



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Magíster en Ciencias Mención
Microbiología

**Evaluación del efecto protector de procianidinas naturales
y derivados semi-sintéticos frente a la infección por
*Helicobacter pylori***

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención en Microbiología

EILLEN ROMANET TORRES VALLEJOS
CONCEPCIÓN-CHILE
2017

Profesor Guía: Apolinaria García Cancino
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Se autoriza la reproducción parcial o total, con fines académicos, por cualquier medio
o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento



Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Apolinaria García Cancino
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Edgar Pastene Navarrete
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dr. Carlos González Correa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. María Angélica Mondaca
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Mario Aranda Bustos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi madre Jessica Vallejos, mi padre Carlos Torres y hermano Enrique Torres, quienes fueron mi apoyo fundamental en la construcción de mi desarrollo profesional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo financiero otorgado por el proyecto FONDECYT regular N° 1150948 en el cual trabajé como tesista de post-grado. Este proyecto estuvo encabezado por mi co-tutor Edgar Pastene al cual agradezco infinitamente por su apoyo en ámbito académico y personal además por su generosidad al transmitir su conocimiento y mostrar su visible dedicación e indudable pasión por la ciencia. Agradezco a mi tutora de tesis la doctora Apolinaria García por su preocupación, dedicación y apoyo académico durante todo el proceso de mi tesis, por guiarme y alentarme a seguir con sus sabios consejos. Gracias a mis profesores por enseñarnos a ser autosuficientes y mejores científicos.

Agradezco con especial cariño a mis amigos Romina Carvajal, María José Salas, Alejandra Ilabaca, Mario Romero y Jonathan Lara por acompañarme y entenderme en cada paso, por darme alegrías en momentos de estrés, por compartir viajes y momentos inolvidables que tendrán siempre un lugar en mi corazón. Agradezco a Dios por ponerlos en mi camino para darme la fuerza cada día y hacerme más feliz. Gracias a todos los amigos que me apoyaron en esta decisión de estudiar un magister, por preocuparse de cada paso, por darme siempre una sonrisa de aliento y un momento de felicidad. Gracias a todos quienes hicieron de este proceso un camino más ameno.

Y agradezco por sobre todo a mis padres Carlos Torres y Jessica Vallejos y a mi hermano Enrique Torres por darme el apoyo incondicional, y amor infinito. Ustedes fueron mi gran roca de apoyo, mi compañía y alegría en cada momento. Gracias familia por su grandeza.

Gracias Dios porque pusiste en mi camino a las mejores personas mi familia, amigos, compañeros y profesores. Esta carrera no la corrí sola, sino con Dios y todos ustedes.

“Se fuerte y valiente, no tengas miedo, ni te desanimes, porque el señor tú Dios está contigo donde quiera que tu vayas”. Josué 1:19

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras.....	x
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2. Principales factores de virulencia presentes en <i>H. pylori</i>	3
1.3. Inducción de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	4
1.4. Ureasa y Anhidrasa carbónica en la patogénesis de <i>H. pylori</i>	6
1.5. Rol cooperativo de la ureasa y Anhidrasa Carbónica en la patogénesis de <i>H.pylori</i>	12
1.6. Adherencia como estrategia para la colonización.....	14
1.7. Terapia antibiótica y nuevas alternativas para el tratamiento contra <i>H. pylori</i>	16
1.8. Evidencia de actividad anti <i>H. pylori</i> de compuestos fenólicos.....	19
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
2. METODOLOGÍA.....	24
2.1. Obtención de procianidinas naturales y derivados semi-sintético.....	24
2.1.1. Preparación de extractos y obtención de procianidinas naturales.....	24
2.1.2. Preparación y purificación de derivados semi-sintéticos.....	25
2.1.3. Confirmación por TLC y espectrometría de masas.....	26
2.2. Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la actividad Ureasa y Anhidrasa Carbónica.....	27

2.2.1. Cepas de <i>H. pylori</i> y condiciones de cultivo.....	27
2.2.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	27
2.2.3. Ensayo viabilidad: Medición de los niveles intracelulares de ATP en <i>H. pylori</i>	29
2.2.4. Ensayo sobre actividad ureasa de <i>H. pylori</i>	30
2.2.5. Ensayo sobre la actividad Anhidrasa Carbónica de <i>H. pylori</i>	32
2.3. Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la adherencia de <i>H. pylori</i> y la producción de IL-8.....	33
2.3.1. Ensayo de citotoxicidad en células AGS.....	33
2.3.2. Ensayos anti-adherencia en células AGS mediante imagen molecular en tiempo real.....	34
2.3.3. Ensayo de inflamación.....	35
2.4. Efecto de procianidinas naturales y semi-sintéticos sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados por <i>H. pylori</i>	35
2.4.1. Ensayo de bioluminiscencia en neutrófilos humanos.....	36
2.5. Análisis estadísticos.....	37
3. RESULTADOS.....	38
3.1. Obtención polímeros de procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos a través de ataque nucleofílico.....	38
3.1.1. Obtención de procianidinas naturales desde cáscara de palta y zumo de cranberry.	38
3.1.2. Obtención de procianidinas semi-sintéticas desde extracto de cáscara de palta.....	40
3.2. Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la actividad ureasa y anhidrasa carbónica de <i>H. pylori</i>	46
3.2.1. Determinación de CMI y CMB.....	46
3.2.2. Viabilidad de <i>H. pylori</i> mediante la producción de ATP.....	49
3.2.3. Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la actividad ureasa.....	50

3.2.4. Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la actividad Anhidrasa Carbónica.....	57
3.3. Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la adherencia de <i>H. pylori</i> y la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias en células de adenocarcinoma gástrico (AGS).....	62
3.3.1. Ensayo de citotoxicidad.....	62
3.3.2. Ensayo de adherencia a células AGS.....	64
3.3.3. Ensayo de inflamación.....	66
3.4. Efecto de procianidinas naturales y semi-sintéticos sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados por <i>H. pylori</i>	68
3.4.1. Efecto de procianidinas naturales y semi-sintéticos sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados por <i>H. pylori</i>	68
4. DISCUSIÓN.....	72
4.1. Obtención de polímeros de procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos.....	72
4.2. Determinación de CMI, CMB y viabilidad de <i>H. pylori</i> frente a procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos.....	74
4.3. Efecto de procianidinas y derivados semi-sintéticos frente a la actividad enzimática de la Ureasa y Anhidrasa carbónica de <i>H.pylori</i>	75
4.4. Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos frente a la adherencia de <i>H. pylori</i>	82
4.5. Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos frente a la producción de ERO en neutrófilos estimulados por <i>H. pylori</i>	85
5. CONCLUSIONES.....	88
6. BIBLIOGRAFÍA.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

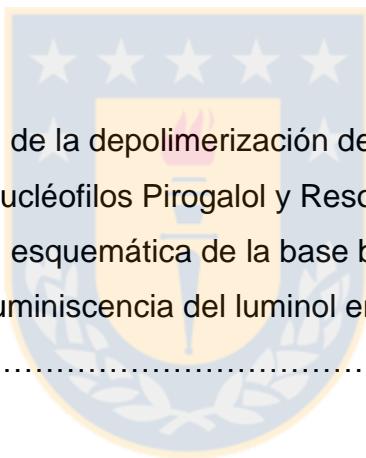
Capítulo 3: RESULTADOS

Tabla 3.1: Rendimiento de extracto polifenólico de palta y craberry sus fracciones poliméricas y derivados semi-sintéticos.....	44
Tabla 3.2: Agentes nucleofílicos usados para la obtención de derivados de procianidinas del extracto de cáscara de palta.....	46
Tabla 3.3: Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida (CMI y CMB) de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos para <i>Helicobacter pylori</i> cepas SS1 y ATCC 43504.....	48
Tabla 3.4: Conversión de concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) a Logaritmos.....	54
Tabla 3.5: IC50 de las ureasa Jack Bean y ureasa de <i>H. pylori</i> cepas ATCC 43504 y SS1.....	56
Tabla 3.6: IC50 de las anhidrasa carbónica comercial y anhidrasa carbónica de <i>H. pylori</i> cepas ATCC 43504 y SS1.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

Figura 1.1: Formas clínicas de la infección por <i>H. pylori</i>	3
Figura 1.2: Producción de ERO en mucosa gástrica infectada con <i>H. pylori</i>	6
Figura 1.3: Conformación aminoacídica del sitio de activo enzima Ureasa.....	9
Figura 1.4: Rol de la ureasa y Anhidrasa Carbónica en la regulación del pH de <i>H. pylori</i>	14



Capítulo 2: METODOLOGÍA

Figura 2.1: Representación de la depolimerización de procianidinas con los agentes nucléofilos Pirogalol y Resorcinol.....	26
Figura 2.2: Representación esquemática de la base bioquímica del uso de la bioluminiscencia del luminol en la detección de ROS.....	37

Capítulo 3: RESULTADOS

Figura 3.1: Obtención de polímeros de procianidinas desde extracto total de cáscara de palta.....	39
Figura 3.2: Obtención de polímeros de procianidinas desde extracto total de cranberry.....	40
Figura 3.3: CPC de los productos de depolimerización de extracto de cáscara de palta con pirogalol.....	42
Figura 3.4: CPC de la depolimerización de extracto de cáscara de palta con resorcinol.....	43
Figura 3.5: Espectros de masas de Epicatequina-Pirogalol.....	45
Figura 3.6: Espectros de masas de Epicatequina-Resorcinol.....	45

Figura 3.7: Determinación de viabilidad celular mediante biooxidación de resazurina. CMI de polímeros de cranberry y cáscara de palta sobre <i>H. pylori</i> cepa SS1 y ATCC 43504.....	47
Figura 3.8: Determinación de viabilidad celular mediante biooxidación de resazurina. CMI de derivados semi-sintéticos de cáscara de palta sobre <i>H. pylori</i> cepa SS1 y 43504.....	48
Figura 3.9: Efecto de procianidinas naturales (A) y semi-sintéticas (B) sobre los niveles intracelulares de ATP de <i>H. pylori</i> (ATCC 43504).....	50
Figura 3.10: Inhibición de la Ureasa Jack Bean por las procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos con diferentes tiempo de incubación a 200 µg/mL.....	51
Figura 3.11: Porcentaje de inhibición de la actividad ureasa Jack Bean por procianidinas naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B).....	55
Figura 3.12: Porcentaje de inhibición de la actividad Ureasa de <i>H. pylori</i> cepa ATCC 43504 por las diferentes procianidinas naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B).....	55
Figura 3.13: Porcentaje de inhibición de la actividad Ureasa de <i>H. pylori</i> cepa SS1 por las diferentes procianidinas naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B).....	56
Figura 3.14: Inhibición de la Anhidrasa carbónica comercial por las procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos con diferentes tiempos de incubación a 100 µg/ml.....	58
Figura 3.15: Porcentaje de inhibición de la Anhidrasa Carbónica Comercial Humana frente a los polímeros naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B).....	60
Figura 3.16: Porcentaje de inhibición de la Anhidrasa Carbónica de <i>H. pylori</i> cepa ATCC 43504 frente a los polímeros naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B).....	60

Figura 3.17: Porcentaje de inhibición de la Anhidrasa Carbónica de <i>H. pylori</i> cepa SS1 frente a los polímeros naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B).....	61
Figura 3.18: Viabilidad de células AGS frente a los polímeros naturales de procianidinas (cranberry y cáscara de palta) (A) y derivados semisintéticos (epicatequina-pirogalol y epicatequina-resorcinol) (B).....	63
Figura 3.19: A) Efecto de la adherencia de <i>H. pylori</i> ATCC 43504 frente a las procianidinas naturales y semi-sintéticas. B) Intensidad de fluorescencia posterior a la infección de células AGS con <i>H. pylori</i> ATCC 43504 marcado con FITC.....	64
Figura 3.20: A) Efecto de la adherencia de <i>H. pylori</i> SS1 frente a las procianidinas naturales y semi-sintéticas. B) Intensidad de fluorescencia posterior a la infección de células AGS con <i>H. pylori</i> SS1 marcado con FITC.....	65
Figura 3.21: Efecto de procianidinas naturales y semi-sintéticas en la producción de interleuquina 8 (IL-8) en células AGS inducido por la cepa ATCC 43504 de <i>H. pylori</i>	67
Figura 3.22: Efecto de procianidinas naturales (A) y semi-sintéticas (B) en la producción de interleuquina 8 (IL-8) en células AGS inducido por la cepa SS1 de <i>H. pylori</i>	67
Figura 3.23: Producción de ERO en neutrófilos estimulados con PMA y <i>H. pylori</i>	69
Figura 3.24: Porcentaje de inhibición de ERO en neutrófilos estimulados con <i>H. pylori</i> 43504 frente a procianidinas naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B).....	70
Figura 3.25: Porcentaje de inhibición de ERO en neutrófilos estimulados con <i>H. pylori</i> SS1 frente a procianidinas naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B).....	71

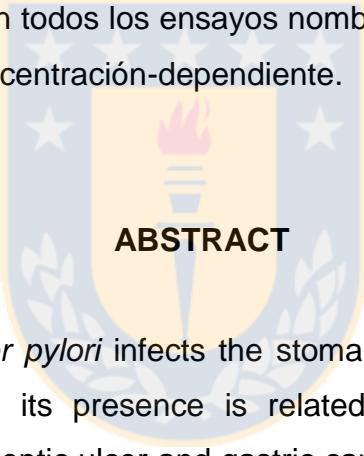
RESUMEN

H. pylori es conocido porque infecta la mucosa gástrica humana de la mitad de la población mundial y se asocia directamente con patologías como gastritis, linfoma de MALT, ulceras pépticas y cáncer gástrico. A pesar de que existe un tratamiento antibiótico con aceptables tasas de recuperación, la resistencia bacteriana va en aumento. Por este motivo es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos contra *H. pylori*. Actualmente se reconoce que productos naturales como las proantocianidinas (PACs) poseen efecto anti-*H. pylori*, ayudando a inhibir el efecto de ciertos factores de virulencia de *H. pylori* como la ureasa y anhidrasa carbónica (AC) las cuales están encargadas de neutralizar el entorno ácido del estómago, lo que permite su supervivencia. También estos compuestos han sido evaluados como potentes inhibidores de la adherencia bacteriana al epitelio gástrico.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos sobre factores de virulencia de *H. pylori* y estudiar si dichas moléculas ejercen un efecto protector frente a la infección *in vitro*. Estos derivados semi-sintéticos fueron preparados por ataque nucleofílico a partir de PACs naturales (cáscara de palta) con los agentes pirogalol y resorcinol. El aislamiento de las procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos se llevó a cabo mediante cromatografía de partición centrífuga (CPC), las muestras obtenidas fueron identificadas por cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquido con espectrometría de masas (LC-MS). Con las muestras obtenidas se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) en medio líquido. La viabilidad bacteriana fue monitoreada a través de la cuantificación de los niveles de ATP. Posteriormente se realizaron ensayos sobre la actividad ureasa y AC de *H. pylori*. Finalmente se probaron estos PACs y aductos sobre la adherencia de *H. pylori* y la inflamación promovida en células AGS. Debido a la naturaleza polifenólica de PACs y aductos se evaluó su capacidad de eliminar la

producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en neutrófilos estimulados por *H. pylori*.

De todos los compuestos utilizados, el derivado de pirogalol presentó la menor CMI y logró comprometer tempranamente y en mayor grado la viabilidad bacteriana. Todos los compuestos mostraron ser buenos inhibidores de las enzimas ureasa y anhidrasa carbónica, siendo el derivado de pirogalol el que logró un mayor porcentaje de inhibición, en todos los casos se observó un efecto tiempo-dependiente. En los ensayos sobre células AGS se observó que los compuestos reducen significativamente la adherencia de *H. pylori* y la producción de IL-8. Además se encontró que estos compuestos lograron inhibir la producción de ERO en neutrófilos estimulados con *H. pylori*. En todos los ensayos nombrados se observó que el efecto de estos compuestos es concentración-dependiente.



ABSTRACT

It is known that *Helicobacter pylori* infects the stomach of approximately the half of the world's population and its presence is related with gastric pathologies like gastritis, MALT lymphoma, peptic ulcer and gastric cancer. Despite the existence of a consensual treatment with antibiotics and acceptable recovery rates, bacterial resistance is increasing. For this reason, it's necessary to search news molecules with potential against *H. pylori*. Recently is recognized that natural products such as proanthocyanidins (PACs) possess an anti-*H. pylori* effect associated with its ability to neutralize certain virulence factors like the bacterial enzymes urease and carbonic anhydrase (CA). Both enzymes helps *H. pylori* to neutralize the acidic environment of the stomach, allowing it to survive for decades. Also, PACs have been evaluated as potent inhibitors of the pathogen adherence to gastric mucosa.

The aim of the present study was to evaluate the effect of natural proanthocyanidins (PACs) compared with its semi-synthetic derivatives on *H. pylori*'s virulence factors and to study if such molecules have protector effects upon in vitro infection. These semi-synthetic derivatives were prepared by nucleophilic attack of natural PACs (from avocado peels), with pyrogallol and resorcinol. Isolation of PACs and its semi-synthetic derivates was performed through CPC, and further identification was done by TLC and LC-MS. For these new compounds, CMI and CMB were determined in liquid media. Also, bacterial viability was monitored through ATP level quantification. Later, inhibition assays were performed upon urease and carbonic anhydrase. Finally, the effect of PACs adducts on the adherence of *H. pylori* to AGS cells was tested using FITC-Labeled bacteria. In the same cell model the synthesis of pro-inflammatory IL-8 was also assessed. Additionally, due to the polyphenolic nature of PAC-adducts we evaluate its ability to scavenge the ROS production in *H. pylori*-stimulated human neutrophils.

Of all compounds used, epicatechin-pirogaloll adduct presented the lowest MIC. This latter compound promoted an early reduction in bacterial viability. All compounds shown to be good inhibitors of urease and carbonic ahhidrase enzymes, being epicatechin-pirogaloll the one that reach the greater inhibition percentage. In the AGS cells assays, all compounds reduce significantly the *H. pylori* adherence and IL-8 production. Also it was found that this compounds inhibit ROS production in *H. pylori*-stimulated neutrophils. In all cell assays, a concentration-dependent effect was observed.

1. INTRODUCCIÓN

1.1- *Helicobacter pylori*

Esta bacteria fue incorporada a la comunidad científica gracias a los trabajos realizados por Robin Warren y Barry Marshall, lo que les significó obtener el premio nobel en Fisiología y Medicina en el año 2005. El año 1982 Warren y Marshall lograron aislar *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 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 (Ahmed, 2005), por esto Marshall en 1984 decide auto-infectarse. Al séptimo día comenzaron náuseas y vómitos, la segunda biopsia evidenció la presencia de la bacteria, luego inició un tratamiento con sales de bismuto y Metronidazol, y en la 3º endoscopia realizada pasado un mes finalizado el tratamiento demostró que las bacterias habían desaparecido de su mucosa gástrica (Marshall *et al.*, 1985).

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 la úlceras gastroduodenal 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) (IARC, 1994).

H. pylori es un bacilo espiralado, Gram negativo y microaerófilo, que se encuentra en la mucosa gástrica del estómago humano, su tamaño es de 0.5 a 1.0 micras de ancho y 3 micras de largo, puede tener de 4 a 6 flagelos unipolares fundamentales para su movilidad de 2.5 a 4.5 micras de longitud (Moncayo *et al.*, 2012) tiene morfología espiral en forma de sacacorchos cuando se encuentra en la mucosa gástrica y menos espiral cuando crece en medios de cultivo artificiales. Esta forma

espiralada se puede perder en los cultivos más viejos o sometidos a condiciones desfavorables para su crecimiento, adoptando la forma cocoide (Amieva, 2008). Esta transformación depende del tiempo de cultivo, del cambio de concentración de oxígeno en el medio ambiente, tratamiento a antibióticos y del acceso a nutrientes, entre otros factores (Neng *et al.*, 2013). La temperatura de crecimiento óptima para su multiplicación es de 37°C en condiciones de microaerofilia y una concentración aproximada de CO₂ del 10%. El cultivo in vitro de *H. pylori* tiene un pH óptimo de crecimiento cercano a 7 y se requiere medios suplementados con suero o sangre entre el 5-10%, los cuales actúan como fuentes adicionales de nutrientes (Fauci *et al.*, 2009).

H. pylori tiene una gran importancia a nivel mundial, tanto por su prevalencia como por las patologías que provoca (Izquierdo *et al.*, 2015), es probablemente la más común de las infecciones bacterianas crónicas de los seres humanos. Su prevalencia mundial es cercana al 50% y es mayor aún en los países subdesarrollados, aquí la infección es corrientemente adquirida en la niñez y en ausencia de tratamiento puede persistir toda la vida (Chávez *et al.*, 2011). Específicamente en Chile, la prevalencia de *H. pylori* alcanza un 73% en adultos asintomáticos y se ha asociado altamente al desarrollo de cáncer gástrico. Chile ocupa el quinto lugar a nivel mundial de los países con mayor incidencia de cáncer gástrico, siendo este último la segunda causa de muerte a nivel mundial (Ferreccio *et al.*, 2007).

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. Algunos factores que se asocian con alta incidencia de la infección son hacinamiento en la vivienda y ausencia de agua potable en el hogar (González *et al.*, 2006).

Se acepta su participación en la causalidad de gastritis, úlcera péptica, linfoma de MALT e incluso se asocia el desarrollo del cáncer gástrico (Mendes, 2014). A pesar

de la alta prevalencia de la infección por *H. pylori*, sólo una minoría de individuos infectados desarrolla una patología severa maligna. Esto puede deberse a la diversidad genética entre individuos, a factores ambientales, como tipo de dieta, edad de la primera infección y a factores de virulencia específicos de la bacteria (García *et al.*, 2006). 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 (Suerbaum & Micheti, 2002) (Fig. 1.1)

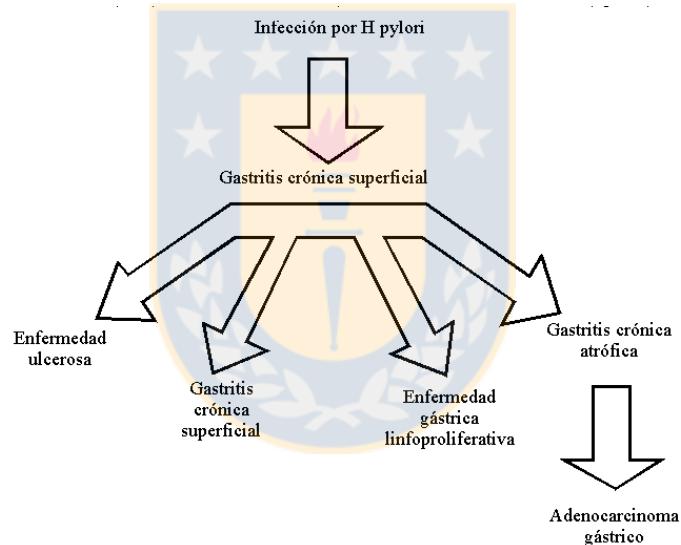


Figura 1.1: Formas clínicas de la infección por *H. pylori*. Fuente: González *et al.*, 2006, *Acta Gastroenterol. Latinoam.*, 40:206-210.

1.2 Principales factores de virulencia presentes en *H. pylori*

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 (Geis *et al.*, 1993), las enzimas ureasa y anhidrasa carbónica permiten la neutralización del medio ácido del estómago, 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) (Ilver *et al.*, 1998), 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 alcohol deshidrogenasa y la isla de patogenicidad (CagA) el gen cagA pertenece a la isla de patogenicidad cag (PAI), que codifica un sistema de secreción de tipo IV (T4SS), un dispositivo de pilus de tipo aguja que proporciona proteínas efectoras tales como la oncoproteína CagA en el citoplasma de las células epiteliales gástricas (Castillo *et al.*, 2004).

1.3 Inducción de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Inicialmente las bacterias necesitan penetrar en el organismo hasta llegar a la zona donde van a persistir y producir su efecto patógeno (Allen, 2008). A la entrada de bacterias patógenas, los neutrófilos en el cuerpo inmediatamente fagocitan a las bacterias para formar fagosomas. En éstas estructuras los neutrófilos matan a los patógenos invaginados por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y enzimas proteolíticas. La producción de ROS es catalizada por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa; Nox) en la membrana celular (Machado *et al.*, 2010). Este sistema se encuentra conformado por 5 subunidades proteicas, 3 de ellas (p40phox, p47phox y p67phox) se encuentran en el citoplasma formando un complejo macromolecular, mientras que el resto (gp91phox y p22phox) están localizadas en la membrana de los fagolisosomas y la membrana plasmática, donde constituyen un heterodímero llamado flavocitocromo b558.

La activación del mismo da comienzo al fenómeno llamado “estallido respiratorio”, que se caracteriza por la liberación de ROS. Tras la activación fagocítica, grandes cantidades de MPO (Mieloperoxidasa) activa se secretan en los fagosomas, y éste cataliza la producción de ácido hipocloroso altamente bactericida (HOCl) con H₂O₂ e iones cloruro (Cl⁻) como sustratos. Aparte de HOCl, MPO cataliza la formación de otras especies moleculares reactivas tales como radicales tirosilo, aldehídos y quizás radicales hidroxilo (OH[•]) y oxida el óxido nítrico (NO[•]) para producir nitrito. Cada uno de estos productos pueden activar directamente o indirectamente cascadas de señalización celular o reaccionar adicionalmente para inducir la lesión celular tanto de las especies invasoras y el tejido huésped (Uberti *et al.*, 2013) (fig 1.2)

Desde el descubrimiento de *H. pylori* las investigaciones se han centrado en aclarar el papel preciso de esta bacteria en la patogénesis gástrica. En particular, los mecanismos responsables para el desarrollo de gastritis crónica que activan el carcinoma gástrico han sido estudiados por muchos investigadores. La gastritis puede progresar a cáncer gástrico, y se cree actualmente que el cáncer gástrico se debe a múltiples factores, incluyendo el estrés oxidativo y las toxinas ambientales, que aumentan las tasas de mutación de ADN. Se ha observado exceso de la producción de ROS / RNS en la mucosa gástrica humana infectada con *H. pylori* (Handa *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2009), lo que se correlaciona directamente con daño histológico de la mucosa. Tras la infección, *H. pylori* causa fuerte inflamación en la mucosa gástrica. Sin embargo, el sistema inmunitario humano no puede eliminarla, y logra sobrevivir en el estómago e inducir inflamación crónica con una marcada infiltración de neutrófilos polimorfonucleares. Una de las razones para este fenómeno es que *H. pylori* es básicamente no invasiva, y por lo tanto el huésped tiene una respuesta inflamatoria inducida por el sistema inmune que no siempre reconoce a *H. pylori* (Machado *et al.*, 2009).

La actividad de la ureasa también puede ser responsable indirectamente del daño tisular mediante su interacción con el sistema inmune, estimulando el estallido respiratorio de neutrófilos. Ello se ha demostrado experimentalmente con células intactas de *H. pylori*, las cuales son capaces de estimular e inclusive causar una activación directa del estallido respiratorio de leucocitos, neutrófilos polimorfonucleares y monocitos; además ejerce acción quimiotáctica sobre otras células inflamatorias mediante liberación de citoquinas proinflamatorias e intermediarios del oxígeno reactivo que colaboran con el proceso inflamatorio (Bryk *et al.*, 2000).

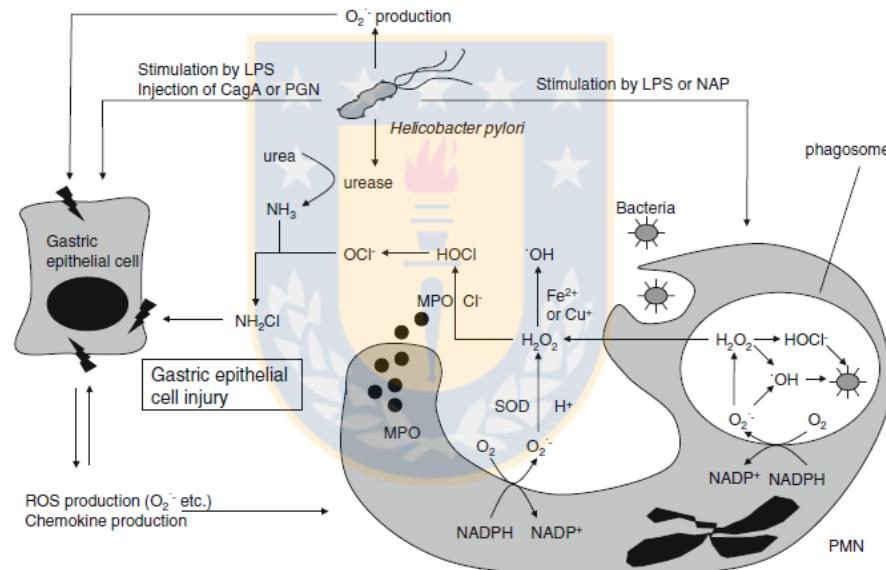


Figura 1.2: Producción de ERO en mucosa gástrica infectada con *H. pylori*. Fuente: Handa *et al.*, 2010, *Inflamm. Res.* 59: 997–1003.

1.4.- Ureasa y Anhidrasa carbónica en la patogénesis de *H. pylori*

Una de las enzimas más importantes para *H. pylori* es la ureasa, la cual es esencial para la colonización gástrica ya que neutraliza la acidez, lo que permite la supervivencia bacteriana (Hong *et al.*, 2003). El jugo gástrico normal posee un pH <

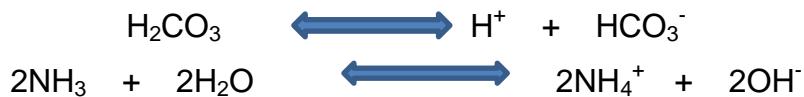
3, el cual le confiere un carácter bactericida capaz de eliminar a muchas de las bacterias que llegan al estómago con la ingesta de agua y alimentos. La colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* implica la capacidad de esta bacteria de sobrevivir en ese ambiente ácido. Así, la clave para la adaptación al pH gástrico reside en la producción de ureasa (Chávez *et al.*, 2011). La mayor parte de la ureasa (urea amidohidrolasa) se encuentra en el citoplasma bacteriano y sólo una pequeña cantidad se encuentra en la superficie de la célula bacteriana. Esta enzima tiene un pH óptimo entre 7,5 y 8,0 y se inactiva irreversiblemente por debajo de pH 4,0 o pH 3,0 (Hong *et al.*, 2003). La ureasa (urea amidohidrolasa: EC 3.5.1.5) cataliza la hidrólisis de la urea para producir amoniaco y carbamato (Kot *et al.*, 2011).



