



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*,
GASTROPROTECTORA Y ANTIINFLAMATORIA DEL EXTRACTO ACUOSO DE
CYRTOCARPA PROCERA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Joel Díaz del Carpio



MÉXICO, D.F.

AÑO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Eduardo Bonilla Espinosa

VOCAL: Profesor: José Fausto Rivero Cruz

SECRETARIO: Profesor: Irma Romero Álvarez

1er. SUPLENTE: Profesor: Beatriz Ruíz Villafán

2° SUPLENTE: Profesor: Mabel Clara Fragoso Serrano

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 2, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. JUAN FRANCISCO PALACIOS ESPINOSA

SUSTENTANTE: JOEL DÍAZ DEL CARPIO

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer y dedicar esta tesis a mi Mamá por ser el motor de mis esfuerzos y la inspiración de mi vida, por estar conmigo en todos los momentos difíciles y ayudarme a superar las adversidades que la vida misma pone en el camino, por haberse desvelado junto conmigo y por cobijarme con su gran amor.

A mi Papá que ahora me cuida desde el cielo, te extraño mucho viejo.

A mis hermanos por creer en mí y por su gran apoyo

Adolfo gracias por tu gran apoyo y sobre todo por el mejor ejemplo que he tenido en la vida, el de la superación y el esfuerzo, te extraño mucho hermano.

Juan Carlos por haberme jalado las orejas a tiempo y también por ser un gran ejemplo de superación, pero sobre todo por tu apoyo cuando lo necesitaba.

Bocho por apoyarme cuando estaba en aprietos y por descargar video juegos.

A toda mi familia que siempre fue un motivo para luchar y no caer en el esmero. Espero algún día ser digno de la gran familia que tengo.

A todos mis amigos por ser una parte importante en mi vida y por la gran escuela de la vida que forjamos en cada una de las anécdotas vividas, nunca olvidare ninguno de los días de "La Banca". Arriba el K-GUAMA POWER!!!!!!

A Francisco que más allá de ser un gran tutor y un consejero en los momentos difíciles (seminarios), por ser una gran persona y sobre todo un excelente amigo, gracias por todo tu apoyo... tú ya sabes. Vas a ser un gran padre de eso estoy completamente seguro, sin necesidad de hacer ensayos que sean replicables, todas las estadísticas están a tu favor, no hay dispersión en el gran ser humano que eres.

A IRA también por ser una gran tutora y por el apoyo mostrado hacia mi persona y por creer en mis capacidades, además por la amistad de la cual me siento afortunado y digno de poseer. Nunca olvidare esas reuniones, espero que me sigas invitando!

A mi BBITA MOSHA por ser una gran persona, por su apoyo, por existir; sin ti mi vida no sería la misma, pero sobre todo por el gran amor que me demuestras cada día. Gracias por creer en mí y por ayudarme en todos los aspectos en lo que lo haces. Te amo con todo mí ser Evelyn, nunca lo olvides.

A todos mis amigos del laboratorio a Bubu, Jazmín, mi compadre Memo, Oscar; por su amistad y por ser muy buenos conmigo, por todo el relaxo que hicimos en el laboratorio, los extrañaré amigos.

A Dios por colocar en mi camino a cada una de las personas antes mencionadas, todos excelentes seres humanos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por los grandes valores y sobre todo por haberme hecho un hombre libre, siempre las llevare en el corazón y representare con dignidad y responsabilidad.

A la Mtra. Rosa María Fonseca, de la Facultad de Ciencias, UNAM. Por su apoyo en la identificación y a recolección de *Cyrtocarpa procera*.

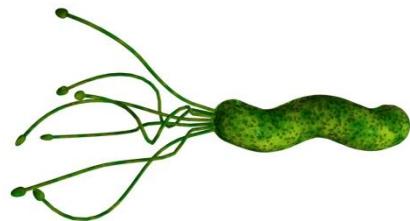
A los apoyos económicos otorgados por PAPIIT No. IN 225711-3.

Los resultados presentados en ésta tesis contribuyeron a la publicación del artículo titulado “Contribution to the ethnopharmacological and anti-*Helicobacter pylori* knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae)” en “Journal of Ethnopharmacology” disponible en línea el 13 Julio del 2012, el cual se presenta al final de éste trabajo.

