

**ANALISIS ESTRUCTURAL DE POLIFENOLES EN SU ACTIVIDAD ANTI-
*Helicobacter pylori***

EDISON JAVIER SANTACRUZ DELGADO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA BIOLOGÍA
PASTO, NARIÑO – COLOMBIA

2022

**ANALISIS ESTRUCTURAL DE POLIFENOLES EN SU ACTIVIDAD ANTI-
*Helicobacter pylori***

EDISON JAVIER SANTACRUZ DELGADO

Trabajo final para optar por el título de
BIOLOGO
Modalidad Investigación

DIRECTOR:
Ph.D. ALVARO PAZOS MONCAYO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA BIOLOGÍA
PASTO, NARIÑO – COLOMBIA

2022

Dedicado a mi familia y amigos, quienes me enseñaron que a los resultados adversos se les debe multiplicar los esfuerzos, agregar dedicación como un exponente y finalmente sumarle mucha felicidad.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, quienes han luchado por mi bienestar y educación, por su ejemplo de constancia y dedicación, por cada palabra, momento e instante.

En especial, mi madre Juliana Delgado, hermanos Luis Fernando, Ana Milena, Pablo Andrés y mi sobrino Cristian Sebastián, por su infinito cariño.

A mis jurados, doctores Lidia Madeline Montenegro y Cesar Augusto Mujica, por dedicar su tiempo a mi formación académica, por sus aportes, análisis y comentarios.

A los profesores del Programa de Biología por expandir los límites de mis saberes y enseñarme una visión integradora de las ciencias en un “big bang” de conocimientos.

A los grupos de investigación: Biología de Paramos - Ecosistemas Andinos y Biotecnología Microbiana de la Universidad de Nariño, a quienes agradezco mi larga caminata de aprendizaje, inspirada por las experiencias y guiada por sus saberes.

Para mis mejores amigos, Diego Bastidas, Kevin Guzmán, Juan David, Anderson Ordoñez, Javier Portilla, María José, el profesor Belisario Cepeda y muchos más, quienes me compartieron su alegría y regalaron momentos que siempre serán motivo de felicidad.

A todos los integrantes del Programa de Biología, en donde aprendí que la ciencia es la mejor manera de exhibir la belleza contenida en la naturaleza, donde sus misterios tienen los ingredientes para ser una de las aventuras más fascinantes.

No podría terminar este recorrido sin darle un espacio a la Universidad de Nariño por su respaldo y compromiso con la próxima generación de biólogos y científicos, que abordaran algunos de los mayores desafíos que enfrentamos como sociedad en la actualidad.

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas del autor”. Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo superior de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Alvaro Pazos Moncayo, Ph.D

Firma Director de Trabajo de Grado

Lidia Madeline Montenegro, Ph.D

Firma Jurado Evaluador

Dr. Cesar Mujica Martinez

Firma Jurado Evaluador

San Juan de Pasto, Marzo de 2022

RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) causa inflamación crónica y constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo de ulcera péptica y cáncer gástrico. La creciente resistencia a los antibióticos adquirida por el patógeno ha reducido de forma alarmante las tasas de erradicación de las terapias de primera línea. Este problema se puede abordar mediante la búsqueda de compuestos bioactivos con nuevos mecanismos de actividad antibacteriana, como los compuestos fenólicos vegetales cuya fuente de diversas estructuras químicas puede superar la resistencia a los antibióticos de patógenos humanos. Aquí, evaluamos el posible efecto bactericida o bacteriostático frente a *H. pylori* de polifenoles identificados en diversos extractos vegetales, a través del uso de la enzima ADN girasa como potencial diana terapéutica. Nuestros ensayos incluyen una evaluación *in silico* de la actividad biológica por acoplamiento molecular entre treinta polifenoles y la subunidad A de ADN girasa (GyrA), seguida de un modelo de Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR), desarrollado para predecir la energía de interacción ligando-objetivo para más compuestos. El estudio de acoplamiento molecular exhibió interacciones con dieciséis aminoácidos como Arg-72, Lys-69, Tyr-153, Thr-156 y otros, además la epigallocatequina mostró una unión estable y la mayor energía de interacción (-7,2 kcal / mol) entre todos los ligandos. En adición, el modelo QSAR ($r^2 = 0,8558$ - $q^2 = 0,64$) estimó una mejor actividad biológica para la apigenina 7-O-apiosil-glucósido y la luteolina 7-O- (2-apiosil-glucósido) con -8,72 y -8,65 kcal/mol, respectivamente. Encontramos treinta y ocho extractos de plantas incluidos en familias botánicas como Vitaceae, Rosaceae, Olaceae, Theaceae y Grossulariaceae, cuyos polifenoles mostraron un mayor potencial para inhibir el crecimiento de *H. pylori*, al actuar específicamente sobre GyrA. Los resultados proporcionan evidencia para identificar nuevos inhibidores polifenólicos candidatos para el tratamiento de la infección por *H. pylori*, mediante el uso de un mecanismo antibacteriano (GyrA), que puede ser una ruta valiosa para el descubrimiento de fármacos, y respaldar aún más el potencial de los extractos naturales y sus moléculas como opciones terapéuticas alternativas para suprimir la incidencia de cáncer gástrico.

PALABRAS CLAVE: *Helicobacter pylori*, ADN girasa, Polifenoles, Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR), Acoplamiento molecular.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection causes chronic inflammation and forms a major risk factor for the development of peptic ulcer disease and gastric cancer. The increasing antibiotic resistance evolved by the pathogen has alarmingly reduced the eradication rates of first-line therapies. This problem can be addressed through the search of bioactive compounds with new mechanisms of antibacterial activity as the plant phenolic compounds whose source of diverse chemical structures can overcome the antibiotic resistance of human pathogens. Here, we evaluate the possible bactericidal or bacteriostatic effect against *H. pylori* of polyphenols identified in several plant extracts through the use of the enzyme DNA gyrase as a potential therapeutic target. Our assays include an *in silico* evaluation of the biological activity by molecular docking between thirty polyphenols and A subunit DNA gyrase (GyrA), followed by a Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) model developed to predict the ligand-target interaction energy for more compounds. The molecular docking study exhibited interactions with sixteen amino acids as Arg-72, Lys-69, Tyr-153, Thr-156 and others, also epigallocatechin showed a stable binding and the highest interaction energy (-7,2 kcal/mol) among all ligands. In addition, the QSAR model ($r^2=0,8558$ - $q^2=0,64$) estimated a better biological activity for the Apigenin 7-O-apiosyl-glucoside and Luteolin 7-O-(2-apiosyl-glucoside) with -8,72 and -8,65 kcal/mol, respectively. We found thirty-eight plant extracts include in botanical families as Vitaceae, Rosaceae, Olaceae, Theaceae y Grossulariaceae, which polyphenols showed a higher potential to inhibit the growth of *H. pylori* by acting specifically on GyrA. The results provide evidence to identify new candidate polyphenolic inhibitors for treating *H. pylori* infection through the use of a antibacterial mechanism (GyrA) that can be a valuable route for drug discovery and further support the potential of natural extracts and their molecules as alternative therapeutic options to suppress the gastric cancer incidence.

KEYWORDS: *Helicobacter pylori*, DNA gyrase, Polyphenols, Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR), Molecular docking.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	1
1. OBJETIVOS.....	3
1.1 Objetivo general.....	3
1.2 Objetivos específicos	3
2. MARCO TEORICO	4
2.1 Cáncer gástrico.....	4
2.2 <i>Helicobacter pylori</i>	5
2.2.1 Prevalencia de <i>Helicobacter pylori</i>	5
2.2.2 Mecanismos adaptativos de <i>Helicobacter pylori</i>	6
2.2.3 Resistencia a antibióticos de <i>Helicobacter pylori</i>	7
2.2.4 Tratamientos para la infección de <i>Helicobacter pylori</i>	7
2.2.5 Perspectivas de los tratamientos frente a <i>Helicobacter pylori</i>	9
2.2.6 Extractos naturales frente a la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	10
2.3 Compuestos fenólicos (polifenoles), propiedades y clasificación	11
2.3.1 Potencial de los polifenoles frente a las enfermedades complejas	12
2.3.2 Diseño de terapias anti- <i>Helicobacter pylori</i> a partir de polifenoles	13
2.4 Acoplamiento molecular y relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR)	13
3. ANTECEDENTES.....	16
4. METODOLOGIA.....	18
4.1 Construcción de una matriz de datos	18
4.1.1 Análisis matriz de datos	18
4.2 Estimación de la representatividad de la riqueza de polifenoles	19
4.3 Interacciones previstas entre polifenoles y proteínas de <i>Helicobacter pylori</i>	19
4.4 Acoplamiento Molecular	20
4.5 Desarrollo relación estructura actividad-cuantitativa (QSAR).....	21
4.5.1 Cálculo de descriptores moleculares de los polifenoles	21
4.5.2 Regresión lineal múltiple (MLR) para inferir el modelo QSAR	21
4.6 Exploración del potencial anti- <i>Helicobacter pylori</i> de los extractos botánicos	22
4.7 Análisis estadístico.....	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Estimación de la representatividad de la riqueza polifenolica analizada.....	25
5.2 Interacciones previstas entre polifenoles y proteínas de <i>Helicobacter Pylori</i>	25
5.3 Acoplamiento molecular	27

5.4 Relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR).....	31
5.5 Exploración del potencial anti- <i>H. pylori</i> de los extractos botánicos	36
6. DISCUSION	39
7. CONCLUSIONES.....	44
8. PERSPECTIVAS	45
9. LIMITACIONES	46
10. REFERENCIAS.....	47
11. ANEXOS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análisis comparativo del número de especies y polifenoles reportados por familia botánica.

Figura 2: Análisis de recurrencia de los tipos de polifenoles entre las especies evaluadas.

Figura 3: Representatividad de la riqueza polifenólica analizada.

Figura 4: Interacciones previstas entre polifenoles y proteínas de *Helicobacter Pylori*.

Figura 5: Resultados y patrones de acoplamiento molecular para GyrA de *Helicobacter pylori* y los compuestos polifenólicos.

Figura 6. Aminoácidos interactuantes en GyrA de *Helicobacter pylori* para los compuestos polifenólicos.

Figura 7. Resultados energía de interacción en el acoplamiento molecular entre GyrA de *Helicobacter pylori* y los polifenoles.

Figura 8. Rangos de valores para la energía de interacción en el acoplamiento molecular entre GyrA de *Helicobacter pylori* y los polifenoles.

Figura 9. Matriz de correlación de los descriptores moleculares usados en el modelo QSAR.

Figura 10: Correlación de la actividad calculada y observada.

Figura 11: Energía de interacción predicha entre los polifenoles y GyrA de *Helicobacter pylori*.

Figura 12: Exploración del potencial anti-*Helicobacter pylori* de los extractos botánicos.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla energía libre de unión estimada de los compuestos polifenólicos con GyrA de *Helicobacter pylori*.

Anexo 2. Tabla descriptores moleculares calculados para los 30 polifenoles con energía libre de interacción estimada.

Anexo 3. Análisis de correlación descriptores moleculares.

Anexo 4. Conjunto de descriptores moleculares utilizados en el modelo QSAR.

Anexo 5. Tabla conjunto de datos de entrada regresión lineal múltiple (MLR).

Anexo 6. Resumen regresión lineal múltiple (MLR).

Anexo 8. Energía de interacción predicha a partir del modelo QSAR.

Anexo 9. Código análisis de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) en la herramienta R 4.0.4.

ABREVIATURAS

CG:	Cáncer gástrico
QSAR:	Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (por sus siglas en inglés)
MLR:	Regresión Lineal Múltiple (por sus siglas en inglés)
ATP:	Adenosín trifosfato
GyrA:	Subunidad A de ADN girasa
GyrB:	Subunidad B de ADN girasa
CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria
DM:	Descriptor Molecular
µm:	Micrómetro
Asn:	Asparagina
Lys:	Lisina
Asp:	Acido aspártico
Tyr:	Tirosina
Thr:	Treonina
Gly:	Glicina
Arg:	Arginina
Met	Metionina
Ala	Alanina
Gln	Glutamina
µm/ml:	Microgramo/mililitro
Kcal/mol:	Kilocaloría de energía/mol de sustancia

GLOSARIO

Polifenoles: Moléculas pequeñas o compuestos altamente polimerizados que tienen al menos un (fenol) o más (polifenol) grupos hidroxilo (-OH) unidos directamente a un anillo aromático (C6) y otros sustituyentes como los grupos metoxilo o carboxilo.

Relación Cuantitativa Estructura-Actividad: Modelo de caracterización de las asociaciones entre descriptores moleculares que representan información relacionada con la estructura de los compuestos y una propiedad biológica.

Acoplamiento molecular: Método molecular ampliamente utilizado para predecir energías de interacción, y modos de enlace entre ligandos y proteínas.

ADN girasa: Enzima bacteriana que cataliza el superenrollamiento negativo del ADN circular de doble hebra.

GyrA: Gen que codifica la ADN girasa (topoisomerasa de tipo II), subunidad A.

In silico: Simulación computacional de procesos biológicos *in vitro* e *in vivo*.

Antibiótico: Sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, con efecto bactericida o bacteriostático sobre ciertas clases de microorganismos sensibles.

Sinergismo: El efecto de una combinación de antibióticos es mayor que la suma de los efectos individuales.

Patógeno: Microorganismo capaz de producir alguna enfermedad o daño en un huésped.

Resistencia antibiótica: Capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico.

INTRODUCCION

La relación de *H. pylori* como patógeno gástrico y el desarrollo de cáncer gástrico (CG) fue aceptada por la comunidad científica en los años ochenta, llevando a tratar la gastritis sintomática con antibióticos convencionales de amplio espectro y fármacos supresores de ácido (Malfertheiner *et al.*, 2017). Sin embargo, la bacteria rápidamente demostró ser una especie resistente, incrementando las dosis requeridas, el costo del tratamiento y los efectos adversos sobre la salud (Savoldi *et al.*, 2018). Estos inconvenientes, subrayan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias, direccionadas al uso de extractos naturales, que a lo largo de la historia, han sido los principales agentes terapéuticos disponibles, con propiedades farmacológicas soportadas en la actividad concomitante y/o sinérgica de sus principios activos (Rempe *et al.*, 2017).

Los polifenoles diversos en estructuras químicas “hiperdiversos”, combinados en matrices naturales biológicamente activas, tienen el potencial para utilizarse en la erradicación de la infección por *H. pylori* (Cory *et al.*, 2018; Crozier *et al.*, 2006). La acción de los polifenoles de forma individual ha demostrado un efecto moderado, que se puede potenciar con interacciones sinérgicas en los extractos botánicos, alcanzando una actividad antimicrobiana privilegiada. Este enfoque podría disminuir las tasas de resistencia, ya que la probabilidad de que aparezca un mutante frente a distintos inhibidores de acción múltiple es menor a la probabilidad de que se genere una cepa resistente a un solo antibiótico de amplio espectro (Debraekeleer y Remaut, 2018).

La emergente expansión en el uso de fitoquímicos con propiedades anti-*H. pylori* y la comprensión de los mecanismos moleculares de la bacteria, pueden generar tratamientos alternativos, que incrementen las tasas de éxito terapéutico (Górniak *et al.*, 2019). La escasa correlación entre los resultados *in vitro* e *in vivo* de los polifenoles, explicada por una drástica disminución de su actividad biológica, direcciona su investigación a una completa comprensión de los procesos constitutivos de la bacteria (replicación del ADN, síntesis de proteínas e integridad de la membrana y la pared celular) (Cory *et al.*, 2018; Debraekeleer y Remaut, 2018). La necesidad de validar los diferentes objetivos farmacológicos de la bacteria y los ligandos polifenólicos; hace importante la optimización de las múltiples relaciones estructura-actividad

inhibitoria de los extractos y compuestos en estudio, así como su potencial farmacológico (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019).

En este sentido determinar la energía de interacción entre los polifenoles y la subunidad A de la ADN girasa (GyrA), permitirá analizar el potencial de las combinaciones de compuestos polifenólicos activos presentes en distintos extractos naturales, apuntando al aumento de la tasa de éxito en estudios *in vitro* e *in vivo*, con resultados favorables y disminución de los costos asociados al fracaso de las investigaciones. La notable capacidad y propiedades emergentes de los polifenoles frente al preocupante problema de resistencia a los antibióticos en *H. pylori*, hace posible diseñar este estudio para responder:

¿Cuál es la relación entre las estructuras de los compuestos polifenólicos de diversos extractos naturales y su potencial anti-*Helicobacter pylori*?

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Determinar la relación entre las estructuras de los compuestos polifenólicos de diversos extractos naturales y su actividad anti-*Helicobacter pylori*.

1.2 Objetivos específicos

- Estimar la afinidad de unión de los compuestos polifenólicos presentes en extractos naturales y la subunidad A de la ADN girasa (GyrA) de *Helicobacter pylori*.
- Determinar la relación entre las estructuras polifenólicas y su actividad sobre la subunidad A de la ADN girasa (GyrA) de *Helicobacter pylori*.

2. MARCO TEORICO

2.1 Cáncer gástrico

Hasta hace poco el CG era la causa más común de muerte por cáncer en el mundo. Pero a pesar de la disminución en su tasa de incidencia en el siglo XXI, el CG es el quinto cáncer más frecuente (1.089.103 nuevos casos reportados en 2020) y la cuarta causa de muerte por cáncer con 768.793 decesos en el mismo año. La epidemiología del CG varía geográficamente, las tasas de incidencia son notablemente elevadas en Asia Oriental con países como la República de Corea (tasas de incidencia más altas en todo el mundo), el Oriente de Europa y Latino America; mientras que las tasas en América del Norte y Europa del Norte son generalmente bajas y equivalentes a las observadas en algunas regiones africanas (IARC, 2020).

La disminución en la prevalencia de CG para ciertas regiones, se asocia al uso generalizado de la endoscopia digestiva alta y los tratamientos de prevención; desafortunadamente, el pronóstico en pacientes afectados para el mundo occidental no ha mejorado lo suficiente (Waldum *et al.*, 2017). En Sudamérica las tasas de incidencia y mortalidad de CG han generado una preocupante carga en la salud pública de sus países. Colombia con un segundo lugar poco alentador reportó 8.214 casos nuevos de CG y 6.451 muertes en 2020 (IARC, 2020). En Colombia existen regiones de alto riesgo como: Boyacá, Cundinamarca, Tolima, Santander y Nariño, con poblaciones que reportaron tasas de incidencia de hasta 150/100.000 habitantes, regiones de riesgo intermedio como Antioquia, Valle del Cauca y Norte de Santander, y finalmente regiones costeras de bajo riesgo (Correa y Piazzuelo, 2010).

La infección crónica por *H. pylori* es el principal agente tensionante para el desarrollo de atrofia gástrica, con resultados clínicos como úlceras pépticas, adenocarcinoma y linfoma tipo MALT, siendo así, clasificado por la agencia internacional para la investigación sobre el cáncer como carcinógeno tipo I para los seres humanos. El riesgo de desarrollar CG se correlaciona positivamente con el alcance y la gravedad de la gastritis atrófica, originándose de esta forma el principal tratamiento preventivo de CG, basado en la noción que la erradicación de *H. pylori* detiene la progresión del daño en la mucosa y el epitelio gástrico, al eliminar los eventos asociados con la patogénesis del microorganismo (Sugano *et al.*, 2015).

2.2 *Helicobacter pylori*

En los últimos 30 años se ha investigado intensamente a *H. pylori*, convirtiéndose en la infección bacteriana crónica mejor estudiada para los humanos en un nicho ecológico definido (Li y Perez-Perez, 2018; Salama *et al.*, 2013). *H. pylori* pertenece al género *Helicobacter* spp, subdivisión *Proteobacterias*, orden *Campylobacterales*, clase *Epsilonproteobacteria*, familia *Helicobacteraceae*. Es un patógeno gástrico microaerófilico, Gram-negativo, con forma helicoidal de 2,5 a 5,0 µm de largo y 0,5 a 1,0 µm de ancho, con cuatro a seis flagelos con cubierta polar, esenciales para la motilidad bacteriana. *H. pylori* coloniza aproximadamente a la mitad de la población mundial y generalmente se asocia a gastritis asintomática sin efectos adversos; infortunadamente, para un grupo de infectados pueden surgir resultados clínicos de mayor severidad como úlceras pépticas o carcinoma gástrico (Cover y Blaser, 2009; Salama *et al.*, 2013).

2.2.1 Prevalencia de *Helicobacter pylori*

H. pylori se ha convertido en la causa infecciosa de cáncer más importante a nivel mundial con una prevalencia estrechamente vinculada al tipo de región y población (Sasaki *et al.*, 2021). Hooi *et al.*, 2017, sugirieron que aproximadamente 4.400 millones de personas se infectaron en todo el mundo para 2015, lo que representaba el 60,3% de la población humana, con una prevalencia media en los países que varió desde un mínimo del 18,9 % en Suiza al 87,7% en Nigeria; los mismos, para Sudamérica reportaron una prevalencia del 69,4%, con un rango del 3,9 a 74,9% entre regiones.

En Colombia la prevalencia de la infección es alta, Bravo *et al.*, 2003, reportaron de acuerdo a informes histopatológicos practicados durante 1997 una prevalencia de 69,1%; no obstante, el método diagnóstico (Histología, cultivo, ureasa, prueba de aliento y serología-IgG) vario entre poblaciones. En la ciudad de Ibagué se informó la presencia de *H. pylori* en 78,3%, 63,3% y 67,6% de los pacientes, mediante histología, amplificación del gen *16S ADNr* y del locus *iceA*, respectivamente (Montealegre *et al.*, 2010). Trujillo *et al.*, 2014, no observaron diferencias en la prevalencia de la infección por *H. pylori* entre zonas de alto riesgo (Tunja y Bogotá - 77,3%) y zonas de bajo riesgo (Barranquilla, Santa Marta y Cartagena – 77,9%); aunque se han reportado tasas de incidencia de CG 25 veces más altas en las zonas montañosas que en la costa Pacífica (Correa y Piazuolo, 2010).

Nariño con tasas de prevalencia de ~90%, representa una de las regiones con mayor número de infectados, asociados a una alta tasa de lesiones gástricas y CG (Bravo *et al.*, 2003). El análisis en este departamento demuestra que los diferentes niveles de riesgo entre poblaciones no dependen solo de la variación en las tasas de prevalencia de *H. pylori* (Correa y Piazuelo, 2010), puesto que para cada población e incluso paciente el resultado de la interacción entre la virulencia de las cepas infectantes, la genética humana y los factores sociodemográficos es distinta.

2.2.2 Mecanismos adaptativos de *Helicobacter pylori*

Desde la secuenciación del genoma completo de *H. pylori* en 1997, con un tamaño de 1.667.867 pb., se estableció un importante punto de partida para entender sus mecanismos de variación patogénica y evolución (Tomb *et al.*, 1997). Se ha encontrado una cantidad impresionante de diversidad genética entre los aislamientos clínicos de *H. pylori*, producto de una alta tasa de mutación y frecuentes eventos de recombinación (Jackson *et al.*, 2020). Se reporta por medio de los análisis de su genoma, la presencia de grupos de genes dentro de islas genómicas que albergan distintas regiones de variabilidad, denominadas "zonas de plasticidad" (Haley y Gaddy, 2015). Advirtiéndose que es probable que las zonas de plasticidad ampliamente distribuidas entre las cepas de *H. pylori*, estén involucradas en la transferencia horizontal de genes, brindándole una ventaja adaptativa, al promover la evasión de la respuesta inmune y los antibióticos (Fischer *et al.*, 2014).

La tasa de mutación de *H. pylori* se incrementa hasta 10 veces durante la infección aguda o temprana como mecanismo frente a la respuesta inmune del huésped y el ambiente gástrico hostil, para posteriormente disminuir sus tasas de cambio genético durante la infección crónica. Esto explica que *H. pylori* presente una de las tasas de mutación más altas entre las bacterias actualmente evaluadas, principalmente en genes que codifican proteínas de membrana externa (OMPs), implicadas en la interacción huésped-patógeno, siendo los objetivos de la respuesta inmune adaptativa, los componentes bacterianos que experimentan la mayor presión de selección (Haley y Gaddy, 2015; Linz *et al.*, 2014).

2.2.3 Resistencia a antibióticos de *Helicobacter pylori*

En la actualidad, a menos de 100 años del descubrimiento de Fleming, la comunidad científica se encuentra en una constante “carrera armamentista” en contra de las bacterias patogénicas. Aunque Marshall y Warren en 1984 demostraron la relación entre *H. pylori* y el desarrollo de gastritis atrófica y úlcera péptica, aún no se ha establecido un tratamiento 100% efectivo o una vacuna. En cambio, han sobresalido desafíos para los tratamientos preventivos de erradicación de *H. pylori*, como la resistencia a los antibióticos y sus efectos adversos sobre la salud del paciente/microbiota (disbiosis), además de sus altos costos económicos (Malfertheiner *et al.*, 2017). En consecuencia la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2017 incluyó a *H. pylori* en la lista de los 16 microorganismos de más alta prioridad por su amenaza a la salud pública de la humanidad, que amerita urgentes medidas de control.