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



En soluciones acuosas, el ácido carbónico liberado y las dos moléculas de amoniaco están en equilibrio con sus formas desprotonadas y protonadas, respectivamente. El efecto neto de estas reacciones es un aumento en el pH (Mobley *et al.*, 2001), proporcionándole un pH casi neutro a la periferia de la bacteria lo que le permite evadir las propiedades bactericidas del ácido clorhídrico presente en el estómago. Además las altas concentraciones de amonio alteran la biosíntesis del mucus gástrico causando lesiones en el tejido local de la mucosa gastroduodenal, especialmente en las uniones intracelulares (Moncayo *et al.*, 2012)



Como fue mencionado anteriormente, el hidróxido de amonio generado durante la hidrólisis de urea contribuye significativamente al daño histológico asociado con esta infección, aunque debe enfatizarse que directamente el amonio no es tóxico, si no que el daño infringido es el resultado del ión hidróxido generado por el equilibrio del amonio con el agua. Este desdobra el moco gástrico, haciéndolo más fluido, con lo cual la bacteria puede desplazarse más fácilmente para ganar los espacios intercelulares. En la capa de moco funciona uno de los mecanismos que protegen la mucosa del propio ácido, lo cual se conoce como el gradiente de bicarbonato, por lo tanto, al licuarse el moco se pierde parte de esa protección lo que colabora en la formación de la gastritis. (Krajewsk, 2011).

La actividad de la ureasa también es dependiente de la afluencia de urea, que es controlada por una porina situada en la membrana externa y el canal Urel, lo que aumenta aproximadamente 300 veces la difusión de urea al citoplasma de *H. pylori* cuando el pH cae a niveles críticos (Bury -Moné *et al.*, 2001).

La ureasa es la enzima más estudiada de todos los productos génicos de *H. pylori*, pesa 600 kDa, es codificada por siete genes (*ureA* a *ureG*) y representa alrededor de 2-16% del total de sus proteínas celulares (Fahey *et al.*, 2013). La estructura cristalina de la ureasa se revela como $[(\text{UreAB})_3]_4$, 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 (Lam *et al.*, 2010) (fig. 1.3)

Además esta enzima cumple un rol en la quimiotaxis, ya 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 mencionado anteriormente 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 (Amtul *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2006).

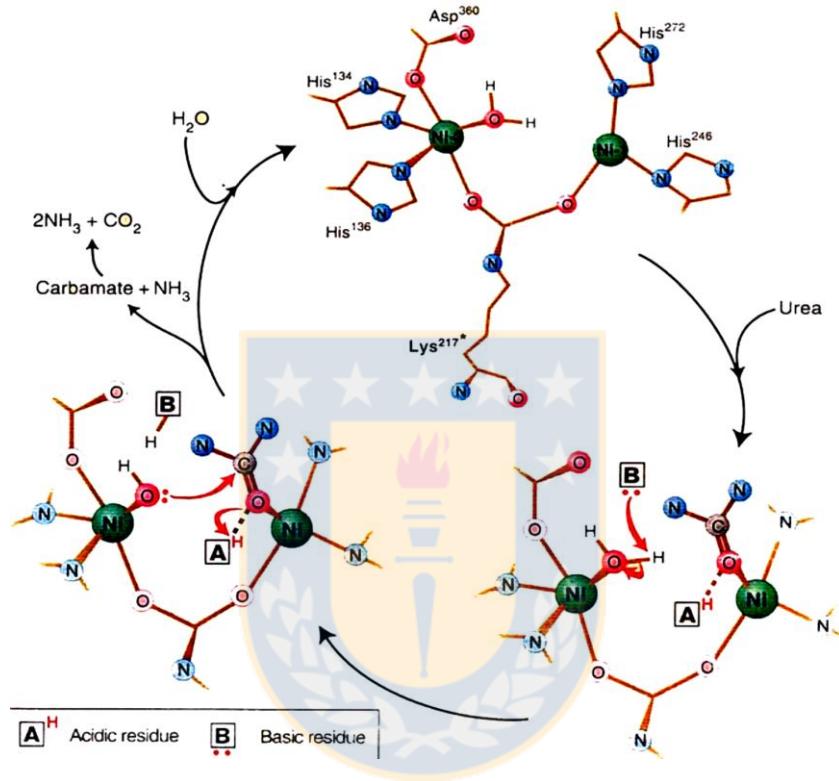


Figura 1.3. Conformación aminoacídica del sitio de activo enzima ureasa. Fuente: Amtul *et al.*, 2002, *Curr Med Chem*, 9(6): 1323-1348.

Recientemente se ha establecido que la ureasa no es la única enzima que *H. pylori* utiliza para neutralizar el HCl y lograr prevalecer en la mucosa gástrica. Se sabe que la AC (anhidrasa carbónica) también conocida como carbonata deshidrogenasa de esta bacteria actúa cooperativamente con la ureasa, ayudando a neutralizar el pH del entorno por medio de la producción de bicarbonato (Marcus *et al.*, 2005) (Fig. 2). Existe una estrecha relación entre la ureasa y AC, que permiten a esta bacteria

realizar un control fino del pH circundante. De hecho, *H. pylori* está dotado con sistemas sensores de pH (HP0244, ARS, ExDb) que le permiten detectar cambios en el pH y ensamblar más ureasa para producir amoniaco citoplasmático (Scott *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2009).

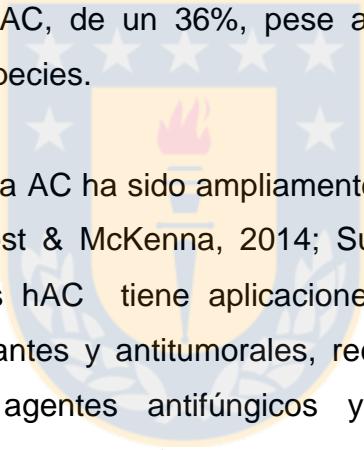
La AC es una metaloenzima que contiene un cofactor de Zn^{+2} en su sitio activo, y cataliza la conversión rápida de dióxido de carbono y agua a bicarbonato y protones H⁺ y HCO₃⁻ ($CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$) (Mayank *et al.*, 2013). El mecanismo de acción de AC se puede separar en 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. (Alterio *et al.*, 2012).

En literatura se mencionan seis grupos de estas metaloenzimas: α-, β-, γ-, δ-, ζ-, η-ACs. La α-AC se expresa en los vertebrados, protozoos, algas, plantas verdes y bacterias; β-AC en las plantas y los procariotas; γ-AC en arqueas; δ-AC y ζ-AC se expresan en diatomeas marinas; y η en protozoos. La mayoría de los grupos utilizan de cofactor en el sitio activo el Zn⁺². Las AC han sido ampliamente estudiadas, en especial las ACs humanas (hAC). Esto se debe a que participan en muchos procesos fisiológicos o patológicos. Los seres

humanos presentan la AC de tipo α las que se subdividen en 16 isoformas que varía según la localización y actividad. Principalmente, las isoformas de AC I y II son las más estudiadas por su alta distribución en el organismo y su participación en procesos patológicos (Pastorekova *et al.*, 2004; Supuran, 2008; 2010; 2011 y 2015).

H. pylori cuenta con dos AC, una citoplásrica (HpβCA) y una periplásrica (HpαCA), un grupo de investigadores clonaron inicialmente la HpαAC. Este grupo informó que

la H_{pa}AC tenía una actividad catalítica similar a la hACI (Chirica *et al.*, 2001), y posteriormente (Chirica *et al.*, 2002), describieron el tipo de estructura de la H_{pa}AC e informaron que compartían un 28% de identidad con la secuencia de la hACII. La H_{pa}CA está compuesta por un dímero que contiene dos monómeros esencialmente iguales a diferencia de las AC de mamíferos ya que son de tipo monoméricas. Cada monómero presenta 226 residuos aminoacídicos (Compostella *et al.*, 2015). H_{pa}AC muestra cierta similitud con otras estructuras de α-AC bacterianas ya estudiadas incluyendo un 39% de identidad con *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* (Di Fiore *et al.*, 2013), un 37% de identidad con *Thermovibrio ammonificans* en las secuencias (James *et al.*, 2014) y un 36% de identidad en las secuencias con *Neisseria gonorrhoeae* (Huang *et al.*, 1998). También H_{pa}AC muestra una similitud relativamente alta con la hAC, de un 36%, pese a que hay una larga distancia evolutiva entre estas dos especies.

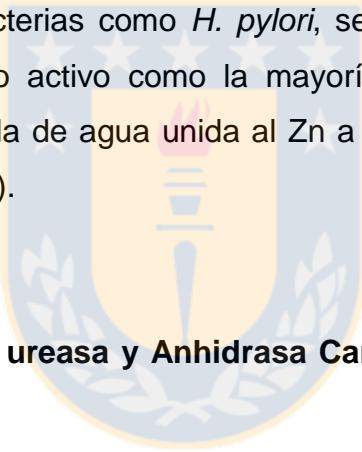


El diseño de inhibidores de la AC ha sido ampliamente estudiado por estar implicada en distintas patologías (Frost & McKenna, 2014; Supuran, 2015; Lomelino *et al.*, 2016). La inhibición de las hAC tiene aplicaciones en el desarrollo de drogas antiglaucoma, anticonvulsivantes y antitumorales, recientemente se ha descrito su posible aplicación como agentes antifúngicos y antibacteriales. La AC es clásicamente inhibida por los compuestos que presentan un grupo de unión a zinc, entre los diversos inhibidores se destacan sulfonamidas, sulfamidas y sulfamatos, utilizados en terapias de patologías del tejido renal, cardiaco, hepático, sistema nervioso central, así como también de los epitelios ocular, oído interno y mucosa nasal. En seres humanos, sólo las isoformas de AC tales como AC II, VI, VII, IX, XII y XIII son susceptibles de ser inhibidas por sulfonamidas (Chirica *et al.*, 2001).

Al igual que las α-ACs de otras especies, H_{pa}AC es inhibida por las sulfonamidas, en particular por la acetazolamida (Chirica *et al.*, 2002; Marcus *et al.*, 2005; Shahidzadeh *et al.*, 2005; Nishimori *et al.*, 2006; 2007). Por lo tanto, uno de los inconvenientes de la utilización de sulfonamidas es que inhiben todas las isoformas

de AC de manera no específica, además, existe un gran número de isoformas en muchos tejidos y órganos humanos (Supuran, 2010) 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 HpaAC debe garantizar que estas nuevas moléculas en lo posible, sean altamente específicos y no clásica, es decir, que no se basen en las estructuras de sulfonamidas, sulfamatos, o sulfamidas (Compostella *et al.*, 2015; Supuran, 2015; Marcus *et al.*, 2016; Pastene *et al.*, 2016).

Durante el último tiempo se están investigando compuestos fenólicos que actuarían frente a AC de algunas bacterias como *H. pylori*, se cree que estos no se unirían directamente al Zn del sitio activo como la mayoría de los inhibidores sino que interactúan con una molécula de agua unida al Zn a través de un enlace puente de hidrógeno (Sethi *et al.*, 2011).



1.5 Rol cooperativo de la ureasa y Anhidrasa Carbónica en la patogénesis de *H. pylori*

Como fue mencionando anteriormente, esta enzima actúa cooperativamente con la ureasa, ayudando a neutralizar el pH ácido del entorno por medio de la producción de bicarbonato (Chirica *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2007). En la figura 1.4 se observa el mecanismo de aclimatación ácida de *H. pylori*, el cual está dotado de un sistema sensor de pH (HP0244, ArsRS) (Scott *et al.*, 2010; Marcus *et al.*, 2012, Marcus *et al.*, 2016), que se activa cuando se expone a acidez.

Estos activan la sobre regulación de los genes que contribuyen en aumentar la actividad ureasa mediante la conversión de la apoenzima en ureasa activa (Mobley *et al.*, 1995; Sachs, 2003; Sachs *et al.*, 2006). A su vez el canal Urel, por la activación del pH ácido se abre y aumenta la difusión de urea en el citoplasma por al

menos 300 veces. Esta difusión rápida mediada por Urel conduce a la máxima actividad de la enzima ureasa (Voland *et al.*, 2003; Sachs *et al.*, 2006) hidrolizando la urea a ácido carbónico y amoniaco. El amoniaco difunde por la membrana interna para neutralizar los iones H^+ , convirtiéndose en amonio, para mantener el pH neutro. También difunde a través de la membrana externa para neutralizar la acidez del medio y puede neutralizar los protones que entran en el citoplasma (Sachs *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2007; Marcus *et al.*, 2009). Sin embargo, no es un tampón suficiente para mantener el entorno neutro, específicamente del periplasma. Es por ello que la AC cumple un rol muy importante y está estrechamente relacionada, debido a que mantiene el pH periplásmico del ambiente ácido del estómago (Marcus *et al.*, 2005).

H. pylori cuenta con dos AC, una citoplásrica ($H\beta AC$) y una periplásrica ($H\alpha AC$) que poseen ciertas modificaciones que le permiten su ubicación en la membrana interna de la bacteria con el sitio catalítico frente al periplasma (Chirica *et al.*, 2002). La $H\beta AC$ es quien toma el producto de la hidrólisis de la urea, específicamente H_2CO_3 , y lo convierte en CO_2 y H_2O . Estas moléculas (CO_2 y NH_3) difunden a través de la membrana interna hacia el periplasma, donde el CO_2 es tomado por la $H\alpha AC$ y es convertida a HCO_3^- y H^+ y este reacciona con el producto NH_3 . El bicarbonato amortigua el periplasma para mantenerlo a un pH 6,1 y actuar como una barrera evitando que el ácido del medio gástrico llegue al interior de la bacteria (Sachs, 2005; Scott *et al.*, 2007; Marcus *et al.*, 2012). Cabe destacar que la isoforma citoplásrica tiene una actividad catalítica 3,2 veces mayor que la de α -AC

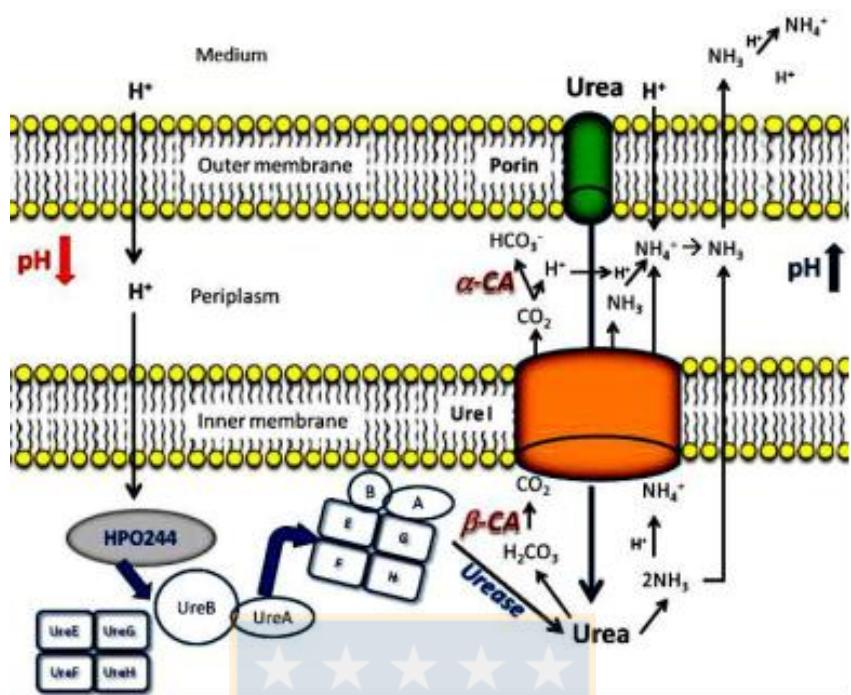


Figura 1.4: Rol de la ureasa y Anhidrasa Carbónica en la regulación del pH de *H. pylori*. Fuente: Adaptado de Supuran, 2008 *Nat Rev Drug Dis*, 7:168-181.y Scott et al., 2007, *J. Bacteriol*, 192(1):94-103.

1.6. Adherencia como estrategia para la colonización

Luego que *H. pylori* logra llegar al estómago, una estrategia importante para que permanezca en la mucosa gástrica humana es la adherencia, esto es un primer paso en la colonización y permanencia en el epitelio gástrico. *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica de humanos al adherirse y penetrar en la capa de moco que cubre el epitelio gástrico (Oleastro & Ménard, 2013). Esta colonización del estómago provoca respuestas inmunes humorales y celulares que en la mayoría de los casos no dan lugar a la eliminación de la bacteria. La bacteria ha desarrollado un conjunto único de factores, apoyando su supervivencia y persistencia éxito en su nicho ecológico, a lo largo de la vida del individuo, si no es tratada.

H. pylori se adhiere a las células epiteliales a través las adhesinas las cuales son proteínas bacterianas, que están implicadas en las etapas iniciales de la colonización por medio de la interacción entre la bacteria y la superficie de la célula huésped (Backert, 2011). *H. pylori* se une con adhesinas que son proteínas de superficie (OMPs), algunas de éstas son BabA, SabA, AlpA/B, OipA, Hop Z, HomB. BabA (blood antigen binding adhesion) OMP28 (~ 80 kDa) es la principal adhesina, esta se une a las células epiteliales gástricas a través de los antígenos de Lewis Le^b (Mahdavi *et al.*, 2002), este antígeno se expresan en la superficie de mucinas (MUC1 y MUC5B) y las células epiteliales gástricas (Aspholm *et al.*, 2004). Llamó la atención, el primer aislamiento de una cepa portadora del gen *babA2*, en aislados clínicos de *H. pylori* en Chile, gen que codifica para la proteína BabA, que se ha asociado con mayor adherencia y patologías más severas (Garcia *et al.*, 2006). Tanto in vitro e in vivo revelaron que la adhesión mediada por BabA a Le^b en la superficie epitelial es un potenciador de la actividad del sistema de secreción T4SS de *H. pylori*, desencadenando así la transcripción de genes que aumentan la inflamación, el desarrollo de metaplasia intestinal, y las transformaciones precancerosas asociadas (Ishijima *et al.*, 2011). Sorprendentemente, un estudio realizado, demostró que un pequeño grupo de cepas que producían bajos niveles de BabA y que carecen de unión a Le^b eran más propensos a estar asociados con un aumento de la inflamación de la mucosa y con resultados clínicos graves (Fujimoto *et al.*, 2007)

SabA (sialic acid binding adhesin) OMP17 (~ 70 kDa) la segunda adhesina mejor caracterizada (Walz *et al.*, 2009), se une al antígeno de Lewis-X (Le^x), SabA al igual que BabA participa en la unión de *H. pylori* a la mucina salival MUC5B, pero en menor medida. Varios estudios mostraron que la adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica desempeña un papel fundamental en el resultado de la infección. Al llegar *H. pylori*, neutrófilos y monocitos se infiltran en la mucosa gástrica. SabA de *H. pylori* no opsonizado se une específicamente a los neutrófilos a través de los hidratos de

carbono sialilados. Como consecuencia, los neutrófilos estimulados producen especies reactivas de oxígeno causando daño oxidativo del epitelio gástrico, lo que demuestra que Saba es sin embargo un cierto factor de virulencia (Nuñez *et al.*, 2006).

Tras su adhesión a la mucosa, *H. pylori* secreta toxinas de naturaleza peptídica, como son VacA y la CagA (propias del *H. pylori*), ambas son capaces de actuar localmente sobre el epitelio blanco. Si bien *H. pylori* logra asociarse al epitelio gástrico con bastante éxito, una vez ahí debe lidiar con la primera línea de defensa constituida por la inmunidad innata.

1.7 Terapia antibiótica y nuevas alternativas para el tratamiento contra *H. pylori*

El tratamiento triple estándar en base a un inhibidor de la bomba de protones (IBP) más dos antibióticos (amoxicilina, claritromicina o metronidazol) en esquemas de 7 a 14 días ha sido recomendado como de primera línea en los diferentes consensos (Martínez *et al.*, 2014). Datos recientes muestran un descenso del éxito de la erradicación con la triple terapia estándar llegando solo al 60%, debido fundamentalmente a la creciente resistencia a los antibióticos, en especial a la claritromicina (Dacoll *et al.*, 2014). La resistencia antibiótica varía según las diferentes áreas geográficas, por lo cual es importante considerar las tasas de resistencia de cada país en el momento de elegir el plan antibiótico (Graham *et al.*, 2010).

La resistencia al metronidazol en Uruguay es de 36%, en Chile de 44,9% y en México de 76,9%, en tanto que la resistencia a la claritromicina en Uruguay es de 12%, en Chile de 20% y en México de 24% (Torres *et al.*, 2009; Vallejos *et al.*, 2007; Camargo *et al.*, 2014). Cuando el índice de resistencia a la claritromicina en la región

es mayor de 15% a 20%, no debería emplearse el triple plan estándar (Malfertheiner *et al.*, 2012). El ultimo conceso de Maastricht V se confirma que las tasas de resistencia de *H. pylori* a los antibióticos están aumentando en la mayoría de las partes del mundo, mientras que las tasas de erradicación han disminuido. Por lo tanto, las recomendaciones para el tratamiento de *H pylori* que surgen de los consensos deberán adaptarse a cada área geográfica.

El consenso 2016 indica que una vez que se detecta *H. pylori* debe tratarse inmediatamente. Dado el descenso de la eficacia de la triple terapia estándar, surgen tratamientos alternativos para la infección por: terapia secuencial, concomitante, cuádruple con y sin bismuto, y triple con nuevas drogas como levofloxacina, moxifloxacina o rifabutina (Gisbert *et al.*, 2013; Malfertheiner *et al.*, 2016).

El consenso Mastricht 2016 recomienda que la triple terapia con PPI-claritromicina deba abandonarse cuando la tasa de resistencia a la claritromicina en la región sea superior al 15% utilizando triple terapia con metronidazol. La eficacia de la triple terapia estándar va en descenso, algunas razones se deben a la alta acidez gástrica, alta carga bacteriana y cepas bacterianas, pero lo más importante es el aumento de la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina. Por lo tanto el consenso recomienda que en las zonas de alta resistencia a la claritromicina ($> 15\%$) se utilice terapias cuádruple con bismuto o cuádruple sin bismuto, concomitantes. En áreas de alta resistencia a ambos antibióticos (claritromicina y metronidazol), la terapia cuádruple con bismuto (BQT) es el tratamiento de primera línea recomendado.

Actualmente, la terapia concomitante (PPI, amoxicilina, claritromicina y un nitroimidazol (administrado simultáneamente) recomendado por 14 días y no la terapia cuádruple con bismuto, ya que ha demostrado ser la más eficaz para superar resistencia antibiótica. (Malfertheiner *et al.*, 2016).

Debido al problema mencionado anteriormente sobre las tasas de resistencia a los antibióticos, es necesario abordar nuevas formas de inhibir el crecimiento de esta bacteria en el estómago ya sea reduciendo el daño en la mucosa gástrica, atacando

sus principales factores de virulencia o impidiendo su adhesión al epitelio. Así, las alternativas terapéuticas o preventivas han cobrado fuerza en los últimos años. En este ámbito se ha encontrado que los compuestos polifenólicos poseen efectos anti-*H. pylori* ya que su principal sitio de acción es en el tracto gastrointestinal (Pastene *et al.*, 2014). Un tipo de polifenol de gran importancia son las procianidinas, las cuales presentan un variado rango de actividades biológicas, entre las que se pueden mencionar la anti-inflamatoria, antibiótica, hepatoprotectora, antiviral, antioxidante, antihipertensiva, la modulación de procesos de inmunidad celular y la acción sobre sistemas enzimáticos (Ricco *et al.*, 2008). Habitualmente, las cáscaras de muchos frutos concentran compuestos biológicamente activos como los polifenoles, los cuales poseen algunas de las propiedades mencionadas, y por ello pueden ser empleados en el desarrollo de ingredientes funcionales. La principal ventaja de tales compuestos es su baja toxicidad con respecto a otras sustancias. Los flavonoides son el grupo mejor definido entre los polifenoles de la dieta humana (Casares, 2011). Dentro del grupo de interés, los flavanoles existen tanto en la forma monomérica (catequinas) como en forma de polímero (proantocianidinas) (Bao *et al.*, 2014). Actualmente se sabe que las proantocianidinas o “taninos condensados”, deben tener un peso molecular en el rango 1.000-3.000 Da y suficientes hidroxilos fenólicos para formar complejos con proteínas y otras macromoléculas que contengan grupos aminos y carbonilos (Ricco *et al.*, 2008), cuya composición y estructura dependen de la fuente vegetal de donde se extraen. Las procianidinas son la principal clase de proantocianidinas (Verstraeten *et al.*, 2015) y están presente en muchos alimentos de origen vegetal.

Así, los beneficios en la salud de estos compuestos polifenólicos en la Palta y Cranberries han sido ampliamente investigados. Chile posee algo más de 40.000 mil hectáreas plantadas con paltos, siendo las zonas más productivas aquellas ubicadas entre las regiones Tercera y Octava, se ha transformado en el segundo mayor productor y exportador de Paltas del mundo. Parte del volumen de este fruto es destinado a la elaboración de pasta o puré de palta, en el proceso se genera como

subproducto, grandes cantidades de cáscara y carozos (Yu *et al.*, 2008). Dentro de las especies de palta la variedad más conocida es la Hass y es la única que se produce durante todo el año. Por otro lado el Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) es un fruto o baya originario de Norte América que crece sobre suelos impermeables. Los compuestos fenólicos de las berries se encuentran principalmente en los tejidos superficiales de las plantas o el fruto para protegerlas de cualquier estrés medioambiental o animales (Nohynek *et al.*, 2006).

Cranberry presenta variados beneficios que proveen los frutos. Al año 2001, la industria del arándano rojo americano (cranberry) representaba aproximadamente un mercado mundial de 2.000 millones de dólares (Cunningham *et al.*, 2004) y, actualmente, abarca diversos tipos de productos comercializados que van desde jugos y pulpas, mermeladas. Por esto aquí se presenta una gran oportunidad para el uso de esta cáscara de palta como material de desecho, que ayude a combatir uno de los patógenos más comunes que afectan a la población. Crecientes evidencias indican que el consumo de algunos alimentos particularmente ricos en procianidinas, contribuiría a la prevención, el manejo y/o la atenuación del daño a la mucosa gástrica asociado a la infección por *H. pylori*. El mecanismo anti-*H. pylori* de las procianidinas, no necesariamente implica un efecto bactericida que pueda afectar la microbiota normal del individuo, por lo que su empleo constituye una aproximación ideal para la prevención y el manejo de la infección en la mayoría de la población (Chávez *et al.*, 2011)

1.8 Evidencia de actividad anti *H. pylori* de compuestos fenólicos

El daño de la membrana es uno de los posibles mecanismos por los que los polifenoles podrían mostrar un efecto bactericida contra *H. pylori* (Funatogawa *et al.*, 2004). Una de las características de la infección por *H. pylori* es el alto grado de infiltración linfocítica (Allen, 2001). Los neutrófilos y células inflamatorias

mononucleares infiltran en el estómago infectados con *H. pylori* causando inflamación en la mucosa y la producción de ROS .Sin embargo, tales estallidos respiratorios pueden ser evadidos por *H. pylori* desviando las ROS hacia el huésped, con el consiguiente daño a los tejidos sanos (Allen *et al.*, 2001; 2005).

En trabajos realizados por Pastene *et al.*, (2009) se observó disminución de ROS en neutrófilos estimulados con *H. pylori* y tratados con concentraciones crecientes de extractos de cáscara de manzana. Algunos de los polifenoles presentes en la manzana han previamente demostrado ser eficaces como eliminadores de radicales superóxido y peroxilo (Vanzani *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2004). Los polifenoles o sus metabolitos generados durante el estallido respiratorio (productos de oxidación y / o hidrólisis) no sólo actuarían como captadores de radicales libres, sino también pueden inhibir algunas enzimas tales como la PKC o MPO (Pastene *et al.*, 2009).

La ureasa es una de las enzimas presentes en *H. pylori* más estudiadas, ya que se encarga de modificar el pH del medio para lograr sobrevivir causando daño en el epitelio gástrico. Muchos compuestos descritos en la literatura sólo presentan una escasa actividad inhibitoria resultando en un bajo potencial para aplicaciones clínicas. No obstante, la ureasa todavía permanece como uno de los blancos más importantes en el desarrollo de drogas para el manejo de infecciones gástricas y urinarias (Follmer, 2010; Kosikowska & Berlicki, 2011). Xiao (2007) ensayó la actividad anti-ureásica de 20 polifenoles sintéticos a partir de isoflavonas, demostrando que algunos presentaban una potente actividad contra la enzima y reportó además que la presencia de dos grupos hidroxilos en posición orto y la integridad del anillo C eran esenciales para su actividad inhibitoria. En un estudio utilizaron extracto naturales de cáscara de manzana para evaluar su efecto sobre esta enzima y los resultados sugirieron, en base a los valores de sus IC₅₀, que la actividad inhibitoria de la ureasa mostrada por APPE estuvo asociada principalmente a la presencia de polifenoles de alto peso molecular (HMW) y, en menor grado, con la presencia de los componentes de bajo peso molecular (LMW). Tal inhibición fue

concentración-dependiente, tiempo-independiente, reversible y competitiva (Pastene *et al.*, 2009).