Algunos resultados presentados a continuación fueron expuestos en los siguientes congresos:

46° Congreso Mexicano de Química, Sociedad Química de México, A. C. 2011. Trabajo titulado: “Actividad anti-*Helicobacter pylori* y Farmacológica de *Cyrtocarpa procera*”.

8a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Sociedad Italo-Latinoamericana de Etnomedicina (SILAE), 2012. Trabajo titulado (POSTER): “Estudio de las actividades gastroprotectoras del extracto acuoso de *Cyrtocarpa procera*”.



I ÍNDICE

I ÍNDICE I	I
I.1 Lista de Figuras	IV
I.2 Lista de Tablas	V
I.3 Lista de Abreviaturas	V
II RESUMEN	VIII
III INTRODUCCIÓN	1
III.1.1 Generalidades	1
III.1.2 Taxonomía	2
III.1.3 Morfología	2
III.1.4 Hábitat	3
III.1.5 Especies patógenas de <i>Helicobacter pylori</i>	4
III.1.6 Modo de transmisión y reservorios	4
III.1.7 Epidemiología	6
III.1.8 Mecanismos de virulencia, colonización y sobrevivencia	8
III.1.9 Patologías	13
III.2. Diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i> .	20
III.2.1 Tratamientos	21
III.2.2 Mecanismo de acción de los principales antibióticos empleados en la terapia contra <i>H. pylori</i> y resistencia.	22
III.2.3 Uso de las plantas medicinales	25
III.2.4 <i>Cyrtocarpa procera</i>	27
III.2.5 Taxonomía	27
III.2.6 Nombres comunes y/o sinonimia popular	27
III.2.7 Descripción	28
III.2.8 Distribución	28
III.2.9 Uso etnomédico	29
III.3. Estudios fitoquímicos	30

IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	32
IV.1.1 Justificación	32
IV.1.2 Objetivo general	33
IV.1.3 Objetivos particulares	33
V MATERIALES Y MÉTODOS	34
V.1.1 Material vegetal	34
V.1.2 Preparación y fraccionamiento primario del extracto acuoso	34
V.1.3 Material microbiológico	35
V.1.4 Medios de cultivo y pruebas de identificación para <i>H. pylori</i>	35
V.1.5 Placas para cultivo de agar sangre	35
V.1.6 Medio de cosecha	35
V.1.7 Medio de cultivo líquido Müller-Hinton	35
V.1.8 Placas para cuenta viable y determinación de unidades formadoras de colonia (UFC)	36
V.1.9 Condiciones de cultivo	36
V.2.1 Pruebas de identificación para <i>H. pylori</i>	36
V.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	39
V.2.3 Animales de experimentación	40
V.2.4 Determinación de la toxicidad aguda del extracto acuoso íntegro	40
V.2.5 Determinación del efecto gastroprotector	41
V.2.6 Estudios preliminares del mecanismo de acción del efecto gastroprotector del extracto acuoso de <i>C. procera</i>	42
V.2.7 Lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratones pretratados con indometacina	42
V.2.8 Lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratones pretratados con L-NAME	43
V.2.9 Lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto	

en ratones pretratados con NEM	43
V.3.1 Determinación de la actividad antiinflamatoria	43
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
VI.1.1 Obtención del extracto acuoso íntegro de <i>C. procera</i> y fraccionamiento	44
VI.1.2 Actividad anti- <i>H. pylori</i> del extracto acuoso íntegro de <i>C. procera</i> y de sus fracciones primarias	46
VI.1.3 Fraccionamiento secundario de las fracciones primarias de acetato de etilo y butanólica	47
VI.1.4 Estudio de toxicidad aguda	50
VI.1.5 Actividad gastroprotectora del extracto acuoso íntegro y fracciones primarias	52
VI.1.6 Estudios preliminares del mecanismo de acción del efecto gastroprotector del extracto acuoso de <i>C. procera</i>	55
VI.1.7 Determinación de la actividad anti-inflamatoria	58
VII CONCLUSIONES	61
VIII BIBLIOGRAFIA	63

