hu IL-8 en células AGS infectadas con *H. pylori* luego de ser tratadas con extracto de boldo (E. Boldo), Aducto catequina-floroglucinol (Ad Cat-Ph), Aducto catequina-pirogalol (Ad Cat.Py), 4-hidroxycumarina (4-HC), 7-hidroxycumarina (7-HC).

VI. DISCUSION

Discusión de aspectos químicos e inhibición de ureasa

Helicobacter pylori puede infectar el estómago humano gracias a su gran capacidad de adherirse a la mucosa gástrica. Dentro de los factores que hacen posible la colonización se ha comprobado que tanto la ureasa como la anhidrasa carbónica tienen un papel central en la supervivencia de *H. pylori* en el medio ácido gástrico. En el presente trabajo se profundizó en los estudios realizados previamente con el extracto acuoso de Boldo y sus PACs, comprobando que éstas derivan de catequina. Nuestros resultados sugieren que ésta característica las hace superiores a las PACs derivadas de epicatequina como las estudiadas en extractos de cáscaras de manzana y palta (49,50). Para confirmar lo anterior, en forma complementaria al estudio de los productos de florglucinólisis, primero se aisló dos procianidinas, cuya estructura fue confirmada por LC-MS. Como se mostró en la Figura 9, los espectros de masas para estas PACs son consistentes con el peso molecular de un dímero y trímero. Estos resultados coinciden con los informados por Simirgiotis *et al.*, (2010) (74). Sin embargo, estos autores no investigaron el tipo específico de unión de polimerización y la naturaleza del monómero como se informa por primera vez en esta tesis. El primer compuesto dio un ion pseudomolecular a m/z 579 con polaridad positiva, mientras que el segundo compuesto dio un ion pseudomolecular a m/z 865.7 en polaridad negativa. En MS², este compuesto dio fragmentos en m/z 577.7 y 289.3. Estos fragmentos son indicativos de procianidinas del tipo B. Estos datos, en conjunto con el análisis por florglucinólisis posteriormente nos permitió confirmar que el Boldo tiene las PACs B3 y C2, ambas derivadas de catequina. Anteriormente, en la tesis de pregrado se había observado que una fracción (F-5, DP_m = 7.8) del extracto de Boldo obtenida mediante Sephadex LH-20, era la que poseía mayor efecto inhibitorio de ureasa (IC₅₀ = 3.1 ug/mL) y además disminuía marcadamente la adhesión de la bacteria a cultivos de células AGS. Como se muestra en la Tabla 2, las procianidinas B3 y C2 inhiben la ureasa de *H. pylori* con valores de IC₅₀ de 117 y 66 ug/mL, respectivamente. Tal inhibición fue mayor que la observada por procianidinas

derivadas de la epicatequina como la procianidina B2 ($IC_{50} = 165 \text{ ug/mL}$) y C1 ($IC_{50} = 112 \text{ ug/mL}$) analizados simultáneamente. Por lo tanto, los resultados del presente estudio están en línea con un anterior trabajo con procianidinas de manzana y palta (49,50). Por lo tanto, se puede concluir que el grado de polimerización sigue siendo uno de los principales factores que influye en el efecto inhibitorio de ureasas en todos los tipos de PACs (derivadas de catequina y epicatequina) y que la naturaleza del monómero sería a segunda característica de estructura actividad más relevante. En los ensayos con las ureasas (Jack bean y *H. pylori*), el ácido acetohidroxámico fue usado como control. Este compuesto es una molécula pequeña ($MW = 75.07 \text{ g/mol}$) con cierto efecto bactericida contra *H. pylori* ($MIC = 398 \text{ ug/mL}$). Por lo tanto, esta sustancia no sólo sería capaz de inhibir la fracción de ureasa secretada y la que está presente en el periplasma, sino que también su fracción citoplásmica. Tal efecto es altamente relevante *in vivo*, ya que *H. pylori* no podría manejar la acidez circundante a ningún nivel. Debido a su gran tamaño y alta polaridad, las PACs apenas podrían ingresar e inhibir el pool citoplásmico de ureasa. Esto último sugiere que las PACs solamente neutralizan la fracción más externa de la ureasa y podrían actuar de manera preventiva más que terapéutica. Pese a ello, varios estudios reportan que las PACs son eficaces *in vivo*. Por ejemplo, entre los extractos ricos en PACs con demostrados efectos *anti-H. pylori in vivo*, los obtenidos del lúpulo y vino tinto han probado ser particularmente eficaces (75,76). Sólo unos pocos estudios han evaluado el efecto de algunos PACs diméricas (B1 y B2) sobre la actividad de la ureasa (77). Por desgracia, este último trabajo no abordó la importancia del patrón de hidroxilación del anillo B, naturaleza de monómero y grado de polimerización en el efecto inhibitorio de la ureasa de tales PACs. Por otro lado, aunque la relevancia de ureasa para la capacidad de colonización de *H. pylori* ha sido ampliamente divulgada (78,79), hay un estudio en Jerbos de Mongolia donde cepas ureasa negativas aún conservan su capacidad de infectar la mucosa gástrica (80). Teniendo en cuenta todo lo antedicho, se debe investigar mecanismos adicionales explicando cómo las PACs podrían inhibir *in vivo* la colonización por *H. pylori* más allá de la inhibición de la ureasa. Los resultados específicos de la inhibición de ureasa por parte de las PACs de Boldo y el descubrimiento del efecto

del tipo de monómero en dicha propiedad, motivaron la preparación del primer manuscrito asociado a esta tesis, el cual fue publicado en *Phytotherapy Research* el año 2014 (68). Respecto de los aductos obtenidos a través del ataque nucleofílico con floroglucinol, pirogalol y resorcinol, no se observó una inhibición importante (Tabla 2), y se requirieron concentraciones mayores que las que fueron necesarias con las PACs naturales. Este resultado indica claramente que para que los flavan-3-oles puedan inhibir a la ureasa de *H. pylori*, otro requisito de estructura-actividad es que exista una forma dimérica como mínimo. Esta forma dimérica, preferentemente debe ser de tipo B y enlazada en 4→8. Por lo tanto, cualquier sustitución realizada en el C-4 de un flavan-3-ol (catequina o epicatequina), debe ser de similar naturaleza química que el mismo flavan-3-ol.