En otros estudios se reportó la inhibición de siete fenoles naturales sobre hAC II, (anhidrasa carbónica humana II) siendo el ácido grifólico y ácido 4-O-metillgrifólico los más activos. Por lo tanto, los flavonoides de diferentes fuentes se encuentran entre los compuestos fenólicos más investigados como inhibidores de la AC (Huang *et al.*, 2009). Otro trabajo evaluó el efecto inhibidor de la quercetina, catequina, apigenina, luteolina sobre la actividad de diferentes hAC humana (isoformas I-IV). En todos los casos de inhibición, la Ki estuvo en el rango de 2.2 a 12.8 μ M. Ekinci *et al.* (2013) señalan que estos compuestos son inhibidores competitivos pero no han elucidado la naturaleza de la interacción con la enzima. Algunos autores han encontrado ciertos compuestos fenólicos naturales que inhiben AC por medio de diferentes interacciones dentro de la hendidura del sitio activo de la AC (Davis *et al.*, 2011).

La posibilidad de reducir el daño en la mucosa gástrica producto de exceso de ROS o de inhibir ambas enzimas como la ureasa y anhidrasa carbónica que intervienen en la regulación de pH de *H. pylori*, sería una buena estrategia para prevenir la llegada de la bacteria a la mucosa, limitando la capacidad de este patógeno para infectar el epitelio gástrico, evitando el daño. Varios estudios han probado la capacidad de compuestos fenólicos de impedir la adherencia de *H. pylori* a células epiteliales. En un estudio evaluaron las procianidinas a base de catequina de *Peumus boldus Mol.* y fracciones obtenidas de un extracto acuoso, encontrando que inhibieron la adhesión de *H. pylori* a células de adenocarcinoma gástrico (Pastene *et al.*, 2014).

En algunos estudios, los compuestos fenólicos naturales se han utilizado como base para la formación de derivados semi-sintéticos y sintéticos para ensayos de inhibición bacteriana. En nuestro laboratorio se realizó un análisis preliminar utilizando AC humana (HAC I), la cual guarda una elevada similitud con la AC de *H. pylori*. Para el

ensayo se prepararon derivados de proantocianidinas de manzana por ataque nucleofílico con compuestos (nucleófilos) tales como Pirogalol, floroglucinol y Orcina lo cuales mostraron una inhibición consistente de la enzima. Por otro lado es importante destacar que, los aductos preparados con agentes nucleofílicos tiólicos como cisteamina, cisteína y tolueno- α -tiol no lograron inhibir HAC I. En la actualidad, algunos de estos resultados preliminares dan pie para proponer que los derivados de compuestos fenólicos de diferentes fuentes naturales podrían ser candidatos interesantes para la utilización de nuevas moléculas capaces de inhibir el crecimiento o afectar algunos de los variados factores de virulencia presentes en *H. pylori*.

En el marco de esta tesis se evaluará el efecto protector de procianidinas naturales y nuevos derivados semi-sintéticos preparados desde fuentes vegetales sobre diferentes blancos moleculares de *H. pylori* y el proceso inflamatorio asociado a la infección. Específicamente, se estudiara si estos compuestos son capaces de inhibir la actividad de enzimas relevantes como la ureasa y anhidrasa carbónica. Por otro lado, utilizando co-cultivo de células AGS-*H. pylori* y neutrófilos estimulados con la bacteria, se evaluará si al limitar la interacción huésped-patógeno es posible inhibir la secreción de señales pro-inflamatorias y la producción de ERO, respectivamente.

HIPÓTESIS

Las procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos ejercen efectos protectores frente a la infección por *H. pylori*. Dichos efectos están vinculados con la inhibición dual de las enzimas ureasa y anhidrasa carbónica, lo que finalmente contribuye a limitar la capacidad de la bacteria para infectar células AGS e inducir ROS por parte de los neutrófilos.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto de procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos sobre factores de virulencia de *H. pylori* y estudiar si dichas moléculas ejercen un efecto protector frente a la infección *in vitro*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1 Obtener polímeros de procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos a través de ataque nucleofílico y múltiples estrategias de separación.
- 2 Determinar el efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la actividad ureasa y anhidrasa carbónica de *H. pylori*.
- 3 Establecer el efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la adherencia de *H. pylori* y la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias en células de adenocarcinoma gástrico (AGS).
- 4 Evaluar el efecto de procianidinas naturales y semi-sintéticos sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados por *H. pylori*

2. METODOLOGÍA

2.1 Obtención de procianidinas naturales y derivados semi-sintético

2.1.1 Preparación de extractos y obtención de procianidinas naturales

- a) El epicarpio de la Palta se removió cuidadosamente, posteriormente, se introdujo en un blender con 1000 mL de agua a 80º C y se homogenizó a 20.000 rpm durante 1 minuto. El extracto acuoso se clarificó a través de un filtro de gasa. El extracto acuoso de Palta se desgrasó con n-hexano en un embudo de decantación (500 mL x 3 veces). El n-hexano remanente se removió por destilación al vacío. Posteriormente el extracto acuoso eluyó por una columna de Amberlita XAD-7, inicialmente se eluyó con agua y finalmente para obtener los polifenoles se eluyó con etanol. La muestra se recolectó y se concentró en un rotavapor y finalmente se liofilizó para obtener un extracto a la forma de polvo.
- b) El cranberry se trituró con agua en un blender, para posteriormente ser centrifugado a 6000 RPM por 10 min. 3 litros del sobrenadante se eluyó por una columna de Amberlita XAD-7, con agua para eliminar azúcares, y posteriormente los polifenoles se eluyeron con etanol. Se eliminó el alcohol en un rotavapor y finalmente la muestra se secó para obtener el extracto polifenólico en forma de polvo.

Para la purificación de polímeros de procianidinas naturales se utilizó el sistema Spot-CPC 250-L (Centrifugal Partition Chromatograph) donde se inyectaron los diferentes extractos por separado al sistema con flujo de 4 mL/min y la velocidad de rotación de 2000 rpm. El modo de elución que se utilizó fue ascendente. Se utilizó el sistema C, como fase móvil Hexano / acetato de etilo / Etanol / agua (1:9:1:9, v/v/v/v) para finalmente obtener fracciones de alto peso molecular de procianidinas de cáscara de epicarpio de Palta y Cranberry. (Kohler & Winterhalter, 2007). Para confirmar la presencia de polímeros se utilizó TLC.

2.1.2 Preparación y purificación de derivados semi-sintéticos

Para la preparación de derivados semi-sintéticos de procianidinas se siguió la metodología descrita por Bordiga *et al.*, (2013) con algunas modificaciones. Se realizó una depolimerización del extracto de cáscara de palta por el mayor rendimiento de polifenoles presentes en este extracto. La depolimerización se realizó con los agente nucleofílico Pirogalol y Resorcinol. Para esto se tomó 1 gr de extracto total de cáscara de palta más 4g de Pirogalol o Resorcinol en cada caso, 3,2 gr de Ácido Ascórbico, 5,6 mL de HCl y 200 mL de Metanol. Esta mezcla se llevó a un baño de agua a 35°C por 20 minutos, una vez finalizado este tiempo se detuvo la reacción con 40 mL de acetato de sodio 40mM, (Los agentes nucleofólicos Pirogalol y Resorcinol atacan el núcleo de las procianidinas en el enlace C4-C8 rompiéndolo y uniéndose a la epicatequina libre de la procianidina, formando finalmente el derivado correspondiente (Fig. 2.1)

La purificación final de los derivados se realizó mediante el sistema CPC con flujo de 6 mL/min, a 1800 RPM utilizando el sistema C descrito anteriormente. La confirmación de estos derivados se determinó mediante TLC y espectrometría de masas.

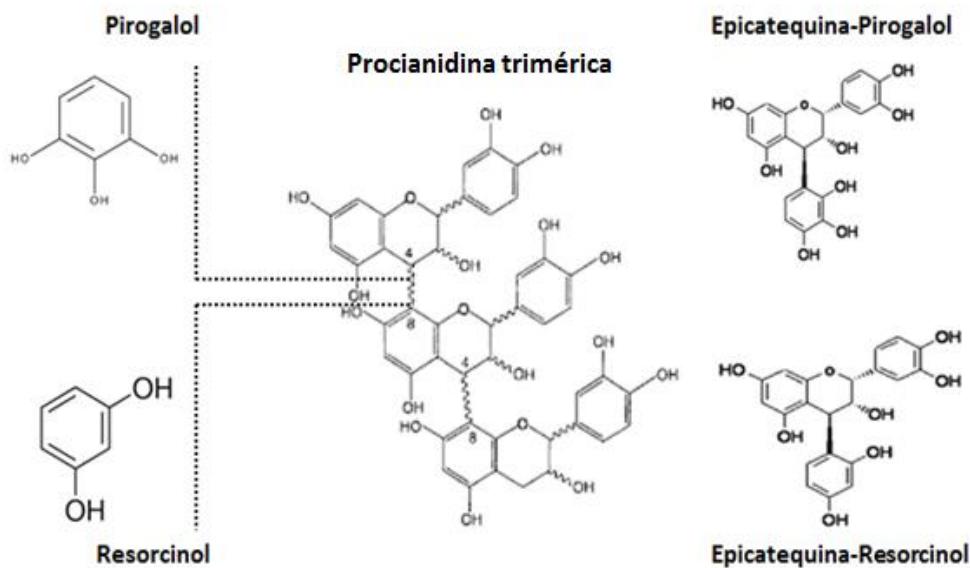
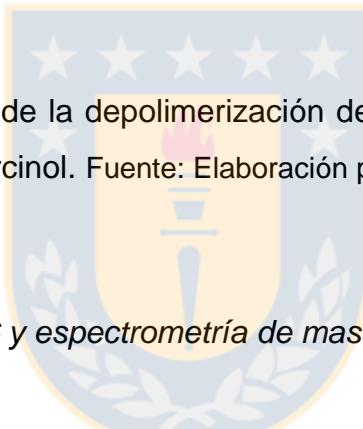


Figura 2.1: Representación de la depolimerización de procianidinas con los agentes nucléofilos Pirogalol y Resorcinol. Fuente: Elaboración propia

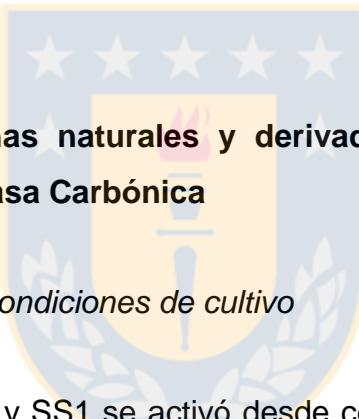


2.1.3 Confirmación por TLC y espectrometría de masas

Para el análisis de confirmación las procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos se sembró en placas TLC cromatofolios de sílica gel G-60 para cromatografía de capa fina. La cromatografía se realizó en cámaras de desarrollo utilizando como fase móvil 10 mL de la solución Tolueno: Acetona: Ácido fórmico en proporciones 3:6:1 v/v, utilizando como medio revelador una solución de DMCA.

Los derivados semi-sintéticos generados fueron analizados por medio de espectrometría de masa para verificar la formación y analizar su pureza (Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia). El extracto y las principales fracciones bioactivas fueron analizadas 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 µm) con una precolumna UHPLC C18 (4.6 mm, 2.6 µm) (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: modo electrospray ionización negativa, -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).



2.2 Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la actividad Ureasa y Anhidrasa Carbónica

*2.2.1 Cepas de *H. pylori* y condiciones de cultivo*

H. pylori cepa ATCC 43504 y SS1 se activó desde cepario a 38°C y se cultivó bajo condiciones de microaerofilia, a 37°C durante 3-4 días en placas de agar Columbia suplementado con 5% de sangre de caballo y DENT. Luego se realizó un traspaso a placa de agar sangre y nuevamente se cultivó 2-3 días para su uso. Antes de cada ensayo se realizaron los respectivos test de las cepas mediante tinción Gram, pruebas de catalasa y ureasa.

2.2.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La Concentración Mínima Inhibitoria, es decir la mínima concentración a la que las muestras de procianidinas naturales y semi-sintéticas son capaces de inhibir a *H. pylori* ATCC 43504 y SS1, se determinó mediante el método de microdilución en caldo empleando placas de 96 pocillos (TPP, Suiza). Se utiliza este método en vez de la dilución en agar como lo recomienda el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2010) por la dificultad de obtener grandes cantidades de muestras. Se preparó 20 mL de un inóculo con ambas cepas por separado en caldo BHI estéril suplementado con 20% de Suero Fetal Bobino (SFB). Desde un Mc Farland N°2, correspondiente a una concentración bacteriana de 6×10^8 ufc/mL la cual se modificó a 1×10^8 ufc/mL. Se preparó 100 mL caldo BHI estéril suplementado con 20% de Suero Fetal Bobino. Posteriormente se prepararon las muestras de procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos disueltos en DMSO y PBS estéril 1x para una concentración final de 3000 µg/mL en pocillo, se debe tener en cuenta que la concentración de DMSO no supere al 1% en el pocillo de la placa, las muestras se filtraron con filtros de 0,22µm.

El montaje del ensayo se realizó de la siguiente manera: En una microplaca de 96 pocillos se agregó en las filas A de 1-3, 20 µL cranberry, 4-6, 20 µL cáscara de palta, 7-10, 20 µL de controles antibióticos (Amoxicilina y Metronidazol) 11-12 control del medio. Además a cada pocillo se agregó 180 µL de caldo BHI suplementado con SFB al 20%. A continuación las muestras de la filas se homogenizan y se pipetean 100 µL para realizar diluciones seriadas en columnas, desde las filas A-H las cuales previamente fueron llenadas con 100 µL de caldo BHI estéril suplementado con SFB al 20% (de B-H). Finalmente se agregó 100 µL del inóculo bacteriano preparado en BHI suplementado con SBF a cada pocillo desde las columnas 1 a 11 de A-H. Los controles antibióticos Metronidazol se disolvió en 20 µL de DMSO y diluído en agua estéril y la Amoxicilina se disolvió y diluyó en agua estéril.

El control negativo corresponde a 200 μ L de caldo BHI estéril, y el control positivo 1 fue 100 μ L de caldo BHI estéril y 100 μ L de inóculo y control positivo 2, 20 μ L de H₂O/DMSO 80 μ L caldo BHI y 100 μ L de inóculo.

Las placas se incubaron tapadas y selladas con parafilm por 3 días, y la concentración en donde a ojo desnudo no se observó crecimiento se consideró como la CMI. Adicionalmente, se utilizó 20 μ L del colorante resazurina al 0,01% estéril, disuelta en PBS 1X y se dejó incubar a 37° C y en microaerofilia con el objetivo de evidenciar la viabilidad celular, de modo que al estar las células viables éstas incorporarán el colorante y lo biotransformarán a resorufina, evidenciándose un color rosado, si esto no ocurre el color del indicador permanece azul evidenciándose muerte bacteriana. Los resultados de las cepas ATCC 43504 y SS1 se observaron 2 h después de la incubación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para llevar a cabo la CMB, se utilizó los pocillos en los cuales no hubo crecimiento. De estos pocillos se tomó una alícuota de 10 μ L, y realizó un ensayo de microgota en placas de agar sangre, donde no hubo crecimiento de *H. pylori* después de 5 días de incubación, se consideró como la CMB (Pastene *et al.*, 2010).

*2.2.3 Ensayo viabilidad: Medición de los niveles intracelulares de ATP en *H. pylori*.*

Para conocer si *H. pylori* mantenía su viabilidad en los ensayos posteriores, como un equivalente de cargas de energía antibacterianas, se midió el ATP intracelular según protocolo publicado previamente y con modificaciones menores (Schweitzer *et al.*, 2008). Las células bacterianas se tomaron directamente de colonias obtenidas durante la fase de crecimiento exponencial y se resuspendieron suavemente en caldo Brucella en un inóculo bacteriano inicial de 10^6 UFC/ml. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos, en las que se agregaron las muestras preparadas en agua estéril y DMSO 10%. En la placa se agregó 20 μ L de procianidinas naturales en los

pocillos de la fila A de 1-4 y procianidinas semisintéticas en la fila A de 5-8, posteriormente se agregó a estos pocillos 180ul de una preparación de un inóculo bacteriano de 10^6 UFC/mL de *H. pylori* (ambas cepas por separado) cuidando que esta concentración corresponda a la final en el pocillo y teniendo en cuenta que las concentraciones de los compuestos en pocillo fueran valores cercanos a la CMI. Luego se agregó a los pocillos de las filas B-F de 1-8, 100 μ L de inóculo bacteriano preparado anteriormente para realizar diluciones a la mitad desde A - F y en todos las filas de 1 a 8, finalmente se utilizaron los pocillos sobrantes para los controles respectivos. El control negativo fue medio de cultivo sin bacterias y el control positivo fue medio de cultivo con bacterias y sin inhibidores. En total las muestras se incubaron 1 h y luego se determinó el contenido de ATP en las células, utilizando el reactivo BacTiter-Glo (una mezcla de reactivos luciferasa-lucifera dependiente de ATP; Promega Inc., Madison, WI) se añadió directamente a las suspensiones bacterianas vivas en una proporción de 1: 1 después del tiempo de incubación deseado. Las suspensiones se incubaron durante 5 min a 37° C para lisar las bacterias y para iniciar la reacción enzimática. La emisión de fotones se medió con un luminómetro. (Pastene *et al.*, 2009)

2.2.4 Ensayo sobre actividad ureasa de *H. pylori*

Como enzima control se utilizó una ureasa comercial de Jack bean (Tipo IV, Sigma). La generación de amoniaco se evidenció mediante el ensayo del rojo fenol (Tanaka *et al.*, 2004). Una unidad de actividad de la ureasa se define como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 mol de urea (producido 2 mol de amoníaco) por minuto por mg de proteína total. La cantidad de amoníaco liberado se determinó a partir de una curva estándar. Este indicador de pH puede detectar cambios entre pH 6.8 a 7.7 lo que se manifiesta como un viraje desde el color amarillo al rojo intenso. Este cambio concuerda con la aparición de una banda de absorción intensa a 570 nm. Para el ensayo las muestras de procianidinas naturales o semi-sintéticas se

prepararon en agua ultrapura y 10% DMSO, la concentración inicial fue ½ CMI de cada compuesto realizando 8 diluciones a la mitad, para el ensayo en pocillo se utilizó 10 µL de enzima Jack bean preparada en agua/glicerol 1:1 más 20 µL de cada muestra por separado, esta mezcla se incubó durante 1 hr y posteriormente se agregó 100 µL de sustrato el cual contenía urea 250mM y el indicador rojo fenol. Los controles fueron, la enzima sin inhibidores más el sustrato e indicador, y la enzima incubada con 10 µL del solvente donde se prepararon las muestras. La base del método considera que la ureasa al tener disponibilidad de urea a pH 6.8 (buffer fosfato), rápidamente puede generar amoniaco y elevar el pH hasta 7.7. Matemáticamente esta variación de la absorbancia en el tiempo (dA/dt), corresponde a la pendiente en la porción recta de cada curva, la que se relaciona linealmente con la actividad enzimática remanente en el medio de incubación (rango 0.0065-0.4 UI; y = 0.0043x + 0.0066, r² = 0.9971), lo que permite estimar los porcentajes de inhibición. Posteriormente se establecen los parámetros experimentales para trabajar con la enzima de *H. pylori*, tales como la concentración de las muestras a utilizar y el tiempo de pre-incubación de la enzima y las muestras.

Para aislar la ureasa desde *H. pylori* se realizaron suspensiones bacterianas en agua estéril de la bacteria cultivada en las condiciones anteriormente mencionadas. Las bacterias se lisaron mediante 7 ciclos de congelamiento-descongelamiento y ultrasonido (60 segundos). Luego se centrifugaron los lisados (8.000 rpm por 10 min) y los sobrenadantes se colectaron, posteriormente se utilizaron tubos de ultrafiltración de 100kD para concentrar la enzima ureasa en la parte superior del tubo de ultrafiltración ya que esta enzima posee un peso molecular de 600kD, mientras que el resto de las proteínas eluyen a la parte inferior del tubo.

Finalmente, para estabilizar la ureasa, el concentrado se resuspendió en un volumen de agua/glicerol 1:1 y se almacenó a -20°C. Para el ensayo rojo fenol de la ureasa de *H. pylori* se procedió como con la de Jack Bean. La lectura de absorbancias se realizó en un espectrofotómetro a 570 nm durante 30 min con lecturas cada 30

segundos. A partir de los datos de absorbancia obtenidos se realizaron las curvas de A versus tiempo. Se eligió el rango de tiempo de la parte recta de la curva en cada tratamiento para obtener la pendiente y en base a esto realizar los cálculos del porcentaje de inhibición de cada tratamiento con respecto al control de la actividad enzimática sin inhibidor y una vez realizados los gráficos de % de inhibición versus Log (concentración $\mu\text{g/mL}$) en el programa Graph Pad Prism se calculó la IC₅₀ que corresponde a la concentración que inhibe el 50 % de la actividad ureasa.

*2.2.5 Ensayo sobre la actividad Anhidrasa Carbónica de *H. pylori**

La inhibición de AC se evaluó a través de su actividad esterasa con el sustrato p-Nitro fenil acetato (NPA) a 348 nm de acuerdo con Barrese *et al.* (2008). La actividad esterasa de AC II con 4-NPA proporciona una medida fiable de la actividad que no requiere el uso de CO₂ disuelto, cuya concentración es difícil de manejar. Para el ensayo se utilizó a modo comparativo la hAC-II. Para esto se preparó AC (315 unid/mL de AC, 0,9 mg en 10mL de AC 3500 unid/g) la cual se disolvió en buffer tris ajustado con H₂SO₄ a pH 7,6 (2,423g de Tris base para 100mL)

La actividad se midió en microplacas 96 pocillos donde en cada pocillo se agregó 10 μL de la enzima hAC-II y se incubó durante 30 min con 20 μL de diferentes concentraciones de los compuestos desde 100-0 $\mu\text{g/mL}$ realizando diluciones a la mitad al igual que para el ensayo de actividad ureasa. Posteriormente se agregó 170 μL de buffer tris ajustado con H₂SO₄ a pH 7,6 a cada pocillo y 100 μL de sustrato 4-NPA. (13,6 mg de 4-NPA en 1mL de Acetona y 24 mL de Agua). Esta mezcla inmediatamente se llevó a un espectrofotómetro para realizar la lectura de absorbancias las cuales se hicieron durante 15 min cada 30 s. El mismo procedimiento se siguió con la anhidrasa carbónica de *H. pylori* (HpAC). Para obtener esta enzima se recolectó la HpAC desde la parte inferior (Eluato) del tubo de ultrafiltración en el que se realizó el proceso de concentración de la ureasa, ya que

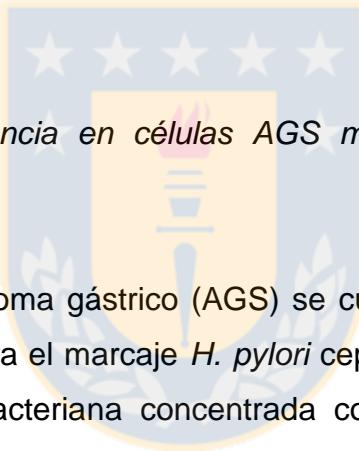
esta enzima es de menor tamaño que el cut-off de la membrana de ultrafiltración. Inicialmente se estandarizó la cantidad de HpAC que se debía usar en el ensayo para obtener una actividad similar a la hAC-I y se prosiguió del mismo modo. Una vez obtenidos todos los datos se calcularon los porcentajes de inhibición de cada tratamiento del mismo modo en que se realizaron los cálculos para la actividad ureasa. Posteriormente con los datos obtenidos se realizaron los gráficos de inhibición y se procedió a calcular las IC₅₀ de cada compuesto.

2.3 Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la adherencia de *H. pylori* y la producción de IL-8

2.3.1. Ensayo de citotoxicidad en células AGS

Previamente se realizó el ensayo de citotoxicidad para determinar las concentraciones de compuestos que permitieron la viabilidad de las células AGS. Las células de adenocarcinoma gástrico (AGS) fueron sembradas en frascos de cultivo T-75 con filtro, con medio RPMI 1640, con un 10% de suero bovino fetal, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, en condiciones de microaerofilia con un 5% de CO₂ y 37°C, el medio de cultivo se renovó cada dos días. Se dejaron crecer las células hasta confluencia de aproximadamente 90%, luego se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X y se despegaron con tripsina. Las células AGS se contaron con una cámara de Neubauer y se traspasaron a placas de 96 pocillos con una concentración de 2x10⁵ células por pocillo. Estas placas fueron cultivadas según las condiciones anteriores por 24 horas y luego se prosiguió de la siguiente forma: Se prepararon diferentes concentraciones de las muestras de procianidinas naturales y semi-sintéticas en tubos eppendorf en agua estéril y 10% de DMSO, 20 µL de este contenido fue agregado a las células AGS confluentes contenidas en las placas de 96 pocillos previa eliminación del medio de cultivo. Para el ensayo se utilizaron concentraciones desde 2000-47 µg/ml en pocillo

de cada compuesto y posteriormente se agregó 100 µL de medio de cultivo RPMI completo. Los controles fueron las células AGS en el medio de cultivo, y las células AGS con 20 µL del solvente donde se prepararon las muestras. Las placas fueron incubadas por tres horas y posteriormente se les agregó 10 µL de resazurina el cual es un indicador de óxido-reducción que permite estimar la viabilidad celular. La resazurina se preparó con 5 mg en 50 mL de agua, se filtró y guardó refrigerada (Sarker *et al.*, 2007). Las placas con resazurina se dejaron incubar por 2 horas adicionales y posteriormente se procedió a la lectura de absorbancias en un espectrofotómetro a 570 nm y 600 nm. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de viabilidad en base al control positivo que solo tenía células AGS. Los gráficos se realizaron en el programa GraphPad Prism.



2.3.2. *Ensayos anti-adherencia en células AGS mediante imagen molecular en tiempo real*

Las células de adenocarcinoma gástrico (AGS) se cultivaron según las condiciones descritas anteriormente. Para el marcaje *H. pylori* cepa ATCC 43504 y cepa SS1 se preparó una suspensión bacteriana concentrada con un asa plástica en 1ml de PBS1X, se agregó 10 µl de FITC (10mg/mL DMSO), la mezcla se incubó 1 h protegida de la luz. Posteriormente la preparación se centrifugó a 7000 RPM 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 llegando a un Mc Farland Nº 2 (6×10^8 ufc/mL). Se prepararon diferentes concentraciones de las muestras de procianidinas naturales y semi-sintéticas en tubos eppendorf, 20 µL de estas soluciones fueron agregados a las células AGS contenidas en las placas de 96 pocillos previa eliminación del medio de cultivo. Posteriormente se agregó 100 µL de la suspensión bacteriana *H. pylori*-FITC. Las placas fueron cultivadas por tres horas, luego se les retiró el medio, el cual se reservó para la determinación de IL-8 mediante ELISA y los pocillos se lavaron 3 veces con PBS (Pastene *et al.*, 2014).

Finalmente se agregó 100 µL del PBS y el resultado se observó usando un equipo de imagen molecular UVP IBOX Sciencia mediante Video Imagen en tiempo Real con Filtro excitación 502-547 y filtro emisión 565-625 nm.

2.3.3. *Ensayo de inflamación*

La determinación de la citoquiinas proinflamatoria IL-8 se realizó mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) utilizando un kit comercial (Pharmingen). En una placa de 96 pocillos de fondo plano se agregaron en los primeros pocillos 50 µL de la muestras de la curva de calibración realizada según lo indica el protocolo y en el resto de los pocillos, 50 µL de las muestras obtenidas de los sobrenadantes recolectados anteriormente en el ensayo de adhesión. Además se agregó 50 µL de solución de biotina anti-IL-8, esta mezcla se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente, posteriormente se retiró la solución y los pocillos se lavaron 4 veces con solución de lavado preparado según el protocolo, luego se agregó a cada pocillo 100 µL de esreptavidina-HRP, y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 4 veces con la solución de lavado, y se adicionó 100 µL del cromógeno estabilizado, se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad, transcurrido este tiempo, se agregó la solución de stop a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro. Con los datos obtenidos se realizó el gráfico de la curva de calibración para obtener la cantidad de IL-8 en cada tratamiento. Los datos fueron expresados en picogramos por mL. Finalmente se realizaron las gráficas de producción de IL-8 (pg)/mL versus concentración de las muestras utilizadas en el programa GraphPad.

2.4 efecto de procianidinas naturales y semi-sintéticos sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados por *H. pylori*

2.4.1 Ensayo de bioluminiscencia en neutrófilos humanos.

Inicialmente se realizó un ensayo control para evidenciar la producción de ROS en neutrófilos, para lo cual se utilizaron microplacas negras de 96 pocillos negras. En cada pocillo se agregó 200 µL de sangre fresca heparinizada, 20 µL Luminol sódico (100 uM). El luminol se utilizó como sonda ya que es un compuesto sensible a diferentes ROS y que emite luminiscencia azul ($\lambda_{\text{max}} = 425$ nm). El luminol permite la detección de bajas concentraciones de especies oxidantes en los sistemas biológicos (Fig. 2.2). En algunos pocillos se agregó 10 µL de forbol miristato acetato (PMA) (5 µM) que se utilizó como control estimulante de ROS en neutrofilos, 150 µL de buffer HBSS, inmediatamente el resultado se visualizó en el equipo de imagen molecular IBOX sciencia usando Video Imagen en tiempo Real, mediante el cual se fueron tomando fotos de la luminiscencia de la placa completa cada 5 min. Las fotos se procesaron para cuantificar la luminiscencia en cada tratamiento. Los datos de RLU (unidades relativas de luminiscencia) se graficaron para visualizar el tiempo en el que se obtuvo el peak más alto de luminiscencia producto de la mayor producción de ROS en neutrófilos estimulados.