La terapia de erradicación de *H. pylori* confiere un beneficio crucial para el paciente, al detener la progresión del daño en la mucosa gástrica y reducir el reservorio de individuos infectados. Las mayores tasas de prevención se obtienen en fases para las cuales la cascada precancerosa no ha progresado más allá del diagnóstico no atrófico; a la vez el éxito de erradicación depende de la interrelación de diferentes variables como: Cumplimiento del tratamiento, adherencia de la bacteria al epitelio gástrico, acidez gástrica, tipo de cepa bacteriana infectante y/o resistencia, entre otras, puesto que estos factores pueden ocasionar que no se alcance tasas superiores al 90-95% de efectividad (Malfertheiner *et al.*, 2017; Sugano *et al.*, 2015).

La existencia de terapias triples, secuenciales, concomitantes e híbridas, hacen que el tratamiento que formula el médico no sea una decisión a la ligera, dado que debe ajustarse al régimen local más efectivo (Graham y Shiotani, 2012). En Colombia como en el resto del mundo existe la preocupación de que la eficacia de los tratamientos de primera línea sea inferior a los porcentajes aceptables >90 o 95%, lo cual se asocia con la aparición de aislamientos multiresistentes, el uso inadecuado de antibióticos y la falta de cumplimiento del régimen terapéutico por los pacientes (Arévalo *et al.*, 2019; Figueroa *et al.*, 2012; Savoldi *et al.*, 2018)

2.2.4 Tratamientos para la infección de *Helicobacter pylori*

El tratamiento de erradicación de la infección por *H. pylori* se basa en combinaciones de agentes antimicrobianos (amoxicilina, claritromicina, metronidazol, levofloxacina y otros) y un agente

antisecretores como los inhibidores de la bomba de protones (IBP). La terapia que incluye un IBP y dos antibióticos (claritromicina y amoxicilina/metronidazol) se usa ampliamente como régimen de primera línea; pero el aumento de la resistencia de *H. pylori* a estos antimicrobianos ha reducido significativamente la tasa de erradicación, llevando a realizar terapias triples modificadas o terapias secuenciales (Graham y Shiotani, 2012). Además de usar como terapia de rescate del tratamiento de primera línea la adición de levofloxacina o un esquema dual de IBP y amoxicilina (dosis altas) (Gatta *et al.*, 2005; Safavi, 2016).

La urgente necesidad de introducir más opciones para la erradicación de la infección, ha apuntado al uso de quinolonas, entre las cuales, se resaltan la levofloxacina y la moxifloxacina como alternativa a los antibióticos estándar contra *H. pylori*, en una segunda línea de tratamiento y rescate (Rispo *et al.*, 2014). Su utilización continua viene provocando el aumento de sus tasas de resistencia para algunas poblaciones, como una situación crítica, considerando que las quinolonas son la única clase de antibióticos para uso clínico que inhiben directamente la síntesis de ADN bacteriano (Rispo *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2010).

El principal mecanismo de resistencia consiste en una combinación de mutaciones que alteran la afinidad de unión de las enzimas diana con el antibiótico, resultado de las sustituciones de aminoácidos que cambian estructuralmente la proteína. Para las quinolonas las mutaciones en GyrA son notablemente más frecuentes (Correia *et al.*, 2017), tales alteraciones en el gen *gyrA* elevan las concentraciones mínimas inhibitorias, debido a que el mecanismo de acción de estos antibióticos se fundamenta en la inhibición de la ADN girasa, que controla la topología del ADN durante la transcripción y la replicación, mediante la introducción de rupturas transitorias de ambas cadenas de ADN (Ziraldó *et al.*, 2019).

Las ADN topoisomerasas se dividen en dos clases, tipo I y II; de estas últimas la ADN girasa consta de dos proteínas, GyrA y GyrB, que forman un complejo A₂B₂ en la enzima activa (Ziraldó *et al.*, 2019). La ADN girasa es fundamental para la supervivencia bacteriana, ya que el ADN no es solo un portador de información genética, sino también un importante contribuyente al control de la expresión génica por sus propiedades estructurales. En conjunto la topología del

ADN y la expresión génica sustentan la respuesta global del genoma a los cambios en los entornos intra y extracelular, que promueven la evolución bacteriana (Dorman y Dorman, 2016).

La importancia biológica de la ADN girasa la convierte en un importante objetivo farmacológico; sin embargo, el incremento del fracaso terapéutico de las quinolonas, hace necesario un aumento en los esfuerzos para establecer nuevas estrategias de tratamiento, comprendiendo que la resistencia de *H. pylori* a este tipo de antibióticos es causada por una mutación puntual en GyrA, especialmente en los aminoácidos 87 (Asn a Lys) y 91 (Asp a Gly, Asp a Asn o Asp a Tyr) (Kasahun *et al.*, 2020; Rispo *et al.*, 2014).

2.2.5 Perspectivas de los tratamientos frente a *Helicobacter pylori*

La erradicación de *H. pylori* como punto de inflexión en los tratamientos preventivos de CG, se ha puesto a prueba con el incremento de la resistencia a los antibióticos, lo que puede ocasionar el posible regreso a la era preantibiótica, dado que las opciones terapéuticas se agotan muy deprisa y el diseño de nuevas estrategias es un proceso costoso. En este sentido no es suficiente con encontrar y probar compuestos con actividad bactericida, sin entender aún sus mecanismos de acción en los sistemas biológicos complejos, que modulan la resistencia a los antibióticos (Davies y Davies, 2010).

La presión de selección ejercida por los antibióticos de la terapia convencional y sus modificaciones, favorece la aparición e incremento de cepas resistentes y/o multiresistentes, mediante procesos de mutación y recombinación (Davies y Davies, 2010). Esto se debe a la notable versatilidad de las poblaciones de *H. pylori* naturalmente competentes, con su capacidad de maximizar la utilización de los recursos en un ambiente hostil como el estómago, a través de respuestas fisiológicas que imponen cambios en el epitelio gástrico y sus condiciones desfavorables (Salama *et al.*, 2013).

La comprensión del contexto ecológico y evolutivo que modula los mecanismos de patogenicidad y resistencia de la bacteria, permitirá el desarrollo de mejores estrategias de prevención. Si se tiene en cuenta el proceso coevolutivo humano-*H. pylori*, los nuevos enfoques de tratamiento, se tendrían que ajustar a un balance ecológico, que diferencie las relaciones huésped/comensal y huésped/patógeno oportunista, en respuesta a que las complicaciones graves

de la colonización por *H. pylori* solo se observan en un 10 a 15% de los individuos infectados (Debraekeleer y Remaut, 2018; Li y Perez-Perez, 2018).

Desarrollar estrategias de prevención de CG comprendiendo que el 85 a 90% de los individuos infectados no progresan a lesiones gástricas y mantienen a *H. pylori* como un organismo comensal, reducirá el uso inadecuado de antibióticos en pacientes de baja susceptibilidad y evitaría la formación de un microambiente incitador de los mecanismos de resistencia. Realizar un tratamiento preventivo optimizado hacia el subconjunto de individuos con atrofia gástrica puede ser más factible a través de la combinación de efectos bactericidas (sinergia), encontrados en los extractos de origen natural, ya que la probabilidad de que aparezca un mutante de *H. pylori* a varios antagonista es igual al producto de las probabilidades de que aparezcan mutantes resistentes a cada uno de ellos (Debraekeleer y Remaut, 2018).

2.2.6 Extractos naturales frente a la infección por *Helicobacter pylori*

La creciente resistencia a antibióticos de los patógenos, puede abordarse a través de compuestos naturales, con diversas estructuras químicas y efectos biológicos (Rempe *et al.*, 2017). No obstante, su investigación aún es un panorama muy desalentador porque para varios de estos compuestos no se ha establecido un mecanismo de acción científicamente comprobado por ensayos dirigidos a este tipo de patógenos; es así que fundamentar el estudio de compuestos naturales bioactivos, únicamente con ensayos *in vitro*, amenaza con que el potencial de estas terapias alternativas pueda caer en la ambigüedad. Ante este panorama es necesario corroborar las nuevas hipótesis sobre el uso de sus propiedades bactericidas, con enfoques combinados (*in vitro*, *in silico* e *in vivo*), que permitan acercarse al éxito encontrado en su contexto natural.

Las plantas no pueden moverse para escapar de sus desafíos ambientales, así que durante su proceso evolutivo han desarrollado una gran cantidad de moléculas bioactivas, a través de mecanismos para percibir tales ataques y traducir esas señales en una respuesta eficiente frente a los múltiples microorganismos patogénicos. Ante una situación tensionante, la planta produce una cascada de cambios bioquímicos en sus células, produciendo respuestas inmunitarias locales que se convierten en una señal para desencadenar mecanismos de defensa sistémicos que abarcan la totalidad de estructuras vegetales (Chisholm *et al.*, 2006).

La interacción planta-patógeno, ha dado forma a la evolución de la respuesta inmune de las plantas y ha culminado en un sistema de defensa altamente efectivo que puede resistir un ataque potencial (Chisholm *et al.*, 2006); en este sentido utilizar moléculas fitoquímicas naturales para resolver la interacción humano-*H. pylori* (patógeno), con resultados críticos en la salud de un subconjunto de infectados, es una hipótesis con gran potencial para ser investigada.

2.3 Compuestos fenólicos (polifenoles), propiedades y clasificación

Los polifenoles son metabolitos secundarios presentes ubicuamente en las plantas y cumplen diferentes funciones de resistencia al estrés biótico y abiótico. Incluyen moléculas de señalización, pigmentos y sabores que pueden atraer o repeler organismos coexistentes, además de compuestos contra insectos, hongos, nematodos, bacterias y virus. Como mecanismos de defensa se activan en muy poco tiempo en respuesta a agentes nocivos y se sintetizan a través de las vías del ácido shikímico y fenilpropanoide, principalmente a partir del aminoácido fenilalanina que se convierte en ácido cinámico (Crozier *et al.*, 2006).

Los polifenoles poseen numerosas propiedades bioactivas aunque no son nutrientes y su ingesta alimentaria proporciona efectos protectores para la salud. Son moléculas pequeñas o compuestos altamente polimerizados que tienen al menos un (fenol) o más (polifenol) grupos hidroxilo (-OH) unidos directamente a un anillo aromático (C6) y otros sustituyentes como los grupos metoxilo o carboxilo, que generan el carácter polar de los compuestos y permiten su disolución en agua (Crozier *et al.*, 2006).

Los polifenoles se pueden separar en taninos de alto peso molecular y compuestos de bajo peso molecular. Los taninos se clasifican en compuestos hidrolizables (gallotaninos - elagitaninos) y taninos condensados no hidrolizables (proantocianidinas); mientras que los polifenoles de bajo peso molecular se pueden clasificar en varios subgrupos: derivados de ácido fenólico, flavonoides, lignanos, estilbenos y curcuminas. Los flavonoides se clasifican en flavanoles, flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonoides y antocianinas; por su parte los ácidos fenólicos se clasifican en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos (Crozier *et al.*, 2006). Entre los flavonoides y los ácidos fenólicos se representa aproximadamente el 90% de todos los polifenoles naturales y los grupos mayormente estudiados frente a su bioactividad (Cory *et al.*, 2018).

2.3.1 Potencial de los polifenoles frente a las enfermedades complejas

El efecto de los polifenoles en la salud humana apunta a la prevención de enfermedades agudas y crónicas: Cardiovasculares, hepáticas, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, diabetes tipo II y cáncer (Cory *et al.*, 2018). Tales beneficios se han asociado a numerosas actividades biológicas: Antioxidante, modulación de los procesos inflamatorios, regulación del metabolismo y la proliferación celular (Cory *et al.*, 2018; Hussain *et al.*, 2016). Sin embargo, estas funciones son aún muy inciertas o han fracasado en los ensayos *in vivo* con polifenoles aislados. Un claro ejemplo son los bioensayos, en los que se ha demostrado que el metabolismo extenso en el humano después de la ingestión, disminuye la actividad biológica para algunos polifenoles (Hollman *et al.*, 2011).

Muchos de los efectos beneficiosos de los polifenoles “potencial” fueron concluidos a partir de una evidencia limitada. Los mejores resultados se encontraron en estudios epidemiológicos, que asocian el consumo de frutas y verduras de alto contenido polifenólico con una mayor esperanza de vida y mejores condiciones de salud. Dicha situación ha hecho que los efectos protectores atribuidos a los polifenoles contra los problemas de salud pública y dieta, generen un gran interés por parte de grupos de investigación biotecnológica y farmacéutica, además de la industria de suplementos alimenticios y nutricionales. No obstante, aún no es posible evaluar los beneficios que el incremento en la ingesta de estos compuestos aislados podrían tener para los humanos y sus grupos particulares con riesgo específico de enfermedad (Cory *et al.*, 2018).

Los beneficios de los polifenoles en salud deben ser abordados a partir de sus múltiples mecanismos de acción a nivel celular, aunque en la actualidad no se encuentren completamente descifrados. El enfoque predominante en la investigación de los polifenoles basado en el aislamiento y purificación, puede carecer de los efectos sinérgicos encontrados en las frutas y otros extractos naturales moldeadas a lo largo de la evolución, para responder a diferentes presiones de selección. Algunos estudios ya han advertido que pueden haber efectos nocivos por el consumo excesivo de estos compuestos, especialmente en los casos en que se aíslan en lugar de consumirse en una matriz alimentaria (Williamson y Holst, 2008).

Es evidente el potencial de los polifenoles dada su amplia diversidad estructural/funcional; pero la información para establecer los efectos de cada compuesto es aún insuficiente. Se necesita un nuevo enfoque para lograr usar efectivamente a los polifenoles como antibiótico o coadyuvante en terapias de salud, que permitan establecer su biodisponibilidad, efectos de la dosis y de mayor prioridad los verdaderos mecanismos de acción, para aprovechar los efectos pleiotrópicos en los procesos biológicos del humano (Lacroix *et al.*, 2018; Williamson y Holst, 2008).

2.3.2 Diseño de terapias anti-*Helicobacter pylori* a partir de polifenoles

Los extractos polifenólicos constituidos por principios bioactivos de acción antagónica frente a múltiples objetivos proteicos en patógenos y efectos pleiotrópicos en el humano, pueden significar una solución terapéutica para enfermedades de etiología compleja y problemas de resistencia a antibióticos, si se conoce su modo de acción y posible acción simultánea ejercida como inhibidores múltiples, con un efecto dual o sinérgico que inhibe el patógeno, controlando los problemas de resistencia (Sanhueza *et al.*, 2017; Talevi, 2015).

Es necesario comenzar por una completa comprensión de los procesos constitutivos de la bacteria (replicación del ADN, síntesis de proteínas e integridad de la membrana y la pared celular) (Debraekeleer y Remaut, 2018). En donde los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos sinérgicos, aditivos y antagónicos de las combinaciones de compuestos polifenólicos encontrados en las plantas podría facilitar el descubrimiento de nuevas combinaciones de antibióticos eficaces frente a la infección por *H. pylori*. Sin embargo, estas investigaciones enfrentan la necesidad de validar los múltiples objetivos farmacológicos de la bacteria, a los cuales se van a dirigir los compuestos; siendo importante como paso inicial la optimización de las múltiples relaciones estructura/actividad inhibitoria de los extractos y polifenoles en estudio, así como su potencial farmacológico.

2.4 Acoplamiento molecular y relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR)

El estudio de los mecanismos moleculares inherentes a la actividad antimicrobiana se pueden abordar con el uso de técnicas de puntuación y acoplamiento computacional, que han revolucionado la bioinformática estructural al proporcionar conocimientos sobre aspectos clave de la interacción ligando-receptor (El-hachem *et al.*, 2017). El acoplamiento molecular, como herramienta utilizada para la predicción y diseño de nuevos fármacos, implica la predicción de la

conformación y orientación del ligando (posición) dentro del sitio de unión de una proteína diana. En general, los estudios de acoplamiento tienen dos objetivos: el modelado estructural preciso y la predicción correcta de la actividad (El-hachem *et al.*, 2017; Fang *et al.*, 2016).

El modelo de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) es una de las principales herramientas computacionales empleadas en el diseño de fármacos. Es efectivo cuando el número de posibles experimentos excede significativamente las capacidades técnicas de los investigadores para sintetizar y/o probar todos los compuestos. Los modelos QSAR demuestran las asociaciones entre los descriptores moleculares (DM), que representan la información de la estructura de los polifenoles y su actividad (Afinidad de unión GyrA de *H. pylori*), como efecto biológico. Un QSAR permite la evaluación preliminar *in silico* de las propiedades cruciales en la acción bactericida, la selectividad y la toxicidad de los compuestos; consiguiendo optimizar el tiempo y los costos durante los proyectos de investigación (Cherkasov *et al.*, 2014; Dearden *et al.*, 2009; Ponzoni *et al.*, 2017).

La metodología QSAR ha venido siendo usada por cerca de 50 años. En la actualidad, el QSAR pueden definirse por modelos de regresión o clasificación mediante el uso de diferentes estrategias computacionales, como diseños estadísticos o métodos de aprendizaje automático de gran alcance, como las redes neuronales (Ponzoni *et al.*, 2017). Todos los métodos con la predictividad como propósito compartido, tienen como objetivo estimar los valores de actividad para compuestos no utilizados para desarrollar la correlación (Cherkasov *et al.*, 2014; Dearden *et al.*, 2009).

Los DM (Descriptores moleculares) describen diferentes propiedades de la estructura química, como la fórmula molecular (1D) y las más utilizadas como las estructuras bidimensional (2D) y tridimensional (3D); es así que los DM son variables cuantitativas, que se pueden considerar en términos de grupos: Constitucionales (recuentos de átomos, enlaces, etc.), geométricos (estructura tridimensional de una molécula), topológicos (representación teórica gráfica) y electrónicos (características electrónicas) (Cherkasov *et al.*, 2014; Dearden *et al.*, 2009).

En este sentido determinar la energía de interacción entre los polifenoles y GyrA de *H. pylori*, permitirá analizar el potencial de las combinaciones de compuestos polifenólicos activos presentes en distintos extractos naturales, aumentando posiblemente la tasa de éxito de los ensayos *in vitro* e *in vivo*, generando así resultados favorables y disminuyendo los costos asociados al fracaso en las investigaciones.

3. ANTECEDENTES

La acción inhibitoria de *H. pylori* por los polifenoles de extractos naturales *in vitro* e *in vivo* ha sido documentada en varios estudios, mediante el uso de extractos de té (Mabe *et al.*, 1999), vino tinto (Mahady *et al.*, 2003), uva (Brown *et al.*, 2009), entre otros; así como la utilización de polifenoles aislados como el ácido gálico y la catequina (Díaz-Gómez *et al.*, 2013) o el estudio de la acción dual en la actividad anti-*H. pylori* para combinaciones de kaempferol y epicatequina (Escandón *et al.*, 2016); además de resaltarse los mecanismos sinérgicos de estos compuestos en el manejo de la infección e inflamación gástrica.

Los polifenoles se han asociado como inhibidores potenciales de múltiples objetivos proteicos en *H. pylori*, debido a bioensayos *in vitro* o análisis de interacción *in silico* como la inhibición de los factores de patogenicidad, como el efecto de la curcumina frente a dominios activos de Ureasa (Kataria y Khatkar, 2019), la alta afinidad de unión de cinco sesquiterpenoides contra la deformilasa peptídica de *H. pylori* (Dawood *et al.*, 2016), la acción del ácido succínico frente a la enzima pantotenato sintetasa (panC) de *H. pylori* (Damale *et al.*, 2019) y otros estudios de inhibición sobre vías constitutivas del patógeno (replicación de ADN, síntesis de proteínas e integridad de la membrana y pared celular).

La presencia de la ADN girasa solo en procariotas la convierte en un objetivo atractivo para varios antimicrobianos como los polifenoles Suriyanarayanan *et al.*, 2013, realizaron estudios de acoplamiento para determinar la afinidad de interacción de la quercetina con la subunidad B de la ADN girasa (GyrB) de *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis*, reportando un valor de -7,9 kcal/mol. En adición, Ostrov *et al.*, 2007 identificaron nuevas moléculas con acción antimicrobiana, a partir de análisis de acoplamiento entre GyrA de *E. coli* y una base de datos de 140.000 moléculas pequeñas, donde los diez mejores resultados se presentaron en un rango de -7,01 a -15,68 kcal/mol, evidenciando así la complejidad para encontrar nuevos compuestos con potencial bactericida.

La actividad anti-*H. pylori*, estimada como energía de unión ligando-proteína, puede ser utilizada en un modelo QSAR para predecir valores en compuestos aun no investigados, como una alternativa a la evaluación experimental (Dearden *et al.*, 2009). En los polifenoles se ha realizado

análisis QSAR, utilizando el efecto bactericida sobre diferentes patógenos, que han mostrado resultados variables, debido a la interacción entre los polifenoles, la clase de bacteria (Gram-negativa/Gram-positiva) y su historia natural en el proceso infeccioso (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019). Numerosos investigadores han establecido modelos QSAR para investigar la actividad antioxidante de los flavonoides e interpretar la relación entre la estructura de los compuestos fenólicos y su actividad antioxidante (Farkas *et al.*, 2004; Shi, 2021), siendo prometedor este tipo de análisis para resolver el problema de la escasa correlación del efecto *in vitro* e *in vivo* de los polifenoles, explicada por la pérdida de eficacia.

La posible razón del fracaso en los estudios de los polifenoles, se debe a que estos se enfocan en la extracción y purificación individual del polifenol, incrementando la presión de selección en el patógeno y la toxicidad en el huesped (mayores concentraciones inhibitorias); por lo cual la inhibición a través de la sumatoria de efectos moderados de este tipo de compuestos, podría ser un tipo de investigación con mayor éxito ante una infección de *H. pylori* multifacética y una enfermedad compleja (CG); requiriéndose en este proceso el desarrollo de modelos QSAR para inferir el potencial de la totalidad de la matriz polifenólica.

4. METODOLOGIA

El estudio es de tipo predictivo (*in silico*) y descriptivo, para el cual se recuperó una matriz de compuestos significativa, que mantuvo como base de los análisis las combinaciones polifenólicas naturales encontradas en diversos extractos botánicos. Esta investigación permitió establecer la afinidad de unión entre los polifenoles y GyrA de *H. pylori*, para ser utilizada como valor de actividad biológica en el análisis QSAR, generado a partir del método de Regresión Lineal Múltiple (MLR). A partir del modelo QSAR se obtuvieron valores de energía de interacción predichos para polifenoles, que permitieron explorar el potencial anti-*H. pylori*, de una amplia diversidad de extractos botánicos (especies), tomando como punto de inflexión su composición.

4.1 Construcción de una matriz de datos

Se obtuvo una primera matriz de datos p por d que contiene los extractos botánicos como E especies y los valores C correspondientes a la composición (número y tipo de polifenoles presentes en la muestra). La matriz de datos fue recuperada de Phenol-Explorer 3.6, una base de datos completa en la web, con información detallada sobre la naturaleza y cantidades de polifenoles que se encuentran en los principales alimentos consumidos en la dieta humana. Sus datos son recopilados de publicaciones científicas revisadas por pares, en la lista se registran los nombres científicos y las familias botánicas de las especies de plantas y su composición se representa en base a las características estructurales de las clases y subclases descritas en Phenol Explorer; en donde se han discriminado 6 clases principales (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos, otros polifenoles y metabolitos no fenólicos de polifenoles), conformadas por un total de 31 subclases (como flavonoles, ácidos hidroxibenzoicos, etc.) (Neveu *et al.*, 2010).

4.1.1 Análisis matriz de datos

Se comparó el promedio de polifenoles identificados entre las familias botánicas, las cuales se clasifican en relación al número de especies con composición polifenólica reportada. La recurrencia de los diferentes tipos de compuestos entre las muestras, se presenta de acuerdo a las cinco clases polifenólicas principales (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos y otros polifenoles). Los resultados se representan por medio de histogramas.

4.2 Estimación de la representatividad de la riqueza de polifenoles

La trascendencia y calidad de los datos de composición polifenólica recuperados de Phenol-Explorer se determinó a través de la estimación de una curva de acumulación de compuestos, por medio del estimador Chao 1 en el programa EstimateS 9.1.0 (Chao *et al.*, 2005). Esta herramienta utilizó el número de polifenoles con una sola ocurrencia (Singletons) y el número de polifenoles con exactamente dos ocurrencias (Doubletons) en la matriz de datos, como una forma de calcular la probabilidad de que haya más polifenoles sin reportar, de acuerdo a la siguiente ecuación de Chao y colaboradores:

$$S = P_{obs} + \frac{P_1^2}{2(P_2)}$$

Donde, S = Riqueza polifenólica o número de compuestos presentes en una muestra, P_{obs} es el número de polifenoles observados (reportados), P_1 es el número de singletons y P_2 el número de doubletons.