Las cumarinas probadas mostraron ser inhibidores moderados de ureasa. No son mejores que las PACs pero sí exhiben un efecto más potente que los aductos ensayados. Estudios recientes revelan que las cumarinas inhiben a la ureasa de *H. pylori* y pueden entrar en su sitio catalítico. Para ello son esenciales los grupos hidroxilos en 4,5, 7 y 8 y la presencia de un grupo fenol en 4 (Jadhav et al., 2013)(81). Los estudios de Docking realizados por este grupo de investigadores sugieren que las cumarinas requieren ser modificadas para mejorar su actividad inhibitoria de ureasa. En el trabajo de Jadhav llama la atención que la introducción de un grupo fenol adicional mejore mucho la actividad, generando una estructura muy similar a los compuestos fenólicos estudiados en la presente tesis. Sin embargo, en el caso de los aductos de catequina y epicatequina, es posible que la redundancia de grupos hidroxilos que están presentes en los anillos del pirogalol y el floroglucinol podría finalmente actuar en forma desfavorable, generando un impedimento estérico que dificulta su ingreso en la cavidad del sitio catalítico.

Discusión de los efectos sobre AC

Muchos trabajos han reportado a la AC como una potencial diana terapéutica por estar presente en diversas enfermedades, por lo tanto, el diseño de inhibidores ha sido ampliamente estudiado (82,83). La AC es inhibida por compuestos que presentan grupos capaces de coordinar con el zinc del sitio catalítico. Estos grupos están presentes en las sulfonamidas, sulfamatos y sulfamidas. Estos compuestos se unen en una geometría tetraédrica, interactuando directamente con el zinc catalítico en su forma desprotonada, inhibiendo la actividad de AC mediante el desplazamiento de los iones del agua/hidróxido (83,84). Diferentes sulfonamidas de uso clínico se han utilizado en tratamientos de enfermedades como el glaucoma, edema, la epilepsia, hipertensión, etc (84,85,83). Es interesante que, al igual que con α -CAs de otras especies, la H ρ α AC es inhibida por las mismas sulfonamidas, en particular por la acetazolamida (86,87,88,89,90). Estudios anteriores demostraron que la acetazolamida puede inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro* y la capacidad infectiva de *H. pylori* (89,91). Esto es consistente con estudios previos hechos en humanos tratados con acetazolamida. Sorprendentemente, los datos mostraron que los inhibidores de AC mejoraron la cicatrización de las úlceras pépticas con 91% a 97% de tasas de curación, con una sola recaída del 6% en 2 años (88,92). Por lo tanto, dicha estrategia terapéutica empírica demostró ser eficaz no sólo en la curación de úlceras, sino también en la prevención de la recurrencia de éstas. Esto sugiere que probablemente el tratamiento de las úlceras con acetazolamida dio lugar a la erradicación de *H. pylori*. Curiosamente, los inhibidores de la α -AC humana como la acetazolamida han sido capaces de inhibir la h ρ α CA con constantes (k_d) muy bajas (nM), lo que se sugiere una gran afinidad del inhibidor al sitio activo de la enzima. Así, los valores obtenidos para la acetazolamida están en el rango de 12 a 84 nM (91). Además, este grupo llevó a cabo el mismo enfoque con h ρ α CA con diferentes sulfonamidas y sulfamatos. Todos estos datos sugieren que el diseño de inhibidores con actividad contra ambas isoenzimas debe conducir a la muerte *H. pylori* y por lo tanto a su erradicación (90,91). Sin embargo, uno de los inconvenientes de la utilización clínica de sulfonaminas es que inhiben todas las isoformas de AC de manera no específica. Esto es un problema muy complejo ya

que existe un gran número de isoformas en muchos tejidos y órganos humanos (93) como hAC II (isoforma más abundante fisiológicamente), VI, VII, IX, XII y XIII que además son susceptibles de ser inhibidas por sulfonamidas, disminuyendo la eficacia del fármaco y causando efectos secundarios no deseados.