Posteriormente se realizó el ensayo para analizar el efecto de las procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la producción de ROS inducida en neutrófilos estimulados con *H. pylori*. Se preparó las placas de la siguiente manera: 200 µL de sangre fresca heparinizada se incubaron con 20 µL de diferentes concentraciones de procianidinas naturales y semi-sintéticas (100-75-50-20-5-0) µg/ml por 10min, luego se agregó 20 µL Luminol (100 µM) y *H. pylori* cepa ATCC 43504 y SS1 Mc farland 2 ($6,0 \times 10^8$ ufc/mL) preparado en buffer HBSS 60 µL. Luego de 10 min se tomaron fotos de la placa completa para cuantificar la luminiscencia como se explicó anteriormente. (Gross *et al.*, 2009).

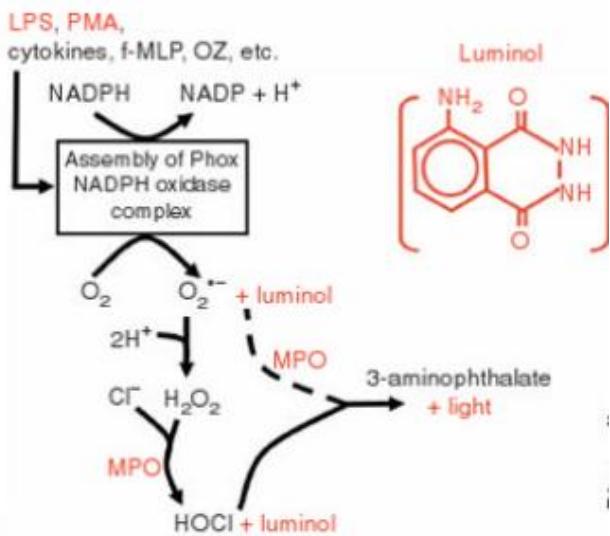


Figura 2.2: Representación esquemática de la base bioquímica del uso de la bioluminiscencia del luminol en la detección de ROS. HOCl producido por MPO puede oxidar directamente o indirectamente luminol para producir luz. Alternativamente, MPO también puede utilizar el anión superóxido (línea discontinua) o de otro ROS (por ejemplo, NO[•]) como sustratos para la oxidación de luminol catalizada por peroxidasa. Fuente: Gross *et al.*, 2009, Nat Med, 15(4): 455-461.

2.5. Análisis estadísticos

Se utilizó el software GraphPad Prism para los análisis estadísticos. Los resultados de este estudio se compararán por ANOVA de una vía, seguido por el post-test de Dunnett para la comparación de los tratamientos con el control. El nivel de significancia fue p <0,05.

3. RESULTADOS

3.1. Obtención polímeros de procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos a través de ataque nucleofílico

3.1.1 Obtención de procianidinas naturales desde cáscara de palta y zumo de cranberry.

Una vez obtenidos los polifenoles de cada fuente vegetal, estos se pesaron en seco para estimar el rendimiento final. La tabla 3.1 muestra el rendimiento en gramos de cáscara de palta y de zumo de cranberries, observando que el rendimiento fue mayor con cáscara de palta con 27 gr de extracto seco por kilo de cáscara, mientras que a partir de 1 litro de zumo de cranberry se obtuvo 15 gr de extracto seco.

Luego de seguir la metodología descrita para la obtención de los extractos naturales de zumo de cranberry y cáscara de palta, estos se utilizaron para obtener las fracciones poliméricas o fracciones de alto peso molecular. Para esto se inyectó al sistema CPC, 1,5 gr de cada extracto por separado, utilizando las condiciones nombradas en la metodología. La figura 3.1 A muestra el registro del perfil polifenólico del extracto total cáscara de palta que fueron obtenidos mediante este sistema CPC. Con esta metodología se logró separar la fracción polimérica de procianidinas de tipo B perteneciente al peak número 4 del cromatograma. La separación fue confirmada por TLC (Fig. 3.1 B) donde se observa en B1 el perfil del extracto total de cáscara de palta y en B2 el perfil de la fracción polimérica aislada en la parte inferior de la placa TLC. El mismo procedimiento se realizó para obtener los polímeros de procianidina de tipo A del jugo de cranberry. Dado que en modo ascendente los polímeros de cranberry tardan demasiado en eluirl, se usó el sistema CPC en modo descendente para obtener los polímeros al inicio del sistema (Fig. 3.2). Este resultado también fue confirmado mediante TLC (Fig. 3.2 B) donde se observa

el perfil del extracto total y la fracción polimérica por separado. El rendimiento total de los extractos totales y poliméricos está detallado en la tabla 1.

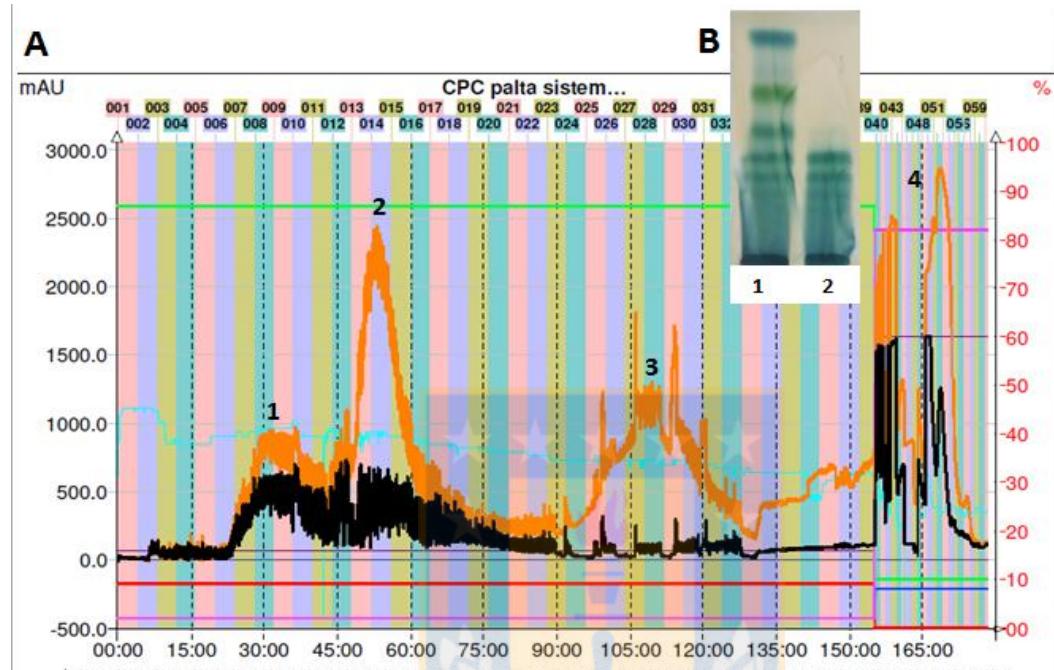


Figura 3.1: Obtención de polímeros de procianidinas desde extracto total de cáscara de palta. A.- Cromatograma del perfil polifenólico de extracto de cáscara de palta separado por CPC en modo ascendente. B.- TLC del perfil polifenólico del extracto total de cáscara de palta (1) y perfil de la fracción polimérica del extracto de cáscara de palta (2). Nota: el peak 4 (polímeros) corresponde a las bandas que se observan en el carril 2 de la TLC. Fuente: Elaboración propia

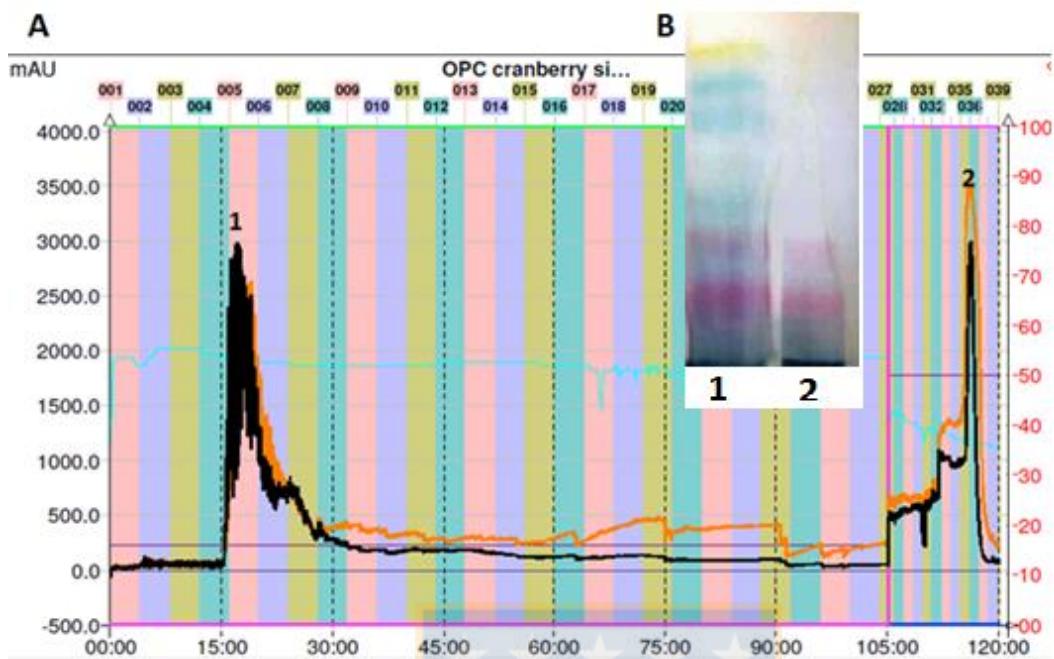


Figura 3.2: Obtención de polímeros de procianidinas desde extracto total de cranberry. A. Cromatograma del perfil polifenólico de extracto de cranberry separado mediante CPC en modo descendente. B.- TLC del perfil polifenólico del extracto total cranberry (1) y perfil de la fracción polimérica del extracto de cranberry (2). Nota: el peak 1 (polímeros) corresponden a las bandas que se observan en el carril 2 de la TLC. Fuente: Elaboración propia

3.1.2 Obtención de procianidinas semi-sintéticas desde extracto de cáscara de palta

Para la depolimerización de las procianidinas se escogió el extracto de cáscara de palta debido a que este posee mayor rendimiento de polímeros en comparación con el extracto de cranberry. Otro motivo para dicha elección es el hecho que los nucleófilos empleados en esta tesis no generan una buena degradación de los polímeros tipo A, llegando a rendimientos muy bajo y productos intermediarios de estructura no definida. Para la depolimerización se utilizó el agente nucleófilo

Pirogalol para formar el derivado epicatequina-pirogalol, y Resorcinol para formar el derivado Epicatequina-Resorcinol. Mediante CPC se intentó aislar dichos derivados, con las condiciones descritas en la metodología. La figura 3.3 A, muestra el cromatograma de la depolimerización realizada con el agente Pirogalol, se recolectaron todos los peak y se determinó mediante TLC que el peak 3 que se muestra en el cromatograma del sistema CPC pertenecía al derivado epicatequina-pirogalol. En la figura 3.3 B se observa la placa de TLC donde se verifica el aislamiento de este derivado, en B1 está el perfil del extracto total de palta para la comparación de los compuestos, en B2 se observa el derivado que se logró aislar del sistema CPC (peak 3). La banda que se observa no coincide con ninguna banda del extracto natural (sin depolimerizar), ni tampoco corresponde a ninguno de los reactivos usados en la reacción. Lo anterior indica que es el nuevo derivado epicatequina-pirogalol. Junto a esta banda en B3 se agregó un estándar de epicatequina a modo de comparación.

La figura 3.4 A, muestra el cromatograma de los productos de depolimerización realizada con el agente Resorcinol se recolectaron todos los peaks y se determinó mediante TLC que el peak 5 que se muestra en el cromatograma del sistema CPC pertenecía al derivado Epicatequina-Resorcinol. En la figura 3.4 B se observa la placa de TLC donde se verifica el aislamiento de este derivado. En B1 se observa el perfil del extracto total de palta para la comparación de los compuestos, en B2 está el derivado que se logró aislar del sistema CPC (peak 5). La banda que se observa no coincide con ninguna banda del extracto natural, lo que indica que es el nuevo derivado epicatequina-resorcinol. Junto a esta banda en B3 se agregó un estándar de epicatequina a modo de comparación.

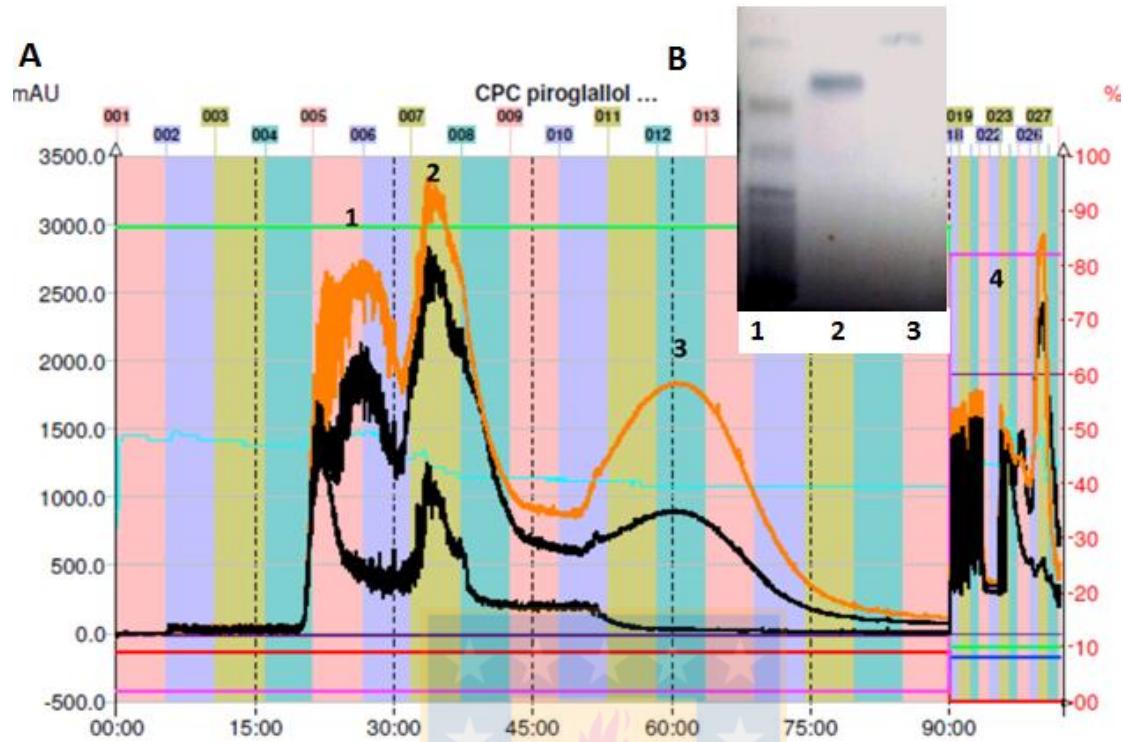


Figura 3.3: CPC de los productos de depolimerización de extracto de cáscara de palta con pirogalol. A.- Cromatograma del perfil de la depolimerización de los polímeros del extracto de cáscara de palta con el agente Pirogalol (modo ascendente). B.- TLC, (1) perfil polifenólico del extracto de cáscara de palta, (2) derivado Epicatequina-Pirogalol, (3) estándar epicatequina. Nota: el peak 3 (aducto) corresponde a la banda que se observa en el carril 2 de la TLC. Fuente: Elaboración propia

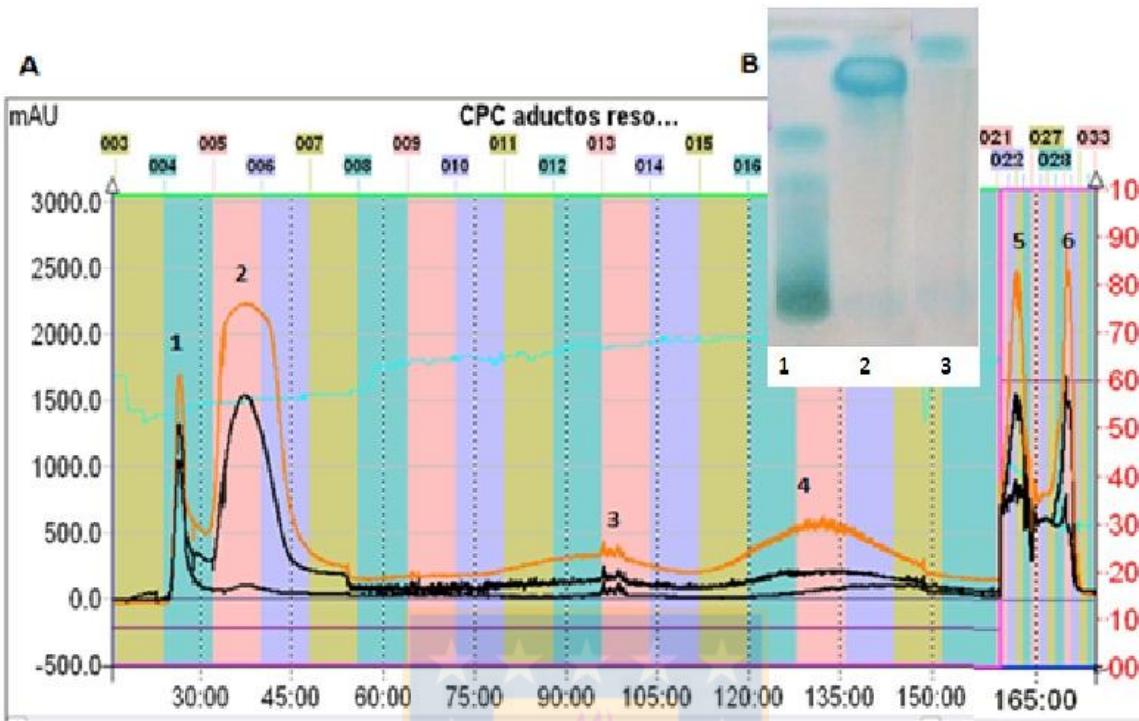


Figura 3.4: CPC de la depolimerización de extracto de cáscara de palta con resorcinol. A.- Cromatograma del perfil de la depolimerización de los polímeros del extracto de cáscara de palta con el agente resorcinol. B.- TLC , (1) perfil polifenólico del extracto de cáscara de palta, (2) derivado Epicatequina-resorcinol, (3) estándar epicatequina. Nota: el peak 4 (aducto) corresponde a la banda que se observa en el carril 2 de la TLC. Fuente: Elaboración propia

La tabla 3.1 muestra el rendimiento de polifenoles obtenidos por litro de zumo de Cranberry y por kg de cáscara de palta, además del rendimiento de la fracción polimérica obtenida mediante el sistema CPC, en donde el mayor rendimiento de polímeros es para el extracto de palta ya que se obtienen más polímeros por gramo de extracto total mediante el mismo sistema y bajo las mismas condiciones. Los derivados semi-sintéticos se obtuvieron desde extracto de palta debido a la mayor cantidad de polímeros en la muestra.

Tabla 3.1: Rendimiento de extracto polifenólico de palta y cranberry, sus fracciones poliméricas y derivados semi-sintéticos. Fuente: Elaboración propia

	Fuente	Extracto polifenólico	Extracto polimérico	Epicatequina-Resorcinol	Epicatequina-Pirogalol
Palta	Cáscara fresca	27 g de extracto por kg de cáscara	350 mg/ g de extracto	180 mg/g de extracto	216 mg/g de extracto
Cranberry	Zumo del fruto	15 g de extracto por Lt de zumo	300 mg/ g de extracto	-	-

Finalmente la formación de ambos derivados se confirmó por espectrometría de masas mediante la cual se pudo determinar el peso molecular, la relación de la masa/carga (m/z) de los principales fragmentos del aducto y su abundancia. La Figura 3.5 muestra el espectro de abundancia relativa, donde aparece el pico del reactivo pirogalol con una m/z 125,1 g/mol y la señal más abundante perteneciente a la epicatequina con una m/z 287,6 g/mol. Luego el derivado epicatequina-pirogalol aparece en el espectro con una m/z 413,6 g/mol. El mismo procedimiento se realizó para el derivado epicatequina-resorcinol donde su espectro muestra al compuesto resorcinol con una m/z de 110 g/mol, a la epicatequina con una relación m/z 287 g/mol y al derivado con 398,0 g/mol (Fig 3.6). Los datos pueden ser comprobados con la tabla 3.2, donde se observan las fórmulas químicas de los nucleófilos utilizados y su respectivo peso molecular.

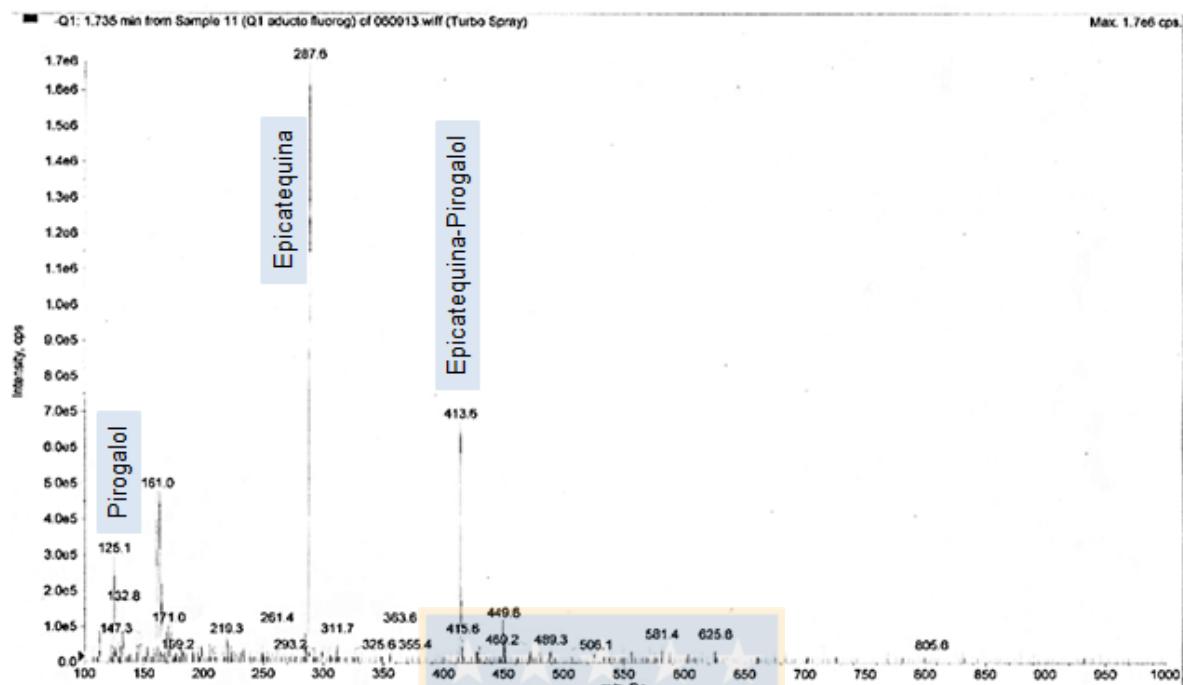


Figura 3.5: Espectros de masas de Epicatequina-Pirogalol Fuente: Elaboración propia

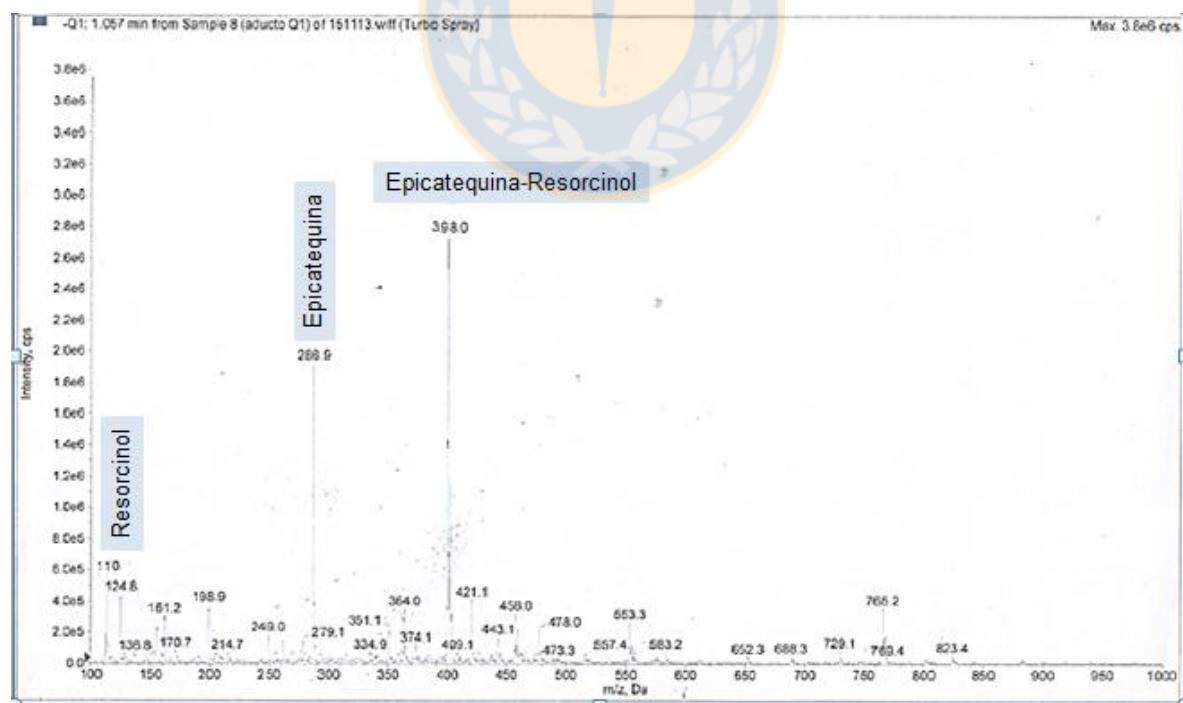


Figura 3.6: Espectros de masas de Epicatequina-Resorcinol Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.2: Agentes nucleofílicos usados para la obtención de derivados de procianidinas del extracto de cáscara de palta. Fuente: Elaboración propia

	Fórmula química	Peso Molecular
Pirogalol	C ₆ H ₆ O ₃	126,1
Resorcinol	C ₆ H ₆ O ₂	110,1
Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,26

3.2 Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la actividad ureasa y anhidrasa carbónica de *H. pylori*.

3.2.1- Determinación de CMI y CMB

Se determinó la CMI (concentración mínima inhibitoria) y la CMB (concentración mínima bactericida) para conocer las concentraciones a utilizar en los ensayos posteriores. La Figura 3.7 ilustra los resultados del ensayo que se realizó en placas de 96 pocillos, donde se analizaron las CMI de las procianidinas naturales. Se observa que para la cepa SS1 de *H. pylori* las CMI para los polímeros naturales de cranberry y cáscara de palta es de 1500 y 750 µg/mL respectivamente. Para la cepa ATCC 43504 la CMI fue de 750 µg/mL para polímeros cranberries y 375 µg/mL para polímeros de cáscara de palta. En cuanto a las procianidinas semi-sintéticas (Fig. 3.8) se observa que la CMI para la cepa SS1 fue de 375 µg/ml para el derivado epicatequina-pirogalol y 750 µg/ml para el derivado epicatequina-resorcinol. Para la cepa ATCC 43504 se obtuvo la menor CMI con una concentración de 187,5 µg/ml con el derivado epicatequina-pirogalol y de 375 µg/ml con el derivado epicatequina-resorcinol. Además se agregó a cada ensayo un control antibiótico y controles del medio para asegurar la confiabilidad del ensayo. A partir de la CMI obtenidas se realizó la CMB, para lo cual se tomaron alícuotas en los pocillos donde no se observó

crecimiento y se sembraron en placas de agar sangre y se incubaron durante 4 días. La tabla 3.3 muestra un resumen de todas las CMI y CMB obtenidas para cada cepa de *H. pylori* y cada compuesto.