Se obtuvo la distribución de frecuencias de los valores de incremento en el número de nuevos polifenoles tipo Singletons y Doubletons, cada vez que se adicionó una muestra al análisis, utilizando la estimación no paramétrica de la densidad de kernel del software R 4.0.4; paralelamente se comparó su distribución a través del test no paramétrico U de Mann-Whitney.

4.3 Interacciones previstas entre polifenoles y proteínas de *Helicobacter pylori*

Se obtuvo una descripción general de los efectos potenciales de los polifenoles y proteínas de *H. pylori*, utilizando la herramienta de búsqueda de sustancias químicas en interacción (Search Tool for Interacting Chemicals, STITCH); su interfaz en línea abarca más de 9.600.000 proteínas para 2030 genomas eucariotas y procariotas, además de 430.000 compuestos (Szklarczyk *et al.*, 2016). Se usaron como entrada 8 compuestos: Quercetina, procianidina B2, apigenina, kaempferol, rutina, ácido ferúlico, vainillina y catequina, realizando una búsqueda con base al organismo de referencia *H. pylori*, cepas 26695, J99 y SouthAfrica7, logrando visualizar las proteínas con reporte de interacción y los socios funcionales previstos. En el análisis se seleccionó como fuentes de evidencia, redes de interacción, experimentos, bases de datos, coexpresión y extracción de texto, generando una puntuación de confianza entre 0 y 1. Los datos de interacción se descargaron de STITCH y se construyeron redes utilizando el software Cytoscape 3.8.2 (Shannon *et al.*, 2003).

4.4 Acoplamiento Molecular

Se realizó un estudio de acoplamiento molecular para determinar la afinidad de unión (energía de interacción) de los polifenoles más conservados entre las especies y el sitio activo de GyrA de *H. pylori*. Dado que la estructura cristalográfica de rayos x de la proteína no es accesible, se utilizó un modelo de homología de la cepa 26695 (UniProtKB - P48370) existente en el programa automatizado SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018). Las estructuras 3D de los compuestos se descargaron de la base de datos de información química PubChem (Kim *et al.*, 2021) y se optimizó su geometría molecular utilizando el campo de fuerza MMFF94 (Merch Molecular Force Field, por sus siglas en inglés) del software Avogadro 1.2.0 (Hanwell *et al.*, 2012), el cual se ajusta a compuestos orgánicos y esta parametrizado para estructuras como los fenoles, a partir de cálculos *ab initio*. Por su parte a la proteína se le realizó la eliminación de las moléculas de agua (deshidratación) en el software Chimera 1.15 (Pettersen *et al.*, 2004).

Para preparar y ejecutar el análisis de acoplamiento se siguió el protocolo previamente informado por El-hachem *et al.*, 2017; en tres pasos principales. (1) la preparación de los parámetros de acoplamiento y puntuación, creando los archivos de parámetros de cuadrícula, archivos de mapas y archivos de parámetros de acoplamiento. Los compuestos seleccionados y GyrA se convirtieron en coordenadas “.pdbqt” usando AutodockTools, posteriormente para la preparación de los ligandos se agregó átomos tipo AD4 compatibles con el formato de Autodock 4.2, hidrógenos polares y se asignaron cargas de Gasteiger; en cuanto a la proteína se agregaron átomos de hidrogeno polares, se asignaron cargas de Kollman y la estructura obtenida se usó como un archivo de entrada para la herramienta Autogrid (Morris *et al.*, 2009). Los parámetros Grid, se establecieron con una cuadrícula de coordenadas atómicas X=5,122, Y=35,886, Z=41,643, alrededor del sitio activo TYR 126 (Tirosina), las dimensiones de la caja fueron X=90, Y=90, Z=100; esto fue guardado en formato “.gpf”. Para la preparación de los parámetros de acoplamiento, para cada sistema de interacción se seleccionó un algoritmo genético de Lamarck, sustentado en 2.500.000 ejecuciones de la búsqueda AUTODOCK, con un formato “.dpf”. (2) Por último se generó la ejecución del programa de acoplamiento, y (3) el análisis/evaluación de los resultados, comparando las poses de acoplamiento con el ligando.

4.5 Desarrollo relación estructura actividad-cuantitativa (QSAR)

Para el análisis de la relación estructura-actividad (SAR), se seleccionó los 30 compuestos más conservados entre las especies vegetales (**Anexo 1**), para los cuales, la variable dependiente fue la energía de interacción (kcal/mol), correspondiente al valor de actividad con la mejor pose de cada ligando (polifenol) con GyrA de *H. pylori*. Las estructuras 3D de los compuestos se descargaron en formato “.sdf” de la base de datos de información química PubChem (Kim *et al.*, 2021). El código reproducible usado en el software R, se extrajo y modifico de la metodología general propuesta por Goode-Romero *et al.*, 2019 (**Anexo 9**).

4.5.1 Cálculo de descriptores moleculares de los polifenoles

Los descriptores moleculares (DM) de los polifenoles definen su estructura y función. Muchos descriptores ahora son fáciles de calcular debido a los avances en la quimioinformática. Se utilizó el paquete rcdk del software R 4.0.4., el cual proporcionó acceso al CDK, un marco de java para calcular descriptores moleculares de tipo constitucional, geométrico, topológico y electrónico. Es conocido que todos los descriptores no son relevantes para la actividad, así que se eliminaron los descriptores altamente correlacionados (coeficientes de correlación de Pearson); buscando aplicar un modelo de baja correlación entre DM, lo que evita la información redundante, especialmente para muestras pequeñas como la utilizada en este estudio (Shi, 2021). Posteriormente, se seleccionó un subconjunto más relevante, mediante la función *regsubsets* del paquete leaps, con el propósito de evitar dependencias lineales exactas entre los DM preseleccionados y la inestabilidad en los coeficientes de regresión (Dearden *et al.*, 2009).

4.5.2 Regresión lineal múltiple (MLR) para inferir el modelo QSAR

Se utilizó un enfoque QSAR basado en el método MLR llevado a cabo en el software R. La capacidad predictiva y descriptiva se evaluó con las métricas de rendimiento, coeficiente de correlación r^2 , coeficiente de correlación ajustado R^2 y el coeficiente de regresión de validación cruzada interna q^2 . El modelo QSAR se infirió, estableciendo el tamaño de los conjuntos de entrenamiento y prueba (80/20%), de forma aleatoria, usando la función *floor* del software R (**Anexo 9**). Con el modelo QSAR disponible se predijo el valor de la energía de interacción para 123 polifenoles con la función *predict* (**Anexo 9**).

4.6 Exploración del potencial anti-*Helicobacter pylori* de los extractos botánicos

Para acercarse al potencial de los diversos extractos botánicos (especies) anti-*H. pylori*, en este estudio se utilizó una estrategia de clasificación botánica y un enfoque de análisis ecológico. Los valores de energía de interacción con la subunidad A de la ADN girasa, calculados y predichos para los compuestos polifenólicos más conservados entre las especies, reemplazaron en la matriz de datos a los valores de concentración polifenólica. La actividad total de los extractos botánicos se calculó como la suma de las energías de interacción de todos los polifenoles individuales, estos valores se mostraron utilizando una agrupación de bordes jerárquica, que permitió visualizar las relaciones de adyacencia entre los extractos botánicos con mayor potencial de éxito en posibles estudios *in vitro* e *in vivo* posteriores, por medio de una clasificación en función de sus puntuaciones finales de afinidad de unión.

4.7 Análisis estadístico

La mayoría de datos obtenidos en los pasos anteriores se analizaron utilizando el software R versión 4.0.4 (R Core Team, 2021). Los diferentes gráficos encontrados en las diferentes secciones, fueron realizados con el mismo programa estadístico y su código reproducible fue extraído de la galería de gráficos R de Holtz, Y. (2021).

5. RESULTADOS

Para acercarse a la evaluación de diversos extractos polifenólicos con capacidad de inhibición para GyrA de *H. pylori*, en este estudio se utilizó una estrategia de clasificación botánica y un enfoque de análisis ecológico. Se analizó un total de 48 familias vegetales, que reportan distinto número de especies y contenido polifenólico; familias como Vitaceae, Theaceae, Grossulariaceae, Rosaceae y Oleaceae, mostraron un mayor número de compuestos identificados entre sus especies (en adelante, riqueza de especies); por el contrario la mitad de familias (48%) reportaron solo una especie con composición polifenólica conocida (**Figura 1**).

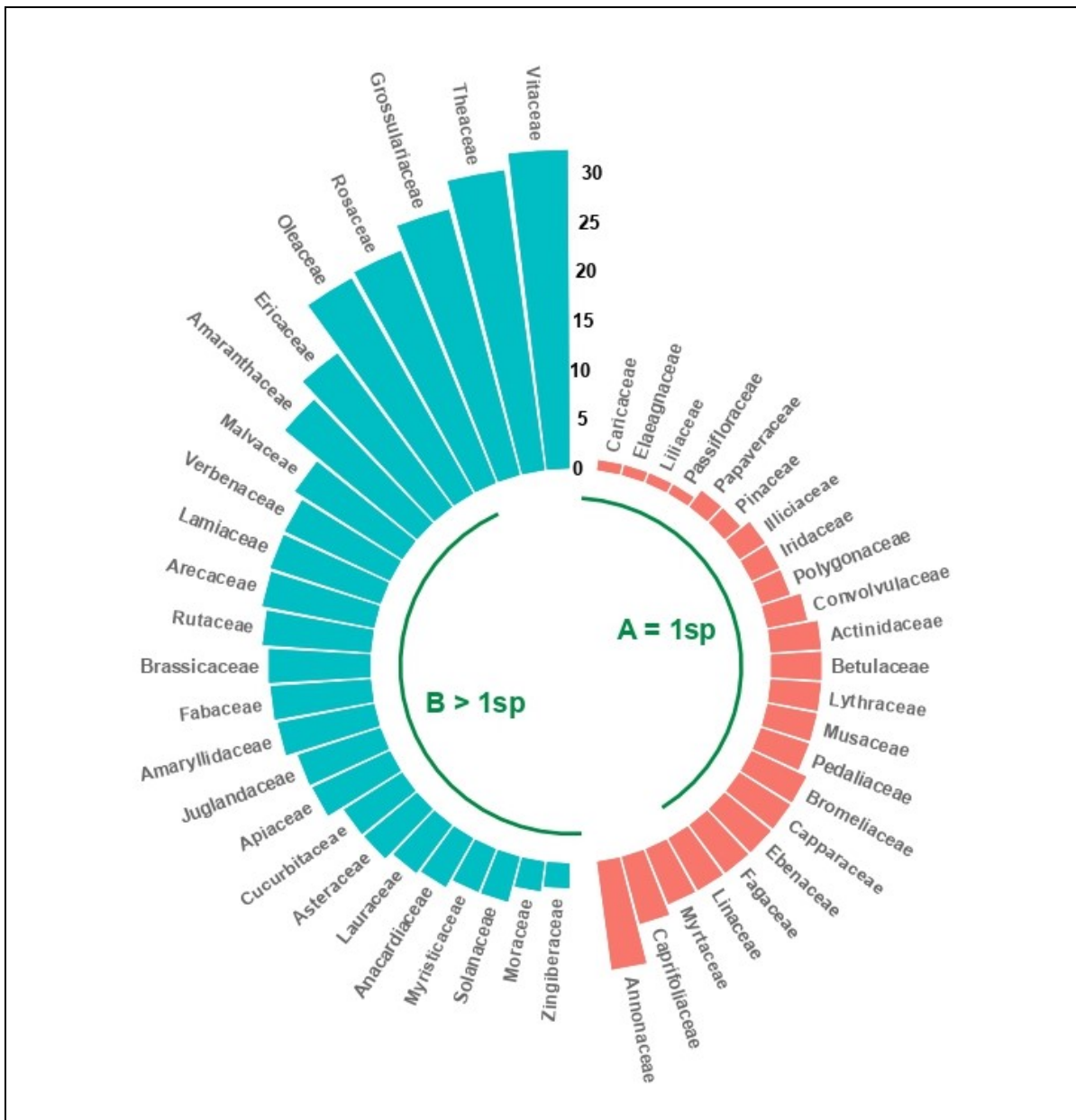


Figura 1: Análisis comparativo del número de especies y polifenoles reportados por familia botánica. Las barras rojas pertenecen a las familias con solo una especie con reporte de composición polifenólica ($A = 1sp$); por su parte, las barras azules muestran familias con más de dos especies con reporte de composición ($B > 1sp$). La escala de valores indica el número promedio de polifenoles encontrado entre las especies (sp). Fuente esta investigación.

Entre las especies analizadas los flavonoides y ácidos fenólicos son mayormente recurrentes, respectivamente. En cambio, los estilbenos se encuentran limitados a especies como las pertenecientes a la familia Vitaceae; a la vez la clase Otros polifenoles puede no estar suficientemente representada debido a los problemas de clasificación, así mismo los lignanos tienden a ser menos estudiados (**Figura 2**).

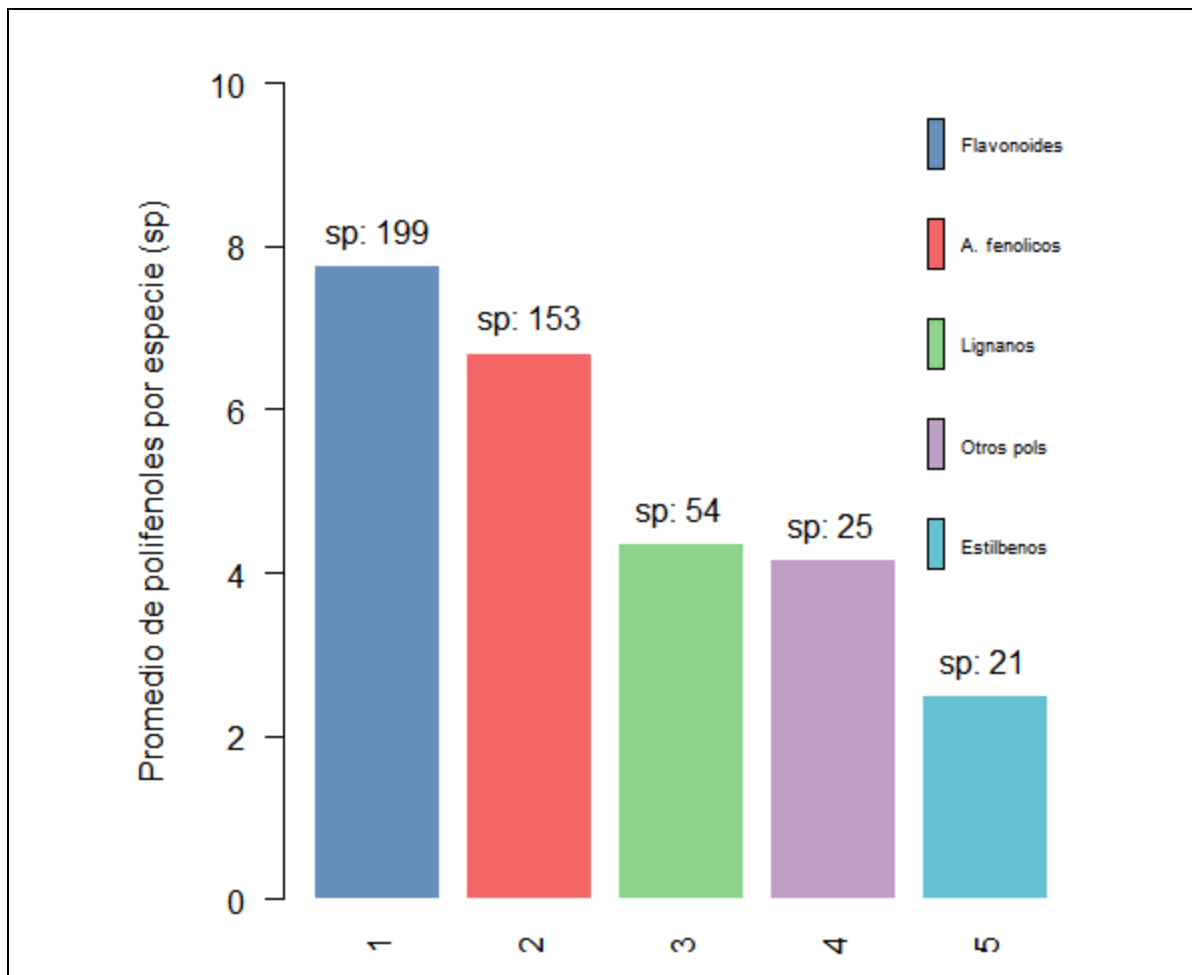


Figura 2: Análisis de recurrencia de los tipos de polifenoles entre las especies evaluadas. Se muestran las cinco clases polifenólicas principales (Flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos y otros polifenoles) con el número promedio de compuestos reportados por especie.

Las etiquetas sobre las barras indican el número total de especies en las que se reportaron. Fuente esta investigación.

5.1 Estimación de la representatividad de la riqueza polifenólica analizada

La curva de acumulación de polifenoles ($364 \pm 11,4$ compuestos reportados) explica para las 263 muestras vegetales extraídas de Phenol-Explorer, una representatividad del 65% del total de polifenoles predichos ($564,05 \pm 42,11$), con el estimador Chao 1 (**Figura 3a-b**). Se estima que ~35% de los polifenoles existentes en las muestras aún no han sido registrados para su composición, dada la desviación entre la riqueza observada y esperada (**Figura 3d**). Se evidencia un alto número de polifenoles de baja ocurrencia entre las muestras (71,55% Singletons - 28,45% Doubletons), provocando que la riqueza observada no alcance la saturación (asíntota de la curva) (**Figura 3a**). A la vez, el incremento en la probabilidad de encontrar un polifenol de baja ocurrencia supera la probabilidad de detectar un nuevo polifenol compartido ($p \text{ valor} = 2,771e^{-12}$, U de Mann-Whitney) (**Figura 3c-d**).

5.2 Interacciones previstas entre polifenoles y proteínas de *Helicobacter Pylori*

La vista de red construida con base en las interacciones reportadas en STITCH, indicaron que la procianidina tipo B2, puede ser un ligando (inhibidor) de ADN girasa subunidad A y B, existente solo en procariotas (**Figura 4-a**). A la vez, se evidencia la superposición de las proantocianidinas con algunos fármacos; esto convierte a los polifenoles en posibles socios funcionales, que a través de efectos sinérgicos o duales, podrían potenciarse como agentes para combatir las cepas de *H. pylori* resistentes a los antibacterianos quinolónicos como moxifloxacina, levofloxacinas y otros (**Figura 4-a**).

Por otra parte, las catequinas mostraron interacciones con dominios de las ADN metilasas (**Figura 4-c**), como resultado llamativo para futuras investigaciones, si se considera que la metilación en el genoma de la bacteria es de tres tipos: Metilación de N^6 – adenina (m6A), metilación de C^5 - citosina (m5C) y metilación de N^4 -adenina. Se ha informado que la delección o modificación de las metiltransferasas, conduce a una expresión génica alterada que afecta la transcripción de genes implicados en la motilidad, adherencia y virulencia, al actuar como un regulador epigenético global de *H. pylori* en el sistema de modificación/restricción (M.-R) (Kumar *et al.*, 2018). Kumar *et al.*, 2018, demostraron que el genoma de *H. pylori* contienen

exclusivamente metilación de N4-citosina (m4C), la cual no está presente en otros procariotas o eucariotas. En este sentido, los investigadores han establecido nuevas hipótesis sobre como este tipo de compuestos pueden intervenir en la regulación epigenética de *H. pylori* (Kumar *et al.*, 2018). En adición, los polifenoles pueden incidir directa o indirectamente (por socios funcionales), en la producción localizada de iones de amonio ejercida por la ureasa, la motilidad a cargo de la flagelina o la biosíntesis de ácidos grasos insaturados (**Figura 4-b, c**).

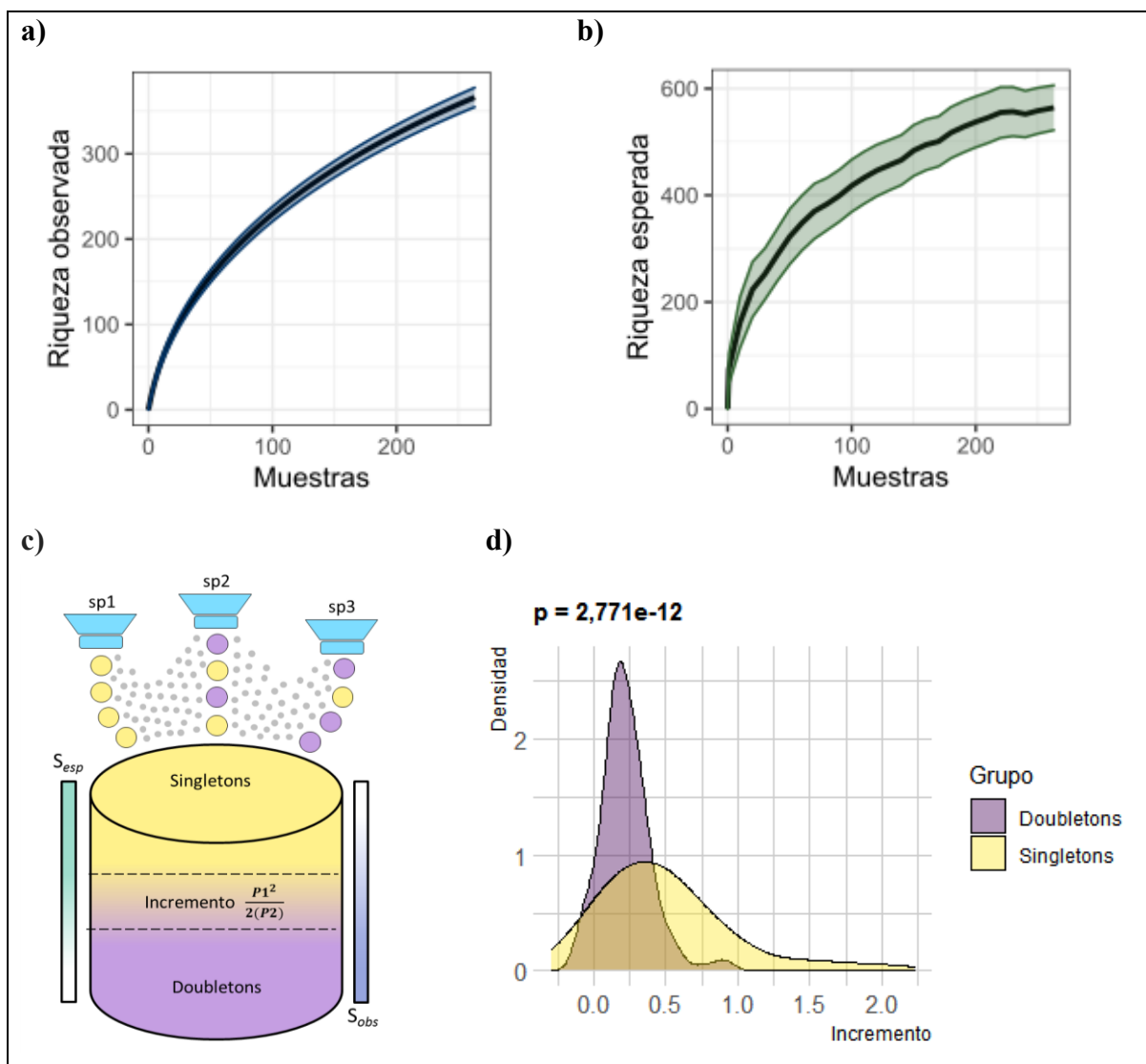


Figura 3: Representatividad de la riqueza polifenolica analizada. Estimación para el conjunto de polifenoles recuperados de Phenol-Explorer en 263 muestras vegetales. **a)** Curva de acumulación de compuestos polifenolicos, donde el eje (x) es descrito por las muestras con composición conocida y el eje (y) es la riqueza observada o el número de polifenoles caracterizados (área azul = desviación estándar). **b)** Curva de acumulación predicha, utilizando el

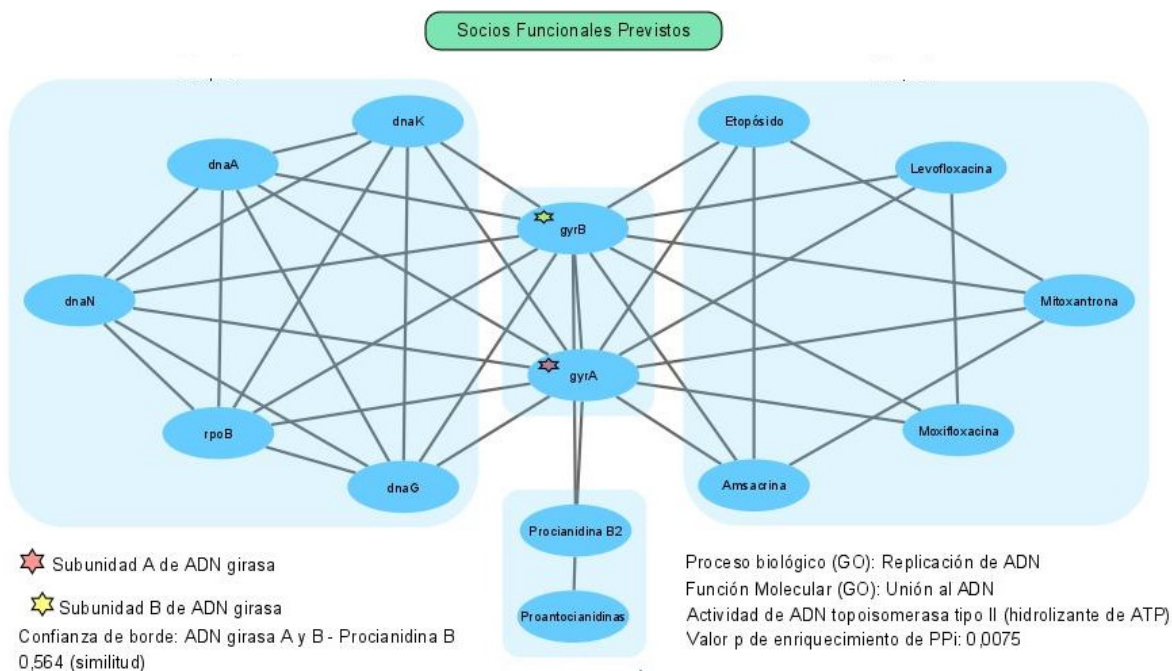
estimador Chao 1, con un eje (x) correspondiente a las muestras y un eje (y) representado por la riqueza esperada o la estimación del número total de polifenoles posibles (área verde = desviación estándar). **c)** Esquema comparativo del incremento en la probabilidad de ocurrencia de un polifenol tipo Singletons o Doubletons, para el cual, S_{esp} = Riqueza esperada, S_{obs} = Riqueza observada y sp = Especie o muestra vegetal adicionada al análisis; aquí el incremento de los Singletons es inversamente proporcional a los Doubletons y la asíntota de la curva de S_{obs} , y directamente proporcional al aumento del número de polifenoles estimados (S_{esp}). **d)** Comparación de la distribución de frecuencias de los polifenoles tipo Singletons y Doubletons, el eje (x) indica el incremento en su ocurrencia; mientras que el eje (y) es descrito por la densidad resultante de su frecuencia de aparición (p valor = $2,771e^{-12}$, U de Mann-Whitney). Fuente esta investigación.