Por lo tanto, en el proceso de diseño de inhibidores de HpAC uno debe garantizar que estas nuevas moléculas en lo posible, deben ser altamente específicas y no clásica, es decir, que no se basen en las estructuras de sulfonamidas, sulfamatos, o sulfamidas (68,83,94,95). En este contexto, hoy en día se conocen distintos mecanismos para inhibir a las ACs. Recientemente, nuevas moléculas de interés, además de la sulfonamida y sulfamato se han descubierto en base de productos naturales. Estos comprenden una vasta colección de diversas estructuras químicas y han demostrado ser una valiosa fuente de nuevos quimioterapéuticos, tales como fenoles/polifenoles, ácidos fenólicos, cumarinas y sus derivados, y ácidos carboxílicos. (83,96). Dada la creciente importancia de la CA, resulta muy relevante que de las cumarinas ensayadas, aquellas con grupos OH en 4 y 7, tengan valores de IC₅₀ de 0,36 y 0,25 ug/mL, respectivamente. Estas estructuras son inhibidores de CA mucho más potentes que los aductos de catequina e incluso en el mismo orden de magnitud de la acetazolamida. Específicamente, el uso de las cumarinas y sus derivados ya ha sido reportado y podría ser muy atractivo para el desarrollo de nuevas generaciones de inhibidores selectivos de la AC (96). Sin embargo, tal como se explicó en la introducción, hay que considerar que las cumarinas podrían tener un mecanismo de inhibición suicida por lo que nuestros resultados deben ser validados con ensayos de "binding" a la AC y estudios de Docking que simulen la unión a sitios alternativos y alostéricos dentro de la misma AC. Por otro lado, aunque los aductos no son tan potentes sobre esta enzima, eventualmente también podrían ser refinados para disminuir su IC₅₀ y los valores de la constante de disociación (K_d). En efecto, uno de los objetivos del proyecto Fondecyt 1150948, es introducir en los aductos, grupos coordinadores de Zn para mejorar esta propiedad. Con los resultados obtenidos en esta sección se puede afirmar que la mejor estrategia para inhibir a las dos enzimas sería usar PACs naturales más aductos o cumarinas. El tipo de aducto y/o cumarina a usar requeriría estudios adicionales de SAR, ampliar

la librería de sus derivados y finalmente validar los resultados usando un modelo *in vivo*.

Discusión del efectos sobre la adhesión de H. pylori a células AGS

Una vez que *H. pylori* llega a la mucosa gástrica y sobrevive el peristaltismo y el ambiente ácido, puede llegar hasta el estómago mediante una serie compleja de adhesinas como BabA, SabA (97). Por lo tanto, buscar compuestos capaces de prevenir o limitar este proceso, podría ser muy útil para prevenir o incluso reducir la carga bacteriana en el estómago. *In vivo*, 15% a 20% de *H. pylori* se fija a las células epiteliales gástricas (98). Por eso, los mecanismos de adhesión resultan ser una diana molecular muy atractiva para limitar la colonización gástrica de *H. pylori*. Con respecto a esto último, las propiedades anti-adherencia de determinados polifenoles como las PACs se han investigado profusamente. Por ejemplo, el jugo de arándano se ha estudiado por sus propiedades *anti-H. pylori* por Burger et al., (2000, 2002) (99,100). Ellos informaron que los componentes de alto peso molecular de jugo de arándano son capaces de inhibir la unión de *H. pylori* a sitios específicos reconocidos tanto en la mucosa gástrica como en líneas celulares. Clínicamente, la eficacia del jugo de arándano contra *H. pylori* fue probada en un estudio con 189 pacientes infectados y también en combinación con los antibióticos e inhibidores de la bomba de protones. La mitad de estos individuos (*H. pylori* positivo por prueba de urea-13C en aliento) bebieron 250 mL de jugo de arándano diariamente durante 90 días, mientras que los otros recibieron una bebida placebo. Después de 35 y 90 días, respectivamente, hubo una disminución significativa de pacientes positivos para *H. pylori* en el grupo que ingirió el zumo de arándano rojo (101).

Rohdewald y Beil (2008) (102) demostraron que un extracto rico en PACs de corteza de pino (Pycnogenol) inhibió la adherencia de *H. pylori* en forma concentración-dependiente a las células AGS. Basado en lo descrito anteriormente, recientemente nuestro grupo intento evaluar un extracto de cáscara de manzana rico en polifenoles (APPE, 24% PACs), contra la adherencia de *H. pylori* y vacuolización en células HeLa (73). Se encontró que el APPE ejerce un doble efecto *anti-H. pylori*, inhibiendo

el proceso de adhesión de las bacterias y su actividad ureasa. El efecto anti-adherencia de APPE se observó con $IC_{50} = 5.3$ mg/mL. Los resultados de los estudios de pregrado, en los cuales se evaluó fracciones de Boldo con PACs de distinto grado de polimerización son consistentes con los experimentos de microscopia de fluorescencia utilizando *H. pylori* marcado con FITC de (cepa ATCC 43504). Así, el extracto de Boldo (0,20 mg GAE/mL) claramente limita la adherencia de FITC-*H. pylori* a células AGS.

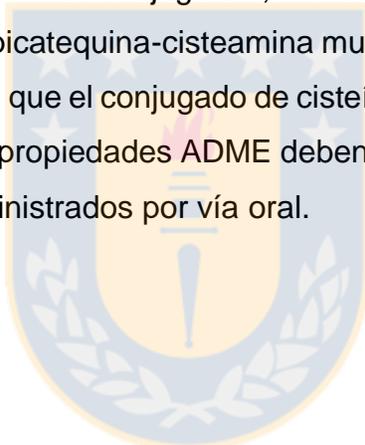
Debido a la complejidad de los mecanismos de adherencia de *H. pylori*, debe considerarse la naturaleza de la cepa analizada en este experimento. Así, previamente se había observado cierta diferencia entre el comportamiento de las cepas de *H. pylori* J99 y 43504. En comparación con la concentración usada para el extracto de cáscara de manzana (10 mg GAE/mL), la concentración de Boldo necesaria para reducir hasta un 80% la adherencia de *H. pylori* es mucho menor, lo que sugiere que otras sustancias además de PACs contribuyen a tal efecto.

Tal como se suponía, la degradación o depolimerización de las PACs tiene consecuencias negativas para los efectos anti-adherentes. Los productos de degradación conocidos como aductos de catequina poseen menor efecto que las PACs naturales y las cumarinas. Estas últimas revelan un elevado efecto anti-adherente, lo que sumado a sus propiedades inhibitorias de CA y ureasa reafirma su calidad de candidatos para futuros estudios. Cabe mencionar que no se puede descartar que las cumarinas afecten otros blancos moleculares de la bacteria y que la disminución de la adherencia sea en realidad un reflejo de una disminución en la viabilidad.