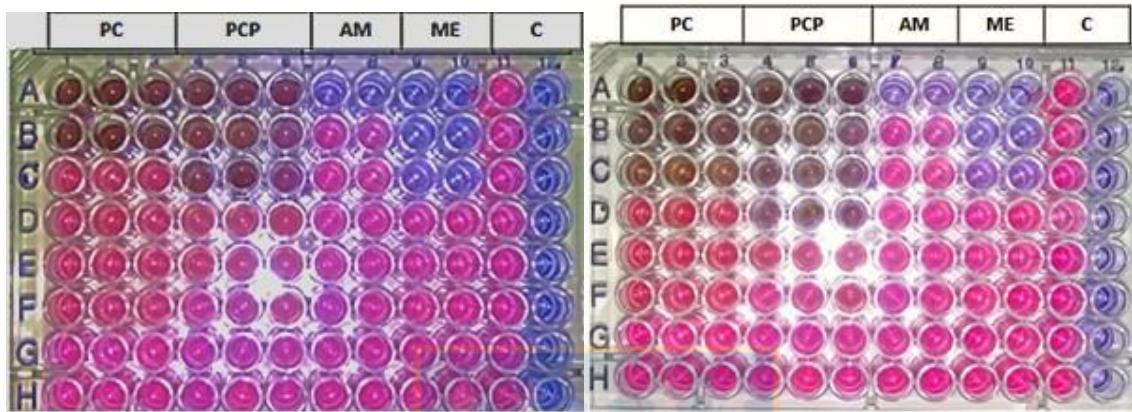


Figura 3.7: Determinación de viabilidad celular mediante biooxidación de resazurina. CMI de polímeros de cranberry y cáscara de palta sobre *H. pylori* cepa SS1 y ATCC 43504 después de 3 días de cultivo. Columna 1, 2 y 3 son réplicas de polímeros de Cranberry (PC), Columna 4, 5 y 6 son réplicas de polímeros de palta (PCP), concentraciones decrecientes desde A-H (3000-62,5 µg/mL). Columna 7 y 8 amoxicilina (A) de A-H (1,28 - 0,01 µg/mL). Las columnas 9 y 10 contienen Metronidazol (M) A-H (128-8 µg/mL). La columna 11 de A-C control positivo DMSO y de D-F control positivo PBS. Columna 12 A-H control negativo. Fuente: Elaboración propia

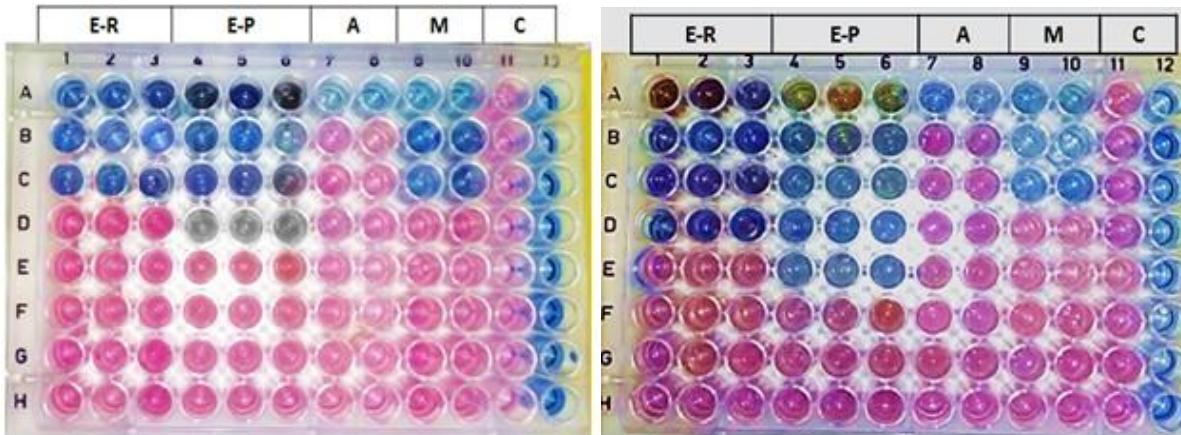


Figura 3.8: Determinación de viabilidad celular mediante biooxidación de resazurina. CMI de derivados semi-sintéticos de cáscara de palta sobre *H. pylori* cepa SS1 y 43504 después de 3 días de cultivo. Columnas 1, 2 y 3 son réplicas de epicatequina-resorcinol (ER). Columna 4, 5 y 6 son réplicas de epicatequina-pirogalol (EP), concentraciones decrecientes desde A-H (3000-62,5 µg/mL). Columna 7 y 8 amoxicilina (A) de A-H (1,28 - 0,01) µg/mL. Las columnas 9 y 10 contienen Metronidazol (M) A-H (128-8 µg/mL). La columna 11 de A-C control positivo con DMSO y de D-F control positivo con PBS. Columna 12 A-H corresponde al control negativo. Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.3: Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida (CMI y CMB) de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos para *Helicobacter pylori* cepas SS1 y ATCC 43504. Fuente: Elaboración propia

		ATCC 43504 (µg/mL)	SS1 (µg/mL)
Polímeros de cranberry	CMI	750	1500
	CMB	ND	ND
Polímeros de cáscara de palta	CMI	375	750
	CMB	1500	3000
Derivado epicatequin-pirogalol	CMI	187,5	375

	CMB	1500	1500
Derivado epicatequin-resorcinol	CMI	375	750
	CMB	3000	3000
Amoxicilina	CMI	0,01	0,01
	CMB	0,01	0,01
Metronidazol	CMI	32	32
	CMB	32	32
Controles		ATCC 43504	SS1
Control positivo PBS/DMSO	CMI	+	+
	CMB	+	+
Control negativo	CMI	-	-
	CMB	-	-

ND: No determinado

(+) Hubo crecimiento bacteriano, (-) No hubo crecimiento bacteriano

3.2.2 Viabilidad de *H. pylori* mediante la producción de ATP

Un ensayo adicional se realizó para medir la producción de ATP bacteriano incubando con diferentes concentraciones de compuestos durante 1 hr. Los gráficos (fig 3.9 A y B) muestran el efecto de concentraciones crecientes de los compuestos sobre el nivel de ATP en *H. pylori*, representado como porcentaje. Para realizar este ensayo se utilizaron valores cercanos a la CMI de cada compuesto como concentraciones más altas y como punto de comparación, disminuyendo estas concentraciones a la mitad con un total de 6 concentraciones más el control cero (sin compuestos). A partir de una curva de calibrado se obtuvieron los porcentajes del nivel de ATP en cada tratamiento. El ensayo realizado con los polímeros de procianidinas naturales se observa que a medida que aumenta la concentración de los compuestos, disminuye el nivel de ATP, lo que indica que a las concentraciones más altas, las bacterias disminuyeron su viabilidad evidenciado por la menor

producción de ATP. Ambos polímeros lograron disminuir la viabilidad bacteriana hasta un 35 % en su CMI. El ensayo también se realizó con los derivados semi-sintéticos en donde la disminución de la viabilidad fue mayor para ambos compuestos con tan solo un 18% de viabilidad en su CMI para Epicatequina-Resorcinol y un porcentaje menor al 10% de viabilidad para el derivado Epicatequina-Pirogalol en la CMI, disminuyendo aún más la viabilidad en concentraciones más altas del derivado

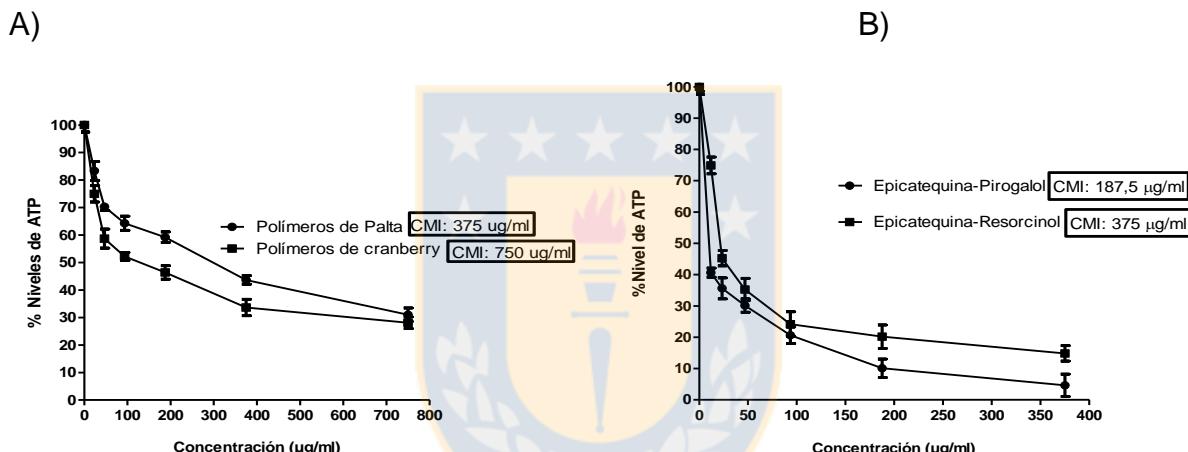


Figura 3.9: Efecto de procianidinas naturales (A) y semi-sintéticas (B) sobre los niveles intracelulares de ATP de *H. pylori* (ATCC 43504). *H. pylori* (10^7 UFC/mL) fueron incubados con varias concentraciones los compuestos por 60 min a 37°C. Cada punto representa la media de dos experimentos. Fuente: Elaboración propia

3.2.3 Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la actividad ureasa

Previo a los ensayos de inhibición de la ureasa comercial Jack Bean se procedió a incubar las muestras a diferentes horas para conocer si existía un aumento de la actividad anti-ureasa a través del tiempo mediante el ensayo del rojo fenol. Para esto

se tomó una concentración de cada muestra ($200 \mu\text{g/mL}$) y se incubó por 30 min, 1, 2, 3 y 4 h debido a que el vaciamiento gástrico ocurre cada 4 hr. En la figura 3.10 se muestra el gráfico de inhibición de ureasa Jack Bean a diferentes tiempos y se observa que a mayor incubación existe una mayor inhibición de la actividad enzimática frente a todos los compuestos ensayados. Sin embargo, dicha tendencia es algo más marcada para los aductos, para los cuales existe una tiempo-dependencia desde el comienzo. Para las procianidinas sólo hay una dependencia en los primeros minutos y luego la inhibición se hace independiente del tiempo de incubación, fenómeno ya reportado anteriormente por Pastene et al. (2009)

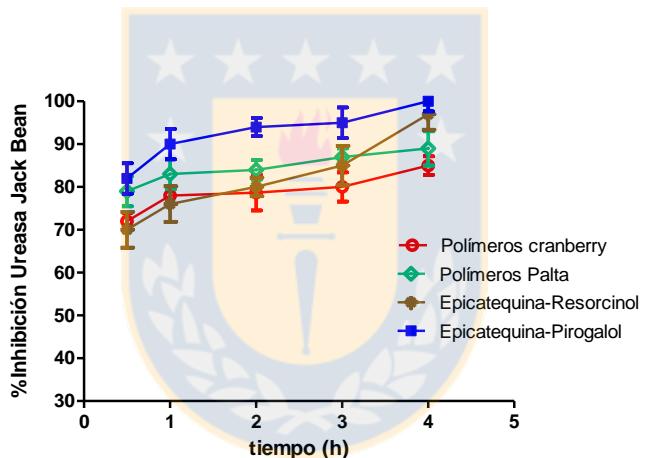


Figura 3.10: Inhibición de la Ureasa Jack Bean por las procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos con diferentes tiempo de incubación a $200 \mu\text{g/mL}$. Fuente: Elaboración propia

Las muestras de polímeros naturales de procianidinas y los derivados semi-sintéticos se probaron a diferentes concentraciones frente a la actividad ureasa Jack bean, mediante el ensayo rojo fenol previo a los ensayos con la Ureasa de *Helicobacter pylori* para comparación. Se agregó a los pocillos la ureasa previamente preparada y se incubó con diferentes concentraciones de los compuestos, inicialmente se tomó la

CMI de cada compuesto como concentración más alta, pero en este caso debido a que algunos compuestos al tener color y estar en una alta concentración en cada pocillo afectaba la lectura de absorbancias, además el derivado Epicatequina-Pirogalol después de un tiempo de incubación comienza a cambiar de color, debido a esto se tomó como concentración más alta $\frac{1}{2}$ de la CMI de cada compuesto, y además el ensayo de actividad ureasa se realizó con un tiempo máximo de incubación de 1hr.

Una vez obtenidos los datos, estos se analizaron y los gráficos obtenidos muestran el porcentaje de inhibición de la actividad ureasa Jack bean por las diferentes concentraciones de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos expresados en logaritmo (Fig.3.11). De las procianidinas naturales (A), ambos polímeros evidencian una respuesta similar alcanzando casi un 90% de inhibición a la mayor concentración, en cuanto a los aductos semi-sintéticos (B), ambos muestran una inhibición similar al de las procianidinas poliméricas, pero estos evidencian que a concentraciones más bajas el derivado epicatequina-pirogalol tiene mayor actividad anti-ureasa en comparación al resto de las muestras analizadas, teniendo en cuenta además que este compuesto presentó la menor CMI. Por lo tanto, la menor concentración utilizada en el ensayo, es la menor concentración entre todos los compuestos. Además todos los compuestos utilizados en este ensayo mostraron concentración-dependencia en donde a medida que se aumenta la concentración de los compuestos, aumenta la inhibición de la actividad ureasa Jack Bean.

Posteriormente, mediante la metodología señalada se logró extraer la ureasa de *Helicobacter pylori* de las cepas ATCC 43504 y SS1 para realizar el ensayo de actividad ureasa. Previo a realizar el experimento con las enzimas nativas se procedió a realizar un ensayo comparando la actividad de las enzimas de ambas cepas con la actividad de la ureasa Jack bean con el ensayo rojo fenol. En este experimento se logró estandarizar la cantidad suficiente de enzima nativa que se agregó a los pocillos para alcanzar una actividad similar a la obtenida con la ureasa

Jack Bean. Los gráficos (3.12 A y B) (3.13 A y B) muestran el porcentaje de inhibición de la actividad ureasa de ambas cepas frente los diferentes compuestos ensayados. Se observa para ambas enzimas de las cepas ATCC 43504 y SS1 de *H. pylori* que presentaron un comportamiento similar a la obtenida con la ureasa Jack Bean, en donde a medida que aumenta la concentración de los compuestos, aumenta también el porcentaje de inhibición de la ureasa nativa alcanzando un porcentaje cercano al 90% con los polímeros naturales para las enzimas de ambas cepas y un porcentaje similar de inhibición frente a los derivados semi-sintéticos. Para una mejor comprensión de los datos en el gráfico se agregó una tabla de conversión de concentración en $\mu\text{g/mL}$ a logaritmo de la concentración (Tabla 3.4). Un ensayo adicional se realizó con la enzima de la cepa ATCC 43504 en donde se incubó esta enzima durante 2 horas con las dos concentraciones más bajas utilizadas en este experimento (1,46 y 2,29) $\mu\text{g/mL}$, el resultado mostró que hubo un aumento de la inhibición enzimática en comparación al ensayo realizado incubando solo 1 hora con las mismas concentraciones de compuestos, este aumento de la inhibición fue de aproximadamente un 20 % más en cada caso (datos no mostrados).

A partir de los gráficos obtenidos, mediante el programa Graph pad se calcularon las IC50, este dato representa a la concentración que se necesita para inhibir al 50% de la actividad ureasa. La tabla 3.5 muestra los valores IC50 para la ureasa Jack Bean y para la ureasa nativa de ambas cepas de *H. pylori*, los datos evidencian que en todos los casos la mayor IC50 obtenida fue para los polímeros naturales de cranberry y luego los polímeros de palta, y las menores IC50 son para los derivados semi-sintéticos epicatequina-resorcinol y Epicatequina-pirogalol siendo este último el que necesitó una menor concentración para alcanzar la IC50 en todos los ensayos con la enzima, como comparación se agregó al ensayo el monómero epicatequina para demostrar que la inhibición de la enzima es producto de la unión del agente nucleofílico resorcinol o pirogalol al monómero epicatequina. Se observa que este monómero epicatequina por sí solo no logra inhibir la actividad de la enzima a las mismas concentraciones utilizadas con los derivados semi-sintéticos.

Tabla 3.4: conversión de concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) a Logaritmos. Fuente: Elaboración propia

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Log conc ($\mu\text{g/ml}$)
0,73	-0,13667714
1,46	0,16435286
2,92	0,46538285
5,85	0,76715587
11,71	1,0685569
23,43	1,36977229
46,87	1,67089495
93,75	1,97197128
187,5	2,27300127
375	2,57403127
750	2,87506126

A

B

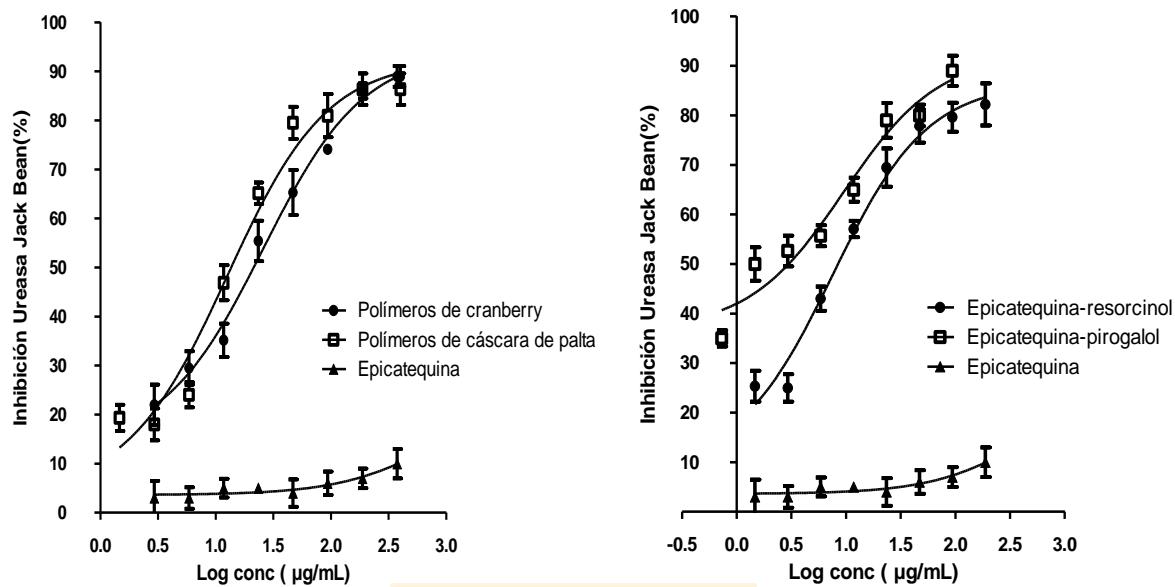


Figura 3.11: Porcentaje de inhibición de la actividad ureasa Jack Bean por procianidinas naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B). Fuente: Elaboración propia

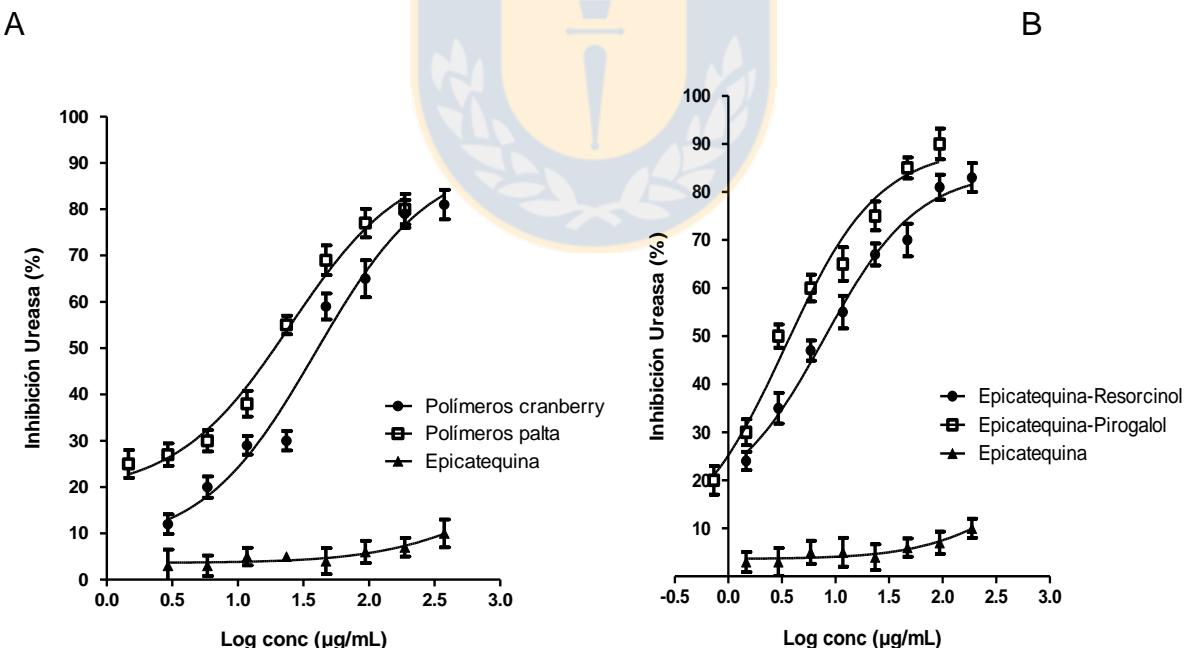


Figura 3.12: Porcentaje de inhibición de la actividad Ureasa de *H. pylori* cepa ATCC 43504 por las diferentes procianidinas naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B). Fuente: Elaboración propia

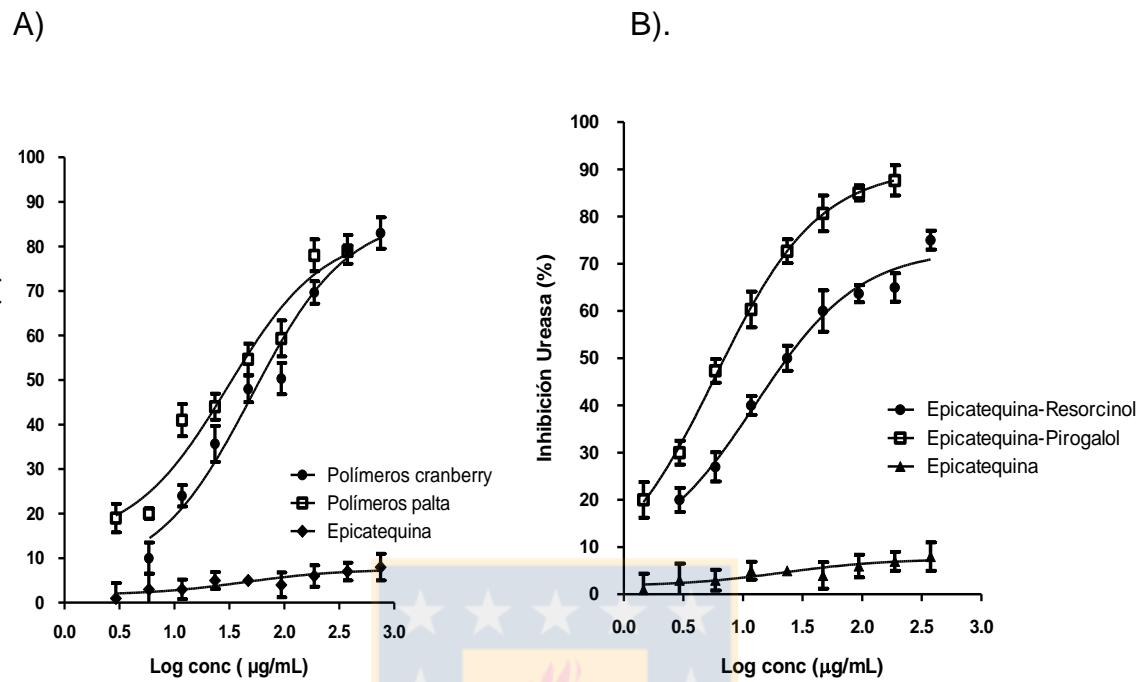


Figura 3.13: Porcentaje de inhibición de la actividad Ureasa de *H. pylori* cepa SS1 por las diferentes procianidinas naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B). Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.5: IC₅₀ de las ureasa Jack Bean y ureasa de *H. pylori* cepas ATCC 43504 y SS1. Fuente: Elaboración propia

	IC ₅₀ Jack Bean ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ <i>H. pylori</i> SS1 ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ <i>H. pylori</i> 43504($\mu\text{g/mL}$)
Polímeros cranberry	25,09	50,46	39,73
Polímeros cáscara de palta	19,56	30,13	25,61
Epicatequina-Resorcinol	17,06	17,60	19,91
Epicatequina-Pirogalol	12,217	15,84	12,89
Epicatequina	953,2	953,2	953,2

3.2.4 Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la actividad Anhidrasa Carbónica

Previo a los ensayos con la AC nativa de *H. pylori*, se realizaron ensayos de actividad con la anhidrasa comercial hAC-I a diferentes tiempo para estandarizar el tiempo de incubación. El gráfico 20 muestra el porcentaje de inhibición de la anhidrasa comercial durante 30 min, 1, 2, 3, 4 hr a 100 µg/mL, se observa al igual que para la ureasa que a medida que aumenta el tiempo de incubación, aumenta el porcentaje de inhibición de la hAC-I. A medida que se realizaba el ensayo en pocillos se observó que al incubar la enzima comercial junto a los compuestos, el color de estos interfería en la lectura de absorbancias, lo mismo que sucedió en el ensayo ureasa. El efecto de la oxidación de los aductos es más crítico en este ensayo colorimétrico, puesto que en la reacción de hidrólisis del sustrato NPA para medir la actividad de AC se evidencia por el cambio de color desde transparente al amarillo. Así, cualquier color como el rosado de cranberry o el color que adquiere el derivado epicatequina pirogalol al incubarse más de 1 hr afectaron las lecturas. Debido a esto las muestras con la enzima solo se incubaron durante media hora y las concentraciones que se utilizaron fueron de 100-0 µg/ml para eliminar el posible error de lectura de absorbancias debido al color de los compuestos.

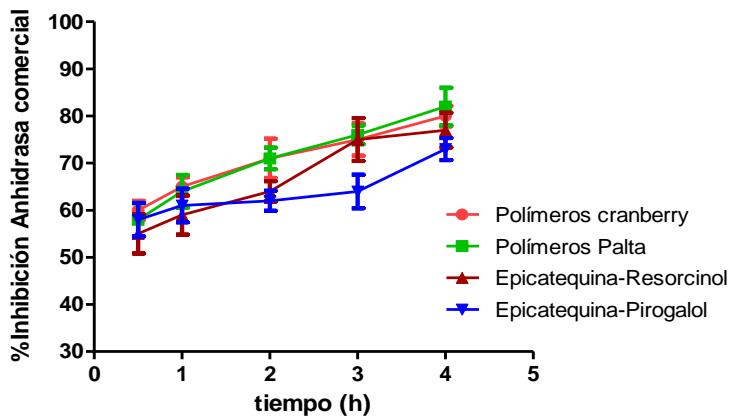


Figura 3.14: Inhibición de la Anhidrasa carbónica comercial por las procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos con diferentes tiempos de incubación a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Fuente: Elaboración propia

Se realizó el ensayo de actividad esterase con la enzima comercial y se observó en la Figura 3.15 que el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática aumenta a medida que aumentan las concentraciones de los compuestos alcanzando alrededor de un 50% de inhibición con los polímeros naturales de procianidinas a la mayor concentración utilizada para cada compuesto (Fig. 3.15 A) y más de un 60% de inhibición con los derivados semi-sintéticos a la mayor concentración. Además, se observa además que el monómero epicatequina no muestra inhibición de la enzima a las mismas concentraciones. (Fig. 3.15 B).

Posteriormente se realizó el mismo ensayo con la anhidrasa carbónica nativa. Para extraer la enzima de *H. pylori* de ambas cepas se prosiguió de acuerdo al procedimiento señalado en la metodología. Una vez obtenidas las enzimas de ambas cepas se realizó un ensayo comparativo de actividades en donde se logró estandarizar la cantidad suficiente de enzima nativa que se agregó a los pocillos para alcanzar una actividad similar a la obtenida con la enzima comercial.

Los gráficos de inhibición obtenidos (Fig. 3.16 y 3.17) muestran una tendencia similar a la obtenida con la AC comercial, pero la inhibición de la enzima obtenida de la cepa ATCC 43504 alcanza más de un 80% frente a los polímeros naturales con la mayor concentración utilizada 100 μ g/ml (Fig. 3.16 A), y frente a los derivados semi-sintéticos la inhibición de la enzima alcanza casi un 90% con el derivado epicatequina-resorcinol y casi un 100% con epicatequina-pirogalol (Fig. 3.16 B), también se observa concentración dependencia en todos los casos. Los polímeros naturales frente a la anhidrasa carbónica de la cepa SS1 presentan un comportamiento similar en donde la inhibición con los polímeros naturales alcanzan alrededor de un 70% (Fig. 3.17 A) mientras que la inhibición con los derivados semi-sintéticos se logra una inhibición cercana al 70% con el derivado epicatequina-Resorcínol y casi un 90% con epicatequina-pirogalol (Fig. 3.17 B), además se observa que a medida que aumenta la concentración de los compuestos, aumenta también la inhibición. En todos los casos el derivado epicatequina-pirogalol es el que evidencia un mayor efecto anti-HpAC. Para tener una visión más amplia del efecto inhibitorio, al igual que con la ureasa se tomaron las concentraciones más bajas de compuestos utilizadas en este ensayo (6,25 – 3,125) μ g/ml y se incubaron 2 horas con la anhidrasa carbónica extraída de la cepa ATCC 43504 de *H. pylori* y se observó un aumento de la inhibición enzimática llegando a aproximadamente un 70% de inhibición con las procianidinas naturales y alcanzando hasta un 100% de inhibición con los derivados semi-sintéticos (datos no mostrados).

A partir de los datos de inhibición se calcularon las IC50 (tabla 3.6) se verifica que el derivado epicatequina-pirogalol es el que necesita una menor concentración para lograr inhibir el 50% de la actividad de la AC, luego el derivado epicatequina-resorcinol y finalmente los polímeros naturales.