I.1 Lista de Figuras

Figura 1. Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2005, Robin Warren y Barry Marshall	2
Figura 2. Morfología de <i>Helicobacter pylori</i>	3
Figura 3. Mortalidad de cáncer gástrico y seroprevalencia de <i>H. pylori</i> en México	8
Figura 4. Factores de colonización de la bacteria <i>H. pylori</i>	11
Figura 5. Actividades biológicas de la citotoxina Vac-A de <i>H. pylori</i>	12
Figura 6. Representación esquemática de la estructura gástrica	16
Figura 7. Glándulas gástricas colonizadas con <i>H. pylori</i>	18
Figura 8. Patologías asociadas a <i>H. pylori</i>	21
Figura 9. Antibióticos más utilizados en la erradicación de <i>H. pylori</i>	26
Figura 10. <i>Cyrtocarpa procera</i> (Chupandilla)	30
Figura 11. Distribución de <i>C. procera</i> en la república Mexicana	31
Figura 12. Estructura química de compuestos aislados de <i>C. procera</i>	33
Figura 13. Incubadora Nuair para el cultivo de <i>H. pylori</i>	38
Figura 14. Pruebas bioquímicas para la tipificación de <i>H. pylori</i>	40
Figura 15. Reacción en cadena de la polimerasa del gen <i>ure-A</i> de <i>H. pylori</i>	41
Figura 16. Extracto acuoso íntegro y fracciones primarias de <i>C. procera</i>	48
Figura 17. Perfil cromatográfico del extracto acuoso íntegro y de sus fracciones primarias	48
Figura 18. Curva de actividad anti- <i>H. pylori</i> del extracto acuoso íntegro y fracciones primarias de <i>C. procera</i>	49
Figura 19. Cromatografía en capa fina de las fracciones secundarias de CPA1	53
Figura 20. Cromatografía en capa fina de las fracciones secundarias de CPA2	54
Figura 21. Efecto gastroprotector del extracto acuoso CPA	58
Figura 22. Efecto gastroprotector de las fracciones primarias CPA1, CPA2 y CPA3	59

Figura 23. Efecto gastroprotector del extracto acuoso CPA en ratones pretratados con L-NAME, N-etilmaleimida o indometacina	61
Figura 24. Efecto antiinflamatorio del extracto acuoso CPA, de <i>C. procera</i>	64

I.2 Lista de Tablas

Tabla 1. Principales especies patógenas del género <i>Helicobacter</i>	5
Tabla 2. Métodos de detección de <i>H. pylori</i>	22
Tabla 3. Medicamentos empleados en la terapia de erradicación de <i>H. pylori</i>	24
Tabla 4. Rendimiento del extracto acuoso (CPA) y de las fracciones primarias	47
Tabla 5. Efecto del extracto acuoso integro y fracciones primarias de <i>C. procera</i> sobre <i>H. pylori</i>	50
Tabla 6. Efecto inhibitorio del crecimiento de <i>H. pylori</i> de las fracciones secundarias de CPA1	52
Tabla 7. Efecto inhibitorio del crecimiento de <i>H. pylori</i> de las fracciones secundarias de CPA2	53
Tabla 8. Toxicidad aguda del extracto acuoso CPA de <i>C. procera</i>	55

I. 3 Lista de Abreviaturas

%I	Por ciento de inhibición
A₆₀₀	Absorbancia a 600 nm
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A_f	Absorbencia final del cultivo
A_i	Absorbencia inicial del cultivo
AINE's	Antiinflamatorios no esteroideos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia

BabA2	Adhesina de unión al antígeno de los grupos sanguíneos A, B y O
CagA	Proteína asociada al gen A
CagA	Gen que codifica para la proteína CagA
cag PAI	Isla de patogenicidad <i>cag</i>
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CD4	Glicoproteína de tipo inmunoglobulina que se expresa en la superficie de algunas células T y células dendríticas.
CMHP	Consenso Mexicano sobre <i>Helicobacter pylori</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CPA	Extracto acuoso íntegro de <i>Cyrtocarpa procera</i>
CPA0	Fracción de diclorometano de <i>Cyrtocarpa procera</i>
CPA1	Fracción de acetato de etilo de <i>Cyrtocarpa procera</i>
CPA2	Fracción butanólica de <i>Cyrtocarpa procera</i>
CPA3	Fracción residual de <i>Cyrtocarpa procera</i>
Cit C	Citocromo C
DE₅₀	Dosis efectiva media
DEX	Dexametasona
DL₅₀	Dosis letal media
DMSO	Dimétil sulfóxido
G-C	Guanina-Citosina
<i>i.p.</i>	Administración intraperitoneal
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBP's	Inhibidores de la bomba de protones
IL	Interleucina
INDO	Indometacina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
INI	Instituto Nacional Indigenista
IU	Índice de úlcera
L-NAME	Ester metílico de la nitro l-arginina
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Tejido Linfoide Asociado a Mucosa
NEM	N-etilmaleimida

nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.o.	Administración oral
PBP's	Proteína de unión a penicilinas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rdrA	Gen que codifica para la nitrorreductasa
s.c.	Administración subcutánea
SabA	Adhesina de unión al ácido siálico
SSI	Solución salina isotónica
TPA	13-acetato del-12-o-tetradecanoil-forbol
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
Vac A	Citotoxina vacuolizante
VEH	Vehículo donde se disuelven los tratamientos
ΔA_{600}	Cambio de absorbancia a 600 nm
$\bar{x}A_c$	Valor promedio de absorbancia de los controles
$\bar{x}A_e$	Valor promedio de absorbancia de los experimentales

II. RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, que coloniza naturalmente a humanos. La bacteria reside primordialmente en la mucosa gástrica de más del 50% de la población mundial y es reconocida como el principal agente etiológico de la gastritis crónica activa o gastritis tipo B, úlcera péptica, carcinoma gástrico y del linfoma de MALT (Lee *et al.*, 2004). Aunque esta bacteria es un patógeno muy acertado para el hombre (Pinto-Santini *et al.*, 2009), alrededor del 80% de los individuos afectados viven con la bacteria durante toda su vida sin desarrollar alguna de las enfermedades (Torres *et al.*, 2000).

En la actualidad, el régimen de tratamiento recomendado a nivel mundial para combatir la infección por *H. pylori* es el uso de una terapia triple, la cual consiste en el empleo de dos antibióticos en combinación con un inhibidor de la secreción de ácido en el estómago (Malfertheiner *et al.*, 2007). Aunque esta terapia es efectiva en un 80% de los casos, existen varios problemas respecto a ella. En primer lugar, son tratamientos complejos que conllevan efectos secundarios perjudiciales (dolor de cabeza, náuseas, vómito, prurito), lo que hace que los pacientes no los terminen, permitiendo la aparición de resistencia a los antibióticos comerciales. Por otra parte, se presenta reincidencia de la enfermedad en pacientes que han tenido un tratamiento previo y siguen viviendo bajo las mismas condiciones en las que se infectaron y por último, el elevado costo del mismo que hace que no todos los pacientes diagnosticados puedan cumplirlo.

La fuente original de muchos fármacos han sido los productos naturales y en particular las plantas, es por esta razón que se ha buscado en ellas algún agente para el control de las enfermedades antes mencionadas estén o no relacionadas con la bacteria. Tomando en cuenta lo anterior, enfocamos nuestra atención en la corteza del árbol *Cyrtocarpa procera*, especie medicinal que se emplea popularmente para tratar trastornos del aparato digestivo (Argueta *et al.*, 1994) y que además es utilizada para adulterar a la del "cuachalalate" (*Amphipterygium adstringens*), una especie ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana para tratar enfermedades como la gastritis y las úlceras (Argueta *et al.*, 1994).

En este trabajo se decidió estudiar el extracto acuoso de *C. procera* ya que este tipo de preparaciones son las formas más frecuentes en la que se utiliza tradicionalmente esta corteza.

En primer lugar se evaluó la actividad anti-*H. pylori* del extracto acuoso íntegro (**CPA**) preparado por infusión. Los resultados obtenidos permitieron establecer una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 125 µg/mL utilizando la metodología de dilución en cultivo líquido con la cepa de referencia ATCC 43504 (Castillo-Juárez *et al.*, 2009). Posteriormente, se procedió al fraccionamiento primario de **CPA** mediante particiones líquido-líquido con disolventes de polaridad creciente [diclorometano (**CPA-0**); acetato de etilo (**CPA-1**); n-butanol (**CPA-2**) y el residuo acuoso (**CPA-3**)]. La evaluación antibacteriana de las fracciones primarias mostraron que **CPA-1** y **CPA-2** inhibieron el crecimiento de la bacteria (CMI de 125 µg/mL y 62.5 µg/mL, respectivamente), por lo que se procedió a su fraccionamiento secundario, sin embargo, solo algunas de las fracciones resultantes mantuvieron la actividad. En segunda instancia se determinó la toxicidad aguda de **CPA** mediante el cálculo de la dosis letal media (DL₅₀); utilizando el protocolo de Lorke. Los resultados indicaron que la DL₅₀ es >5,000mg/kg-r, lo que significa que **CPA** no es tóxico bajo el modelo utilizado.