Discusión del efecto sobre producción de IL-8 en células AGS

Una de las características de la infección por *H. pylori* es su capacidad de promover un alto grado de infiltración linfocítica (103). Los neutrófilos y células inflamatorias mononucleares infiltran la mucosa del estómago infectado con *H. pylori* causando inflamación y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Ciertas proteínas solubles en agua de *H. pylori* son capaces de primar a los neutrófilos para estimular una mayor producción de ROS y quimiocinas (104,105). Satén y colegas (2000) informaron que la proteína NAP HP es uno de los factores que estimulan la NADPH oxidasa de los neutrófilos. Específicamente los autores observaron que la producción de ROS alcanzó un máximo entre 40-60 minutos después de la incubación. Allen et al., (2005) (106) han reportado que *H. pylori* puede evadir el efecto bactericida de la ROS cuando estimulan los neutrófilos, causando daño a la mucosa gástrica del hospedador. Esto último se explicaría por el hecho de que *H. pylori* causa un ensamblaje anómalo del complejo funcional NADPH oxidasa en la membrana celular y no en el fagosoma. Específicamente, mientras que flavocitocromo b558 puede ser adquirido por los fagosomas, las subunidades p47phox o p67phox no pueden ser reclutadas eficientemente. No se han identificado los factores responsables de este tipo de evasión. Otros autores sugieren que la adhesina SabA de *H. pylori* podría jugar un papel preponderante como factor de activación de neutrófilos, lo que vincula el proceso de adherencia con la inflamación (107). Este último mecanismo de evasión promueve daño adicional a la mucosa gástrica. Con respecto a esto, en trabajos anteriores, en el laboratorio de Farmacognosia se comprobó que los polifenoles de cáscara de manzana (flavonoides y procianidinas) mejoran el daño inflamatorio observado en los primeros pasos de la colonización de *H. pylori*. Por lo tanto, pensamos que los compuestos más específicos y potentes como las que se prepararon en esta tesis, podrían suprimir este daño inflamatorio más allá de primeros pasos de la infección por *H. pylori* mediante inhibición de la adherencia y la expresión de señales proinflamatorias. Varios trabajos apoyan efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antiproliferativos de los aductos de catequina y epicatequina. Por ejemplo, los cisteamina/cisteína-derivados de catequina y epicatequina inhiben liberación de IL-

1 β desde células sanguíneas estimuladas con LPS (108). Para estos derivados, se observaron efectos citotóxicos in vitro en concentraciones más altas que la concentración a la cual se vieron los efectos antioxidantes (109). En otro estudio, los aductos 4 β -(2-aminoethylthio) 3-O-galato de epicatequina y 4 β -[S-(N-Acetyl-O-metil-cisteinil)] epicatequina 3-O-galato mostraron potente efecto antioxidante en células HT29, HaCaT y HT3, (110,111,112). Por otra parte, estudios recientes han demostrado que los derivados de floroglucinol y resorcinol de catequina y epicatequina son más potentes inhibidores de la ribonucleasa A que los compuestos parentales. Dichos compuestos fueron capaces de inhibir el proceso de angiogénesis; por lo tanto, podrían ser candidatos potenciales para la supresión del crecimiento y metástasis de tumores sólidos (113). Con el fin de evaluar cambios en la solubilidad en lípidos de estos conjugados, se evaluó su absorción percutánea. En este estudio, el aducto epicatequina-cisteamina muestra mejor penetración de la piel (humana y piel de cerdo) que el conjugado de cisteína-epicatequina (114). Estos resultados sugieren que las propiedades ADME deben evaluarse en el caso de que estos conjugados sean administrados por vía oral.



VII. CONCLUSIÓN

- Se elaboró compuestos semisintéticos a partir de PAC de extracto de boldo mediante ataque nucleofílico en medio ácido con pirogalol, floroglucinol y resorcinol, se obtuvieron los aductos respectivos catequina-pirogalol, catequina-floroglucinol y catequina-resorcinol, Además, mediante síntesis se elaboró un set de cumarinas (JS-CU-3, JS-CU-4, JS-CU-6, JS-CU-7, JS-CU-11, 4-hidroxycumatina, 7-hidroxycumatina, 7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina).
- Los compuestos elaborados se purificaron y aislaron mediante cromatografía preparativa en columna (HPLC) y de partición por centrifugación (CPC).
- Los compuestos elaborados fueron caracterizados mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS para los aductos y mediante las técnicas FT-IR, NMR y MS para las cumarinas.
- Luego evaluó las propiedades inhibitorias frente a ureasa y AC de *H. pylori* de los compuestos elaborados, presentando mayores efectos inhibitorios de ureasa los aductos y mayores efectos inhibitorios de AC las cumarinas.
- Finalmente se evaluó la capacidad de impedir la adhesión de *H. pylori* en células AGS, presentando todos los compuestos robados una gran actividad, llegando incluso a un 80% de inhibición de la adherencia, además, los compuestos presentaron propiedades favorables frente al componente inflamatorio siendo capaces de inhibir en alguna medida la IL-8