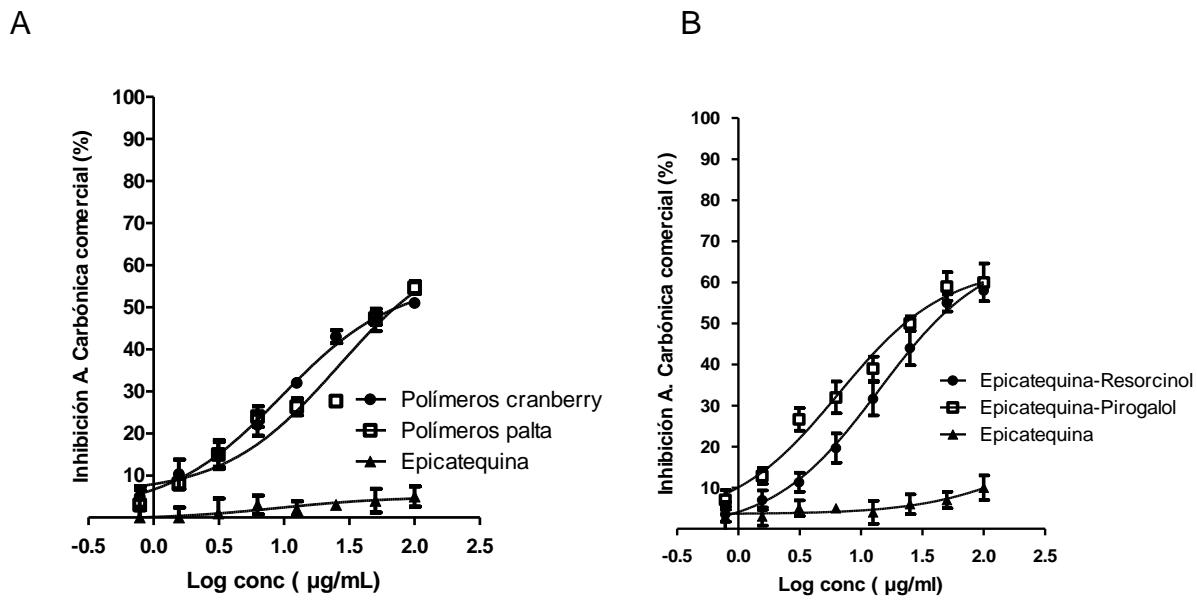


Figura 3.15: Porcentaje de inhibición de la Anhidrasa Carbónica Comercial Humana frente a los polímeros naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B). Fuente: Elaboración propia

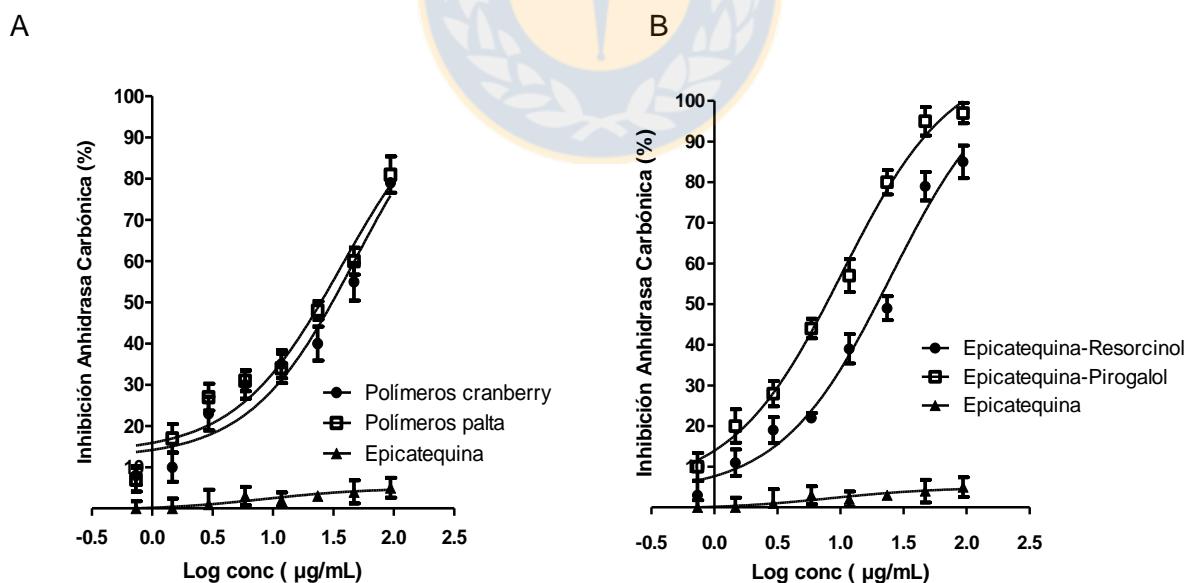


Figura 3.16: Porcentaje de inhibición de la Anhidrasa Carbónica de *H. pylori* cepa ATCC 43504 frente a los polímeros naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B). Fuente: Elaboración propia

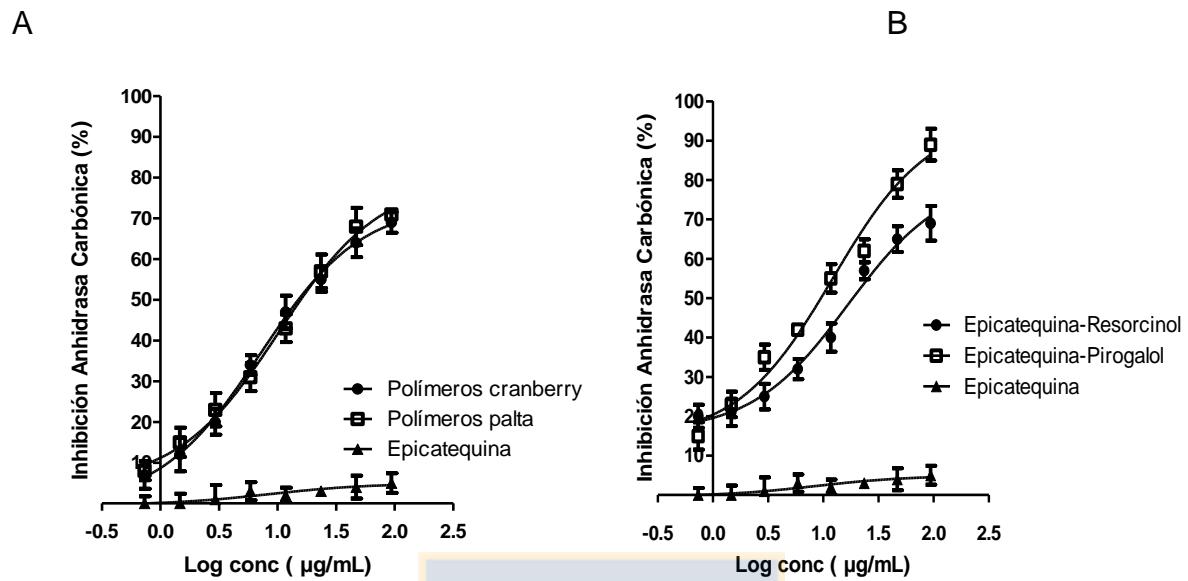


Figura 3.17: Porcentaje de inhibición de la Anhidrasa Carbónica de *H. pylori* cepa SS1 frente a los polímeros naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B). Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.6: IC50 de las anhidrasa carbónica comercial y anhidrasa carbónica de *H. pylori* cepas ATCC 43504 y SS1. Fuente: Elaboración propia

	IC50 (µg/mL)	IC50 (µg/mL)	IC50 (µg/mL)
	hAC-I	<i>H. pylori</i>	<i>H. pylori</i>
	comercial	SS1	43504
Polímeros cranberry	55,4	25,44	40,32
Polímeros cáscara de palta	60,54	25,34	38,65
Epicatequina-Resorcinol	63,69	16,87	15,23
Epicatequina-Pirogalol	59,57	10,45	11,41
Epicatequina	953,2	953,2	953,2

3.3 Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la adherencia de *H. pylori* y la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias en células de adenocarcinoma gástrico (AGS).

3.3.1 Ensayo de citotoxicidad

Previo a los ensayos de adherencia bacteriana a células AGS se realizó un análisis para determinar las concentraciones de los compuestos que no afecten la viabilidad celular. En base a los gráficos obtenidos se puede observar que la viabilidad se mantiene alrededor del 90% con 1000 µg/mL en la mayoría de los casos, para asegurar la viabilidad celular en todos los ensayos se tomó como concentración más alta 700 µg/mL (Fig. 3.18 A y B)

El efecto de los diferentes compuestos sobre la adherencia bacteriana a células AGS se determinó midiendo la intensidad de fluorescencia de FITC-*H. pylori*. Los gráficos (Fig. 3.19 y 3.20) muestran el porcentaje de la intensidad de fluorescencia de cada compuesto a diferentes concentraciones. Se tomó como el 100% de intensidad de fluorescencia a las células AGS infectada con *H. pylori* (sin compuesto) y en base a esto se calculó el porcentaje de fluorescencia de los tratamientos en cada ensayo. Los gráficos realizados con la cepa ATCC 43504 (Fig. 3.19 A) claramente muestran que a menor concentración de los compuestos (47 µg/mL) existe una mayor intensidad de fluorescencia lo que indica que hay una mayor adherencia de *H. pylori* a las células AGS. Además a medida que aumenta la concentración de los compuestos (47-700 µg/mL), la intensidad de fluorescencia disminuye, evidenciando una menor adherencia de *H. pylori* lo que indica que estos compuestos están inhibiendo su adherencia en células AGS. El comportamiento es similar para los polímeros naturales y derivados semi-sintéticos siendo estadísticamente significativos en todos los tratamientos en comparación con el control sin los compuestos (0 µg/mL). La figura 3.19 B muestra las imágenes obtenidas del ensayo de adherencia con el equipo IBOX scientia donde se logra visualizar que a la mayor

concentración hay menos intensidad de fluorescencia y en todos los casos a medida que disminuye la concentración se observa mayor fluorescencia, esto se puede comparar con el control positivo el que se ve de un color rojo más intenso lo que indica que *H. pylori* marcado está fuertemente adherido a las células AGS a diferencia del control negativo (sin bacterias) donde no se observa fluorescencia. Para la cepa SS1 de *H. pylori* (Fig. 3.20 A) se observa el mismo patrón siendo todos los tratamientos estadísticamente significativos en comparación con el 100% de adherencia o cero concentración de compuestos, las imágenes de fluorescencia (Fig. 3.20 B) confirman los resultados.

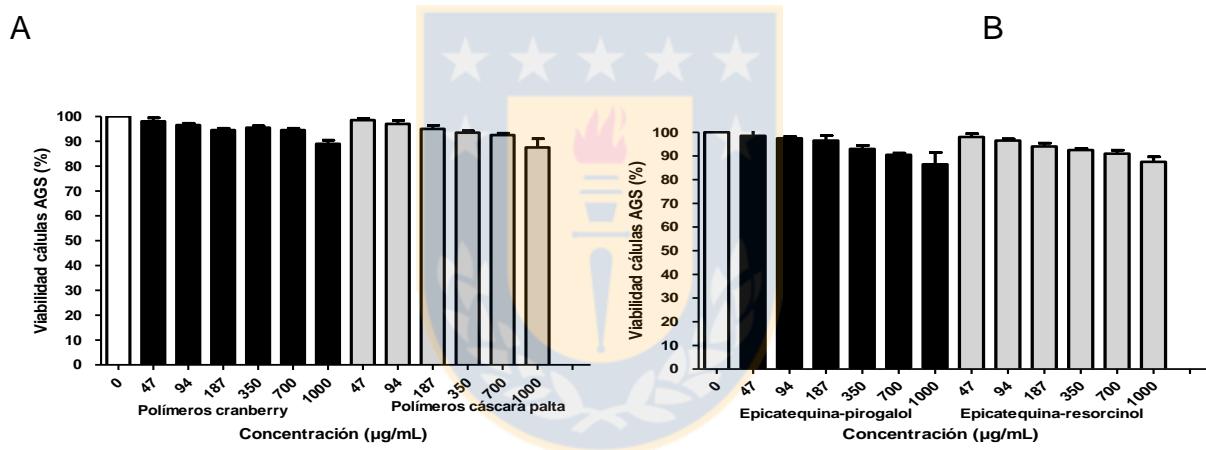
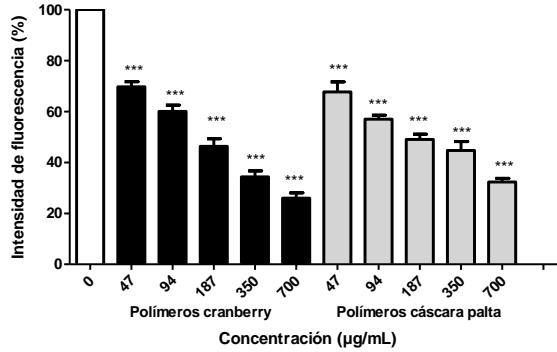


Figura 3.18: Viabilidad de células AGS frente a los polímeros naturales de procianidinas (cranberry y cáscara de palta) (A) y derivados semisintéticos (epicatequina-pirogalol y epicatequina-resorcínol) (B). Fuente: Elaboración propia

3.3.2 Ensayo de adherencia a células AGS

A)



B)

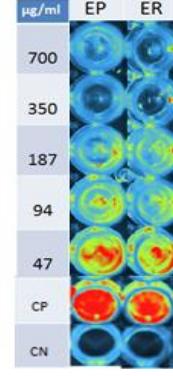
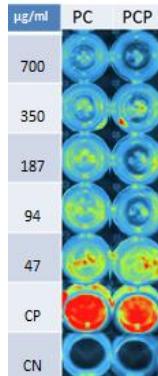
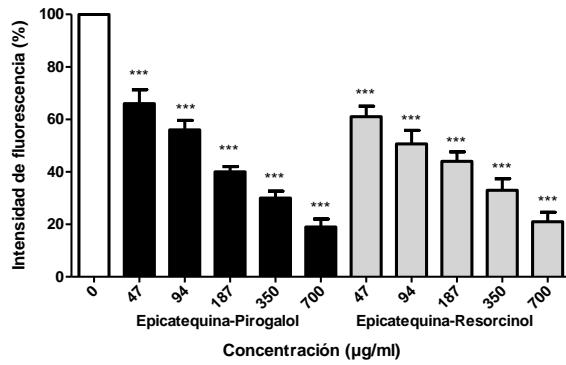


Figura 3.19: A) Efecto de la adherencia de *H. pylori* ATCC 43504 frente a las procianidinas naturales y semi-sintéticas. B) Intensidad de fluorescencia posterior a la infección de células AGS con *H. pylori* ATCC 43504 marcado con FITC. PC: Polímeros de cranberry, PCP: Polímeros de cáscara de palta, EP: Epicatequina-pirogalol, ER: Epicatequina-resorcinol. Fuente: Elaboración propia

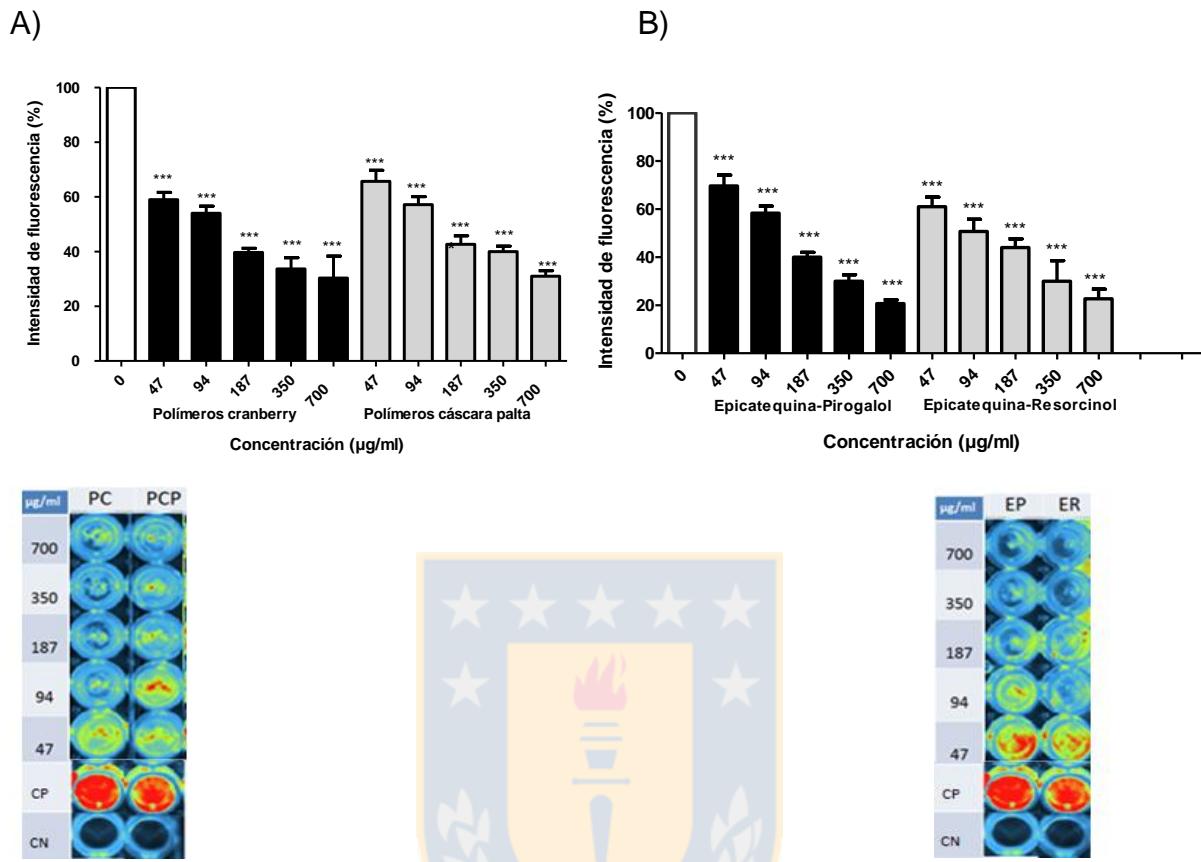


Figura 3.20: A) Efecto de la adherencia de *H. pylori* SS1 frente a las procianidinas naturales y semi-sintéticas. B) Intensidad de fluorescencia posterior a la infección de células AGS con *H. pylori* SS1 marcado con FITC. PC: Polímeros de cranberry, PCP: Polímeros de cáscara de palta, EP: Epicatequina-pirogalol, ER: Epicatequina-resorcinal. Fuente: Elaboración propia

3.3.3 Ensayo de inflamación

Se analizó la producción de IL-8 la cual es una citoquina proinflamatoria mediante el kit comercial de ELISA. Para esto se tomaron los sobrenadantes del ensayo de adherencia. Las células producen interleuquina-8 inducidas por la adherencia de *H. pylori* a las células AGS, el objetivo de este ensayo era saber si los polímeros naturales o los semi-sintéticos tenían algún efecto protector en la inflamación frente a la infección por *H. pylori*.

Los gráficos de la figura 3.21 A para la cepa ATCC 43504 muestran que los polímeros naturales desde los 94 µg/mL en adelante son estadísticamente significativos con respecto al control, y más diferencias significativas se observan con las mayores concentraciones usadas 350 µg/mL y 700 µg/mL, en cuanto a los compuestos semi-sintéticos (Fig. 3.21 B) para ambos se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control con todas las concentraciones utilizadas en el tratamiento desde 47-700 µg/ml, por lo tanto las células producen menos IL-8 cuando son tratadas con estos compuestos.

El mismo patrón se observa para las células infectadas con la cepa SS1 de *H. pylori*, en este caso en todos los tratamientos se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos en el ensayo de adherencia (Fig. 3.22 A y B)

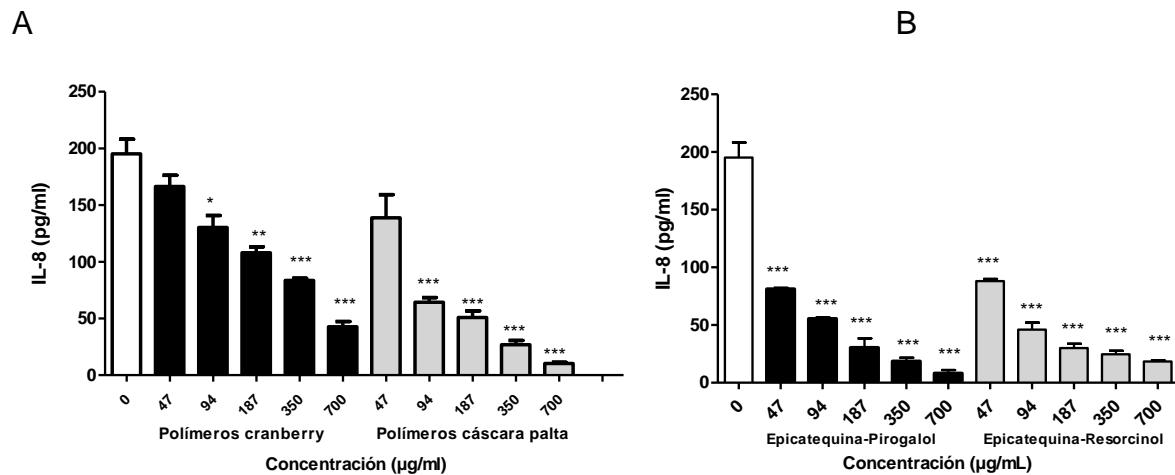


Figura 3.21: Efecto de procianidinas naturales y semi-sintéticas en la producción de interleuquina 8 (IL-8) en células AGS inducida por la cepa ATCC 43504 de *H. pylori*.
Fuente: Elaboración propia

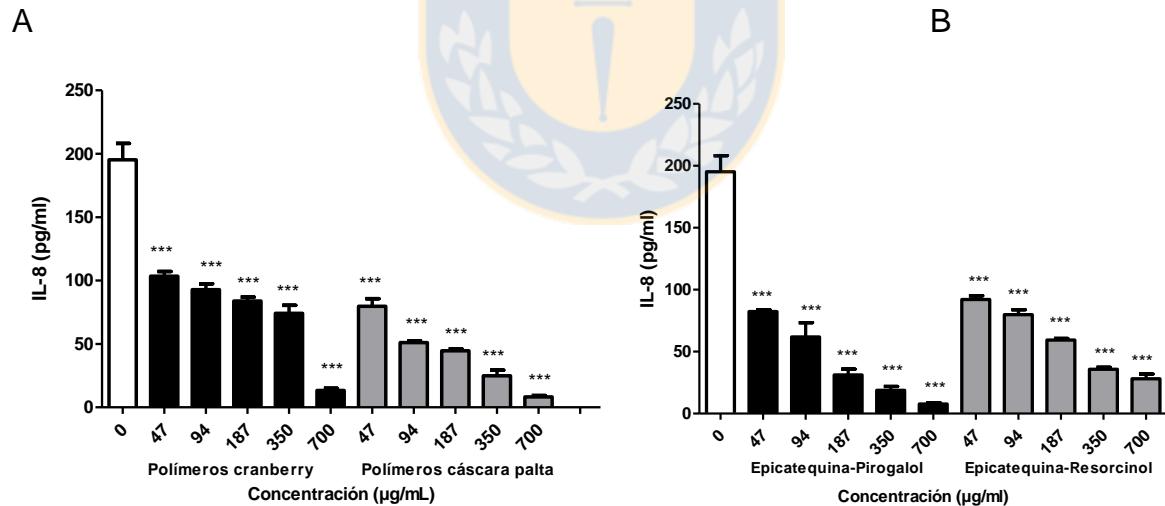


Figura 3.22: Efecto de procianidinas naturales (A) y semi-sintéticas (B) en la producción de interleuquina 8 (IL-8) en células AGS inducida por la cepa SS1 de *H. pylori*.
Fuente: Elaboración propia

3.4- Efecto de procianidinas naturales y semi-sintéticos sobre la producción de ROS en neutrófilos estimulados por *H. pylori*

*3.4.1- Efecto de procianidinas naturales y semi-sintéticos sobre la producción de ERO en neutrófilos estimulados por *H. pylori**

Se evaluó el efecto de las procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos sobre la producción de ERO en neutrófilos estimulados por *H. pylori*, para esto inicialmente se realizó un ensayo que demostró la respuesta de los neutrófilos frente a dos estímulos, PMA y *H. pylori*. PMA es un activador directo de las proteína kinasas (PKCc) que no requiere unión a receptor. Como resultado de su activación, hay movilización de calcio y ensamblaje del complejo NADPH oxidasa. Lo anterior genera primeramente ERO al interior del neutrófilo y posteriormente un flujo hacia el exterior, esta producción de ERO se mide con luminol sódico que finalmente al oxidarse es capaz de emitir luz. Así también *H. pylori* es un inductor de ERO. En la figura 3.23, se observa en el gráfico la respuesta de neutrófilos frente a PMA y *H. pylori* en el tiempo. Inicialmente se agregó la sangre fresca ($\sim 10^3$ células polimorfonucleares + luminol), luego de 10 minutos se estimularon con 200 nM de PMA. Por otro lado las células se incubaron con *H. pylori* con una MOI 25:1. En ambos experimentos se evidenció una respuesta similar en el tiempo, en donde se observa un aumento de la luminiscencia a partir de los 10 min producto de la estimulación, luego de 10 min después del estímulo se llega a un máximo de luminiscencia lo que indica el punto de mayor producción de ERO. Se utilizó esta concentración de bacterias en pocillo para realizar todos los ensayos posteriores.

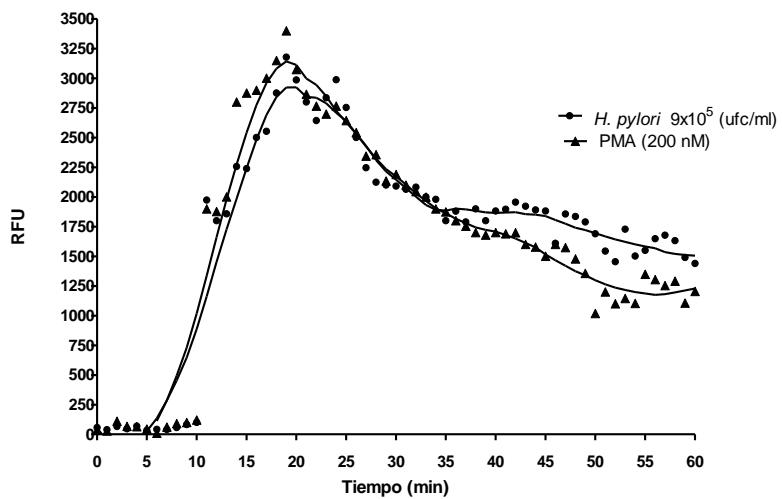
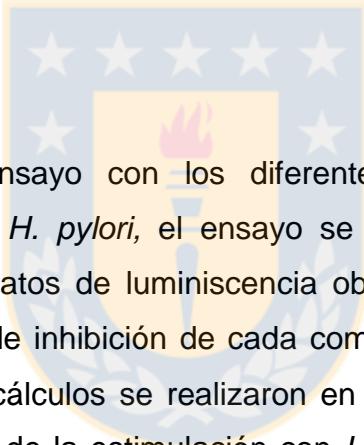


Figura 3.23: Producción de ERO en neutrófilos estimulados con PMA y *H. pylori*.

Fuente: Elaboración propia



Luego para realizar el ensayo con los diferentes compuestos, se prosiguió reemplazando el PMA por *H. pylori*, el ensayo se realizó con ambas cepas por separado. A partir de los datos de luminiscencia obtenidos en el equipo IBOX se calcularon los porcentajes de inhibición de cada compuesto con respecto al control cero o sin inhibidor, estos cálculos se realizaron en el máximo de luminiscencia el cual fue a los 10 min luego de la estimulación con *H. pylori* como se muestra en el gráfico anterior. Se observa el efecto de las procianidinas poliméricas y derivados semi-sintéticos sobre la producción de ERO en neutrófilos, estimulados por *H. pylori*, para la cepa ATCC se muestra que los polímeros de procianidinas naturales logran inhibir la luminiscencia, lo que indica una menor producción de ERO en neutrófilos, las concentraciones utilizadas en este ensayo fueron de (100-0) µg/mL en donde a la mayor concentración logra una mayor inhibición de la producción de ERO alcanzando casi un 90% (Fig. 3.24 A). Los derivados semi-sintéticos también logran inhibir la producción de ERO de modo similar a los polímeros naturales (Fig. 3.24 B).

Un comportamiento similar se evidenció con la cepa SS1 de *H. pylori* (Fig. 3.25 A y B). En todos los casos hay concentración dependencia, en donde, a medida que aumenta la concentración de compuestos, aumenta el porcentaje de inhibición

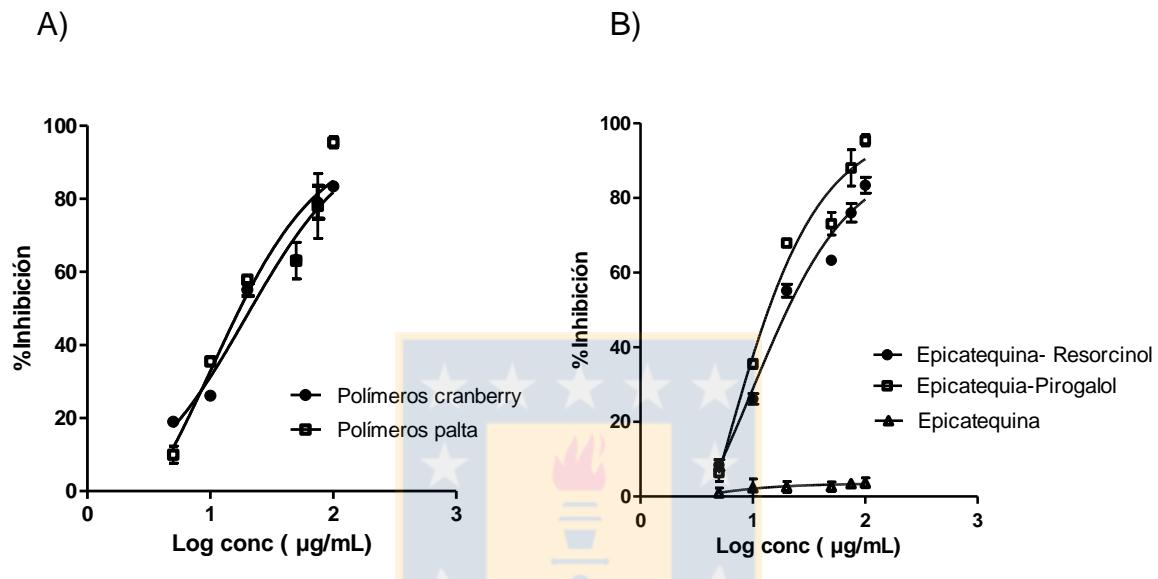


Figura 3.24: Porcentaje de inhibición de ERO en neutrófilos estimulados con *H. pylori* 43504 frente a procianidinas naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B). Fuente: Elaboración propia

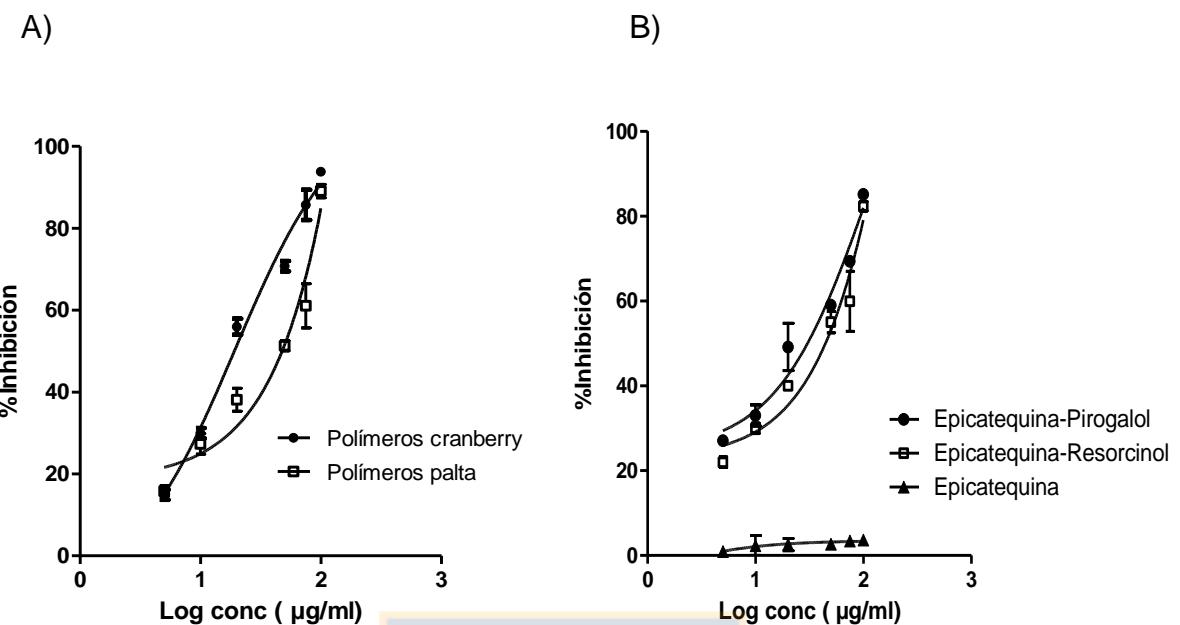


Figura 3.25: Porcentaje de inhibición de ERO en neutrófilos estimulados con *H. pylori* SS1 frente a procianidinas naturales (A) y derivados semi-sintéticos (B). Fuente: Elaboración propia

4 DISCUSIÓN

4.1 obtención de polímeros de procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos.