5.3 Acoplamiento molecular

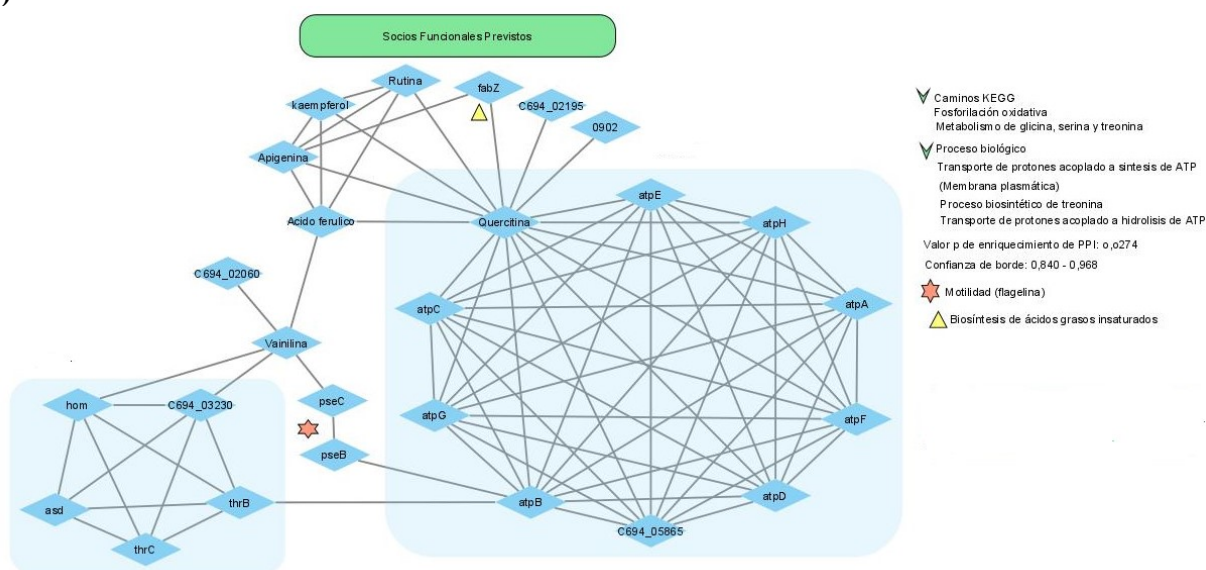
El estudio de acoplamiento molecular para determinar la afinidad de unión de la proteína GyrA de *H. pylori* con los 30 polifenoles de mayor ocurrencia en las especies vegetales, obtuvo puntajes de acoplamiento bajos y altos para 10 conformaciones diferentes por compuesto (**Figura 7-a, Anexo 1**), con resultados que oscilaron entre -1,1 y -7,2 kcal/mol y un promedio de -4,514 kcal/mol, donde los diferentes tipos de compuestos mantienen en su mayoría intervalos entre 4 y 6 kcal/mol, con un limitado número de compuestos con valores mayores a -7 kcal/mol para los flavonoides (**Figura 7-b, Anexo 1**). Al revelarse las posibles interacciones ligando-proteína de unión, varios de los compuestos exhibieron enlaces estables de hidrógeno con uno o más aminoácidos de la proteína, evidenciando regiones interactuantes con: Tyr-153 (Tirosina), Thr-156 (Treonina), Lys-69 (Lisina), Arg-72 (Arginina), para epigallocatequina y epicatequina con valores de energía de interacción de -7,2 y -6,72 kcal/mol, respectivamente; por su parte compuestos como el dímero de procianidina B3 interactuaron con aminoácidos como: Asp-86 (Ácido aspártico), Asn-87 (Asparagina), y Ala-71 (Alanina) con una energía de interacción de -6,78 kcal/mol (**Figura 5**). Al analizar el rango de resultados para las 10 conformaciones posibles de cada compuesto, a partir de la media para la energía de interacción mínima y máxima, compuestos como resveratrol, luteolina, kaempferol, epicatequina y catequina, presentaron valores entre -4,78 y -6,3 (media = 5,54 y desviación estándar = 0,759), que podría significar una mayor probabilidad de éxito, dada la menor dispersión entre las 10 soluciones candidatas del acoplamiento (**Figura 8**). En términos generales los 30 compuestos reportaron mejores puntajes

de interacción con 16 aminoácidos de GyrA, entre los cuales Arg-72, Lys-69, Thr-156 y Tyr-153, fueron los más repetidos en los diferentes complejos de interacción (**Figura 6**).

a)



b)



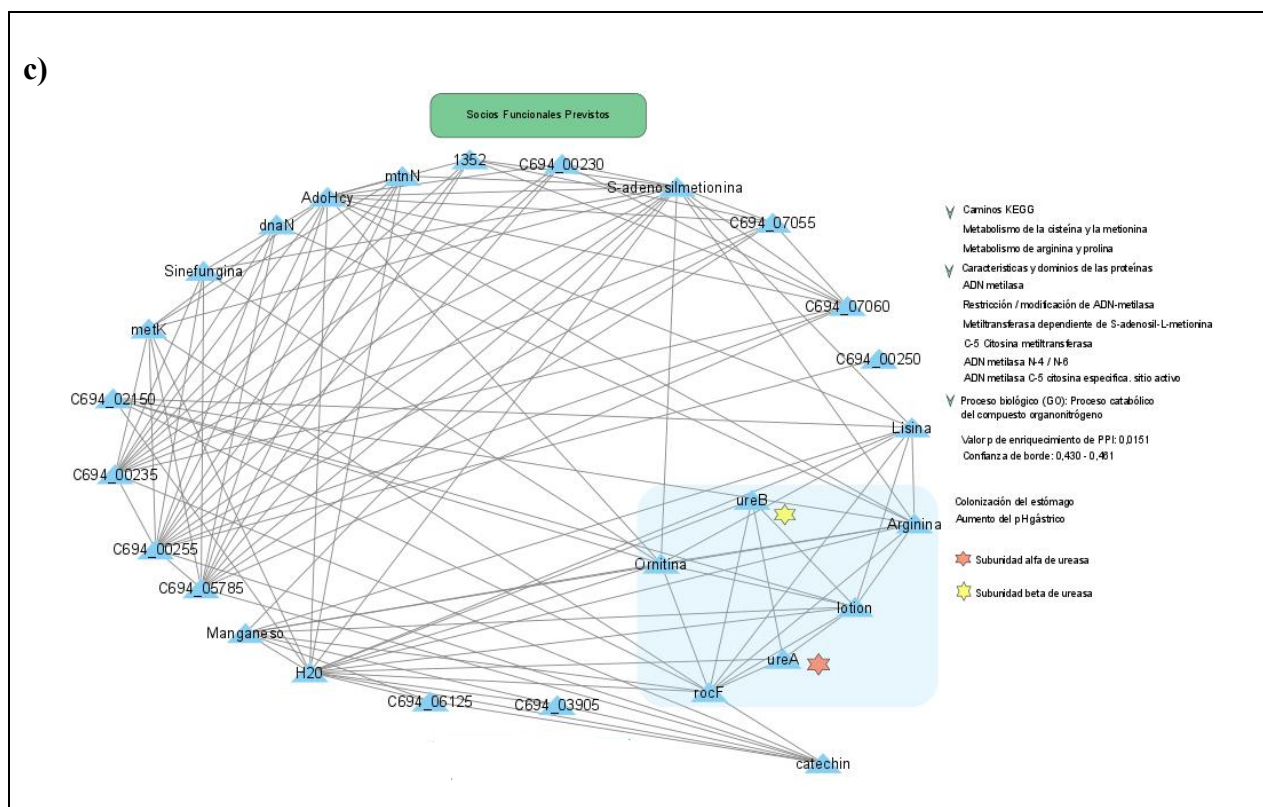


Figura 4. Interacciones previstas entre polifenoles y proteínas de *Helicobacter Pylori*. a) Vista de red de interacción entre la procianidina B2 y la ADN girasa de *H. pylori*: Los nodos de la red muestran al compuesto polifenólico, la subunidad GyrA y GyrB de la bacteria y los socios funcionales previstos. Las interacciones esperadas para el complejo de interacción polifenol – proteína son significativas con un p valor de 0,0075, además obtuvo una puntuación de confianza de 0,564, de acuerdo al tipo de fuentes que aportan información (Redes de interacción, experimentos, bases de datos, coexpresión y extracción de texto). b) Vista de red de interacción entre la catequina y proteínas en *H. pylori*: Las interacciones esperadas para el complejo de interacción polifenol – proteína son significativas con un p valor de 0,0151, además obtuvo una puntuación de confianza de 0,461. c) Vista de red de interacción de quercetina, apigenina, kaempferol, rutina, ácido ferúlico y vainillina con proteínas en *H. pylori*. Las interacciones esperadas para el complejo de interacción polifenol – proteína son significativas con un p valor de 0,0274, además obtuvo una puntuación de confianza entre 0,840 – 0,968. Fuente esta investigación.

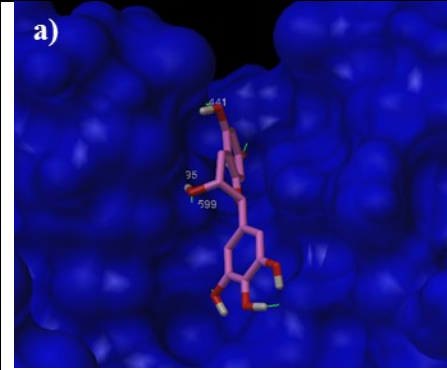
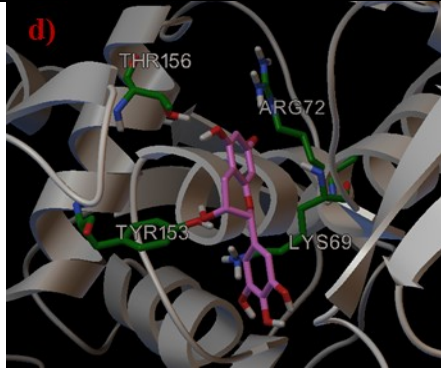
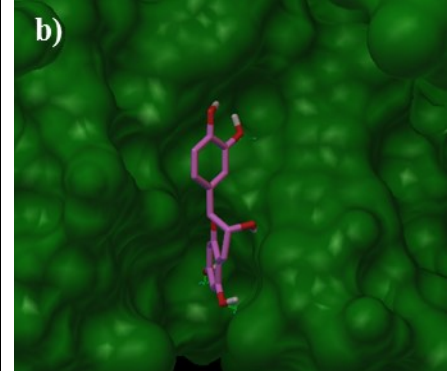
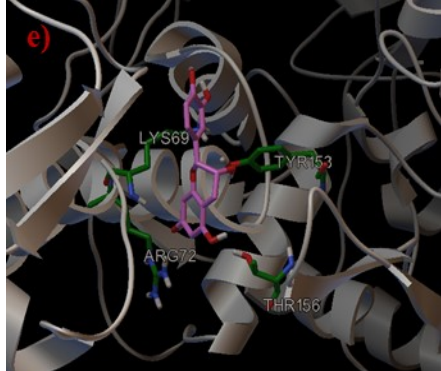
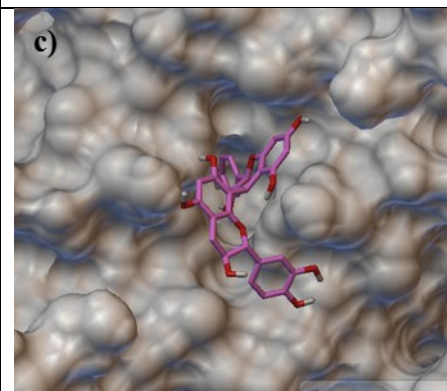
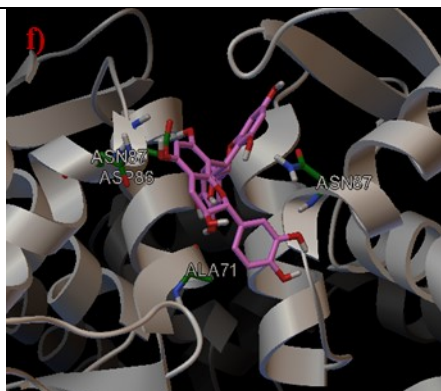
		Complejo Epigallocatequina- GyrA de <i>H. pylori</i> Afinidad de unión: -7,2 kcal/mol
		Complejo Epicatequina-GyrA de <i>H. pylori</i> Afinidad de unión: -6,72 kcal/mol
		Complejo Procianidina B3-GyrA de <i>H. pylori</i> Afinidad de unión: -6,78 kcal/mol

Figura 5. Resultados y patrones de acoplamiento molecular para GyrA de *Helicobacter pylori* y los compuestos polifenolicos. Se muestran complejos de interacción polifenol-proteína para los compuestos que exhibieron valores de interacción más estables (Epigallocatequina, Epicatequina y Procianidina B3). Donde, **a, b y c)** Interfaz proteína-ligando; los compuestos se presentan en forma de tubos, mientras que GyrA es mostrada en un modelo de superficie y **d, e y f)** Polifenoles y aminoácidos interactuantes de la ADN Girasa dispuesta en un modelo de cintas. Fuente esta investigación

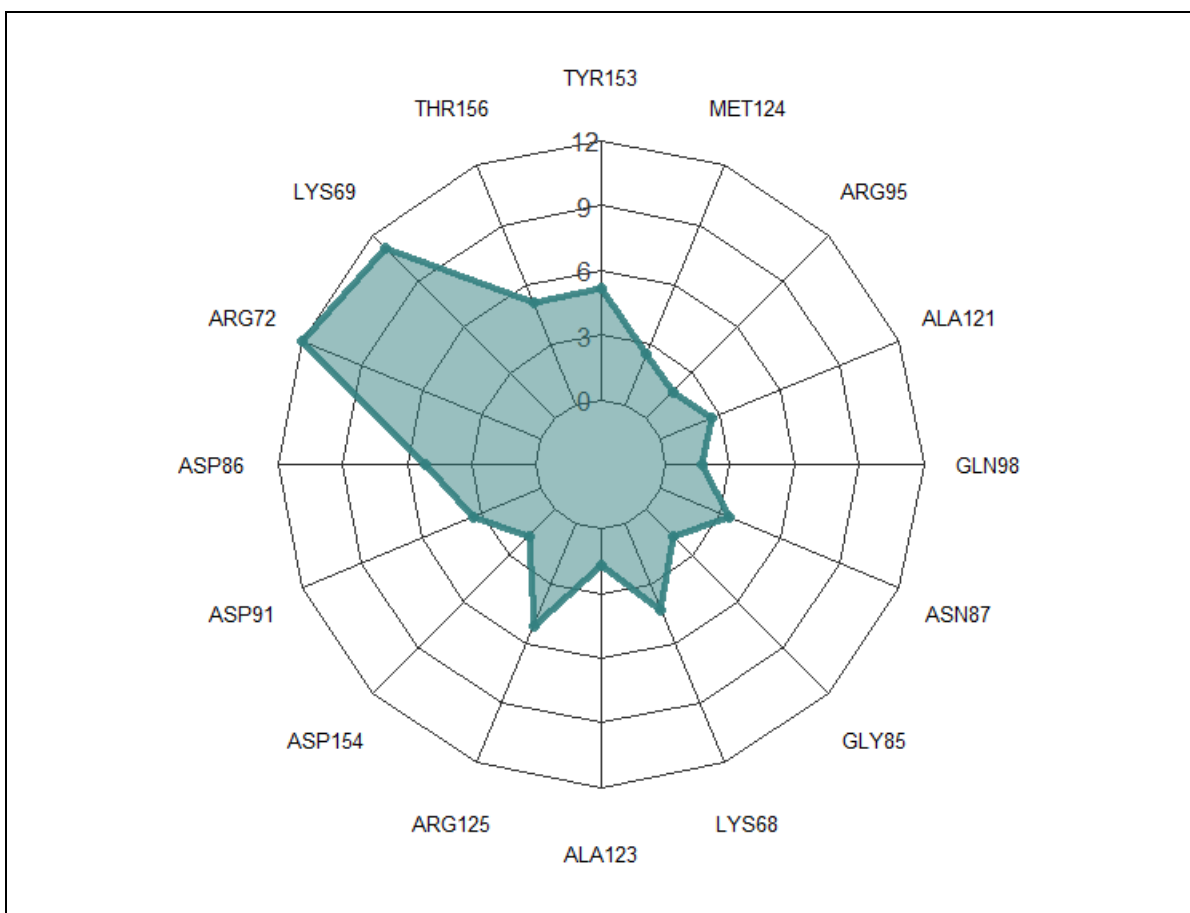


Figura 6. Aminoácidos interactuantes en GyrA de *Helicobacter pylori* para los compuestos polifenólicos. Se muestran los aminoácidos en relación al número de polifenoles en los cuales se reportó su interacción en el complejo de interacción; la escala de valores exhibe su recurrencia los acoplamientos. Donde, TYR (Tirosina), MET (Metionina), ARG (Arginina), ALA (Alanina), GLN (Glutamina), ASN (Asparagina), GLY (Glicina), LYS (Lisina), ASP (Acido aspártico) y THR (Treonina). Fuente esta investigación.

5.4 Relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR)

La relación estructura-actividad (SAR) de los 30 polifenoles, se estableció utilizando como variable dependiente la energía de interacción (kcal/mol), correspondiente al mejor valor de actividad frente a GyrA de *Helicobacter pylori*. Para las variables independientes el programa permitió calcular 196 descriptores (**Anexo 2**), de los cuales 8 se emplearon para la predicción de la energía de interacción: Weta2.unity, Weta3.unity, MDEC.22, Khs.do, VC.6, FNSA.1, FNSA.2, GRAV.6 (**Figura 9 – Anexo 4 y 5**). El modelo desarrollado mostró una capacidad predictiva y descriptiva aceptable representada por los parámetros estadísticos de coeficiente de

correlación $r^2 = 0,8558$, coeficiente de correlación ajustado $R^2 = 0,767$ y el coeficiente de regresión de validación cruzada $q^2 = 0,64$; proporcionando las métricas de rendimiento una descripción adecuada para la mayoría de los polifenoles, aunque se puede encontrar una diferencia relativamente grande entre algunos valores predichos y observados, explicada por la amplia diversidad en el conjunto de datos (4 clases polifenólicas) (Farkas, Jakus y Héberger, 2004) (**Figura 10 a-b**). No obstante q^2 no es del todo suficiente para validar la calidad predictiva del modelo, ya que el modelo no alcanza a ser validado externamente (Conjunto de prueba), por el tamaño pequeño del conjunto de datos disponible con valor de actividad. A partir del modelo se predijo el valor de la energía de interacción para 123 polifenoles con un promedio de -5,05 kcal/mol en un rango de -0,73 a -39,8 kcal/mol (**Figura 11 – Anexo 7**); entre los valores calculados, compuestos como Apigenina 7-O-apiosil-glúcósido y Luteolina 7-O- (2-apiosil-glúcósido), generaron valores más estables de afinidad de unión con -8,72 y -8,65 kcal/mol, respectivamente. Curiosamente el compuesto que exhibió una mayor energía de enlace fue el ácido carnósico perteneciente a los Terpenos fenólicos.

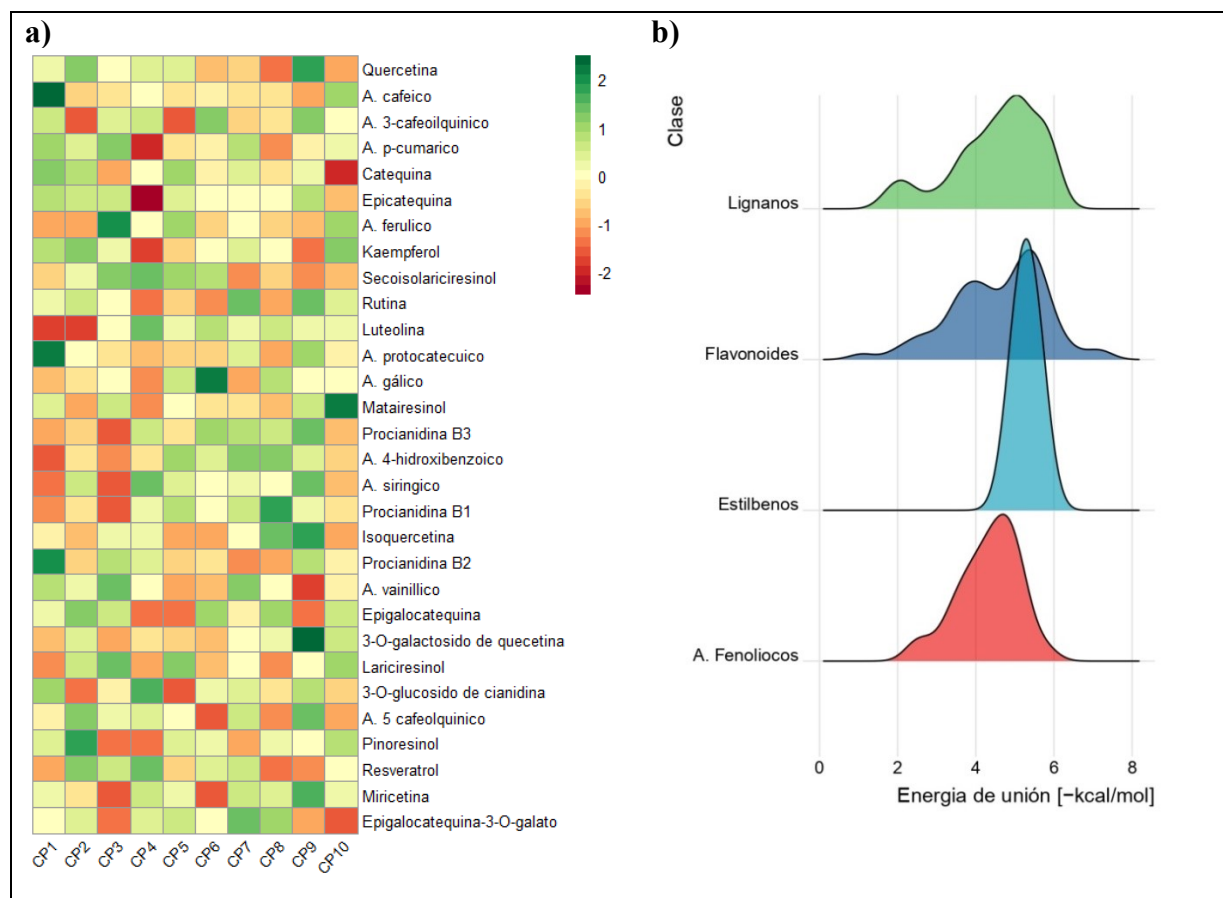


Figura 7: Resultados energía de interacción en el acoplamiento molecular entre GyrA de *Helicobacter pylori* y los polifenoles. a) Mapa de calor, el cuadro punteado muestra los perfiles de energía de interacción (kcal/mol), el código evidencia regiones con afinidad de unión que van desde baja (verde) a alta (rojo) entre las 10 mejores conformaciones de acoplamiento posibles de cada compuesto (CP) y donde los datos se escalaron en función de las filas. b) Rango de distribución de valores de energía de interacción discriminados en clases polifenólicas (Flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos); se utilizaron los resultados de las 300 conformaciones posibles, obtenidas para los 30 compuestos con mayor recurrencia entre las especies analizadas. Las escalas se muestran en valores absolutos (kcal/mol). Fuente esta investigación.