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahme, A., 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*: Is the debate over?, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2005, 4:17.
2. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to humans, Vol. 61. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. *International Agency for Research on Cancer, Lyon* 1994. 1-241.
3. Goodwin, CS., Worsley, BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am.* 1993; 2 2(1):5-19.
4. *Fauci, A., et al., Harrison Principios de Medicina Interna*, 17a edición, Parte 7. Capítulo 144. Infecciones por *Helicobacter pylori*, EDITORIAL McGraw-Hill Interamericana, S.A., 2009.
5. González-Carbajal M., Rojas F., Grá B., Ávalos R., Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos, *Rev Panam Infectol* 2004;6(4):8-14.
6. Suerbaum S., Micheti P., *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med.* 2002, 347: 1175-1186.
7. Figura N., Franceschi F., Santucci A., Bernardini G. Gasbarrini G., Gasbarrini A., Extragastric Manifestations of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter.* 2010, 15 (1): 60–68.
8. Franchini M., Veneri D., *Helicobacter pylori* Infection and Immune Thrombocytopenic Purpura: an Update. , *Helicobacter* 2004. 9:4, 342–346,
9. Geis G., Suerbaum S., Forsthoff B., Leylmg H., Opferkuch W., Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* (1993), 38, 371-377.
10. Paramasivan M., Sankaran G., Sethuraman N., et al. Molecular modelling of urease accessory interaction proteins of *Helicobacter Pylori* J 99 and predicting an interruption in interaction by *Vigna radiata* Defensins. *Bioinformation.* (2011). 5(10): 410-415
11. Ilver D., Arnqvist A., Ögren J., Frick I. M., Kersulyte D., Incecik E. T., Berg D. E., Covacci A., Engstrand L., Borén T. *Helicobacter pylori* adhesin binding

- fucoylated* histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. 1998; 279:373–377.
12. Castillo-Rojas G., Mazari-Hiriart M., López-Vidal Y. Helicobacter pylori: Focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud pública de México*, 2004; 46:6,
 13. Kot M., Olech Z., Influence of 2,5-dichloro-1,4-benzoquinone on jack bean urease activity. Inhibitory effect, total reducing capacity and DPPH radical scavenging activity. *Acta biochimica polonica, Paper in Press*, 58, 2011.
 14. Mobley H., Mendz G., Hazell S., Helicobacter pylori: Fisiología y Genética. Washington (DC): ASM Press, Capitulo 16, 2001.
 15. Nagata K., Takagi E., Tsuda M., et al. Inhibitory Action of Lansoprazole and Its Analogs against *Helicobacter pylori*: Inhibition of Growth Is Not Related to Inhibition of Urease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995; 567–570.
 16. Mobley HLT, Garner RM, Bauerfeind P. Helicobacter pylori nickel-transport gene nixa-synthesis of catalytically active urease in Escherichia coli independent of growth conditions. *Mol Microbiol*. 1995; 16, 97 - 109.
 17. Mobley H., Island M., Hausinger R., Molecular Biology of Microbial Ureases. *microbiological reviews*. 1995; 451–480.
 18. Lam R., Romanov V., Johns K., Crystal structure of a truncated urease accessory protein UreF from Helicobacter pylori. *Proteins* 2010; 78, 2839–2848.
 19. Moncrief M., Hom L., Jabri E., Karplus P., Hausinger R., Urease activity in the crystalline state. *Protein Science*. 1995; 4, 2234-2236.
 20. Amtul Z., Rahman A., Siddiqui R.A., Choudhary M.I. Chemistry and Mechanism of Urease Inhibition, *Current Medicinal Chemistry*. 2002; 9, 1323-1348.
 21. Schwartz J., Allen L., Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006; 79,1214-1225.
 22. Espinosa L., Sierra M., Anhidrasa carbónica, nuevas perspectivas; *Neumol Cir Torax*, Vol. 69, No. 4, 2010
 23. Mayank Aggarwal, Bhargav Kondeti, Robert McKenna. Insights towards sulfonamide drug specificity in α -carbonic anhydrases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (2013) 1526–1533.

24. Alterio V., Di Fiore A., D'Ambrosio K., Supuran C., De Simone G., Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms?. *Chem. Rev.* 2012, 112, 4421–4468
25. Sethi, et. al.: Carbonic anhydrase I and II inhibition with natural products: Leucasephalotes; *Pharmacognosy Communications* Volume 1:2, 2011.
26. Marcus EA, Moshfegh AP, Sachs G, and Scott DR. The periplasmic -carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. *J Bacteriol* 187: 729–738, 2005.
27. Scott DR, et al. 2010. Cytoplasmic histidine kinase (HP0244)-regulated assembly of urease with Urel, a channel for urea and its metabolites, CO₂, NH₃, and NH₄(₊), is necessary for acid survival of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 192:94–103
28. Marcus E., Sachs G., Wen Y., Feng J. and Scott D. R., Role of the *Helicobacter pylori* Sensor Kinase ArsS in Protein Trafficking and Acid Acclimation, *J. Bacteriol.* 2012, 194(20):5545.
29. Weeks, D. L., Eskandari, S., Scott, D. R. & Sachs, G. (2000). A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 287, 482–485.
30. Bury-Moné, S., Skouloubris, S., Labigne, A., and De Reuse, H. (2001) The *Helicobacter pylori* Urel protein: role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation. *Mol Microbiol* 42: 1021–1034.
31. Supuran C. Carbonic anhydrases- an Overview. *Curr. Pharm. Des.* 2008; 14(7): 603-614.
32. Scott DR, Marcus EA, Wen Y, Oh J, Sachs G. Gene expression in vivo shows that *Helicobacter pylori* colonizes an acidic niche on the gastric surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104(17): 7235-7240.
33. Aguilar, C., et al, Estudio de la prueba de la ureasa o test de aliento (TA) y correlación con biopsia gástrica para la detección de *Helicobacter Pylori* (Hp) en pacientes dispépticos del Hospital Nacional Cayetano Heredia – Lima, *Gastroenterol*, 2007; 27, 172-176