En este trabajo se utilizó como fuente de extracción de polifenoles, la cáscara de palta y zumo de cranberries, estas fuentes vegetales presentan una alta cantidad de polifenoles y como es conocido estos presentan una gran variedad de propiedades beneficiosas para la salud, además, la cáscara de la palta es un desecho agroindustrial, ya que esta se elimina para los preparados de puré de palta entre otros. En este trabajo a partir de 1 kg de cáscara fresca se logró obtener 27 gr de extracto polifenólico seco (2,7% de rendimiento) a través de la extracción acuosa mencionada en la metodología, estos resultados son concordantes con el trabajo realizado por Chávez *et al.* (2011), donde emplearon la misma metodología y lograron obtener a partir de 15 g de cáscara fresca 420 mg de extracto seco, lo que representa un 2,8 % de rendimiento. Por otro lado a partir del cranberry se obtuvo un menor rendimiento de polifenoles en comparación con la cáscara de palta, pero se debe tener en cuenta que la extracción se realizó a partir de la trituración del fruto en agua y fue necesario centrifugar previo a limpieza en la columna, por lo tanto debido al centrifugado pudo perderse gran cantidad de los polifenoles (fracción unida) de este fruto. Las procianidinas pueden estar libres o unidas, pero lo habitual es que interaccionen fuertemente con las fibras vegetales. Su interacción con la celulosa solo puede ser eliminada mediante tratamientos con NaOH. Posteriormente se utilizó el sistema CPC para la obtención de las fracciones poliméricas de procianidinas y debido a que la preparación del extracto de cáscara de palta fue más fácil de realizar, se tomó esta muestra para obtener los derivados semi-sintéticos de procianidinas, se realizaron varias metodologías descritas en bibliografía para lograr obtener un rendimiento significativo de los derivados, finalmente se modificó un método el cual permitió obtener mayores cantidades de los derivados.

La ventaja del sistema CPC que se utilizó en este estudio es que se logró obtener rápidamente una gran cantidad de muestra con una sola inyección en comparación con otras técnicas de separación en que el volumen de inyección es menor, por lo tanto la muestra obtenida es pequeña y se requiere varias repeticiones para obtener una cantidad de muestra significativa. En el sistema utilizado en este estudio se pudo inyectar un volumen de 10 mL lo que permitió aumentar la cantidad de muestra recolectada. Esta técnica tiene además otras ventajas es que al ser una separación líquido- líquido, disminuye el riesgo de degradación de ciertos compuestos lábiles. En CPC los polifenoles se separan de acuerdo a su coeficiente de partición. El sistema utiliza la fuerza centrífuga que produce un mezclado altamente eficiente de ambas fases líquidas que son inmiscibles y la retención de una gran parte de la fase estacionaria, esto permite mejorar la transferencia de masa entre las fases y una mejor separación de las fracciones con polaridades similares. Al no tener una fase con soporte sólido, se evita la adsorción irreversible de la muestra en la columna, por lo tanto, la recuperación de los compuestos es casi un 100%. Este sistema tiene la versatilidad de poder seleccionar la modalidad de separación desde fase normal a fase inversa para un mismo sistema de solventes. Además, la separación se puede hacer más eficiente y menos laboriosa, invirtiendo las fases o el flujo, lo que se conoce como CPC en modos extrusión y modo dual, respectivamente. Otra ventaja es que además una gran parte de las fases utilizadas pudieron ser recuperadas mediante destilación simple. Otra técnica que ayudó a identificar las muestras fue la cromatografía en capa fina TLC. Este tipo de análisis al ser una técnica rápida y sencilla permite conocer la identidad tentativa (usando patrones) de los compuestos que se desean purificar. Todas las muestras de procianidinas naturales y semi-sintéticas que obtuvieron se analizaron rápidamente por TLC, por lo tanto, en base a esta técnica se logró identificar los compuestos que se deseaban evaluar y se descartaron el resto de fracciones o picos que no forman parte de los análisis biológicos. Finalmente, gracias al análisis por HPLC acoplado a espectrometría de masas se logró verificar la presencia de los aductos producto de cada

depolimerización, usando la relación m/z de sus pesos moleculares y comparándola con el peso molecular teórico del compuesto formado

4.2 Determinación de CMI, CMB y viabilidad de *H. pylori* frente a procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos

Como se mencionó en los resultados, previo a los ensayos de actividad enzimática se realizó el calculó de las CMI y CMB para obtener las concentraciones a usar sobre la enzima aislada. Con respecto a las CMI encontrada para cada compuesto se observa que son distintas para ambas cepas de *H. pylori*, pero en general las diferencias son solo de una dilución en la concentración de las muestras. Además se debe tener en cuenta que las concentraciones utilizadas de cada compuesto fueron disminuyéndose a la mitad desde 3000-62,5 µg/mL, por lo que las diferencias podrían deberse a pequeñas variaciones en la preparación de los compuestos o los inóculos bacterianos utilizados en el ensayo. De todos los compuestos la menor CMI se obtuvo con el derivado epicatequina-pirogalol con 187,5 µg/mL. En cuanto a las CMB obtenidas, estas fueron más altas que las CMI en todos los casos, e incluso con las concentraciones utilizadas no se logró determinar la CMB para las procianidinas de cranberries. A pesar de las altas concentraciones que se obtuvieron para las CMB en comparación con los antibióticos de la triple terapia que se utilizaron a modo comparativo, hay que tener en cuenta que estos compuestos además de estar inhibiendo el crecimiento bacteriano o matando las bacterias, también podrían inhibir diferentes factores de virulencia que son vitales e importantes para la colonización in vivo de *H. pylori* como la actividad ureasa y hpAC, adherencia, morfología, movilidad, etc.

Como una forma de entender cómo los compuestos utilizados en este estudio disminuyen la viabilidad bacteriana, se realizó un ensayo adicional se realizó para medir la viabilidad de *H. pylori* de la cepa ATCC 43504 a través la medición de ATP

intracelular. Los compuestos utilizados disminuyeron la viabilidad de *H. pylori* en forma concentración-dependiente. Interesantemente se encontró que estos compuestos logran disminuir en gran parte la viabilidad bacteriana después de una hora de incubación con la bacteria. Se tomó la CMI de cada compuesto como punto comparativo y en general todos los compuestos alcanzan una disminución de la viabilidad importante. De todos los compuestos utilizados en este trabajo el derivado epicatequina-pirogalol fue el que logró una mayor disminución de la viabilidad de *H. pylori*, aun siendo el compuesto que poseía la menor CMI de todos. En un estudio similar, Nagata *et al.* (2001), reportaron el efecto concentración-dependiente de lansoprazol sobre los niveles de ATP en *H. pylori*. Sin embargo, aun cuando la actividad respiratoria fue suprimida completamente a partir de concentraciones de 100 µg/mL de lansoprazol, no fue posible disminuir los niveles de ATP más allá de un 20 %. Los autores concluyeron que existe una fracción de ATP insensible a lansoprazol y que probablemente no esté ligado a la actividad respiratoria de *H. pylori*.

Si bien es conocido que las procianidinas poseen efecto anti-*H. pylori* y que este es considerado moderado, en este trabajo se utilizaron estas procianidinas como templado para el desarrollo de nuevos derivados con mayor potencia, lo que fue demostrado en éste y el resto de los ensayos. Al respecto, en un estudio realizado por Li *et al.* (2007), se fabricó un derivado resultante del acoplamiento entre antibiótico-antioxidante (metronidazol-genisteína) que mostró una actividad anti-*H. pylori* muy potente (MIC = 0.39 µg/mL).

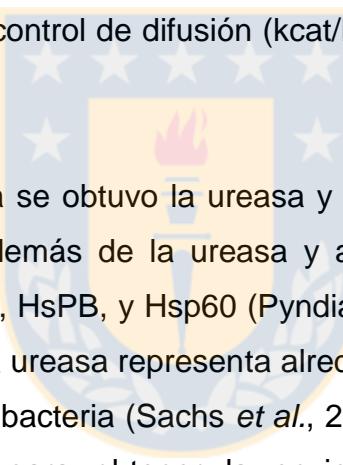
4.3 Efecto de procianidinas y derivados semi-sintéticos frente a la actividad enzimática de la Ureasa y Anhidrasa carbónica de *H. pylori*

Para realizar los ensayos de la actividad enzimática de la ureasa, se eligió la mitad de la CMI, esto se debió a que a medida que se realizaban los ensayos se

presentaron algunos problemas de método ya que al usar la CMI de cada compuesto, en algunos casos las concentraciones a usar fueron muy altas y al agregar los compuestos en pocillo junto con el buffer del rojo fenol y urea este se visualizaba de un color diferente al del rango de color normal del ensayo que va de naranja a rosado intenso cuando hay mayor actividad enzimática, lo que finalmente afectaba la lectura de absorbancias. Por otro lado sucedió lo mismo con el ensayo de la actividad de anhidrasa carbónica (AC), pero este fue aún más acentuado debido a que el rango de color del ensayo va de transparente a amarillo por lo que el color de las muestras de las concentraciones más altas y el tiempo de incubación de la enzima con los compuestos afectaba la lectura de absorbancias, incluso en los ensayos realizados con $\frac{1}{2}$ de la CMI la lectura se vio afectada, por este motivo se tomaron concentraciones más bajas (100-0) $\mu\text{g/mL}$ en todos los casos y tiempos más cortos de incubación de la enzima más los compuestos.

En el caso de los ensayos sobre la actividad enzimática se utilizaron dos ureasa para comparación, la de *H. pylori* y la ureasa Jack Bean. Las ureasas en general contienen tres tipos de subunidades, α , β y γ . Sus masas moleculares están en el rango de 68–73 kDa (α), 8–17 kDa (β) y 8–12 kDa (γ). Las ureasas bacterianas generalmente están formadas por tres subunidades denominadas α , β , y γ . En contraste, la ureasa de *H. pylori* posee sólo dos de éstas subunidades: α (60–66 kDa) y β (26–31 kDa), las cuales se encuentran asociadas en forma no covalente. La subunidad alfa de la ureasa de *H. pylori* comparte un 48% de identidad en secuencias de aminoácidos con las correspondientes N-terminal de la ureasa Jack bean (Krajewska & Zaborska, 2007). Independiente de sus diferencias estructurales, las secuencias aminoacídicas de los sitios activos son básicamente similares en todas las ureasas conocidas, en consecuencias el mecanismo catalítico es el mismo, el sitio activo está siempre ubicado en la subunidad alfa y contiene un centro catalítico con dos átomos de níquel (II) separados por una distancia de 3,5 a 3,7 Å (Ciurli *et al*, 1999). Adicionalmente, los inhibidores clásicos de ureasas vegetales, inhiben de igual manera a las ureasas bacterianas.

Para los ensayos sobre la AC también se utilizaron dos enzimas con fines comparativos, la de *H. pylori* (HpAC) y la anhidrasa humana I (hAC I). La HpAC se presenta en dos isoformas, una citoplasmática Hp β AC y una en el periplasma HpaAC. Chirica *et al.* (2001) encontró que la HpaAC tenía una actividad catalítica similar a la hACI y posteriormente (Chirica *et al.*, 2002), describió el tipo de estructura de la HpaAC e informaron que compartían un 28% de identidad con la secuencia de la hACII. Nishimori *et al.* (2006) encontró que la isoforma citoplasmática tiene una actividad catalítica 3.2 veces mayor que la de HpaAC, sin embargo, su Km está más cerca al valor informado para hAC II. En general, la eficiencia catalítica de la AC es una de las más altas en naturaleza (k_{cat} CO $_2$ 10^6 s $^{-1}$) con constantes de segundo orden próximas al límite de control de difusión (k_{cat}/K_m CO $_2$ 10^8 M $^{-1}$ s $^{-1}$) (Lingskog & Silverman, 2000).



Con la metodología utilizada se obtuvo la ureasa y las HpAC, pero estas no fueron purificadas, por lo tanto, además de la ureasa y anhidrasa se encontraban otras proteínas como GroEL, IlvC, HsPB, y Hsp60 (Pyndiah *et al.*, 2007), a pesar de esto, cabe destacar que la enzima ureasa representa alrededor del 2-16% de las proteínas totales sintetizadas por esta bacteria (Sachs *et al.*, 2003), por lo tanto no se necesitó acumular tantas bacterias para obtener la enzima concentrada. La HpAC se encuentra en menor cantidad por lo que fue necesario acumular más bacterias para la obtención de la enzima más concentrada.

El ensayo de actividad ureasa demostró que todos los compuestos naturales y derivados semi-sintéticos poseen un efecto similar frente a la inhibición de la actividad enzimática. Las procianidinas naturales alcanzan casi un 90% de inhibición, mientras que de los derivados semi-sintéticos el compuesto epicatequina-pirogalol también logra alcanzar casi un 90% de inhibición. No obstante se debe tener en cuenta que se utilizó como concentración más alta la $\frac{1}{2}$ CMI de cada compuesto, y este derivado es el que presentó la menor CMI. Por lo tanto, el aducto de pirogalol

alcanzó una alta inhibición a una concentración menor a las utilizadas con el resto de los compuestos. Cabe destacar que como un ensayo adicional (datos no mostrados) se incubó la enzima durante 2 h con las concentraciones más bajas utilizadas en este ensayo (1,46 y 2,92) $\mu\text{g/mL}$ y se logró alcanzar una inhibición mayor a la lograda incubando solo 1h, con un aumento aproximadamente de 20% más para cada compuesto.

Para la actividad AC se observó que las procianidinas naturales presentaron entre un 70-80% de inhibición enzimática para ambas cepas de *H. pylori*, mientras que los derivados semi-sintéticos alcanzaron una mayor inhibición, siendo el derivado epicatequina-pirogalol el que alcanzó un mayor porcentaje de inhibición llegando casi a 100%. Al igual que con la ureasa se realizó un ensayo adicional donde se incubó la enzima AC con las concentraciones más bajas utilizadas en el ensayo (6,25- 3,125) $\mu\text{g/mL}$ durante 2h (datos no mostrados) y se observó que la inhibición llegó al 70% aproximadamente con los polímeros naturales de procianidinas. Interesantemente, con los derivados, principalmente con epicatequina-pirogalol, la inhibición aumento casi al 100%. Por lo tanto, en todos los ensayos se encontró que el derivado epicatequina-pirogalol fue el que presentó el mayor efecto contra la actividad ureasa y AC ya que fue el compuesto que requirió una menor concentración para lograr inhibir el 50% de la actividad enzimática (IC₅₀) lo que concuerda con los datos obtenidos para las CMI en donde también este derivado fue el más efectivo. En general todos los compuestos naturales y semi-sintéticos presentaron concentración-dependencia, y alcanzaron altos porcentajes de inhibición enzimática a pesar de los cortos tiempos de incubación que se utilizaron en estos ensayos. Se debe tener en cuenta que las gráficas que muestran la inhibición de la enzima en el tiempo, evidencian que mientras más tiempo se incube la enzima con los compuestos (0,5-4 h), mayor es el porcentaje de inhibición. En estos ensayos se incubaron los compuestos con la ureasa solo 1 hr y para la enzima AC solo 30 min producto de los problemas de interferencia que se mencionaron anteriormente.

Con respecto a las procianidinas naturales utilizadas en este estudios sobre la actividad ureasa, los resultados obtenidos son consistentes con el trabajo realizado anteriormente por Pastene *et al.* (2009; 2014) en donde encontraron que las proantocianidinas (PAC) pueden inhibir la ureasa y se estableció que el efecto de estos compuestos depende en gran medida de su tamaño molecular y tipo de monómero. Se demostró que la estructura activa mínima contra la ureasa de *H. pylori* corresponde a los dímeros, y a medida que se aumentaba el grado de polimerización desde dímeros hasta polímeros aumentaba el grado de inhibición de la actividad enzimática, por lo tanto son los polímeros de las procianidinas naturales los que tienen mayor efecto inhibitorio.

Por otro lado con respecto a los derivados semi-sintéticos obtenidos a través del ataque nucleofílico con pirogalol y resorcinol, la inhibición presentada frente a las actividades de la enzima ureasa y anhidrasa carbónica se debe a la formación del derivado, ya que el monómero epicatequina por sí solo no logró inhibir la actividad de estas enzimas como se observa en los gráficos, por ende la formación de este derivado conformado por un núcleo flavan-3-ol y la introducción de un sustituyente en la posición C-4 es la responsable de la inhibición enzimática.

En el estudio llevado a cabo por Xiao (2013) se determinó que el tamaño y la hidrofobicidad de las moléculas evaluadas eran factores fundamentales en la inhibición de la ureasa de *H. pylori*, determinando que moléculas más bien hidrofóbicas y pequeñas tenían una actividad mayor sobre la enzima. Debido al gran tamaño y alta polaridad de las procianidinas utilizadas en este estudio, estas apenas podrían ingresar e inhibir el pool citoplásmico de ureasa. Esto último sugiere que las procianidinas 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 procianidinas son eficaces *in vivo*. Por ejemplo, entre los extractos ricos en procianidinas se han demostrados efectos *anti-H. pylori in vivo*, los extractos obtenidos del lúpulo y vino tinto han probado ser particularmente eficaces (Yahiro *et*

al., 2005; Ruggiero *et al.*, 2007). Sólo unos pocos estudios han evaluado el efecto de algunos procianidinas diméricas (B1 y B2) sobre la actividad de la ureasa (Lee *et al.*, 2006).

Es importante destacar que la relevancia de la ureasa para la capacidad de colonización de *H. pylori* es muy conocida y ha sido ampliamente divulgada (Scott *et al.*, 1998; Mobley *et al.*, 2001), aunque existe un estudio en Jerbos de Mongolia donde cepas ureasa negativas aún conservan su capacidad de infectar la mucosa gástrica (Mine *et al.*, 2005). Pero otro estudio realizado por Bury-Moné *et al.* (2008) demostró que la cepa SS1 de *H. pylori* mutantes para la ureasa y la AC fueron incapaces de colonizar la mucosa gástrica murina. Estos hallazgos demuestran claramente que no solo la ureasa es uno de los factores de virulencia más importantes para *H. pylori*, sino que ambas enzimas son esenciales para la colonización de *H. pylori*.

El rol de la AC se ha respaldado con estudios documentados mediante la delección de genes. Stähler *et al.* (2005) demostraron a través de un análisis mutacional de los genes de la AC que es requerida para la supervivencia en el nicho gástrico y además, que está implicada en el metabolismo del bicarbonato. Otro estudio de Marcus *et al.* (2005) demostraron el rol específico que cumple la HpaAC ya que al suprimirla, los niveles de supervivencia de *H. pylori* en comparación con la cepa salvaje, disminuían en $3,3 \log_{10}$ en medio ácido, incluso en presencia de urea, ocurriendo lo mismo cuando se inhibía con el fármaco acetazolamida. Ellos también demostraron a través de microscopía confocal, que en ausencia de HpaAC, los niveles de pH periplásmico disminuían drásticamente, dañándose la integridad de la membrana interna (Marcus *et al.*, 2005; Nishimori *et al.*, 2008). Esto explicaría por qué los niveles de expresión de la HpaAC, aumentan hasta cinco veces al estar expuesta en pH ácido (Wen *et al.*, 2007).

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 (Frost & McKenna, 2014; Supuran, 2015). La AC es inhibida por compuestos que presentan grupos capaces de coordinar con el zinc del sitio catalítico. Es interesante que, al igual que con α -ACs de otras especies, la HpAC es inhibida por las mismas sulfonamidas, en particular por la acetazolamida (Chirca *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 2005; Shahidzadeh *et al.*, 2005; Nishimori, *et al.*, 2006; 2007). Estudios anteriores demostraron que la acetazolamida puede inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro* y la capacidad infectiva de *H. pylori* (Nishimori, *et al.*, 2006; 2008). 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 (Shahidzadeh *et al.*, 2005; Puscas & Ann, 1984). 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*. 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 (Supuran, 2010). Por lo tanto, en el proceso de diseño de inhibidores de HpAC se intentó 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 (Pastene *et al.*, 2014; Supuran, 2015; Compostella *et al.*, 2015; Marcus *et al.*, 2016).

Tars *et al.* (2013) sintetizaron varias sulfocumarinas, que sufrieron hidrólisis. Los productos de esta escisión fueron ácidos 2-hidroxifenil-vinilsulfónicos. Se observó que el ácido sulfónico se anclaba a la molécula de agua coordinada con Zinc, teniendo interacciones favorables con Thr200 y Pro201. Davis *et al.* (2011) describieron este hallazgo en un estudio en el que se ensayaron 21 compuestos

naturales fenólicos (fúngicos y vegetales) contra las β y α ACs de *Mycobacterium*. Este trabajo reveló que el hidroxilo fenólico de estos compuestos interacciona con AC de una manera no clásica uniéndose directamente a la molécula de agua unida al Zinc mediante enlace puente de hidrógeno.

Teniendo en cuenta todo lo antedicho, estos resultados nos llevan a proponer que los derivados fenólicos podrían ser una fuente ilimitada de candidatos para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad inhibidora de la AC y ureasa. Sin embargo, hay un número reducido de agentes nucleófilos que pueden usarse para generar aductos de flavan-3-ol a partir de PAC.

4.4 Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos frente a la adherencia de *H. pylori*

Luego que *H. pylori* logra llegar al estómago, una estrategia importante para que permanezca en la mucosa gástrica humana es la adherencia, esto es un primer paso en la colonización y permanencia en el epitelio gástrico (Oleastro & Ménard, 2013). *H. pylori* se adhiere a las células epiteliales a través las adhesinas las cuales son proteínas bacterianas, que están implicadas en las etapas iniciales de la colonización por medio de la interacción entre la bacteria y la superficie de la célula huésped. *In vivo*, 15% a 20% de *H. pylori* se fija a las células epiteliales gástricas (Hessey *et al.*, 1990). Por eso, los mecanismos de adhesión resultan ser una diana molecular muy atractiva para limitar la colonización gástrica de *H. pylori*.

En este trabajo previamente se realizó un ensayo de viabilidad con resazurina, donde se logró encontrar la concentración a la cual realizar los ensayos sin tener un efecto negativo en la viabilidad de las células por los extractos, se consideró como células viables cuando están a un 90-100% de viabilidad. La concentración 1000 μ g/ml

generó una viabilidad de cercana al 90%, por lo tanto para asegurar la viabilidad celular se eligió como concentración máxima utilizada fue 700 µg/mL.

Como se mencionó anteriormente la adhesión de *H. pylori* a las células del huésped es el primer paso para la colonización, esto induce a que la bacteria exprese factores de virulencia causantes de daño tisular. Las muestras analizadas en este estudio mostraron un efecto de inhibición de la adherencia de esta bacteria a sus células huésped. Para determinar la actividad anti-adherencia producto de las procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos de procianidinas se utilizó *H. pylori* marcado con FITC lo que permitió visualizar y cuantificar la adherencia. Todos los compuestos evidenciaron inhibición de la adherencia, siendo los polímeros de cranberry los que mostraron mayor efecto inhibitorio, similar al resultado obtenido con el derivado epicatequina-pirogalol, como en la mayoría de los ensayos. Los resultados obtenidos sugieren que, las fracciones y aductos utilizados serían capaces de afectar mecanismos de adherencia de *H. pylori*, lo que podría dificultar su permanencia en el epitelio gástrico. Alternativamente, la adherencia se puede ver afectada indirectamente por la inhibición de la actividad enzimática de la ureasa y AC demostrada in vitro para todos los compuestos. La suma de dichos mecanismos, finalmente podrían impedir que *H. pylori* se adhiera a las células

Algunos estudios respaldan el efecto anti-adherencia de las procianidinas. 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). 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 (Zhang *et al.*, 2005).

Rohdewald & Beil. (2008) 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 intentó evaluar un extracto de cáscara de manzana rico en polifenoles (APPE, 24% PACs), contra la adherencia de *H. pylori* y vacuolización en células HeLa (Pastene *et al.*, 2010). 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 otro estudio, en los cuales se evaluó fracciones de Boldo con PACs de distinto grado de polimerización son consistentes con los experimentos de microscopía de fluorescencia utilizando *H. pylori* marcado con FITC de (cepa ATCC 43504). Así, el extracto de Boldo (0,20 mg GAE/mL) claramente limitó la adherencia de FITC-*H. pylori* a células AGS (Pastene *et al.*, 2014)

Junto al ensayo de adherencia se realizó un ensayo complementario para medir la producción de interleuquina-8. En este estudio se observó una disminución de la producción de IL-8 en los tratamientos analizados con respecto al control. Interesantemente, algunos aductos como el pirogalol inducen un potente efecto anti-inflamatorio, incluso mayor al de las procianidinas naturales. Se sugiere que estos compuestos poseen mayor probabilidad de penetrar en la bacteria comparada con las PACs, así también podrían hacerlo en las células AGS, promoviendo mecanismos de defensa antioxidante y anti-inflamatorios.

4.5 Efecto de procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos frente a la producción de ERO en neutrófilos estimulados por *H. pylori*

Cuando las bacterias patógenas ingresan al organismo, los neutrófilos inmediatamente despliegan mecanismos para promover su fagocitosis. La forma convencional para la destrucción de las bacterias es a través de la formación de fagosomas por parte de los neutrófilos. Una de las características de la infección por *H. pylori* es su capacidad de promover un alto grado de infiltración linfocítica (Allen, 2001). Los neutrófilos y células inflamatorias mononucleares infiltran la mucosa del estómago infectado con *H. pylori* causando inflamación y producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).

En este estudio, inicialmente se intentó demostrar la producción de ERO en un equipo de imagen molecular, lográndose estandarizar la concentración de los reactivos utilizados. El ensayo se realizó con sangre fresca, para esto, los neutrófilos que fueron estimulados primero con PMA, y luego con un inóculo de *H. pylori* estandarizado a 9×10^5 ufc/mL. Cuando a este ensayo se agregaron los inhibidores (procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos) se encontró que estos efectivamente disminuyen la producción de ERO, siendo nuevamente el derivado epicatequina-pirogalol el que genera una mayor inhibición de ERO.

Esto es importante ya que estos compuestos estarían protegiendo el daño a nivel del epitelio gástrico. Es conocido que la gastritis puede progresar a cáncer gástrico, y se cree actualmente que el cáncer gástrico se debe a múltiples factores, incluyendo el estrés oxidativo y las toxinas ambientales, que aumentan las tasas de mutación de ADN. Handa *et al.* (2010) y Herrera *et al.* (2009) observaron exceso de la producción de ROS / RNS en la mucosa gástrica humana infectada con *H. pylori*, lo que se correlaciona directamente con daño histológico de la mucosa. Por lo tanto estos resultados están entrelazados con los obtenidos anteriormente, ya que estos compuestos están actuando en el primer paso para la colonización de *H. pylori*.

inhibiendo gran porcentaje de la adherencia a las células AGS, posteriormente se comprobó que ellos logran inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias y luego se encontró que ejercen un efecto protector ya que inhibe la producción de ERO.

Además, otro punto importante es que la actividad de la ureasa también puede ser responsable indirectamente del daño tisular mediante su interacción con el sistema inmune, estimulando el estallido respiratorio de neutrófilos. Bryk *et al.* (2000), demostraron experimentalmente con células intactas de *H. pylori*, que estas son capaces de estimular e inclusive causar una activación directa del estallido respiratorio de leucocitos, neutrófilos polimorfonucleares y monocitos; además ejerce acción quimiotáctica sobre otras células inflamatorias mediante liberación de citoquinas proinflamatorias e intermediarios reactivos del oxígeno que colaboran con el proceso inflamatorio, por lo que estos compuestos también estarían colaborando en inhibir la actividad de la enzima e impedir el daño producto de la inflamación.

Satén *et al.* (2000) informaron que la proteína NAP HP es uno de los factores que estimulan la NADPH oxidasa de los neutrófilos. Allen *et al.* (2005) han reportado que *H. pylori* puede evadir el efecto bactericida de la ERO cuando estimula 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 (Unemo *et al.*, 2005). 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*.