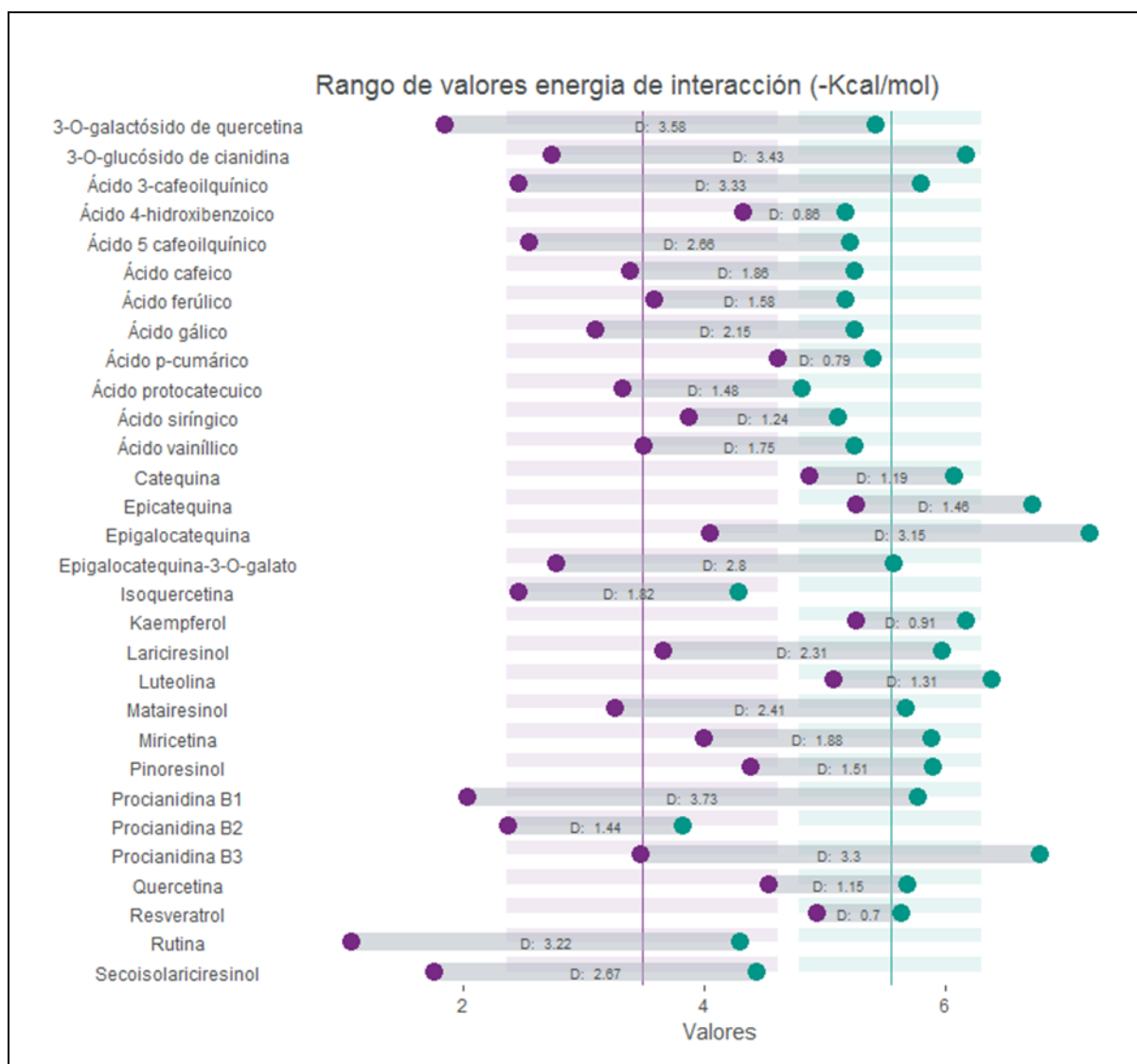


Figura 8: Rangos de valores para la energía de interacción en el acoplamiento molecular entre GyrA de *Helicobacter pylori* y los polifenoles. Se muestran los valores mínimos y máximos (K cal/mol) de cada compuesto, donde se resalta la diferencia (D) entre las conformaciones polifenol-GyrA de menor y mayor estabilidad de unión; las líneas verticales muestran la media entre los 30 compuestos y las zonas coloreadas la desviación estándar. El código base del software R para la construcción de la figura, se extrajo de Stalder y Holtz, (2021). Fuente esta investigación.

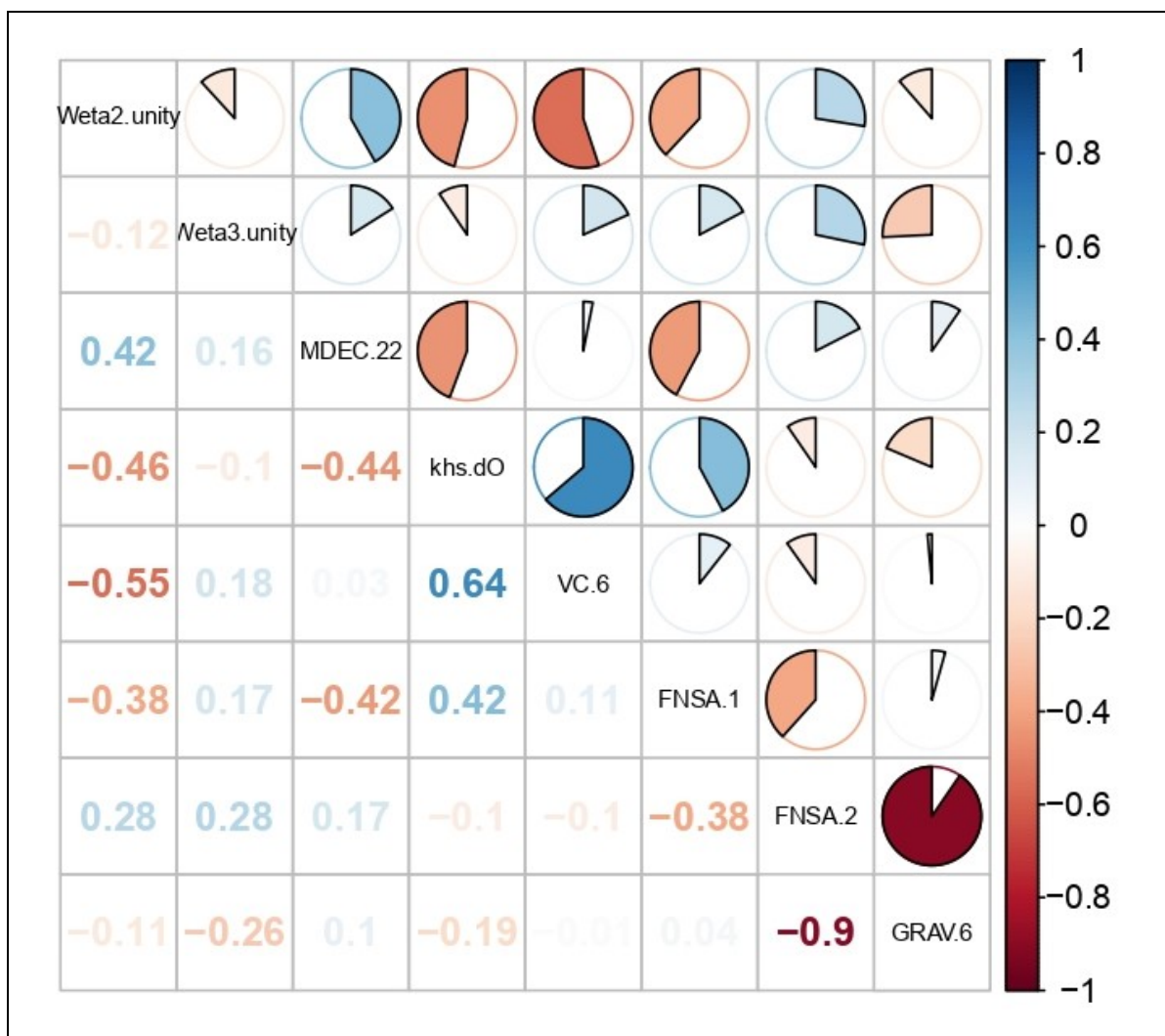


Figura 9: Matriz de correlación de los descriptores moleculares usados en el modelo QSAR. Se muestra el coeficiente de correlación de Pearson para los 8 descriptores moleculares empleados para la predicción de la energía de interacción: Weta2.unify, Weta3.unify, MDEC.22, Khs.do, VC.6, FNSA.1, FNSA.2, GRAV.6. Fuente esta investigación.

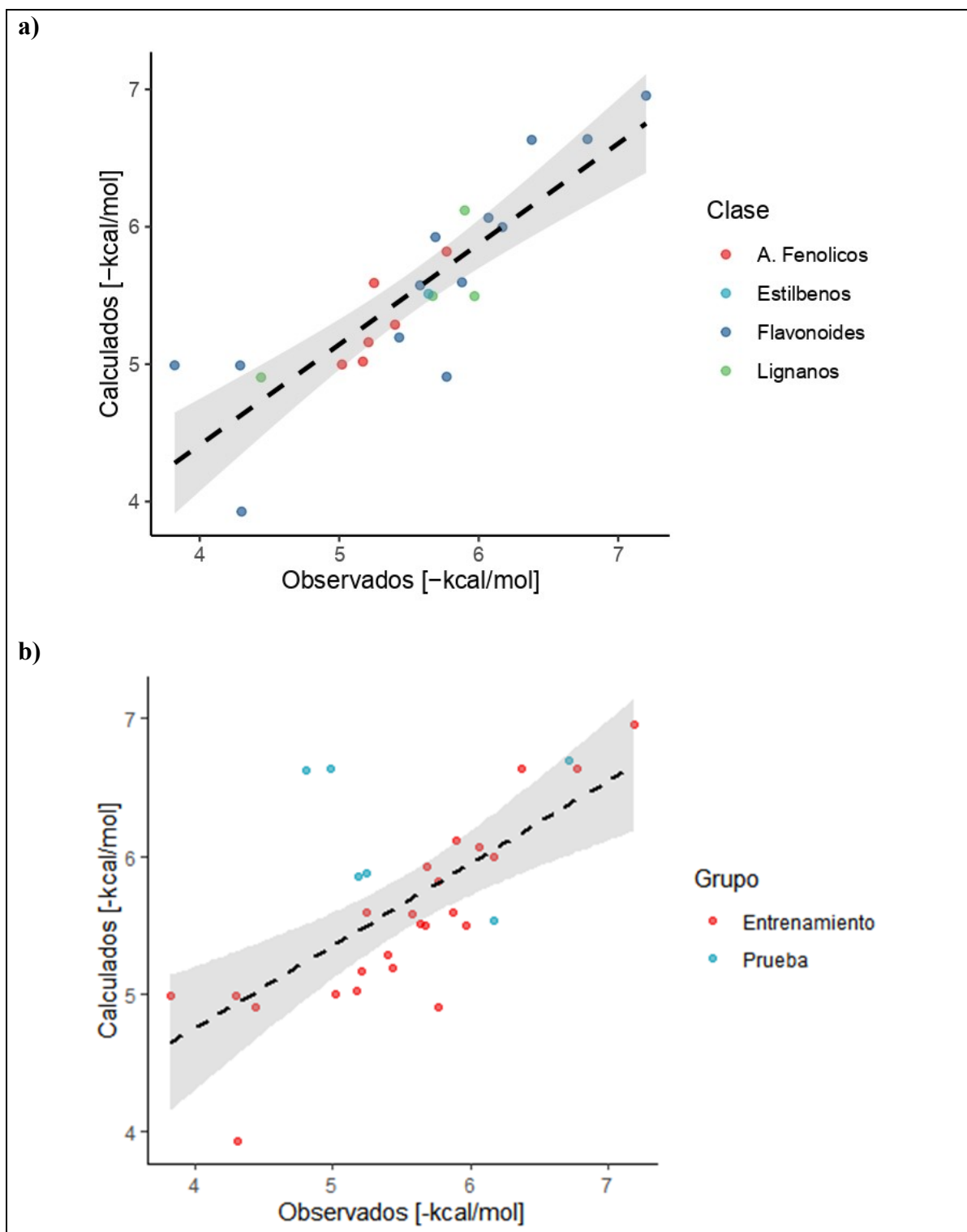


Figura 10. Correlación de la actividad calculada y observada. a) La actividad se expresa como la energía de interacción (kcal/mol) entre los compuestos y GyrA de *H. pylori*; la series de colores indica la clase polifenólica (Flavonoides, Ácidos fenólicos, Estilbenos y Lignanos), la línea recta ajustada a un coeficiente de regresión $R^2 = 0,767$ y el area gris corresponde a los

residuales explicados como la diferencia de los valores observados y los calculados para cada polifenol. b) La actividad se expresa como la energía de interacción (kcal/mol) entre los compuestos y GyrA de *H. pylori*; la series de colores indica el grupo al que pertenecen los datos (Entrenamiento – Prueba). Fuente esta investigación.

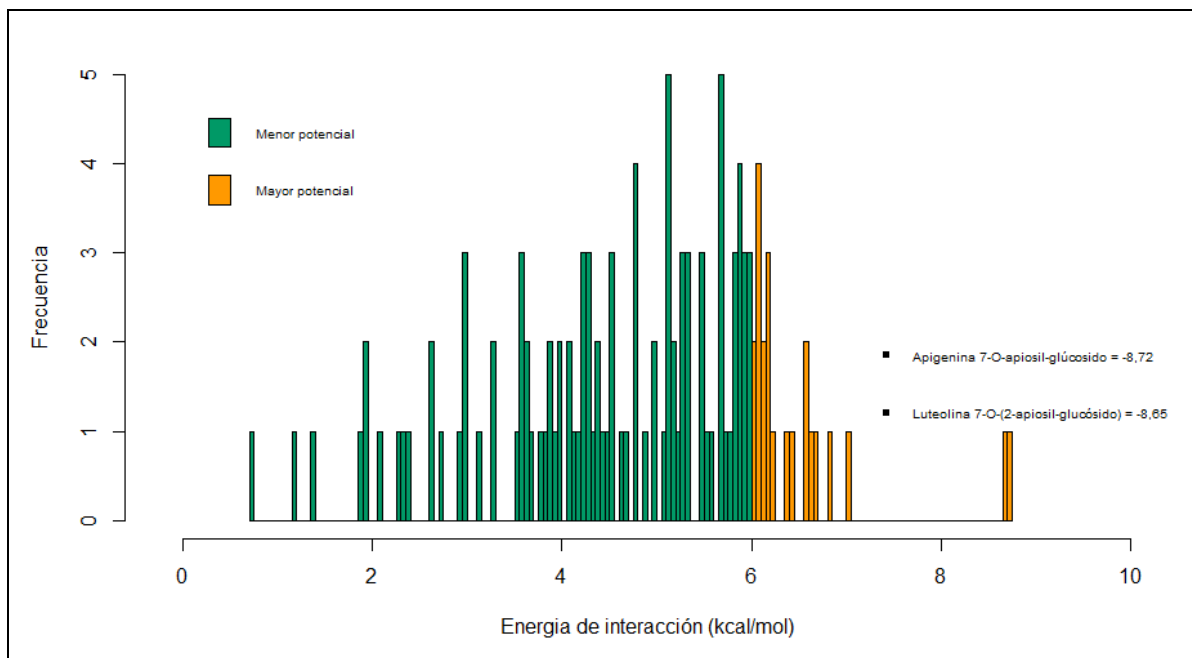
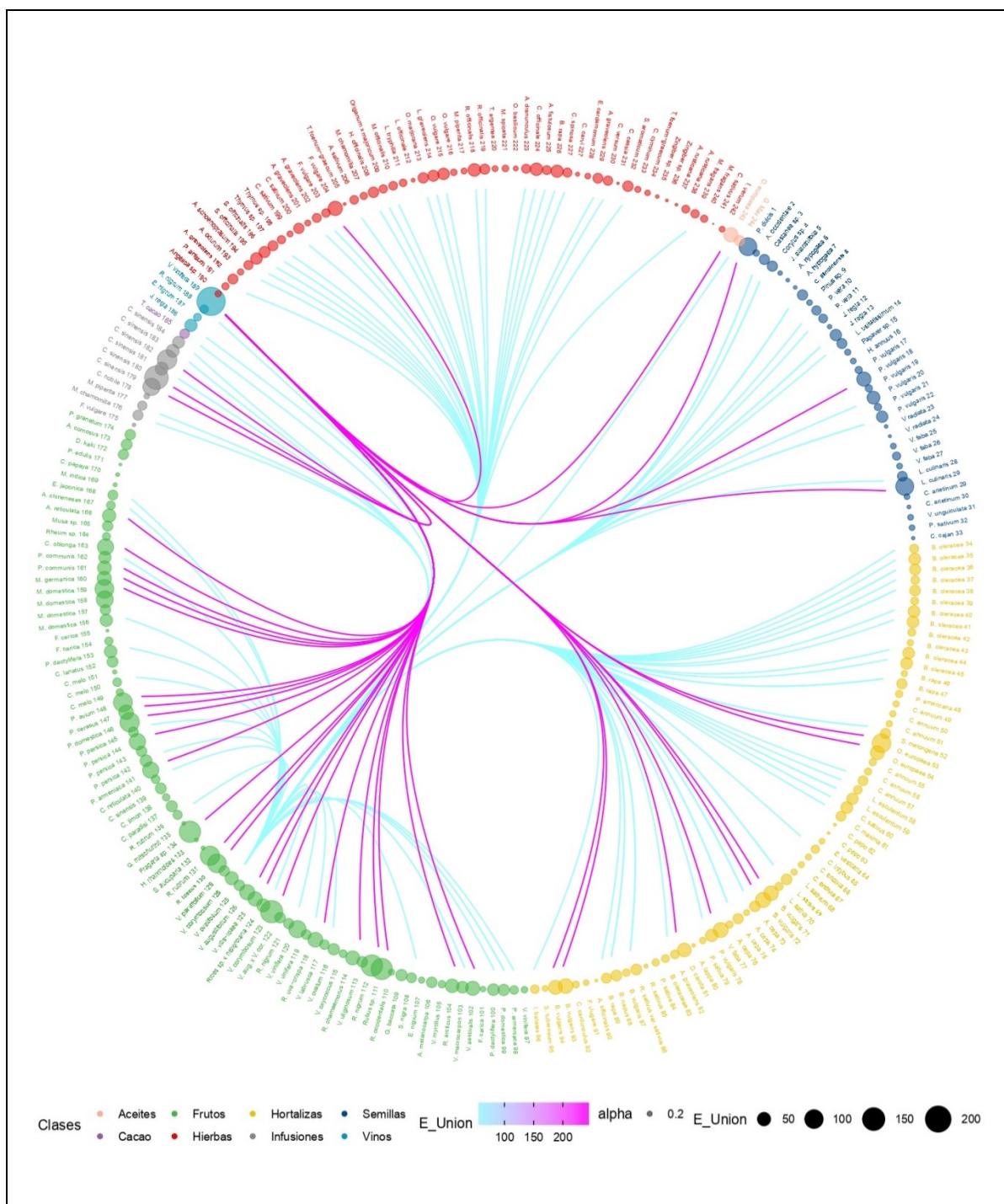


Figura 11. Energía de interacción predicha entre los polifenoles y GyrA de *Helicobacter pylori*. Gráfico de dispersión para los valores de energía de unión (kcal/mol) para 123 compuestos; el eje (y) muestra la frecuencia de los valores; además se destaca a los compuestos Apigenina 7-O-apiosil-glucósido y Luteolina 7-O-(2-apiosil-glucósido), con resultados más estables de afinidad de unión con -8,72 y -8,65 kcal/mol. Fuente esta investigación.

5.5 Exploración del potencial anti- *H. pylori* de los extractos botánicos

La exploración de los diversos extractos botánicos (especies) anti-*H. pylori*, mostró una expansión del potencial a especies que aún no se les ha realizado un estudio *in vitro* de acción bactericida, esto se logró con el cálculo de los valores de actividad observados y esperados (energía de unión) sobre GyrA en los polifenoles presentes en una especie vegetal, representando la posible superposición de funcionalidades, a pesar de su variación interespecífica en la composición. Se encontró 38 extractos botánicos con mayor probabilidad de éxito anti-*H. pylori*, donde su composición polifenolica obtuvo altos valores de energía de interacción; no obstante existe un gran número de extractos, que pueden estar siendo infravalorados, debido a la extracción e identificación incompleta de sus compuestos interactuantes. Entre todos los

extractos analizados, los obtenidos de frutos, hortalizas (vegetales), mostraron un amplio número de especies con mayor potencial de investigación, así mismo, compuestos polifenolicos asociados vinos y aceites, a pesar del menor número de reportes, debido a la presencia de flavonoides y estilbenos (**Figura 12 a- b**).



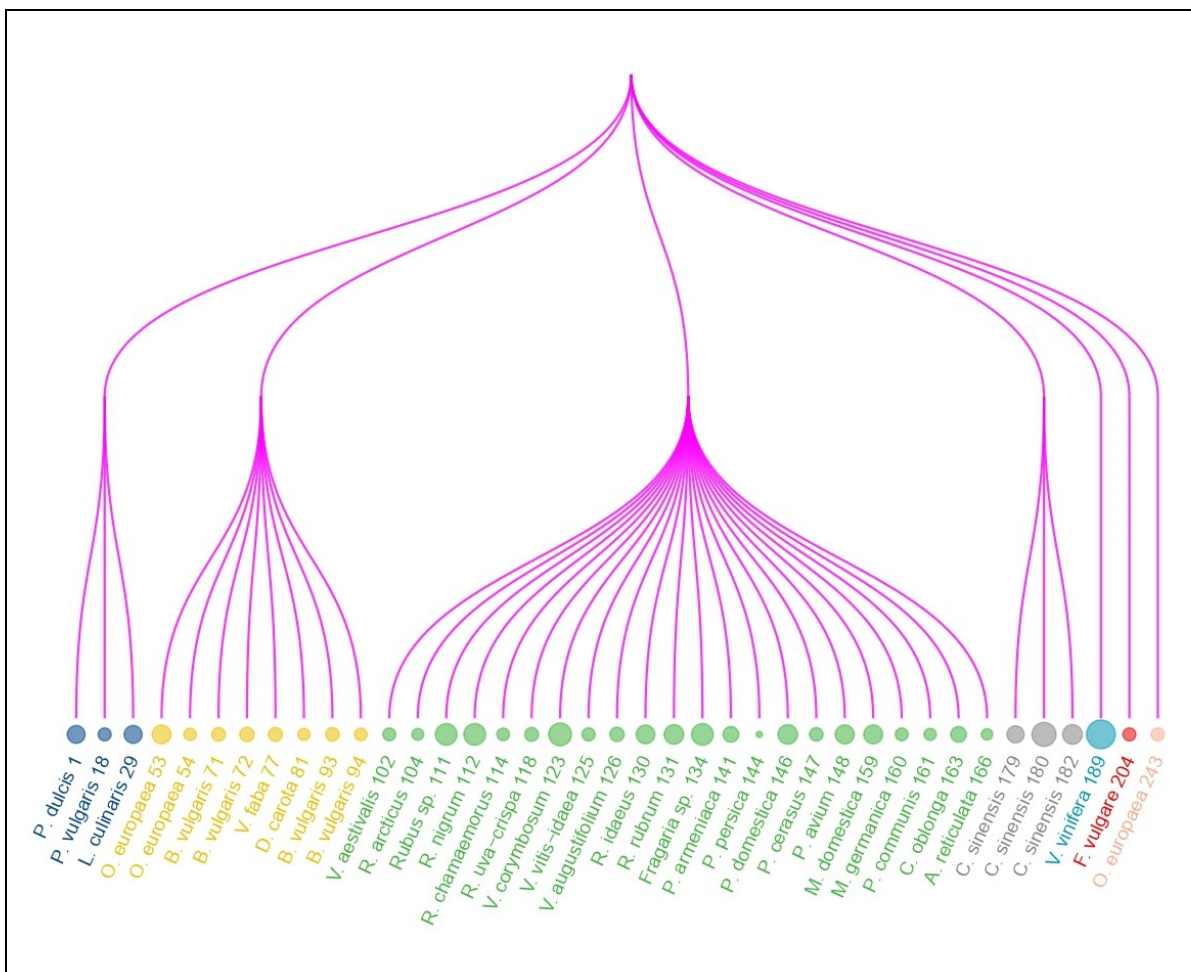


Figura 12: Exploración del potencial anti-*Helicobacter pylori* de los extractos botánicos. a) Agrupación de bordes jerárquica para visualizar las relaciones de adyacencia entre los extractos botánicos con mayor potencial de éxito, las conexiones unen a las especies con composición polifenólica de mayor valor de energía de interacción con GyrA (>potencial = color violeta, <potencial = color azul). El tamaño de los puntos en los bordes aumenta en función de su valor de energía de interacción y se agrupan de acuerdo a su categoría (Frutos, hierbas, hortalizas, Infusiones, semillas, vinos, aceites, cacao). b) Subconjunto de datos extraído del gráfico de agrupación de bordes jerárquica completo, para subrayar los extractos de mayor potencial. Fuente esta investigación.