34. Alba, R., Toledo, R., Viana M., *Helicobacter pylori*: Clínica, Diagnóstico y Tratamiento, *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina*, 2006,158.
35. Calvet, X., Lehours, P., Lario, S., Mégraud, F., Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection, *Helicobacter* 15 (1). 7–13.
36. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection —Summary of the Maastricht_3 2005 Consensus Report. Business briefing: European Gastroenterology Review. 2005.
37. Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., et al. Management of *Helicobacter pylori* infection the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. The European *Helicobacter* Study Group (EHSG) *Gut*. 2012; 61, 646-664.
38. García A., Henríquez P., Retamal C., Pineda S., Delgado C., González C. Propiedades probióticas de *Lactobacillus spp.* aislados de biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Médica de Chile*, 2009; 137, 3.
39. Morihara F., Fujii R., Hifumi E., Nishizono A., Uda T. Effects of vaccination by a recombinant antigen ureB138 (a segment of the b-subunit of urease) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 2007; 56, 847-853.
40. Nagata K., Mizuta T., Tonokatu Y., Fukuda Y., Okamura H., Hayashi T., Shimoyama T., Tamura T. Monoclonal antibodies against the native urease of *Helicobacter pylori*: Synergistic inhibition of urease activity by monoclonal antibodies Combinations. *Infection and Immunity*. 1992; 60(11), 4826-4831.
41. Rowland M. and Drumm B. Clinical significance of *Helicobacter pylori* infection in children. *British Medical Bulletin*. 1998; 54(1), 95-103.
42. Tominaga K., Higuchi K., Hamasaki N., Hamaguchi M., Takashima T., Tanigawa T., Watanabe T., Fujiwara Y., Tezuka Y., Nagaoka T., Kadota S., Ishii E., Kobayashi K., Arakawa T. In vivo action of novel methyl quinolone alkaloids against *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 20, 547-552.
43. Fukai T., Marumo A., Kaitou K., Kanda T., Terada S., Nombra T. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sciences*. 2002; 71, 1449-1463.

44. Ahmad V., Hussain J., Hussain H., Jassbi A., Ullah F., Lodhi M., Yasin A., and Choudhary M. Firts Natural Urease Inhibitor from *Euphorbia discipiens*. *Chem Pharm Bull.* 2003; 51(6), 719-723.
45. Saito M., Hosoyama H., Ariga T., Kataoka S., Yamaji N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J Agric Food Chem.* 1998; 46, 1460-1464.
46. Nostro, A., Cellini L., Di Bartolomeo S., Cannatelli M.A., Di Campi E., Procopio F., Grande R., Marzio L., Alonzo V. Effects of Combinig Extracts (from Propolis or *Zingiber officinale*) with Claritromycin on *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Res.* 2006; 20, 187-190.
47. Siddaraju M., and Dharmesh S. Inhibition of gastric H⁺, K⁺ -ATPase and *Helicobacter pylori* growth by phenolic antioxidants of *Zingiber officinale*. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007; 51(3), 324-332.
48. Lin Y., Kwon Y., Labbe R., Shetty K. Inhibition of *Helicobacter pylori* and Associated Urease by Oregano and Cranberry Phytochemical Synergies. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(12), 8558–8564.
49. Pastene E, Troncoso M, Figueroa G, Alarcón J, Speisky H. Association between polymerization degree of apple peel polyphenols and inhibition of *Helicobacter pylori* urease. *J Agric Food Chem.* 2009; 57, 416 - 424.
50. Chávez F., Aranda M., García A., Pastene E. Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2011;10 (3), 265 – 280
51. Jain, P. & Himanshu, J. (2012). Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *J of Appli Pharm Scien*, (06):236-240.
52. Supuran C. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2015: 1475-6366.
53. Maresca A, Temperini C, Pochet L, Masereei B, Scozzafava A, Supuran C. Deciphering the mechanism of carbonic anhydrase inhibition with coumarins and thiocoumarins. *J. Med. Chem.* 2010; 53(1): 335-344.

54. Maresca A, Carta F, Vullo D and Supuran C. Dithiocarbamates strongly inhibit the β -class carbonic anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2013; 28:407–11.
55. Touisni, N., Maresca, A., McDonald, P., Lou, Y., Scozzafava, A., Dedhar, S., Winum, J. & Supuran, C. (2011). Glycosyl coumarin carbonic anhydrase IX and XII inhibitors strongly attenuate the growth of primary breast tumors. *J Med Chem*, 54:8271–8277.
56. Sharma, A., Tiwari, M. & Supuran, C. (2014). Novel coumarins and benzocoumarins acting as isoform-selective inhibitors against the tumor-associated carbonic anhydrase IX. *J Enzy Inhib Med Chem*, 29(2):292-296.
57. Alessio Nocentini, Mariangela Ceruso, Fabrizio Carta, and Claudiu T. Supuran; 7-Aryl-triazolyl-substituted sulfocoumarins are potent, selective inhibitors of the tumor-associated carbonic anhydrase IX and XII; *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* Vol. 31, Iss. 6, 2016.
58. Basile, A., Sorbo, S., Spadaro, V., Bruno, M., Maggio, A., Faraone, N. & Rosselli, S. (2009). Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). *Molecules*, 14:939-952.
59. Kawase, M., Tanaka, T., Sohara, Y., Tani, S., Sakagami, H., Hauer, H. & Chatterjee, S. (2003). Structural requirements of hydroxylated coumarins for in vitro anti-*Helicobacter pylori* activity. *In Viv*, 17:509-512.
60. Jadhav, S., Meshram, R., Gond, D. & Gacche, R. (2013). Inhibition of growth of *Helicobacter pylori* and its urease by coumarin derivatives: Molecular docking analysis. *J Pharm Res*, 7:705-711.
61. Pastene, E., Carvajal, R., Zúñiga, F., Alarcón, J. & García, A. (2016). Carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori* as pharmacological target: Using natural polyphenols as potential templates for development of new antimicrobials. *Rev Soc Farmacol Chil*, 9:(1)7-18.
62. Keating, G. & O' Kennedy, R. (1997). Coumarin cytotoxicity activity on albino rats. *Joh Wil & So*, 2:54-66.