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 (Mitjans et al., 2004). 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, (Ugartondo et al, 2008; Lozano et al., 2006; Torres et al., 2002)



5. CONCLUSIONES

- Se obtuvo cantidades significativas de polímeros de procianidinas naturales de cranberries y cáscara de palta (entre 300 y 350 mg/mL respectivamente) que permitieron realizar todos los ensayos microbiológicos. A partir de este último tipo de procianidina se llevó a cabo la síntesis de dos aductos mediante depolimerización con dos agentes nucleofílicos. Esta reacción de depolimerización fue estandarizada exitosamente, logrando obtener una cantidad suficiente de los derivados para realizar los ensayos biológicos y finalmente la identidad de estos compuestos se logró determinar de mediante TLC y HPLC acoplada a espectrometría de masas.
- Se realizaron los ensayos de CMI en medio líquido y se determinó la concentración que se utilizó en cada análisis biológico para lograr comparar los resultados obtenidos con cada compuesto. A partir de este ensayo se encontró que de los cuatro compuestos utilizados, el derivado epicatequina-pirogalol fue el que presentó la menor CMI para ambas cepas de *H. pylori*. El efecto sobre la viabilidad de *H. pylori* se evidenció mediante la determinación de los niveles de ATP. Todos los compuestos lograron comprometer tempranamente la viabilidad bacteriana, aunque el derivado de pirogalol presentó la menor CMI y disminuyó en mayor grado la viabilidad de *H. pylori* en comparación con el resto de los compuestos.
- Todos los compuestos mostraron ser buenos inhibidores de las enzimas ureasa y anhidrasa carbónica (AC), siendo el derivado epicatequina-pirogalol el que logró un mayor porcentaje de inhibición. El mismo derivado presentó mejor efecto inhibitorio frente a la AC. El cálculo de IC50 confirmó que este derivado presentó la menor IC-50 frente a ambas enzimas y sobre ambas cepas de *H. pylori*, además en todos los casos se presentó concentración-dependencia. Adicionalmente, se demostró que la inhibición presentada por los derivados se

debe a la formación de estos (introducción del sistema hidroxilado pirogalol y resorcinol), ya que el monómero epicatequina por sí solo no logró inhibir la actividad enzimática en ningún caso

- Se determinó que para las concentraciones utilizadas no hubo efecto citotóxico, por lo tanto se aseguró la viabilidad celular para los ensayo. Posteriormente para los ensayos de adherencia de *H. pylori* a células AGS se demostró que todos los compuestos logran disminuir el porcentaje de fluorescencia extrapolado a una menor adherencia. También se realizó un ensayo para medir producción de señales pro-inflamatorias tempranas en células AGS, en donde se observó una disminución de la producción de IL-8 en las células infectadas en comparación con las no infectadas. Finalmente esta disminución de la adherencia y el potencial efecto antiinflamatorio presentaron concentración-dependencia, y fueron estadísticamente significativos en todos los casos comparando los tratamientos con el control no infectado.
- Las procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos fueron capaces de inhibir el estallido respiratorio en neutrófilos activados por *y H. pylori*. En todos los casos se observó un efecto antioxidante concentración-dependiente
- Los resultados obtenidos en este trabajo permiten aceptar la hipótesis de que las procianidinas naturales y sus derivados semi-sintéticos ejercen efectos protectores frente a la infección por *H. pylori*. Dichos efectos están vinculados con la inhibición dual de las enzimas ureasa y anhidrasa carbónica, lo que finalmente contribuye a limitar la capacidad de la bacteria para infectar células AGS e inducir ROS por parte de los neutrófilos.

Proyecciones

La literatura muestra un aumento en la aparición de cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos, por lo que hoy en día es importante buscar sustancias no-antibióticas con actividad anti-*H. pylori*. El mecanismo anti-*H. pylori* de las procianidinas naturales y derivados semi-sintéticos, no necesariamente implica un efecto bactericida que pueda afectar concomitantemente la microbiota normal del individuo, por lo que su empleo constituye una aproximación ideal para la prevención y el manejo de la infección en la mayoría de la población. La posibilidad de poder usar fuentes baratas de procianidinas (desechos agrarios), es ciertamente muy interesante porque nos permitirá sintetizar nuevas moléculas con elevada capacidad citoprotectora asociada a mecanismos antimicrobianos, antioxidantes y antiinflamatorios.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed N. 2005. 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*. Is the debate over. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 43(3):4-17.
- Allen L. 2008. Rate and extend of *Helicobacter pylori* phagocytosis. Methods Molecular Biology. 431(2):147-57.
- Allen L. 2001. The role of neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. Current Opinion in Infectology Diseases. 14 (3): 273–277.
- Allen L. Beecher B. Lynch J. Rohner O & Wittine L. 2005. *Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide relase. Journal Immunology. 174(4): 3658–3667.
- Alterio V. Di Fiore A. D'Ambrosio K. Supuran C. De Simone G. 2012. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms. Chemical Reviews. 112(4): 4421–4468
- Amieva M. El-Omar E. 2008. Host bacterial interactions infection. Gastroenterology. 134(3): 306 23.
- Amtul Z. Rahman A. Siddiqui R. Choudhary M. 2002. Chemistry and Mechanism of Urease Inhibition, Current Medicinal Chemistry. 9(6): 1323-1348.
- Aspholm-Hurtig M. Dailide G. Lahmann M. Kalia A. Ilver D. Roche N. Vikström S. Lindén S. Bäckström A & Lundberg C. 2004. Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. Science. 305(3): 519–522.

Backert S. Clyne M & Tegtmeyer N. 2011. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Communication Signal.* 2(1): 9- 28.

Barrese A. Genis C. Fisher S. Orwenyo J. Kumara M. Dutta S. Phillips E. Kiddle J. Tu C. Silvermann, D. Govindasamy L. Agbandje-Mckenna M. Mckenna R. & Tripp B. 2008. Inhibition of Carbonic anhydrase II by thioxolone: a mechanistic and structural study. *Biochemistry.* 47(10):3174-3184.

Bao L. Cai X. Dai D. Ye D. Jiang Y. Li Y. Zhag Z & Li Y. 2014. Grape seed proanthocyanidin extracts ameliorate podocyte injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α in low-dose streptozotocin-and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Food & Function.* 5(9): 1872-1880.

Bryk R, Griffin P & Nathan C. 2000. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature.* 407(10):211–5.

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 Immunology Medical Microbiology.* 29(11): 295-301.

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. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 42(8): 279–284.

Bury-Moné S. Skouloubris S & Labigne A. 2001. Urel: A *Helicobacter pylori* protein essential for resistance to acidity and for the early steps of murine gastric mucosa infection. *Gastroenterology Clinical Biology.* 25(6): 659-663.

Bury-Moné S. Mendz G. Ball G. Thibonnier M. Stingl K. & Ecobichon C. (2008). Role of and carbonic anhydrases of *Helicobacter pylori* in the urease-dependent response to acidity and in colonization of the murine gastric mucosa. *Infection and Immunity*. 76(15):497-509.

Casares. 2001. Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación. Universidad Politécnica de Catalunya. 4: 33-44.

Castillo-Rojas G. Mazarí-Hiriart M. López-Vidal Y. 2004. *Helicobacter pylori*: enfoque sobre los factores de virulencia CagA y VacA. *Salud pública*. 46 (6):0036-3634.

Chávez F. Aranda M. García A. Pastene E. 2011. 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*. 10(3): 265- 280.

Chirca L. Elleby B & Lindskog S. 2001. Cloning, expression and some properties of α -carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori*. *Biochemistry and Biophysics*. 1544:55-63.

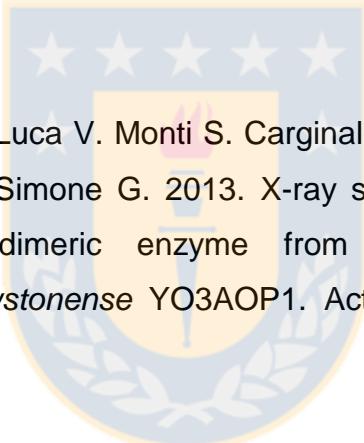
Chirica L. Petersson C. Hurtig M. Jonsson B. Boren T & Lindskog S. 2002. Expression and localization of alpha- and beta-carbonic anhydrase in *Helicobacter pylori*. *Biochemistry and Biophysics*. 1601:192-199.

Ciurli S. Benini S. Rypniewski W. Wilson K. Miletti S & Mangani S. 1999. Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms. *Coordination Chemistry Reviews*. 192:331-355.

Compostella M. Berto P. Vallese F & Zanotti G. 2015. Structure of α -carbonic anhydrase from the human pathogen *Helicobacter pylori*. Acta Crystallographica . 71:1005-1011.

Dacoll C. Balter Henia. Varela L. Buenavida G. González N. Silveira A & Cohen H. 2014. Evolución de la respuesta al tratamiento de primera línea de la infección por *Helicobacter pylori* en Uruguay. Acta Gastroenterología Latinoamericana. 44:88-93.

Davis R. Hofmann A. Osman A. Hall R. Muhschlegel F. Vullo D. Innocenti A. Supuran C & Poulsen S. 2011. Natural product-based phenols as novel probes for mycobacterial and fungal carbonic anhydrases. Journal Medical Chemistry. 54(6) 1682–1692.



Di Fiore A. Capasso C. De Luca V. Monti S. Carginale V. Supuran C. Scozzafava,A. Pedone C. Rossi M & De Simone G. 2013. X-ray structure of the first extremo- α -carbonic anhydrase, a dimeric enzyme from the thermophilic bacterium *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* YO3AOP1. Acta Crystallographica . 26:1150-1159.

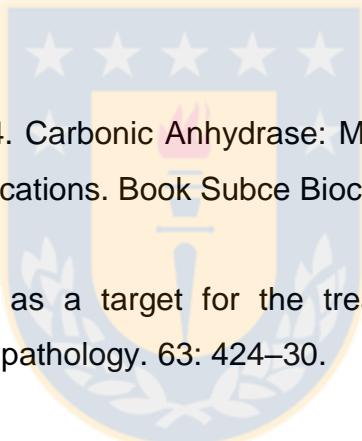
Ding M. Lu Y. Bowman L. Huang C. Leonard S. Wang L. Vallyathan V. Castranova V & Shi X. 2004. Inhibition of AP-1 and Neoplastic Transformation by Fresh Apple Peel Extract. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. 304:285-5938.

Ekinci D. Karagoz L. Ekinci D. Sentuk M & Supuran C. 2013. Carbonic anhydrase inhibitors: in vitro inhibition of alpha isoforms (hCA I, hCA II, hCA III, hCA IV) by flavonoids. Journal Enzyme Inhibition Medical Chemistry. 28(2): 283-288.

Fahey J. Stepheno K & Wade K. 2013. Urease from *Helicobacter pylori* is inactivated by sulforaphane and other isothiocyanates. Biochemical and Biophysical Research Communications 435(1): 1-7.

Fauci A. Braunwald E. Kasper D & Hauser S. 2009. Longo Harrison Principios de Medicina Interna, 17a edición, Parte 7. Capítulo 144. Infecciones por *Helicobacter pylori*, Editorial McGraw-Hill Interamericana S.A. 1918-1925.

Ferreccio C. Rollán A. Harris P. Serrano C. Gederlini A. Margozzini P. Gonzalez C. Aguilera X. Venegas A & Jara A. 2007. Gastric Cancer is related to Early *Helicobacter pylori* Infection in a High-Prevalence Country. Canc. Epidemi. Bioma. Prev. 16:662-667.



Frost S & McKenna R. 2014. Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications. Book Subce Biochem. 75:1-427.

Follmer C. 2010. Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. Journal of clinical pathology. 63: 424–30.

Fujimoto O. Fumiko S. Hideyuki Y. Yoichiro M. Kazushige M & Yutaka T. 2007. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 59(6): 795–805.

Funatogawa K. Hayashi S. Shimomura H. Yoshida T. Hatano T. Ito H & Hirai Y. 2004. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. Microbiology Immunology. 48 (4), 251–261.

García A. Barra R. Delgado C. Kawaguchi F. Trabal N. Montenegro S & González C. 2006. Genotipificación de aislados clínicos de *Helicobacter pylori* en base a genes

asociados virulencia cagA, vacA y babA2. Primer aislamiento de una cepa babA2 positiva en pacientes chilenos. Revista Médica Chilena. 134: 981-988.

Geis G. Suerbaum S. Forsthoff B. Leyln, H & Opferkuch W. 1993. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. Journal Medical Microbiology. 38: 371-377.

Gisbert J. Calvet X. Bermejo F. Boixeda D. Bry F. Bujanda L. Castro M. Dominguez E. Ignasi J. Forné M. Gené E. Gomollón F. Lanas A. De Argila C. McNicholl A. Mearin F. Molina J. Montoro M. Pajares J. Pérez A. Pérez E & Sánchez J. 2013. III Conferencia Española de Consenso sobre la infección por *Helicobacter pylori*. Gastroenterology Hepatology 36:340-374



Gross S. Gammon T. Moss B. Rauch D. Harding J. Heinecke J. Ratner L & Piwnica D. 2009. Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. Nature Medicine. 15(4): 455-461.

González N. Fernández L. Pérez G. Saona G. Raisler K. Torres M. Olivares A. Stein S & Cohen H. 2006. Infección por *Helicobacter pylori* en pacientes uruguayos de origen africano: características clínicas, endoscópicas y genéticas. Acta Gastroenterológica Latinoamericana. 40:206-210.

Graham D. & Shiotani A. 2008. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology. 5:321-31.

Graham D & Fischbach L. 2010. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. Gut. 59:1143-1153.

Handa O. Naito Y & Yoshikawa T. 2010. *Helicobacter pylori*: a ROS-inducing bacterial species in the stomach. Inflammation Reseach. 59: 997–1003.

Herrera V & Parsonnet J. 2009. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. Clinical Microbiology Infectology. 15: 971–976.

Hessey S. Spencer J. Wyatt J. Sobala G. Rathbone B. Axon A. Dixon M. 1990. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. Gut 31: 134-138.

Hong W. Sano K. Morimatsu S. Scott D. Weeks D. Sachs G. Goto T. Mohan S. Harada F. Nakajima N & Nakano T. 2003. Medium pH-dependent redistribution of the urease of *Helicobacter pylori*. Journal of medical microbiology. 3: 211-21.

Huang S. Xue Y. Sauer E. Chirica L. Lindskog S & Jonsson B. 1998. Crystal structure of carbonic anhydrase from *N. gonorrhoeae* and its complex with the inhibitor acetazolamide. Journal Molecular Biology 283:301- 310.

Huang H. Pan X. Ji Ch. Zeng G. Jiang L. Xiang F. Liu J. Hao X. Zhang Y & Tan N. 2009. Screening and docking studies of natural phenolic inhibitors of carbonic anhydrase II. Science in China Series B-Chem. 52(3): 332-337.

IARC. 1994. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. International Agency for Research on Cancer, Lyon. Vol 61:1-241.

Ilver D. Arnqvist A. Ögren J. Frick I. Kersulyte D. Incecik E. Berg D. Covacci A. Engstrand L. Borén T. 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science. 279:373–377.

Ishijima N. Suzuki M. Ashida H. Ichikawa Y. Kanegae Y. Saito I. Borén T. Haas R. Sasakawa C & Mimuro H. 2011. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *Journal Biology Chemistry*. 286(28):25256-64.

Izquierdo H. Vega J & García R. 2015. Infección por *Helicobacter pylori* en adultos sintomáticos. *Archivo Medico de Camaguey*. 9 (2):1025-0255.

Kot M. Olech Z. 2011. 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*. 21(6):697-701.

Krajewska B. Zaborska W. 2007. Double mode of inhibition-inducing interactions of 1,4-naphthoquinone with urease: Arylation versus oxidation of enzyme thiols. *Bioorganic Medical Chemistry*. 15 (12): 4144-4151.

Krajewska B. 2011. Hydrogen peroxide-induced inactivation of urease: mechanism, kinetics and inhibitory potency. *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 68: 262-269.

Kohler N. Wray V & Winterhalter P. 2007. Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracted by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography* 1177: 114 – 125.

Kosikowska P & Berlicki L. 2011. “Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review.” *Expert opinion on therapeutic patents* 21: 945–57.

Lam R. Romanov V & Johns K. 2010. Crystal structure of a truncated urease accessory protein UreF from *Helicobacter pylori*. *Proteins*. 78: 2839-2848.

Lee J. S. Um H. Hahm K. Park Ch.S. Kang D. Surh Y. 2006. Natural urease inhibitors. *Cancer Prevention Research.* 11(2): 129-136.

Li H. Xu C. Li H. Xiao Z. Shi L. Zhu, H. 2007. Metronidazole-flavonoid derivatives as anti-*Helicobacter pylori* agents with potent inhibitory activity against HPE-Induced interleukin-8 production by AGS cells. *Chemmedchem.* 2: (9) 1361-1369.

Lindskog S, Silverman D.N. The Catalytic Mechanism of Mammalian Carbonic Anhydrases. In *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*; Chegwidden, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H., Eds.; Birkhäuser Verlag: Boston, MA, USA, 2000; 175–195.

Lomelino C. Supuran C & McKenna R. 2016. Non-Classical Inhibition of Carbonic Anhydrase. *International Journal of Molecular Sciences.* 17(7):1150-1157.

Lozano C. Juliá L. Jiménez A. Tourin S. Centelles JJ. Cascante M & Torres JL. 2006. Electron transfer capacity of catechin derivatives and influence on the cell cycle and apoptosis in HT29 cells. *FEMS J.* 273: 2475-2486.

Machado A. Figueiredo C. Touati E. Maximo V. Sousa S. Michel V. Carneiro F. Nielsen F. Seruca R. Rasmussen L. 2009. *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clinical Cancer Research.* 15(9):2995-300.

Machado A. Figueiredo C. Seruca R. Rasmussen L. 2010. *Helicobacter pylori* infection generates genetic instability in gastric cells. *Biochimistry Biophys Acta.* 1806:58-65.

Malfertheiner P. Megraud F. O'Morainjohn A. Anthony T. Bazzoli F. Gensini G. Gisbert P. Graham D. Rokkas T. El-Omar E & Kuipers E. 2012. Management of

Helicobacter pylori infection and the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. The European Helicobacter Study Group (EHSG) Gut. 61: 646-664.

Malfertheiner P. Megraud. O'Morain F. Gisbert P. Kuipers E. Axon A. Bazzoli F. Gasbarrini A. Atherton J. Graham D. Hunt R. Moayyedi P. Rokkas T. Rugge M. Selgrad M. Suerbaum S. Sugano K & El-Omar E. 2016. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. the European Helicobacter and Microbiota Study Group and Consensus panel 0:1–25.

Mahdavi J. Sonden B. Hurtig M. Olfat F. Forsberg L. Roche N. Ångstrom J. Larsson T. Teneberg S & Karlsson K. 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. Science. 297:573–578.

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.

Marcus E. Sachs G. Wen Y. Feng J & Scott D. R. 2012. Role of the *Helicobacter pylori* Sensor Kinase ArsS in Protein Trafficking and Acid Acclimation. Journal of Bacteriology. 194(20):5545-5551.

Marcus E. Moshfegh A. Sachs G & Scott D. 2005. The periplasmic α-carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. Journal of Bacteriology. 187(2): 729-738.

Marshall B, Armstrong J, Mcgechie D, Glancy R.J. 1985. Attempt to fulfill Koch's postulates for *pyloric Campylobacter*. Medical Journal of Australia. 142(8): 436-9.

Martínez J. Henao R & Lizarazo R. 2014. Resistencia antibiótica de *Helicobacter pylori* en América Latina y el Caribe. Asociaciones Colombianas de Gastroenterología. 29(3): 218-227.

Mayank A. Bhargav K & Robert M. 2013. Insights towards sulfonamide drug specificity in α -carbonic anhydrases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21:1526-1533.

Mendes L. Attygalle A & Wotherspoon A. 2014 *Helicobacter pylori* infection in gastric extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma: a re-evaluation. *British Society of Gastroenterology*. 63(9):1526-1527.

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.

Mobley H. Garner R & Bauerfeind P. 1995. *Helicobacter pylori* nickel-transport gene nixa-synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growthconditions. *Molecular Microbiology*. 16:97 - 109.

Mobley H. Hu L. Foxall P. 2001. *Helicobacter pylori* urease: properties and role in pathogenesis. *Scand J Gastroent.* 26:39-46.

Moncayo J. Santacruz J. Montes B. López M & Meisel E. 2012. Utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con enfermedad úlcero péptica. *Revista Médica de Risaralda*. 93(12):2330-38.

Nagata K. Sone N & Tamura T. 2001. Inhibitory activities of lansoprazole against respiration in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 45(5): 1522-1527.

Neng L. Han L. Han C. Xu L. Hao C & Feifei S. 2013. Proliferative and apoptotic effects of gastric epithelial cells induced by coccoid *Helicobacter pylori*. Journal of Basic Microbiology. 53(2): 147–155.

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. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters. 17:3585-3594.

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. Journal of Medical Chemistry. 49:2117-2126.

Nishimori I. Onishi S. Takeuchi H & Supuran C. 2008. The alpha and beta classes carbonic anhydrases from *Helicobacter pylori* as novel drug targets. Current Pharmaceutical Design. 14(7):622-30.

Núñez M. Scialom V. Ventura Y. Marcano M. 2006. Modelo teórico para una vacuna efectiva contra la infección por *Helicobacter pylori*. Academia Biomédica digital. 28:1317-987.

Oleastro M & Ménard A. 2013. El papel de *Helicobacter pylori* membrana externa proteínas en la adherencia y Patogénesis. Biology. 2:1110-1134.

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. Revista Farmacéutica. 9:(1)7-18.

Pastene E. Troncoso M. Figueroa G. Alarcon J & Speisky H. 2009. Association between Polymerization Degree of Apple Peel Polyphenols and Inhibition of *Helicobacter pylori* Urease. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57: 416–424.

Pastene E. Speisky H. García A. Moreno J. Troncoso M. Figueroa G. 2010. In Vitro and in Vivo Effects of Apple Peel Polyphenols against *Helicobacter pylori*. Journal Agricultural Food Chemistry. 58(12): 7172–7179.

Pastene E. Parada V. Avello M. Ruiz A. García A. 2014. Catechin-based Procyanidins from *Peumus boldus* Mol. Aqueous Extract Inhibit *Helicobacter pylori* Urease and Adherence to Adenocarcinoma Gastric Cells. Phytotherapy. 28(1):1637-1645.

Pastorekova S. Parkkila S.;Pastorek J. Supuran C. 2004. Enzyme Inhibition Medical Chemistry. 20:19-199.

Puscas I & Ann N. 1984. Treatment of gastroduodenal ulcers with carbonic anhydrase inhibitors. Acad Sci. 429:587-591.

Pyndiah s. Lasserre J. Ménard A. Claverol S. Prouzet-Mauléon V. Mégraud F. Zerbib F & Bonneu M. 2007. Two-dimensional Blue Native/SDS Gel Electrophoresis of Multiprotein Complexes from *Helicobacter pylori*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. 6:193-206.

Ricco R. Lozano V. Lator V. Gurn A & Wagner M. 2008. Modificación en el Perfil de Polifenoles de *Tripodanthusacutifolius* (Ruiz et Pav.) Tiegh. (Loranthaceae) Infectado por “Cochinilla” (Homoptera - Lecanidae). Latin American Journal of Pharmacy. 27 (2): 258-62.

Rohdewald P & Beil W. 2008. In Vitro inhibition of *Helicobacter pylori* growth and adherence to gastric mucosal cells by Pycnogenol. *Phytotherapy Research.* 22: 685-688.

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 Journal Gastroenterology.* 3: 349-354.

Sachs G. Weeks D. Melchers K & Scott D. 2003. The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annual Review of Physiology.* 65:349-369.

Sachs G. Weeks D. Wen Y. Marcus E. Scott D & Melchers K. 2005. Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. *Physiology.* 20:429-438.

Sachs G. Kraut J. Wen Y. Feng J & Scott D. 2006. 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*. *Journal Membrane Biology.* 212(2):71-82.

Sachs G. Kraut J. Wen Y. Feng J & Scott D. 2006. Urea transport in bacteria: acid acclimation by gastric *Helicobacter* spp. *Journal Membrane Biology.* 212:71-82.

Sarker S. Nahar L & Kumarasamy Y. 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Meth.* 42(4):321-324.

Scott D. Marcus E. Wen Y. Oh J & Sachs G. 2007. Gene expression in vivo shows that *Helicobacter pylori* colonizes an acidic niche on the gastric surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 104(17): 7235-7240.

Schwartz J & Allen L. 2006. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology.* 79: 1214 - 1225.

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.

Scott D. Marcus E. Wen Y. Singh S. Feng J & Sachs G. 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*. *Journal of Bacteriology.* 192(1):94-103.

Sethi K. Sahoo S. Pichikala J & Suresh P. 2011. Carbonic anhydrase I and II inhibition with natural products: Leucas cephalotes; *Pharmacognosy Communications.* 27(1):97-100.

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.

Stähler F. Ganter L. Lederer K. Kist M & Bereswill S. 2005. Mutational analysis of the *Helicobacter pylori* carbonic anhydrases. *Immunology Medical Microbiology.* 44:183-189.

Suerbaaum S & Micheti P. 2002. *Helicobacter pylori* infection. *New England Journal of Medicine.* 347: 1175-1186.

Supuran C. 2008. Carbonic anhydrases: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery.* 7:168-181.

-Supuran C. 2008. Carbonic anhydrases- an Overview. *Current Pharmaceutical Design.* 14(7): 603-614.

Supuran C. 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. Bioorganic Medical Chemistry Letters. 20:3467-3474.

Supuran C. 2011. Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms. Molecular Diversity. 15:305-316.

Supuran C. 2015. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist?. Journal Enzyme Inhibition Medical Chemistry. 8:1-16.

Tanaka M & Satoru T. 2004. α -Hydroxyketones as inhibitors of urease. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 12(2):501–505.

Torres J. Lozano C. Julia L. Sanchez F. Anglada J. Centelles J N & Cascantes C. 2002. Cysteinyl-flavan-3-ol Conjugates from Grape Procyanidins. Antioxidant and Antiproliferative Properties. Bioorganic. & Medical Chemistry. 10: 2497-2509.

Torres M. Pérez G. Olivares A. Fernández L. Raisler K. González N. Stein S. Bazet M. Alallón W & Cohen H. 2009. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* and mechanisms of clarithromycin resistance in strains isolated from patients in Uruguay. Revista Española de Enfermeria Digestiva. 101:757-762.

Uberti F. Deiber O. German E. Wassermann S. Guerra A. Moraes P. Barja C & Carlini R. 2013. Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. Toxicon. 69: 240–249.

Ugartondo V. Mitjans M. Tórres J & Vinardell M. 2009. Biobased Epicatechin Conjugates Protect Erythrocytes and Nontumoral Cell Lines from H₂O₂-Induced Oxidative Stress. Journal Agricultural Food Chemistry. 57: 4459-4465.

Unemo M. Aspholm-Hurting M. Ilver D. Bergström J. Borén T. Danielsson D. Teneberg S. 2005. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for Nonopsonic activation of human neutrophils. *Journal Biology Chemistry*. 280(15): 15390-15397.

Vallejos C. Garrido L. Cáceres D. Madrid A. Defilippi C. Defilippi C & Toledo H. 2007. Prevalencia de la resistencia a metronidazol, claritromicina y tetraciclina en *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la Región Metropolitana. *Revista Médica de Chile*. 135:287-293.

Vanzani P. Rossetto M. Rigo A. Vrhovsek U. Mattivi F. D'Amato E & Scarpa M. 2005. Major phytochemicals in apple cultivars: Contribution to peroxy radical trapping efficiency. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 53(9): 3377-3382.

Verstraeten S. Fraga G & Oteiza P. 2015. Interactions of flavan-3-ols and procyanidins with membranes: mechanisms and the physiological relevance. *Food & Function*. 15(6): 32-40.

Voland P. Weeks D. Marcus E. Prinz C. Sachs G & Scott D. 2003. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. *Journal Physiololy Gastroin Liv Physiol*. 284:96-106.

Walz A. Odenbreit S. Stühler K. Wattenberg A. Meyer H. Mahdavi J. Borén T & Ruhl S. 2009. Identification of glycoprotein receptors within the human salivary proteome for the lectin-like BabA and SabA adhesins of *Helicobacter pylori* by fluorescence-based 2-D bacterial overlay. *Proteomics* 9:1582–1592.

Wen Y. Feng J. Scott D. Marcus E. & Sachs G. 2007. The HP0166 two components system (ArsRS) regulates acid-induced expression of HP1186 alphacarbonic anhydrase in *Helicobacter pylori* by activating the pHdependent promoter. *Journal Bacteriology*. 189(6):2426-2434.

Wen Y. Feng J. Scott D. Marcus E & Sachs G. 2009. The pH-responsive regulon of HP0244 (FlgS), the cytoplasmic histidine kinase of *Helicobacter pylori*. Journal Bacteriology. 191(2): 449-460.

Xiao Z. Shi D. Li H. Zhang L. Xu C & Zhu L. 2007. Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. Bioorganic & Medical Chemistry. 15: 3703-3710.

Xiao Z. Peng Z. Dong J. Deng R. Wang X. Ouyang H. Yang P. He J. Wang Y. Zhu M. Peng X. Peng W & Zhu H. 2013. Synthesis, molecular docking and kinetic properties of b-hydroxy-bphenylpropionyl-hydroxamic acids as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry. 68: 212-221.

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.

Yu L & Slavin M. 2008. All natural whole-wheat functional foods for health promotion and disease. Functional Food and Health. 993: 10-1021.

Zhang L. Ma J. Pan K. Go V. Chen J & You W. 2005. Efficacy of cranberry juice on *Helicobacter pylori* infection: A double-blind, randomized placebo controlled trial. *Helicobacter*. 10: 139-145.