6. DISCUSION

En ausencia de una vacuna eficaz contra *H. pylori*, se necesitan mayores esfuerzos para establecer nuevas estrategias de tratamiento, adaptadas a la aparición y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos (Malfertheiner *et al.*, 2017). Esto ha posicionado la búsqueda de compuestos naturales como una posible alternativa con mejores resultados clínicos, tolerancia y aceptación entre los pacientes; estableciéndose como una fuente masiva de compuestos bioactivos pero aun poco explorada para la industria farmacéutica (Górniak *et al.*, 2019).

La investigación de la acción bactericida de los polifenoles es prolífica, faltando aún por conocer sus mecanismos acción y los extractos vegetales con mayor probabilidad de éxito terapéutico. Familias como Vitaceae, Theaceae, Grossulariaceae, Rosaceae y Oleaceae, muestran una mayor riqueza de especies con reporte de composición, puesto que la recopilación de datos se presenta en función de los extractos botánicos más estudiados, como las principales fuentes dietéticas para los seres humanos (Neveu *et al.*, 2010). Las diferencias en la composición polifenólica en su mayoría provienen de características inherentes a la especie o variedad de la planta; no obstante, la falta de estandarización de los métodos analíticos, como el tipo solvente de extracción, hacen que los valores de contenido polifenólico a menudo sean difíciles de comparar (Neveu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2020).

El 65% de representatividad explicada por los polifenoles recuperados de la base de datos, mostró una desviación significativa entre la riqueza polifenólica observada y esperada, dada la alta tasa de compuestos de baja recurrencia entre especies; siendo esto una tendencia que se ajusta a los grupos “hiperdiversos”, llevando a identificar en el reino vegetal más de 8.000 polifenoles (Cory *et al.*, 2018; Crozier *et al.*, 2006). La superposición de los compuestos menos detectados sobre los más recurrentes, es consecuencia de pertenecer a una de las clases más grandes de metabolitos secundarios, que en parte se sintetizan en respuesta a las infecciones microbianas, por lo cual son antibacterianos prometedores, capaces de dirigirse selectivamente a las células bacterianas, revertir la resistencia a los antibióticos y mejorar su acción (Górniak *et al.*, 2019).

Para acceder a este potencial sin explorar, se presentó un flujo de trabajo computacional para seleccionar sistemáticamente las especies con mayor capacidad de inhibición de GyrA de *H. Pylori*. En el área de los antibióticos el cribado dirigido al objetivo (enzima) como herramienta para descubrir nuevas moléculas biológicamente activas ha sido muy productivo y juega un papel crucial en los resultados finales; el requisito principal es el acceso a una gran cantidad de compuestos/extractos que deben ser bien seleccionados, además del conocimiento de sus interacciones moleculares con las proteínas, que aún es un campo muy limitado (Lacroix *et al.*, 2018; Perumal Samy y Gopalakrishnakone, 2010).

Los polifenoles podrían llegar a ser agentes antibacterianos con un amplio espectro de acción frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluida la actividad frente a *H. pylori* (Rempe *et al.*, 2017). La participación de la ADN girasa en el control de las transiciones topológicas del ADN, la hace un importante objetivo farmacológico, donde las interacciones estables encontradas con algunos polifenoles en el análisis de acoplamiento molecular, convierte a estos compuestos en posibles coadyuvantes para antibióticos como las quinolonas, utilizadas en la erradicación de la infección por *H. pylori*, con una prevalencia de resistencia en aumento (Dorman y Dorman, 2016; Kasahun *et al.*, 2020; Rispo *et al.*, 2014).

Considerar a los polifenoles como una nueva estrategia de tratamiento es una idea prometedora, dado que la resistencia de *H. pylori* a las quinolonas es causada por una mutación puntual de GyrA, en los aminoácidos 87 (Asn a Lys) y 91 (Asp a Gly, Asp a Asn o Asp a Tyr) (Moore *et al.*, 1995; Rispo *et al.*, 2014). En este estudio se encontró interacciones hidrofóbicas con aminoácidos como: Tyr-153, Thr-156, Lys-69 y Arg-72 y Asp-86, Asn-87 y Ala-71 en compuestos como las proantocianidinas, cercanas al sitio activo Tyr 126 de GyrA. Para el complejo Procianidina B3-GyrA de *H. pylori* y tres compuestos más, la interacción con el aminoácido Asn 87, hace parte de un sitio puntual de mutación, donde Rhie *et al.*, 2020, encontraron resistencia a las fluoroquinolonas en 15 cepas de *H. pylori*; en adición los mismos reportaron una nueva mutación en Gly-85 por Cys, que pueden visualizar un menor potencial para los polifenoles que involucren interacciones con este sitio.

Las interacciones de algunos polifenoles con residuos de aminoácidos Asn-87 y Gly-85, con presencia de mutación puntual en cepas de *H. pylori*, disminuye la viabilidad en su posible uso sobre *gyrA* como diana farmacológica; puesto que la eficacia de los compuestos inhibitorios depende del grado de interacción con la proteína objetivo, si se entiende al nivel de mutación como una herramienta para seleccionar racionalmente los nuevos mecanismos de acción. La presencia de Asn-87 y Gly-85 en los complejos de interacción disminuye teóricamente su potencial, ya que autores como Rispo *et al.*, 2014, informaron en su revisión que la resistencia primaria a antibióticos como la levofloxacin, se encuentra en cerca del 15% de las cepas de *H. pylori* evaluadas y esta altamente relacionada con mutaciones puntuales para Asn-87 o Asp-91. En este sentido, la presión de selección relacionada con tratamientos a base de quinolonas con acción sobre la ADN girasa, promueve el desarrollo de resistencia cruzada frente a los polifenoles si llegaran a compartir el mismo mecanismo de acción; además de convertirse en una posible limitación para la implementación en pacientes con antecedentes de tratamientos que contengan quinolonas. Paralelamente en esta línea de investigación se hace necesario estimar el efecto de la tasa de mutación espontánea sobre la susceptibilidad de *H. pylori* a los polifenoles, puesto que esta bacteria tiene una alta tasa de mutación (Haley y Gaddy, 2015; Linz *et al.*, 2014).

La presencia de la ADN girasa solo en procariotas la convierte en un objetivo atractivo para varios antimicrobianos. En este estudio algunos polifenoles exhibieron puntajes de acoplamiento óptimos, con un máximo de -7,2 kcal/mol para el complejo epigallocatequina-GyrA de *H. pylori*, cercano a lo obtenido por Suriyanarayanan *et al.*, 2013, quienes realizaron estudios de acoplamiento para determinar la afinidad de interacción de la quercetina con la subunidad B de la ADN girasa (GyrB) de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, con un valor de -7,9 kcal/mol. Sin embargo, los valores se encuentran en su mayoría por debajo de lo reportado por Ostrov *et al.*, 2007, los cuales identificaron nuevas moléculas con acción antimicrobiana, a partir de análisis de acoplamiento entre GyrA de *E. coli* y una base de datos de 140.000 moléculas pequeñas, donde los diez mejores resultados se presentaron en un rango de -7,01 a -15,68 kcal/mol, evidenciando así la complejidad para encontrar compuestos con potencial.

Entre los 30 compuestos acoplados a GyrA de *H. pylori*, los flavonoides pertenecientes a los flavanoles como epigallocatequina, epicatequina y procianidina B3, generaron los mejores

puntajes de acoplamiento. Estos resultados apoyan las líneas de investigación que han determinado a las catequinas y principalmente la epigallocatequina como compuestos de gran capacidad de interacción frente a proteínas relacionadas con cancer, enfermedades neurodegenerativas e infecciosas (Nakano *et al.*, 2018); lo cual se asocia con lo obtenido en estudios *in vitro* e *in vivo* por Mabe *et al.*, 1999, quienes evaluaron la acción de 6 catequinas, siendo epigallocatequina el compuesto con mayor actividad inhibitoria de *H. pylori* con una CMI de 8 µg/ml para el 50% de las cepas, además de erradicar la infección en jerbos de Mongolia en 10 a 36% de los animales tratados.

Con la determinación de la energía de interacción para los compuestos más recurrentes entre las especies, el modelo QSAR permitió la predicción de los valores de actividad para los polifenoles restantes, como una alternativa a la evaluación experimental (Dearden *et al.*, 2009). El modelo desarrollado mostró una capacidad predictiva aceptable, encontrando entre los valores calculados, compuestos como Apigenina 7-O-apiosil-glucósido y Luteolina 7-O- (2-apiosil-glucósido) con una mayor estabilidad en la afinidad de interacción con -8,72 y -8,65 kcal/mol, respectivamente; lo que concuerda con los resultados de Pereira *et al.*, 2007, donde los derivados de apigenina y luteolina junto con otros polifenoles del extracto de *Olea europea*, mostraron un alto potencial antimicrobiano, dada su acción combinada sobre infecciones del tracto respiratorio e intestinal humano con bacterias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*), Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y la actividad antifúngica (*Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*).

La apigenina como uno de los flavonoides más comunes en familias como Apiaceae, Theaceae y otras, es uno de los polifenoles más investigados, es así que en el estudio de Morimoto *et al.*, 2015, se probaron varias flavonas contra cepas de *S. aureus* resistentes a las quinolonas, entre las cuales la apigenina fue el inhibidor más potente, con un notable efecto en la ADN girasa que alberga la mutación de la posición (Ser84 – Leu); haciendo razonable el uso de los derivados de apigenina para el tratamiento anti-*H. pylori*. Por su parte, para el compuesto luteolina Guo *et al.*, 2020, concluyeron una actividad antibacteriana por medio de múltiples mecanismos contra *Trueperella pyogenes*, como el daño a la integridad de la pared y la membrana celular, el efecto

en la expresión de proteínas, la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y la interferencia con el metabolismo energético.

El amplio rango de valores predichos de energía de interacción para los 123 polifenoles de mayor recurrencia entre especies, apoya lo encontrado en otros modelos QSAR, como el de Bouarab-Chibane *et al.*, 2019, donde la acción de 35 polifenoles en bacterias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *Salmonella Enteritidis*) y Gram positivas (*S. aureus*, *B. subtilis* y *Listeria monocytogenes*) fue muy heterogénea. Esto demuestra que los polifenoles totales juegan un rol destacado en su actividad biológica, de acuerdo a la relación dosis – efecto; pero las actividades antibacterianas parecen estar más influenciadas por el tipo de compuesto (Zhang *et al.*, 2020), siendo así promisoría la exploración de la actividad anti-*H. pylori* de diversa especies vegetales.

Especies como *Vitis vinífera*, *O. europea*, *Rubus sp*, *Ribes nigrum*, *Vaccinium corymbosum*, *Rubus idaeus*, *Ribes rubrum*, *Fragaria sp*, *Prunus domestica*, *Prunus avium*, *Malus domestica*, *Camellia sinensis*, *Prunus dulcis*, agrupadas en las familias Vitaceae, Rosaceae, Olaceae, Theaceae, Grossulariaceae exhibieron una mayor probabilidad de éxito en estudios *in vitro* e *in vivo* de acción anti-*H.pylori*. Los resultados se correlacionan positivamente con lo informado por Brown *et al.*, 2009, en extractos de uva con rangos de CMI de 256 a 1024 µg /ml. Lin *et al.*, 2005, utilizaron una combinación de extractos de *Vaccinium macrocarpon* (Rosaceae) y *Origanum vulgare*, con una importante actividad antimicrobiana a nivel individual, que se potencio sinérgicamente en una mezcla (75/25, respectivamente).

La estimación de la viabilidad de los extractos botánicos es de vital importancia para desarrollar futuros estudios que evalúen su actividad antimicrobiana. No obstante, es necesario entender que el amplio espacio químico ocupado por los polifenoles, se ve representado en su actividad, con la existencia de algunas interacciones antagónicas y sinérgicas, que afectan su efecto biológico y aún se desconocen (Zhang *et al.*, 2020). Aunque los métodos y propósitos para los cuales se reporta el contenido polifenólico varía, en este estudio se ha producido una gran cantidad de datos comparables; Sin embargo, es prudente informar el posible sesgo por las posibles interferencias en muestras particulares, que necesitan aún profundizar en su estudio previo, para conducir a resultados más informativos.

7. CONCLUSIONES

El análisis de acoplamiento indicó una afinidad de unión estable entre algunos polifenoles epigallocatequina, epicatequina, procianidina B3 y otros, que pueden convertirse en un subconjunto con mayores probabilidades de éxito para estudios de inhibición.

Los compuestos acoplados con GyrA y la energía libre de unión, mostraron que las principales contribuciones procedían de 16 aminoácidos, entre los cuales Arg-72, Lys-69, Thr-156 y Tyr-153, fueron los más repetidos, permitiendo establecer un punto de partida para el posible desarrollo de nuevos inhibidores. No obstante, algunas conformaciones polifenoles-GyrA, presentaron interacción con residuos de aminoácidos Asn-87 y Gly-85, los cuales se ha probado están expuestos a mutación puntual en cepas de *H. pylori*.

Los resultados predichos a partir del análisis QSAR, mostraron a Apigenina 7-O-apiosil-glucósido y Luteolina 7-O-(2-apiosil-glucósido), como compuestos de mayor potencial para ser probados frente a la ADN girasa de *H. pylori*.

Se generó evidencia de acción de los polifenoles sobre la ADN Girasa, principalmente para 38 extractos vegetales, donde sus compuestos permiten inferir su posible potencial.

8. PERSPECTIVAS

Este estudio proporciona un impulso en el conocimiento para las futuras investigaciones sustentadas en el descubrimiento de polifenoles con acción antagónica sobre bacterias resistentes a los antibióticos, a partir de extractos naturales con un mayor potencial de éxito descrito en un estudio *in silico*.

La evaluación preliminar del efecto *in silico* de los polifenoles y extractos botánicos puede lograr importantes ahorros en términos de dinero y tiempo, durante los proyectos de evaluación de inhibidores potenciales *in vitro* e *in vivo*.

Se genera la base de un enfoque factible para el análisis y unión interdisciplinaria de la etnobotánica y ciencias como la farmacología o análisis “ómicos” requeridos, comenzando con la exploración de las interacciones entre los polifenoles y proteínas diana en las bacterias.

9. LIMITACIONES

El estudio se basa en datos de composición disponibles públicamente, limitando los datos a sus reportes, la literatura puede estar sesgada a un número de extractos botánicos y polifenoles con mayor esfuerzo de investigación.

El análisis de acoplamiento molecular al ser un método de cribado virtual, presenta un sesgo impredecible de la realidad, lo que puede dar lugar a una cierta desviación frente a los experimentos *in vitro/in vivo*. A pesar de que *H. pylori*, es una de las bacterias más estudiadas no existe aún la estructura cristalina de su ADN girasa, llevándonos a utilizar un modelo de homología, que puede presentar ciertas imprecisiones.

La falta de preparación en la optimización de estructuras químicas que normalmente son necesarias en este tipo de estudios; sumada a los problemas para decidir que descriptores moleculares deben utilizarse en el modelo QSAR en particular, necesitan abordarse con mayor conocimiento en el uso de técnicas computacionales y herramientas matemáticas/químicas en el programa de biología.

Este tipo de estudios requieren un gran esfuerzo computacional en su desarrollo, con herramientas y software difíciles de implementar en equipos “estándar”.

10. REFERENCIAS

- Arévalo, A., Otero, W., & Trespalacios, A. A. (2019). Helicobacter pylori: resistencia múltiple en pacientes de Bogotá, Colombia. *Biomédica*, 39(1), 125–134. <https://doi.org/https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4437>
- Bouarab-Chibane, L., Forquet, V., Lantéri, P., Clément, Y., Léonard-Akkari, L., Oulahal, N., Degraeve, P., & Bordes, C. (2019). Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative structure-activity relationship) models. *Frontiers in Microbiology*, 10(829), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00829>
- Bravo, L. E., Cortés, A., Carrascal, M. D. E., Jaramillo, R., García, L. S., Admon, Bravo, P. E., Badel, A., & Bravo, P. A. (2003). Helicobacter pylori: Patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colombia Médica*, 34(3), 124–131.
- Brown, J. C., Huang, G., Haley-zitlin, V., & Jiang, X. (2009). Antibacterial Effects of Grape Extracts on Helicobacter pylori □. *Applied and Enviromental Microbiology*, 75(3), 848–852. <https://doi.org/10.1128/AEM.01595-08>
- Chao, A., Chazdon, R. L., Colwell, R. K., & Shen, T.-J. (2005). A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology Letters*, 8, 148–159. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00707.x>
- Cherkasov, A., Muratov, E. N., Fourches, D., Varnek, A., Baskin, I. I., Cronin, M., Dearden, J., Gramatica, P., Martin, Y. C., Todeschini, R., Consonni, V., Kuz, V. E., Cramer, R., Benigni, R., Yang, C., Rathman, J., Ter, L., Gasteiger, J., Richard, A., & Tropsha, A. (2014). QSAR Modeling : Where Have You Been ? Where Are You Going To ? *Journal of Medicall Chemistry*, 57, 4977–5010. <https://doi.org/10.1021/jm4004285>
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Review Host-Microbe Interactions : Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, 124, 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>
- Correa, P., & Piazuolo, B. M. (2010). Cáncer gástrico: el enigma colombiano. *Revista Colombiana de Gastroenterologia*, 25(4), 334–337.
- Correia, S., Poeta, P., & Michel, H. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance : where do we stand ? *Journal of Medical Microbiology*, 66, 551–559. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000475>
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in

- Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- Cover, T. L., & Blaser, M. J. (2009). *Helicobacter pylori* in Health and Disease. *Gastroenterology*, 136(6), 1863–1873. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.073>
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2006). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*, 18(25), 1–24. <https://doi.org/10.1002/9780470988558.ch1>
- Damale, M. G., Patil, R. B., Ansari, S. A., Alkahtani, H. M., Almeshizia, A. A., Shinde, D. B., Arote, R., & Sangshetti, J. (2019). screening and molecular dynamics studies towards. *RSC Advances*, 9, 26176–26208. <https://doi.org/10.1039/C9RA03281A>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Dawood, M., Fatima, N., Mumtaz, A., Rehman, S., Shazadi, I., Mahmood, Q., & Muhammad, S. (2016). Molecular Docking Studies of Sesquiterpenoids against *Helicobacter pylori* Peptide Deformylase. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3), 1–7. <https://doi.org/10.9734/bjpr/2016/23792>
- Dearden, J. C., Cronin, M. T. D., & Kaiser, K. L. E. (2009). How not to develop a quantitative structure-activity or structure-property relationship (QSAR / QSPR). *Taylor & Francis*, 20, 241–266. <https://doi.org/10.1080/10629360902949567>
- Debraekeleer, A., & Remaut, H. (2018). Future perspective for potential *Helicobacter pylori* eradication therapies. *Future Microbiology*, 13(6), 671–687. <https://doi.org/https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0115>
- Díaz-Gómez, R., López-Solís, R., Obreque-Slier, E., & Toledo-Araya, H. (2013). Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.012>
- Dorman, C. J., & Dorman, M. J. (2016). DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. *Biophysical Reviews*, 8(1), 89–100. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0238-2>
- El-hachem, N., Haibe-kains, B., Khalil, A., Kobeissy, F. H., & Nemer, G. (2017). AutoDock and AutoDockTools for Protein-Ligand Docking: Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1(BACE1) as a Case Study. *Neuroproteomics Methods and Protocols*, 1598, 391–

403. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6952-4>

- Escandón, R. A., del Campo, M., López-Solis, R., Obrique-Slier, E., & Toledo, H. (2016). Antibacterial effect of kaempferol and (–)-epicatechin on *Helicobacter pylori*. *European Food Research and Technology*, 242(9), 1495–1502. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2650-z>
- Fang, Y., Lu, Y., Zang, X., Wu, T., Qi, X., Pan, S., & Xu, X. (2016). 3D-QSAR and docking studies of flavonoids as potent *Escherichia coli* inhibitors. *Nature Scientific Reports*, 6(23634), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep23634>
- Farkas, O., Jakus, J., & Héberger, K. (2004). Quantitative structure - Antioxidant activity relationships of flavonoid compounds. *Molecules*, 9(12), 1079–1088. <https://doi.org/10.3390/91201079>
- Figueroa, M., Cortés, A., Pazos, Á., & Bravo, L. E. (2012). Sensibilidad in vitro a amoxicilina y claritromicina de *helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomedica*, 32(1), 32–42.
- Fischer, W., Breithaupt, U., Kern, B., Smith, S. I., Spicher, C., & Haas, R. (2014). A comprehensive analysis of *Helicobacter pylori* plasticity zones reveals that they are integrating conjugative elements with intermediate integration specificity. *BMC Genomics*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-310>
- Gatta, L., Zullo, A., Perna, F., Ricci, C., De Francesco, V., Tampieri, A., Bernabucci, V., Cavina, M., Hassan, C., Ierardi, E., Morini, S., & Vaira, D. (2005). A 10-day levofloxacin-based triple therapy in patients who have failed two eradication courses. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 22(1), 45–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02522.x>
- Goode-Romero, G., Aguayo-Ortiza, R., & Dominguez Dueñas, L. (2019). Relaciones cuantitativas estructura-actividad/propiedad en dos dimensiones empleando el programa R. *Educación Química*, 30(2), 27–40. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2019.2.67211>
- Górniak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), 241–272. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>
- Graham, D. Y., & Shiotani, A. (2012). Which therapy for *helicobacter pylori* infection? *Gastroenterology*, 143(1), 10–12. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.05.012>

- Guo, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Chen, M., Zhang, D., Tian, C., Liu, M., & Jiang, G. (2020). The antibacterial activity and mechanism of action of luteolin against *trueperella pyogenes*. *Infection and Drug Resistance*, *13*, 1697–1711. <https://doi.org/10.2147/IDR.S253363>
- Haley, K. P., & Gaddy, J. A. (2015). *Helicobacter pylori*: Genomic insight into the host-pathogen interaction. *International Journal of Genomics*, *2015*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/386905>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, *4*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- Hollman, P. C. H., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., Serafini, M., Scalbert, A., Sies, H., & Vidry, S. (2011). The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *The Journal of Nutrition*, *141*(5), 989–1009. <https://doi.org/10.3945/jn.110.131490>
- Holtz, Y. (2021): R graph gallery. Access: <https://www.r-graph-gallery.com/index.html>. Date: 20-02-2022.
- Hooi, J. K. Y., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M. Y., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D. Y., Wong, V. W. S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*, *153*, 420–429. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., & Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Jackson, L. K., Potter, B., Schneider, S., Fitzgibbon, M., Blair, K., Farah, H., Krishna, U., Bedford, T., Peek, R. M., & Salama, N. R. (2020). *Helicobacter pylori* diversification during chronic infection within a single host generates sub-populations with distinct phenotypes. *PLoS Pathogens*, *16*(12), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008686>
- Kasahun, G. G., Demoz, G. T., & Desta, D. M. (2020). Primary resistance pattern of *Helicobacter pylori* to antibiotics in adult population: A systematic review. *Infection and Drug Resistance*, *13*, 1567–1573. <https://doi.org/10.2147/IDR.S250200>