63. Ziarani and Hajiabbasi, 2013, G.M. Ziarani, P. Hajiabbasi: Recent application of 4-hydroxycoumarin in multi-component reactions *Heterocycles*, 87 (2013), pp. 1415–1439
64. Siddiqui, Z. (2014). Sulfamic acid catalysed synthesis of pyranocoumarins in aqueous media. *Tetrah Lett*, 55(1):163-168.
65. Oganesyanyan, E., Nersesyanyan, Z. & Parkhomenko, A. (2007). Chemical composition of the above-ground part of *Coriandrum sativum*. *J Pharm Chem*, 41(3):149-153.
66. Orlovskaya, T., Luneva, I. & Chelombit'ko, V. (2007). Chemical composition of *Cynara scolymus* leaves. *Chem Nat Compd*, 43(2):239-240.
67. Awe, S., Mikolasch, A. & Schauer, F. (2009). Formation of coumarines during the degradation of alkyl substituted aromatic oil components by the yeast *Trichosporon asahii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84(5):965-976.
68. Edgar Pastene, Víctor Parada, Marcia Avello, Antonieta Ruiz and Apolinaria García; Catechin-based Procyanidins from *Peumus boldus* Mol. Aqueous Extract Inhibit *Helicobacter pylori* Urease and Adherence to Adenocarcinoma Gastric J. Cells; *Phytother Res* 2014 Nov; 28 (11): 1637-1645.
69. Brent Friesen y Guido F. Pauli; G.U.E.S.S.—A Generally Useful Estimate of Solvent Systems for CCC; *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies* Vol. 28, Iss. 17, 2005.
70. Fernanda das Neves Costa, Gilda Leitao; Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by counter-current chromatography; *Journal of Separation Science* 33(3):336-47 · February 2010.
71. Toru Tanaka, Masami Kawase and Satoru Tani. α -Hydroxyketones as inhibitors of urease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004; 12501–505.
72. Xiao ZP, Shi DH, Li HQ, Zhang LN, Xu C, Zhu HL. Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007; 15, 3703-3710.
73. Pastene, E., Speisky, H., García, A., Moreno, J., Troncoso, M., Figueroa, G., In Vitro and in Vivo Effects of Apple Peel Polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J. J. Agric. Food Chem*. 2010; 58 (12), 7172–7179.

74. Simirgiotis M, Schmeda-Hirschmann G. 2010. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry *J. Chromatogr A* 1217: 443–449.
75. Yahiro K, Shirasaka D, Tagashira M, Wada A, Morinaga N, Kuroda F, Choi O. 2005. Inhibitory Effects of Polyphenols on Gastric Injury by *Helicobacter pylori* VacA Toxin. *Helicobacter* 3: 231-239.
76. Ruggiero P, Rossi G, Tombola F, Pancotto L, Lauretti L, Del Giudice G, Zoratti M. 2007. Red wine and green tea reduces *H. pylori*-or VacA-induced gastritis in a mouse model. *World J Gastroenterol* 3: 349-354.
77. Lee J. S., Um H.Ch., Hahm K., Park Ch.S., Kang D., Surh Y. Natural urease inhibitors. *Cancer Prevention Res.* 2006, 11(2): 129-136 (COR).
78. Scott D, Weeks D, Hong Ch, Postius S, Melchers K, Sachs G. 1998. The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 114:58-70.
79. Mobley HL, Hu LT, Foxall, PA. 2001. *Helicobacter pylori* urease: properties and role in pathogenesis. *Scand. J. Gastroenterol* 26: 39–46.
80. Mine T, Muraoka H, Saika T, Kobayashi I. 2005. Characteristics of a Clinical Isolate of Urease-Negative *Helicobacter pylori* and its Ability to Induce Gastric Ulcers in Mongolian Gerbils. *Helicobacter* 10:125-131.
81. Jadhav S.G., Meshram R.J., Gond D.S., Gacche R.N. Inhibition of growth of *Helicobacter pylori* and its urease by coumarin derivatives: molecular docking analysis. *J Pharm Res.* 2013;7:705–711.
82. Frost, S. & McKenna, R. (2014). Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications. *Book Subce Biochem*, 75:1-427.
83. Supuran, C. (2015). How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *J Enzyme Inhib Med Chem*, 8:1-16.
84. Supuran, C. (2008) Carbonic anhydrases: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov*, 7:168-181.

85. Capasso, C. & Supuran, C. (2015). An overview of the alpha-, beta- and gamma-carbonic anhydrases from Bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria? *J Enz Inhib Med Chem*, 30:325-32.
86. Chirca, L., Elleby, B. & Lindskog, S. (2001). Cloning, expression and some properties of α -carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori*. *Biochem Biophys*, 1544:55-63.
87. Marcus, E., Moshfegh, A., Sachs, G. & Scott, D. (2005). The periplasmic α -carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. *J Bacter*, 187:729-738.
88. Shahidzadeh, R., Openkun, A., Shiotani, A. & Graham, D. (2005). Effect of the carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, on *Helicobacter pylori* infection in vivo: a pilot study. *Helicob*, 10:136-138.
89. Nishimori, I., Minakuchi, T., Morimoto, K., Sano, S., Onishi, S., Takeuchi, H., Vullo, D., Andrea, S. & Supuran, C. (2006). Carbonic anhydrase inhibitors: DNA cloning and inhibition studies of the alpha-carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori*, a new target for developing sulfonamide and sulfamate gastric drugs. *J Med Chem*, 49:2117-2126.
90. Nishimori, I., Minakuchi, T., Kohsaki, T., Onishi, S., Takeuchi, H., Vullo, D., Scozzafava, A. & Supuran, C. (2007). Carbonic anhydrase inhibitors: the beta-carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori* is a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 17:3585-3594.
91. Nishimori, I., Onishi, S., Takeuchi, H. & Supuran, C. (2008). The alpha and beta classes carbonic anhydrases from *Helicobacter pylori* as novel drug targets. *Curr Pharm Des*, 14(7):622-30.
92. Puscas, I. & Ann, N. (1984). Treatment of gastroduodenal ulcers with carbonic anhydrase inhibitors. *Acad Sci*, 429:587-591.
93. Supuran CT; Carbonic anhydrase inhibitors; *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Jun 15;20(12):3467-74.
94. Compostella, M., Berto, P., Vallese, F. & Zanotti, G. (2015). Structure of α -carbonic anhydrase from the human pathogen *Helicobacter pylori*. *Acta Cryst*, 71:1005-1011.

95. Marcus, E., Sachs, G., Wen, Y. & Scott, D. (2016). Phosphorylation-dependent and Phosphorylation-independent Regulation of *Helicobacter pylori* Acid Acclimation by the ArsRS Two-component System. *Helicob*, 21(1):69-81.
96. Supuran CT; How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31(3):345-60.
97. Backet S, Clyne M, Tegtmeyer N. 2011. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal* 9: 1-11.
98. Hessey SJ, Spencer J, Wyatt JI, Sobala G, Rathbone BJ, Axon AT, Dixon MF. 1990. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut* 31: 134-138.
99. Burger O, Ofek I, Tabak M, Weiss E, Sharon N, Neeman I. 2000. A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunol Med. Microbiol* 29: 295-301.
100. Burger O, Weiss E, Sharon N, Tabak M, Neeman I, Ofek I. 2002. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular weight constituent of cranberry juice. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42: 279–284.
101. Zhang L, Ma JL, Pan KF, Go VLW, Chen J, You WC. 2005. Efficacy of cranberry juice on *Helicobacter pylori* infection: A double-blind, randomized placebo controlled trial. *Helicobacter* 10: 139-145.
102. Rohdewald P, Beil W. 2008. In Vitro inhibition of *Helicobacter pylori* growth and adherence to gastric mucosal cells by Pycnogenol. *Phytother Res* 22: 685-688.
103. Allen, L.A. The role of neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2001, 14(3), 273-277.
104. Shimoyama, T.; Fukuda, S.; Liu, Q.; Nakaji, S.; Fukuda, Y.; Sugawara K. *Helicobacter pylori* water soluble surface proteins prime human neutrophils for enhanced production of reactive oxygen species and stimulate chemokine production. *J. Clin. Pathol.* 2003, 56(5), 348-351.
105. Nørgaard A.; Andersen, L. P.; Nielsen H. Neutrophil degranulation by *Helicobacter pylori* proteins. *Gut*. 1995, 36, 354–357.

106. Allen, L. A.; Beecher, B. R.; Lynch, J. T.; Rohner, O. V.; Wittine, L. M. *Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release. *J. Immunol.* 2005, 174, 3658-3667.
107. Unemo, M.; Aspholm-Hurting, M.; Ilver, D.; Bergström, J.; Borén, T.; Danielsson, D.; Teneberg, S. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for Nonopsonic activation of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 2005, 280(15), 15390-15397.
108. Mitjans, M., Mrtínez, V., del Campo, J., Abajo, C., Lozano, C., Torres, JL., Vinardell, MP. Novel epicatechin derivatives with antioxidant activity modulate interleukin-1 β release in lipopolysaccharide-stimulated human blood. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 5031-5034.
109. Ugartondo, V., Mitjans, M., Lozano, C., Tórres, JL., Vinardell, MP. Comparative Study of the Cytotoxicity Induced by Antioxidant Epicatechin Conjugates Obtained from Grape. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 6945-6950.
110. Ugartondo, V., Mitjans, M., Tórres, JL., Vinardell, MP. Biobased Epicatechin Conjugates Protect Erythrocytes and Nontumoral Cell Lines from H₂O₂-Induced Oxidative Stress. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 4459-4465.
111. Lozano, C., Juliá, L., Jiménez, A., Tourin, S., Centelles, JJ., Cascante, M., Torres, JL. Electron transfer capacity of catechin derivatives and influence on the cell cycle and apoptosis in HT29 cells. *FEMS J.* 2006, 273, 2475-2486.
112. Torres, JL., Lozano, C., Julia, L., Sanchez.Baeza, FJ., Anglada, JM., Centelles, JJ., Cascantes, C. Cysteinyl-flavan-3-ol Conjugates from Grape Procyanidins. Antioxidant and Antiproliferative Properties. *Bioorg. & Med.Chem.* 2002, 10, 2497-2509.
113. Dutta, S., Basak, A., Dasgupta, S. Synthesis and ribonuclease A inhibition activity of resorcinol and phloroglucinol derivatives of catechin and epicatechin: Importance of hydroxyl groups. *Bioorg. & Med. Chem.* 2010, 18, 6538-6546.
114. Alonso, C., Ramon, E., Lozano, C., Parra, JL., Torres, JL., Coderch, L. Percutaneous absorption of flavan-3-ol conjugates from plant procyanidins. *Drug Exp. Clin. Res.* 2004, 30, 1-10.