- Kataria, R., & Khatkar, A. (2019). Molecular docking, synthesis, kinetics study, structure-activity relationship and ADMET analysis of morin analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *BMC Chemistry*, 13(3), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13065-019-0562-2>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2021). PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1388–D1395. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>
- Kumar, S., Karmakar, B. C., Nagarajan, D., Mukhopadhyay, A. K., Morgan, R. D., & Rao, D. N. (2018). N4-cytosine DNA methylation regulates transcription and pathogenesis in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research*, 46(7), 3429–3445. <https://doi.org/10.1093/nar/gky126>
- Lacroix, S., Badoux, J. K., Parolo, S., Matone, A., Priami, C., Morine, M. J., Kaput, J., & Moco, S. (2018). A computationally driven analysis of the polyphenol-protein interactome. *Nature Scientific Reports*, 8(2232), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20625-5>
- Li, J., & Perez-Perez, G. I. (2018). *Helicobacter pylori* the Latent Human Pathogen or an Ancestral Commensal Organism. *Frontiers in Microbiology*, 9(609), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00609>
- Lin, Y. T., Kwon, Y. I., Labbe, R. G., & Shetty, K. (2005). Inhibition of *Helicobacter pylori* and associated urease by oregano and cranberry phytochemical synergies. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8558–8564. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8558-8564.2005>
- Linz, B., Windsor, H. M., McGraw, J. J., Hansen, L. M., Gajewski, J. P., Tomsho, L. P., Hake, C. M., Solnick, J. V., Schuster, S. C., & Marshall, B. J. (2014). A mutation burst during the acute phase of *Helicobacter pylori* infection in humans and rhesus macaques. *Nature Communications*, 5(4165), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms5165>
- Mabe, K., Yamada, M., Oguni, I., & Takahashi, T. (1999). In Vitro and In vivo Activities of Tea Catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(7), 1788–1791.
- Mahady, G. B., Pendland, S. L., Pharm, D., & Chadwick, L. R. (2003). Resveratrol and Red Wine Extracts Inhibit the Growth of CagA+ Strains of *Helicobacter pylori* In Vitro. *Am J Gastroenterol*, 98(6), 1440–1441. <https://doi.org/10.1111/j.1572->

- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A., Bazzoli, F., Gasbarrini, A., Atherton, J., Graham, D. Y., Hunt, R., Moayyedi, P., Rokkas, T., Rugge, M., Selgrad, M., Suerbaum, S., Sugano, K., & El-Omar, E. (2017). Management of helicobacter pylori infection-the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut*, 66(1), 6–30. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>
- Montealegre, M. C., Jaramillo, C. A., Montealegre, G., Parra, G., Echeverry, M., & Delgado, M. del P. (2010). Detección histológica y molecular de Helicobacter pylori y genotipificación con base en los genes de virulencia babA2 e iceA en pacientes con patología gástrica benigna. *Revista Chilena de Infectología*, 27(2), 112–118. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182010000200002>
- Moore, R. A., Beckthold, B., Wong, S., Kureishi, A., & Bryan, L. E. (1995). Nucleotide sequence of the gyrA gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of Helicobacter pylori. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1), 107–111. <https://doi.org/10.1128/aac.39.1.107>
- Morimoto, Y., Baba, T., Sasaki, T., & Hiramatsu, K. (2015). Apigenin as an anti-quinolone-resistance antibiotic. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(6), 666–673. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.09.006>
- Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Nakano, S., Megro, S. I., Hase, T., Suzuki, T., Isemura, M., Nakamura, Y., & Ito, S. (2018). Computational molecular docking and X-ray crystallographic studies of catechins in new drug design strategies. *Molecules*, 23(8), 1–28. <https://doi.org/10.3390/molecules23082020>
- Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., & Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, 1–9. <https://doi.org/10.1093/database/bap024>
- Ostrov, D. A., Hernández Prada, J. A., Corsino, P. E., Finton, K. A., Le, N., & Rowe, T. C. (2007). Discovery of novel DNA gyrase inhibitors by high-throughput virtual screening.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3688–3698.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00392-07>
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C. F. R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., & Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153–1162.
<https://doi.org/10.3390/12051153>
- Perumal Samy, R., & Gopalakrishnakone, P. (2010). Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(3), 283–294. <https://doi.org/10.1093/ecam/nen036>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Ponzoni, I., Sebastián-pérez, V., Requena-triguero, C., Roca, C., María, J., Cravero, F., Díaz, M. F., Páez, J. A., Arrayás, R. G., Adrio, J., & Campillo, N. E. (2017). Hybridizing Feature Selection and Feature Learning Approaches in QSAR Modeling for Drug Discovery. *Nature Scientific Reports*, 7(2403), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02114-3>
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rempe, C. S., Burris, K. P., Lenaghan, S. C., & Jr, C. N. S. (2017). The Potential of Systems Biology to Discover Antibacterial Mechanisms of Plant Phenolics. *Frontiers in Microbiology*, 8(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00422>
- Rhie, S. Y., Park, J. Y., Shin, T. S., Kim, J. W., Kim, B. J., & Kim, J. G. (2020). Discovery of a novel mutation in dna gyrase and changes in the fluoroquinolone resistance of helicobacter pylori over a 14-year period: A single center study in korea. *Antibiotics*, 9(287), 1–11.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9060287>
- Rispo, A., Capone, P., Castiglione, F., Pasquale, L., Rea, M., & Caporaso, N. (2014). Fluoroquinolone-based protocols for eradication of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 20(27), 8947–8956. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i27.8947>
- Safavi, M. (2016). Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current and future insights . *World Journal of Clinical Cases*, 4(1), 5-19. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v4.i1.5>

- Salama, N. R., Hartung, M. L., & Müller, A. (2013). Life in the human stomach : persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature Reviews*, *11*, 385–399. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3016>
- Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L., & Wilkens, M. (2017). Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLOS ONE*, *12*(2), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172273>
- Sasaki, Y., Abe, Y., Shoji, M., Mizumoto, N., Takeda, H., Oizumi, H., Yaoita, T., Sawada, N., Yamagishi, K., Saito, E., Watanabe, M., Ishizawa, K., Konta, T., Kayama, T., Tsugane, S., Ueno, Y., & Inoue, M. (2021). Reliability of self-reported questionnaire for epidemiological investigation of *Helicobacter pylori* eradication in a population-based cohort study. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95124-1>
- Savoldi, A., Carrara, E., Graham, D., Conti, M., & Tacconelli, E. (2018). Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: Revisión sistemática y Metaanálisis en las Regiones de la OMS. *Gastroenterology*, *155*(5), 1372–1382. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.007>.Prevalence
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, *13*, 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Shi, Y. (2021). Support vector regression-based QSAR models for prediction of antioxidant activity of phenolic compounds. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88341-1>
- Sugano, K., Tack, J., Kuipers, E. J., Graham, D. Y., El-omar, E. M., Miura, S., Haruma, K., Asaka, M., Uemura, N., & Malfertheiner, P. (2015). Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*, *64*, 1353–1367. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309252>
- Suriyanarayanan, B., Shanmugam, K., & Sarojini, R. (2013). Synthetic quercetin inhibits mycobacterial growth possibly by interacting with DNA gyrase. *Romanian Biotechnological Letters*, *18*(5), 8587–8593.

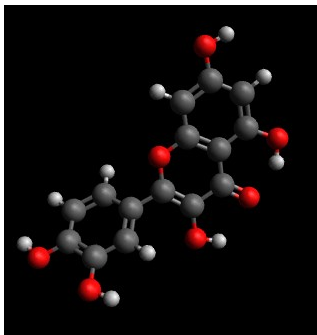
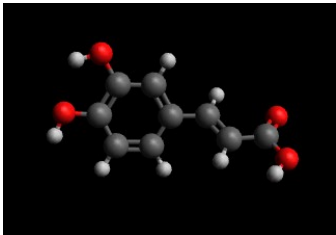
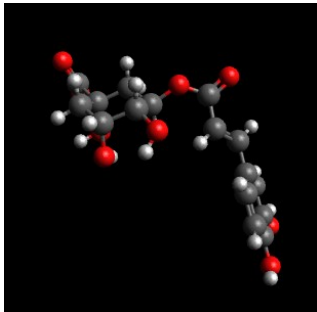
- Stalder, T., Holtz, Y. (2021): Extended Dumbbell Plot in R with ggplot2. R graph gallery. Access: r-graph-gallery.com/web-extended-dumbbell-plot-ggplot2.html. Date: 20-02-2022.
- Szklarczyk, D., Santos, A., Von Mering, C., Jensen, L. J., Bork, P., & Kuhn, M. (2016). STITCH 5: Augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D380–D384. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1277>
- Talevi, A. (2015). Multi-target pharmacology : possibilities and limitations of the “ skeleton key approach ” from a. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00205>
- Tomb, J., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., ... Venter, C. J. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388, 539–547. <https://doi.org/10.1038/41483>
- Trujillo, E., Martínez, T., & Bravo, M. M. (2014). Genotipificación de los factores de virulencia *vacA* y *cagA* de *Helicobacter pylori* en individuos de dos regiones de Colombia con riesgo opuesto de cáncer gástrico. *Biomédica*, 34(4), 567–573. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i4.2273>
- Waldum, H. L., Sagatun, L., & Mjones, P. (2017). Gastrin and Gastric Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00001>
- Wang, L. H., Cheng, H., Hu, F. L., & Li, J. (2010). Distribution of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *helicobacter pylori* strains. *World Journal of Gastroenterology*, 16(18), 2272–2277. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2272>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Williamson, G., & Holst, B. (2008). Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols : are we heading in the right direction ? *British Journal of Nutrition*, 99(3), 55–58. <https://doi.org/10.1017/S0007114508006867>
- Zhang, L. L., Zhang, L. F., & Xu, J. G. (2020). Chemical composition, antibacterial activity and action mechanism of different extracts from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.). *Nature*

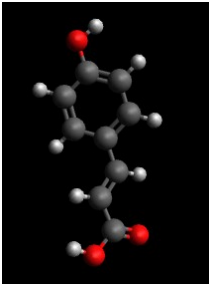
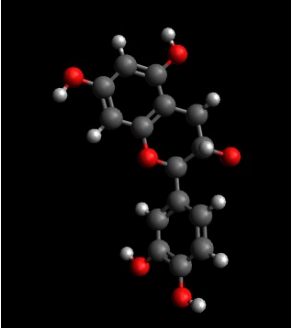
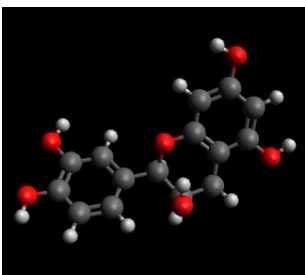
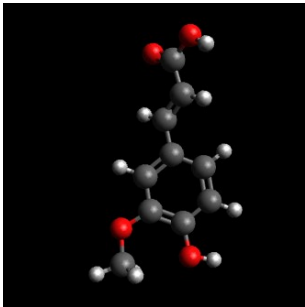
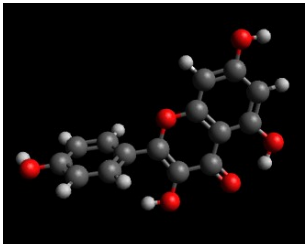
Scientific Reports, 10(8876), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65802-7>

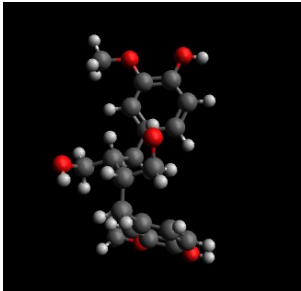
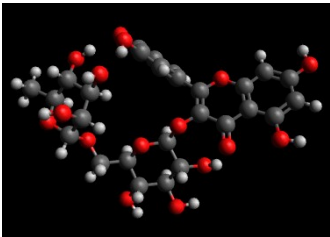
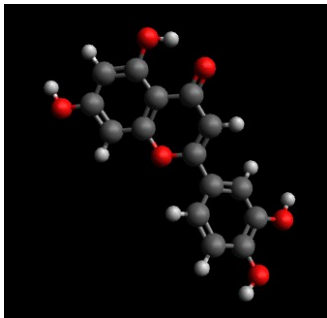
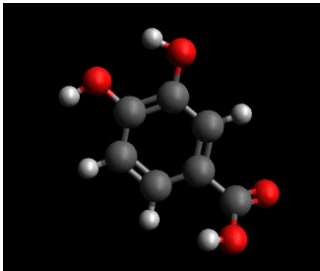
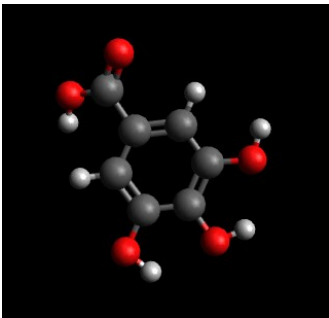
Zirald, R., Hanke, A., & Levene, S. D. (2019). Kinetic pathways of topology simplification by Type-II topoisomerases in knotted supercoiled DNA. *Nucleic Acids Research*, 47(1), 69–84. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1174>

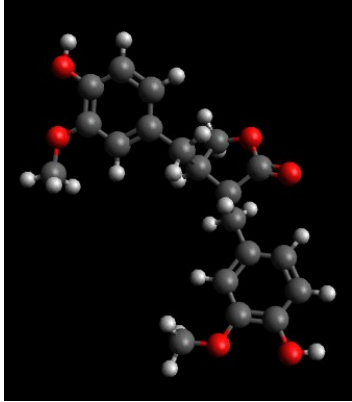
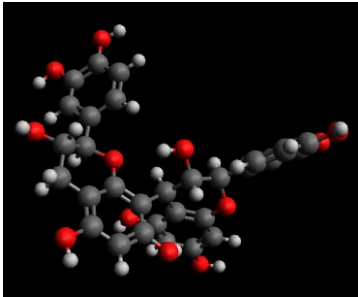
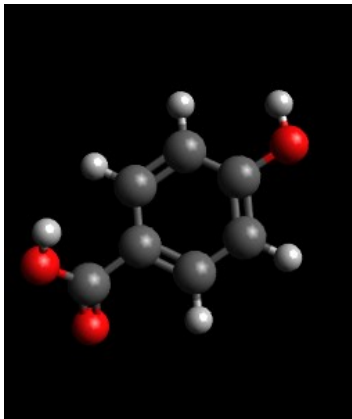
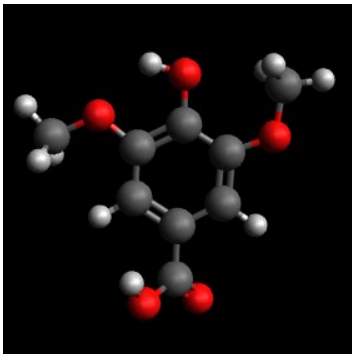
11. ANEXOS

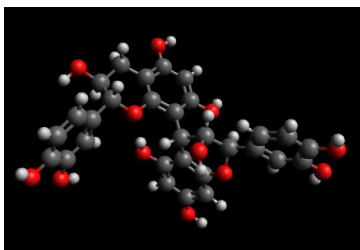
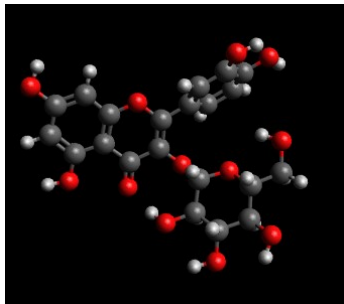
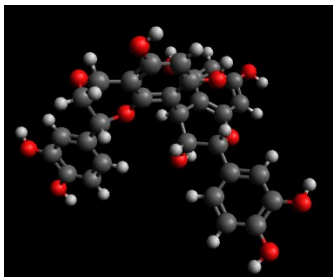
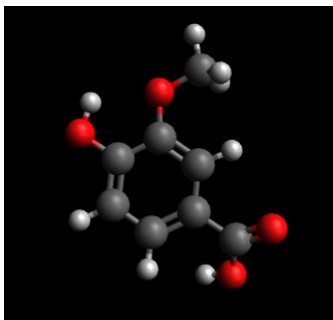
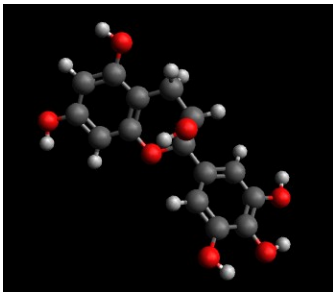
Anexo 1. Tabla energía libre de unión estimada de los compuestos polifenólicos con GyrA de *Helicobacter pylori*.

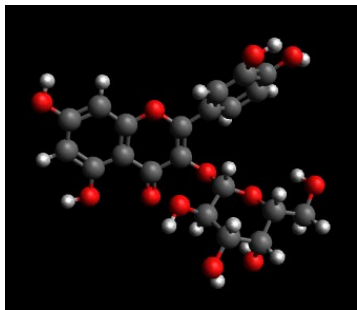
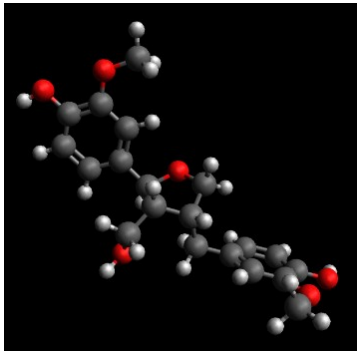
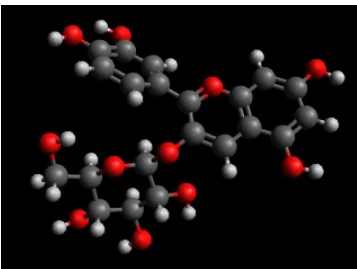
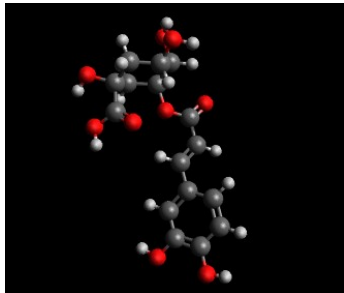
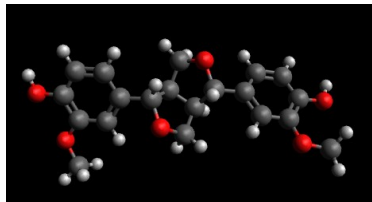
Energía libre de enlace estimada (-kcal/mol)											
Compuesto	Número de probabilidades										Media
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Quercetina 	-5,12	-4,79	-5,21	-5,06	-5,04	-5,52	-5,43	-5,69	-4,54	-5,59	-5,199
Ácido cafeico 	-3,39	-4,98	-4,92	-4,74	-4,89	-4,77	-4,94	-4,97	-5,25	-4,17	-4,702
Ácido 3-cafeoilquínico 	-3,21	-5,77	-3,51	-3,28	-5,8	-2,47	-4,57	-4,33	-2,47	-3,92	-3,933

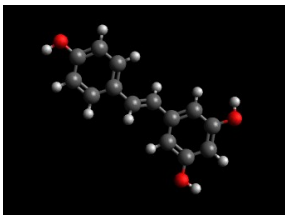
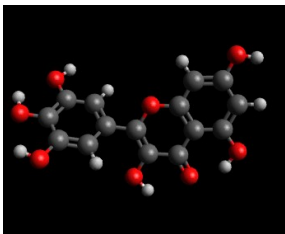
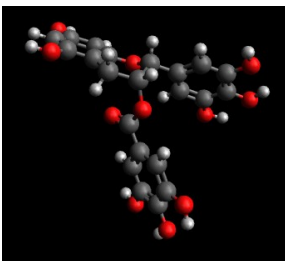
Ácido p-cumarico 	-4,63	-4,78	-4,61	-5,4	-4,98	-4,93	-4,69	-5,19	-4,95	-4,85	-4,901
Catequina 	-4,88	-5,07	-5,71	-5,3	-4,94	-5,38	-5,21	-5,45	-5,26	-6,07	-5,327
Epicatequina 	-5,33	-5,39	-5,42	-6,72	-5,43	-5,65	-5,61	-5,67	-5,26	-5,97	-5,645
Ácido ferúlico 	-5,17	-5,1	-3,59	-4,56	-4,05	-4,87	-4,59	-4,9	-5,06	-4,09	-4,598
Kaempferol 	-5,39	-5,26	-5,56	-6,17	-5,77	-5,65	-5,51	-5,62	-6,01	-5,27	-5,621

Secoisolariciresinol 	-3,81	-2,96	-2,02	-1,77	-2,12	-2,41	-4,33	-3,65	-4,44	-3,94	-3,145
Rutina 	-2,58	-2,16	-2,66	-4,3	-3,48	-4,04	-1,1	-3,86	-1,08	-2,39	-2,765
Luteolina 	-6,38	-6,38	-5,66	-5,07	-5,53	-5,32	-5,55	-5,35	-5,52	-5,54	-5,63
Ácido protocatecuico 	-3,33	-4,36	-4,58	-4,69	-4,65	-4,65	-4,15	-4,81	-3,85	-4,48	-4,355
Ácido gálico 	-4,98	-4,81	-4,52	-5,25	-4,12	-3,1	-5,2	-4,03	-4,57	-4,54	-4,512

Matairesinol 	-4,6	-5,47	-4,46	-5,67	-4,82	-5,09	-5,1	-5,36	-4,35	-3,26	-4,818
Procianidina B3 	-6,00	-5,59	-6,78	-4,45	-5,38	-4,01	-4,29	-4,41	-3,48	-5,94	-5,033
Ácido 4-hidroxibenzoico 	-5,18	-4,81	-5,01	-4,79	-4,34	-4,53	-4,33	-4,32	-4,54	-4,85	-4,67
Ácido siríngico 	-5,02	-4,21	-5,11	-3,88	-4,3	-4,4	-4,33	-4,44	-3,87	-4,82	-3,664

Procianidina B1 	-5,39	-4,37	-5,77	-3,72	-3,26	-4,02	-3,44	-2,04	-3,76	-4,41	-4,018
Isoquercetina 	-3,73	-4,08	-3,46	-3,55	-4,29	-4,22	-3,61	-2,78	-2,47	-4,2	-3,639
Procianidina B2 	-2,38	-3,58	-2,91	-3,15	-3,59	-3,42	-3,82	-3,73	-2,9	-3,37	-3,285
Ácido vainílico 	-3,88	-4,14	-3,5	-4,24	-4,79	-4,67	-3,62	-4,33	-5,25	-4,44	-4,286
Epigallocatequina 	-5,25	-4,05	-4,83	-7,19	-7,2	-4,34	-5,74	-4,29	-7,18	-4,81	-5,488

3-O-galactósido de quercetina 	-5,16	-3,86	-5,43	-4,72	-4,89	-5,19	-4,29	-4,11	-1,85	-3,8	-4,33
Lariciresinol 	-5,97	-4,37	-3,66	-5,77	-3,71	-5,7	-4,84	-5,93	-4,9	-3,89	-4,874
3-O-glucósido de cianidina 	-3,53	-5,99	-4,63	-2,74	-6,17	-4,35	-4,14	-4,84	-3,69	-5,09	-4,517
Ácido 5-cafeoilquínico 	-4,08	-2,79	-3,66	-3,47	-3,74	-5,21	-3,24	-4,84	-2,55	-4,65	-3,823
Pinoresinol 	-5,1	-4,39	-5,87	-5,9	-5,09	-5,11	-5,74	-5,15	-5,25	-4,88	-5,248

Resveratrol 	-5,53	-4,97	-5,16	-4,94	-5,46	-5,21	-5,12	-5,64	-5,62	-5,31	-5,296
Miricetina 	-4,86	-5,13	-5,85	-4,58	-4,82	-5,88	-4,65	-4,72	-4,00	-4,86	-3,991
Epigallocatequina-3-O-galato 	-4,05	-3,78	5,46	-3,66	-3,61	-4,1	-2,78	-3,11	-5,02	-5,58	-4,115

Descripción: Átomos de carbono (color gris), átomos de hidrógeno (color blanco), átomos de oxígeno (color rojo).

Anexo 2. Tabla descriptores moleculares calculados para los 30 polifenoles con energía libre de interacción estimada

Descriptor Molecular	Promedio	Descriptor Molecular	Promedio
Wlambda1.unify	1,37859596	VP.2	5,47304879
Wlambda2.unify	3,71602741	VP.3	3,85335207
Wlambda3.unify	11,1733272	VP.4	2,63480951
Wnu1.unify	0,07157049	VP.5	1,81356698
Wnu2.unify	0,23412915	VP.6	1,04296437
Weta1.unify	0,39320114	VP.7	0,61908849
Weta2.unify	0,45415769	SPC.4	4,80058336
Weta3.unify	0,51408774	SPC.5	7,09038339
WT.unify	16,2679506	SPC.6	10,3302243
WA.unify	63,7205529	VPC.4	1,44083104
WV.unify	159,620054	VPC.5	1,8432185
WK.unify	0,27072527	VPC.6	2,21139728
WD.unify	1,36144657	SC.3	2,02750428
BCUTw.11	11,8566667	SC.4	0,0096225

BCUTw.1h	16,001317	SC.5	0,60454576
BCUTc.1l	-0,37681367	SC.6	0,0096225
BCUTc.1h	0,2473778	VC.3	0,75036854
BCUTp.1l	4,58869775	VC.4	0,00372678
BCUTp.1h	9,97415855	VC.5	0,11858916
Fsp3	0,17950577	VC.6	0,00068041
XLogP	1,6545	SCH.5	0,01283001
MW	333,532723	SCH.6	0,18742706
LipinskiFailures	0,56666667	SCH.7	0,51578579
nRotB	3	VCH.5	0,00715931
MLogP	2,47933333	VCH.6	0,07537535
nAtomLAC	0,7	VCH.7	0,12909903
nAtomP	13,6333333	C1SP2	0,46666667
nAtomLC	2	C2SP2	10,6
nB	25,8666667	C3SP2	2
nBase	0,03333333	C1SP3	0,56666667
nAtom	39,7666667	C2SP3	2,16666667
nAromBond	11,5666667	C3SP3	0,43333333
naAromAtom	11,5333333	ATSp1	1464,89599
ALogP	1,53194333	ATSp2	1749,08724
ALogp2	3,97874429	ATSp3	2521,68469
AMR	82,5099567	ATSp4	2675,15097
nAcid	0,33333333	ATSp5	2345,14198
nSmallRings	2,86666667	ATSm1	29,7052552
nAromRings	2,16666667	ATSm2	28,833355
nRingBlocks	2,23333333	ATSm3	43,4045894
nAromBlocks	1,9	ATSm4	49,7593432
nRings5	0,13333333	ATSm5	44,379379
nRings6	2,73333333	ATSc1	0,67994327
tpsaEfficiency	0,39010259	ATSc2	-0,21704133
Zagreb	127,266667	ATSc3	-0,15511332
WPATH	1785,7	ATSc4	0,02636492
WPOL	41,2333333	ATSc5	-0,01496966
WTPT.1	48,3783626	nHBDon	5,1
WTPT.2	2,00196982	nHBAcc	2,86666667
WTPT.3	19,4176165	PPSA.1	297,166479
WTPT.4	19,4176165	PPSA.2	901,40349
VAdjMat	5,54717407	PPSA.3	34,000736
VABC	286,358201	PNSA.1	238,096553
TopoPSA	129,274667	PNSA.2	-722,159741
topoShape	0,92962963	PNSA.3	-65,6289942

geomShape	0,8171665	DPSA.1	59,0699265
PetitjeanNumber	0,47893414	DPSA.2	1623,56323
MDEC.11	0,01581197	DPSA.3	99,6297303
MDEC.12	0,48263078	FPSA.1	0,5495146
MDEC.13	0,67722211	FPSA.2	1,50670767
MDEC.22	4,8106651	FPSA.3	0,06322666
MDEC.23	18,6567025	FNSA.1	0,4504854
MDEC.24	0,11578262	FNSA.2	-1,22439066
MDEC.33	14,6596173	FNSA.3	-0,1219596
MDEC.34	0,1468676	WPSA.1	171,759221
MDEO.11	2,44779301	WPSA.2	567,634973
MDEO.12	1,92949086	WPSA.3	19,6701135
MDEO.22	0,27060286	WNSA.1	135,30846
khs.sCH3	0,43333333	WNSA.2	-450,441544
khs.ssCH2	0,9	WNSA.3	-37,8691761
khs.dsCH	0,4	RPCG	0,11411023
khs.aaCH	5	RNCG	0,16581445
khs.sssCH	2,16666667	RPCS	1,23900645
khs.dssC	0,46666667	RNCS	4,70449898
khs.aasC	6,43333333	THSA	253,315805
khs.aaaC	0,53333333	TPSA	281,947227
khs.ssssC	0,06666667	RHSA	0,47282955
khs.sOH	5,1	RPSA	0,52717045
khs.dO	0,7	bpol	20,9085637
khs.ssO	1,3	apol	45,6958363
khs.aaO	0,26666667	MOMI.X	5022,10139
Kier1	19,0108348	MOMI.Y	4262,21345
Kier2	7,88735232	MOMI.Z	1796,19012
Kier3	4,23442072	MOMI.XY	1,22296753
HybRatio	0,17950577	MOMI.XZ	4,83157566
fragC	1406,707	MOMI.YZ	4,20465675
FMF	0,40462866	MOMI.R	7,09661215
ECCEN	479,766667	LOBMAX	1,62164441
SP.0	17,5065177	LOBMIN	1,58590051
SP.1	11,3657791	GRAV.1	2114,60854
SP.2	10,7217403	GRAV.2	44,9521589
SP.3	9,04556718	GRAV.3	12,5764673
SP.4	7,18165625	GRAVH.1	2308,30243
SP.5	5,77739854	GRAVH.2	46,9663352
SP.6	4,15939982	GRAVH.3	12,9493517
SP.7	2,85676382	GRAV.4	4989,40249

VP.0	12,5186388	GRAV.5	67,9676211
VP.1	7,12549682	GRAV.6	16,506574

Anexo 3. Análisis de correlación descriptores moleculares

Tabla - Subconjunto de datos correlación por pares de descriptores

Descriptor Molecular 1	Descriptor Molecular 2	Coefficiente de Pearson
Wnu1.unity	Wlambda1.unity	0.9820811
WA.unity	Wlambda1.unity	0.8868930
WV.unity	Wlambda1.unity	0.9332128
BCUTw.1h	Wlambda1.unity	0.8400798
BCUTp.1h	Wlambda1.unity	0.8237412
MW	Wlambda1.unity	0.9094875
LipinskiFailures	Wlambda1.unity	0.8987781
nB	Wlambda1.unity	0.9109633
nAtom	Wlambda1.unity	0.8797225
AMR	Wlambda1.unity	0.8963907

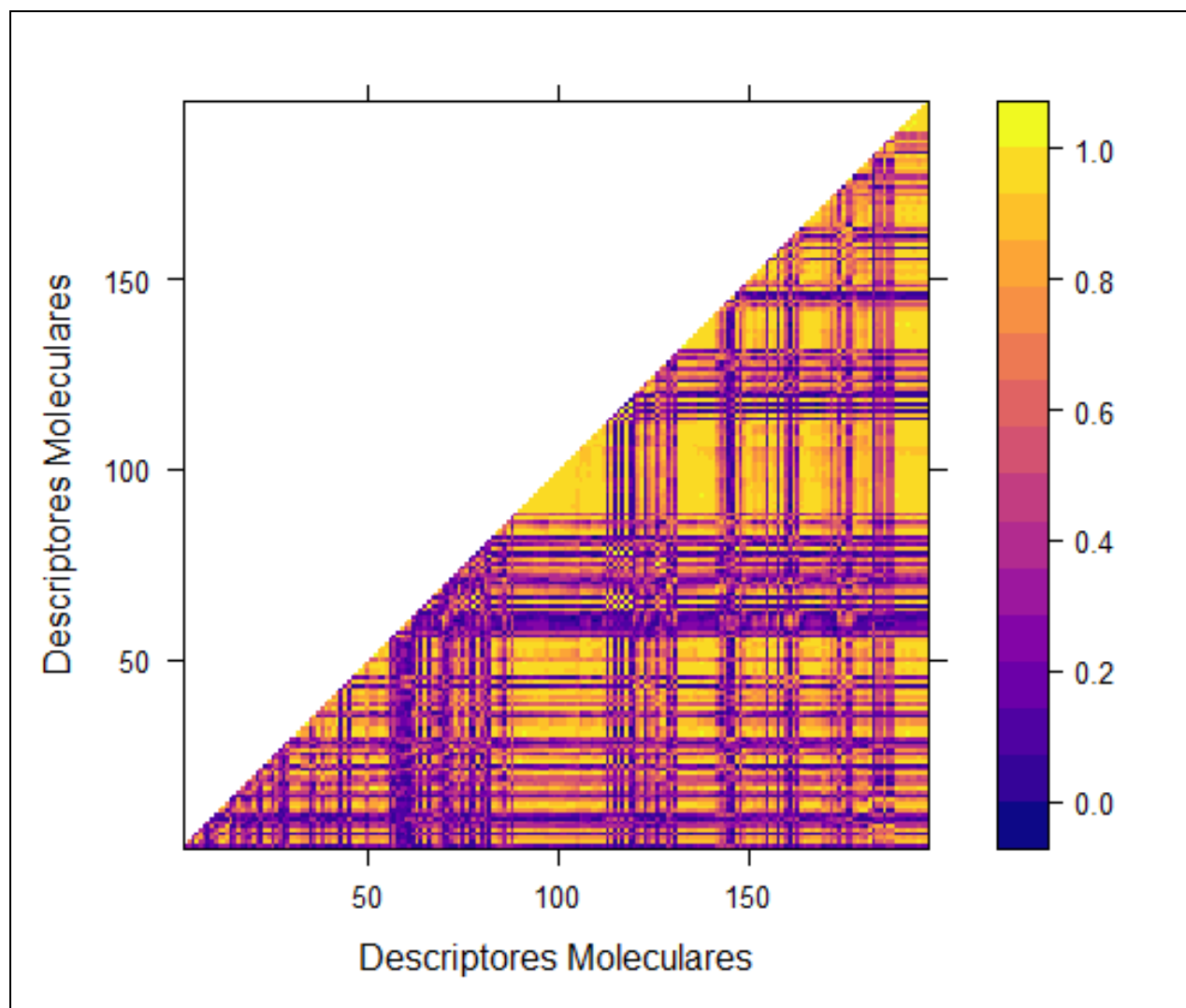


Figura 11: Matriz de correlación para los descriptores moleculares calculados. Se muestra el coeficiente de correlación de Pearson para los 196 descriptores moleculares empleados para la selección del subconjunto aplicado al modelo QSAR. Fuente esta investigación.

Anexo 4. Conjunto de descriptores moleculares utilizados en el modelo QSAR

Nombre Descriptor	Clase	Definición
Weta2.unity Weta3.unity	Híbrido	Descriptores holísticos descritos por Todeschini <i>et al.</i>
MDEC.22	Topológico	Evaluar descriptores de borde de distancia molecular para C, N y O
Khs.do	Topológico	Cuenta el número de apariciones de los fragmentos de estado E.

VC.6	Topológico	Índice de Kier y Hall Chi
FNSA.1 FNSA.2	Geométrico Electrónico	Descriptores que combinan información de área de superficie y carga parcial.
GRAV.6	Geométrico	Descriptor que calcula el número de aceptores de enlaces de hidrógeno.

Anexo 5. Tabla conjunto de datos de entrada regresión lineal múltiple (MLR)

Polifenol	Clase	Grupo	Actividad		Descriptores Moleculares							
			Calculado	Observado	Weta2.unity	Weta3.unity	MDEC.22	khs.dO	VC.6	FNSA.1	FNSA.2	GRAV.6
Isoquercetina	Flavonoides	1	4,99	4,29	0,42	0,40	2,98	1	0	0,49	-2,13	19,78
Matairesinol	Lignanós	1	5,50	5,67	0,50	0,47	9,19	1	0	0,36	-0,84	17,25
Ácido 3-cafeoilquínico	A. Fenólicos	1	5,82	5,77	0,37	0,55	5,55	2	0,0102	0,46	-1,48	16,99
Rutina	Flavonoides	1	3,93	4,3	0,49	0,46	2,98	1	0	0,44	-2,57	22,42
Procianidina B1	Flavonoides	1	4,91	5,77	0,43	0,60	7,41	0	0	0,44	-2,02	21,56
Epigallocatequina	Flavonoides	1	6,95	7,2	0,50	0,54	2,60	0	0	0,44	-1,14	16,31
Luteolina	Flavonoides	1	6,63	6,38	0,53	0,58	4,00	1	0	0,49	-1,04	15,97
Catequina	Flavonoides	1	6,07	6,07	0,34	0,52	3,94	0	0	0,42	-0,97	15,87
Procianidina B2	Flavonoides	1	4,99	3,82	0,43	0,59	7,41	0	0	0,43	-1,95	21,60
Miricetina	Flavonoides	1	5,60	5,88	0,37	0,59	1,46	1	0	0,54	-1,50	16,82
3-O-galactósido de quercetina	Flavonoides	1	5,19	5,43	0,44	0,41	2,98	1	0	0,45	-1,97	19,82
Epigallocatequina-3-O-galato	Flavonoides	1	5,57	5,58	0,47	0,47	4,26	1	0	0,50	-1,93	19,55
Secoisolariciresinol	Lignanós	1	4,90	4,44	0,55	0,51	11,49	0	0	0,34	-0,88	16,68
Resveratrol	Estilbenos	1	5,51	5,64	0,51	0,60	11,07	0	0	0,48	-0,70	13,87
Kaempferol	Flavonoides	1	6,00	6,17	0,39	0,56	4,19	1	0	0,51	-1,11	16,05
Pinoresinol	Lignanós	1	6,12	5,9	0,49	0,55	6,59	0	0	0,31	-0,75	17,14
Ácido ferúlico	A. Fenólicos	1	5,02	5,17	0,49	0,50	4,56	1	0	0,42	-0,61	13,06
Procianidina B3	Flavonoides	1	6,64	6,78	0,44	0,40	7,41	0	0	0,43	-1,98	21,86
Ácido 5 cafeoilquínico	A. Fenólicos	1	5,16	5,21	0,26	0,56	5,55	2	0,0102	0,46	-1,47	16,99
Ácido siríngico	A. Fenólicos	1	5,00	5,02	0,37	0,48	0,50	1	0	0,37	-0,62	13,51
Ácido p-cumarico	A. Fenólicos	1	5,29	5,4	0,51	0,51	6,68	1	0	0,49	-0,58	12,07
Quercetina	Flavonoides	1	5,92	5,69	0,38	0,58	2,60	1	0	0,53	-1,31	16,44
Lariciresinol	Lignanós	1	5,50	5,97	0,53	0,53	8,87	0	0	0,31	-0,76	16,92
Ácido vainílico	A. Fenólicos	1	5,59	5,25	0,51	0,50	1,65	1	0	0,42	-0,58	12,54
Ácido cafeico	A. Fenólicos	2	5,87	5,25	0,53	0,51	4,56	1	0	0,51	-0,76	12,67
Epicatequina	Flavonoides	2	6,69	6,72	0,48	0,54	3,94	0	0	0,42	-0,96	15,90
Ácido protocatecuico	A. Fenólicos	2	6,63	4,81	0,55	0,51	1,65	1	0	0,53	-0,74	12,10
Ácido gálico	A. Fenólicos	2	6,64	4,98	0,47	0,49	0,50	1	0	0,56	-0,94	12,71

Ácido 4-hidroxibenzoico	A. Fenólicos	2	5,85	5,18	0,48	0,49	3,30	1	0	0,50	-0,56	11,45
3-O-glucósido de cianidina	Flavonoides	2	5,53	6,17	0,40	0,41	4,45	0	0	0,45	-1,91	19,32

Descripción: Grupo 1 (Entrenamiento), Grupo 2 (Prueba).

Anexo 6. Resumen regresión lineal múltiple (MLR)

Call:

```
lm(formula = Afinidad.de.union ~ Weta2.unity + Weta3.unity +  
MDEC.22 + khs.d0 + VC.6 + FNSA.1 + FNSA.2 + GRAV.6, data = entrenamiento2)
```

Residuals:

```
      Min       1Q   Median       3Q      Max  
-0.66755 -0.18959  0.06274  0.20237  0.38571
```

Coefficients:

```
      Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)  
(Intercept) -9.43012     2.39254  -3.941 0.001688 **  
Weta2.unity   5.13727     1.69689   3.027 0.009712 **  
Weta3.unity  -5.39815     2.17523  -2.482 0.027525 *  
MDEC.22      -0.24563     0.04474  -5.490 0.000104 ***  
khs.d0       -1.03556     0.23465  -4.413 0.000701 ***  
VC.6         311.84604    59.11427   5.275 0.000150 ***  
FNSA.1       19.62926     2.91215   6.740 1.38e-05 ***  
FNSA.2        5.40185     0.79504   6.794 1.27e-05 ***  
GRAV.6        0.91076     0.13774   6.612 1.68e-05 ***
```

Signif. codes:

```
0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Residual standard error: 0.3505 on 13 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.8558, Adjusted R-squared: 0.767

F-statistic: 9.64 on 8 and 13 DF, p-value: 0.0002316

Anexo 7. Tabla energía de interacción predicha a partir del modelo QSAR

Número de compuestos	Energía libre de interacción	Número de compuestos	Energía libre de interacción
1	6,13943	63	5,91034
2	5,599772	64	5,25444
3	5,857648	65	3,995439
4	6,646279	66	6,187954
5	5,274833	67	6,057043
6	5,320781	68	6,070105
7	6,146358	69	4,764131
8	5,502372	70	4,365748

9	5,320003	71	6,579972
10	3,138276	72	4,624423
11	3,53978	73	5,157651
12	5,333933	74	6,825671
13	4,194973	75	4,297008
14	8,724519	76	4,784749
15	3,842838	77	6,231263
16	6,426297	78	4,329474
17	4,395631	79	5,10044
18	5,844314	80	4,54252
19	2,634783	81	3,635404
20	3,888295	82	3,583029
21	8,650418	83	5,110503
22	1,856592	84	4,448862
23	4,863805	85	6,188638
24	5,688844	86	5,861079
25	5,659976	87	5,743433
26	5,145903	88	6,030536
27	4,961693	89	3,699101
28	4,455191	90	3,609012
29	3,298862	91	5,939905
30	4,103664	92	6,055227
31	2,263332	93	6,042461
32	2,976523	94	4,523075
33	3,282371	95	5,2089
34	5,299211	96	3,935076
35	3,962486	97	4,06382
36	5,926928	98	3,570048
37	5,985644	99	1,931583
38	4,246888	100	1,913041

39	5,663052	101	1,36731
40	5,660361	102	2,728855
41	3,559499	103	5,965014
42	2,398922	104	6,564195
43	1,162201	105	4,077721
44	4,212908	106	4,253342
45	4,760088	107	2,936784
46	5,099193	108	4,227743
47	4,989647	109	2,314715
48	5,472564	110	4,27866
49	5,995583	111	2,0804795
50	3,855105	112	5,1848204
51	2,975196	113	6,0947083
52	5,688216	114	5,8935503
53	6,194416	115	5,7791471
54	4,773574	116	5,8138531
55	2,610177	118	7,0208495
56	4,518809	119	5,8675658
57	3,793394	120	5,1468487
58	5,4595	121	5,8275856
59	4,679554	122	5,4789776
60	2,960453	123	5,1190647
61	6,69643	124	0,7266897
62	6,381711		

Anexo 9. Código análisis de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) en la herramienta R 4.0.4.

```
> library(dplyr)
> library(rcdk)
> library(reshape2)
> library(car)
> library(cvq2)
> library(lattice)
> library(leaps)
> molculas <- load.molecules("C:/Users/Juiana Delgado/Documents/R/file1.sdf")
> datos <- read.csv("C:/Users/Juiana Delgado/Documents/R/File2.csv", header=TRUE, sep=";", quote="", fill=TRUE, dec=".")
> dc <- get.desc.categories()
> tipo_descriptores <- unique(unlist(sapply(get.desc.categories(), get.desc.names)))
> calcdescriptores <- eval.desc(molculas, tipo_descriptores)
> descriptores <- calcdescriptores[, colSums(is.na(calcdescriptores))==0]
> descriptores1 <- descriptores[, -c(42, 43, 46, 47, 48, 57, 67, 73, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 90, 92, 96, 97, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108)]
> datos_qsar <- cbind(datos, descriptores1)
> n_muestra <- floor(0.80*nrow(datos_qsar))
> muestra <- sample(seq_len(nrow(datos_qsar)), size=n_muestra)
> entrenamiento <- datos_qsar[muestra, ]
> prueba <- datos_qsar[-muestra, ]
# Correlación de descriptores
> matriz_correl <- as.matrix(cor(entrenamiento), method="Pearson")
> pares_correl <- melt(matriz_correl)[melt(lower.tri(matriz_correl))$value,]
> colineales <- dplyr::filter(pares_correl, abs(value) > 0.75)
# Selección de subset
> model_subset <- regsubsets(Afinidad.de.union ~ Wlambda3.unite + Weta2.unite + Weta3.unite + WD.unite + BCUTw.11 + nBase + geomShape + MDEC.22 + khs.dsCH + khs.d0 + k
> res.sum <- summary(model_subset)
> data.frame(Adj.R2=which.max(res.sum$adjr2), CP=which.min(res.sum$cp), BIC=which.min(res.sum$bic))
# Modelo ajustado
> modelo <- lm(Afinidad.de.union ~ Weta2.unite + Weta3.unite + MDEC.22 + khs.d0 + VC.6 + FNSA.1 + FNSA.2 + GRAV.6, entrenamiento)
> calculado <- cbind(c(predict(modelo, entrenamiento)))
> observado <- cbind(entrenamiento[c("Afinidad.de.union")])
> cor(calculado, observado)
> xyplot(calculado ~ observado, entrenamiento, type=c("p", "n"), col.line = "red")
> residuales <- resid(modelo)
> shapiro.test(residuales)
> res_std <- rstandard(modelo)

> res_std <- rstudent(modelo)
> outliers <- ifelse(abs(res_std)>((2*sd(res_std))+(mean(res_std))), 1, 0)
> entrenamiento2 <- entrenamiento[!outliers,]
> modelo2 <- lm(Afinidad.de.union ~ Weta2.unite + Weta3.unite + MDEC.22 + khs.d0 + VC.6 + FNSA.1 + FNSA.2 + GRAV.6, entrenamiento2)
> analisis <- summary(modelo2)
> datos_entrenamiento <- entrenamiento2[,c("Afinidad.de.union", "Weta2.unite", "Weta3.unite", "MDEC.22", "khs.d0", "VC.6", "FNSA.1", "FNSA.2", "GRAV.6")]
> looq2(datos_entrenamiento, Afinidad.de.union ~ Weta2.unite + Weta3.unite + MDEC.22 + khs.d0 + VC.6 + FNSA.1 + FNSA.2 + GRAV.6)
> datos_prueba <- prueba[,c("Afinidad.de.union", "Weta2.unite", "Weta3.unite", "MDEC.22", "khs.d0", "VC.6", "FNSA.1", "FNSA.2", "GRAV.6")]
> calculado <- cbind(c(predict(modelo2, datos_prueba)))
> observado <- cbind(datos_prueba[c("Afinidad.de.union")])
> analisis <- cbind(observado, calculado)
> datos_predict <- analisis[,c("Afinidad.de.union", "calculado")]
> looq2(datos_predict, Afinidad.de.union ~ calculado)
> looq2(datos_predict, Afinidad.de.union ~ calculado + 0)
> looq2(datos_predict, calculado ~ Afinidad.de.union + 0)
> summary(lm(calculado ~ 0 + Afinidad.de.union, analisis))$coefficient[, "Estimate"]
> summary(lm(Afinidad.de.union ~ 0 + calculado, analisis))$coefficient[, "Estimate"]
# New data
> molculas4 <- load.molecules("C:/Users/Juiana Delgado/Documents/R/file4.sdf")
> calcdescriptores4 <- eval.desc(molculas4, tipo_descriptores)
> descriptores4 <- calcdescriptores4[, colSums(is.na(calcdescriptores4))==0]
# Predicción
predict(modelo2, newdata=descriptores4)
#Grafico MLR
> MLR <- read_excel("C:/Users/Juiana Delgado/Documents/R/Gregresion.xlsx")
> ggplot(MLR, aes(Observado, Calculado, colour=Clase)) + geom_point() + geom_smooth(method="lm", span=0.8, fill="gray62", alpha=0.3, colour="black", lty=2) +
  theme_minimal() + theme_classic() + xlab("Observados [-kcal/mol]") + ylab("Calculados [-kcal/mol]") +
  scale_colour_manual(values=c("#E0000099", "#00998B99", "#00468899", "#42B54099"))
opcional > ggplot(MLR, aes(Observado, Calculado, colour=Subclase)) + geom_point() + geom_smooth(method="lm", span=0.8, fill="gray62", alpha=0.3, colour="red", lty=2) +
  theme_minimal() + theme_classic() + xlab("Observados [-kcal/mol]") + ylab("Calculados [-kcal/mol]") + theme(text=element_text(family="TT Times New Roman")) +
  scale_color_viridis(discrete = TRUE)
```