Por otra parte, se evaluó la actividad gastroprotectora de **CPA**, determinando la dosis efectiva media (DE₅₀) en el modelo de gastroprotección mediante el método de úlcera aguda inducida con etanol absoluto en ratón (Bucciarelli *et al.*, 2007). Los resultados mostraron que **CPA** tiene buena actividad gastroprotectora (DE₅₀= 11.30 mg/kg).

Finalmente, se ensayó la actividad antiinflamatoria mediante el modelo de edema agudo inducido por **13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA)** en oreja de ratón y los resultados mostraron que **CPA** tiene propiedades antiinflamatorias moderadas.

En conclusión, **CPA** tiene buena actividad anti-*H. pylori* y gastroprotectora; y por otra parte, demostró su seguridad en el modelo ensayado. Finalmente, la fracción primaria butanólica **CPA2** tiene un buen potencial para la obtención de compuestos con actividad anti-*H. pylori*.

III. INTRODUCCIÓN

III.1.1 Generalidades

En 1893, el anatomista italiano Guilio Bizzozero fue el primero en describir la presencia de microorganismos en forma de espiral en biopsias obtenidas de estómagos de perros; de igual forma fue el primero que, a través de sus observaciones de la mucosa antral de estos animales, divulgó y demostró que dichos organismos Gram-negativos, habitaban en las glándulas gástricas e incluso en los pequeños canalículos de las células parietales (Bizzozero, 1893). Sin embargo, no fue sino hasta 1983 cuando los investigadores australianos Barry Marshall y Robin Warren pudieron aislar a una bacteria a partir de una biopsia gástrica de un paciente con gastritis crónica activa. Para demostrar su carácter patológico realizaron experimentos de autoingestión de cultivos, con los que encontraron que se cumplían los postulados de Koch; y que el daño producido por el microorganismo se revertía al eliminarlo con el uso de antibióticos (Marshall y Warren, 1984; van Ámsterdam, 2006). Esta bacteria fue nombrada *Helicobacter pylori* por su apariencia de hélice *in vivo* y su sitio más común de aislamiento, el píloro del estómago (Goodwin *et al.*, 1990).

En 1994, el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América declara a *H. pylori* como el principal agente etiológico de la úlcera péptica y en este mismo año, la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la declara como un carcinógeno del grupo 1 (NIH, 1994; IARC, 1994). Finalmente, en el año 2005, Robin Warren y Barry Marshall fueron galardonados con el premio Nobel de fisiología o medicina por el descubrimiento de la bacteria *H. pylori* y su papel en la gastritis y la úlcera péptica (Fig.1).



Fig.1. Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2005, Robin Warren (izquierda) y Barry Marshall (derecha) (<http://research.ncku.edu.tw/re/commentary/e/20080321/1.html>, consultado el 4 de junio del 2012).

III.1.2 Taxonomía

A partir de que Marshall y Warren lograron aislar por primera vez a esta bacteria de la mucosa gástrica, se marcó un punto crucial para el entendimiento de las enfermedades microbianas gastrointestinales (Marshall y Warren, 1984).

Las primeras descripciones de esta bacteria fueron hechas al observar bacilos curvos o espirales en secciones histológicas de biopsias de la mucosa gástrica antral de humanos. En un principio, la bacteria se incluyó dentro del género *Campylobacter* por algunas características como su morfología curvada, el crecimiento en medios ricos y condiciones microaerófilas, su incapacidad para fermentar glucosa, la sensibilidad al metronidazol y el contenido G-C de su DNA (34%), por lo que en 1985 se validó el nombre de *Campylobacter pyloridis*. Dos años más tarde, el epíteto fue revisado y corregido quedando como *Campylobacter pylori* (Marshall y Goodwin, 1987).

Posteriormente, estudios de microscopía electrónica mostraron que tenía múltiples flagelos unipolares, en contraste con los típicos flagelos bipolares de *Campylobacter spp.* Los estudios bioquímicos indicaron diferencias en el tipo de proteínas y ácidos grasos además de que el análisis de la secuencia de ARNr 16s mostró que la distancia era suficiente para excluir a la bacteria de este género y crear uno nuevo: *Helicobacter*, cuyo primer miembro fue *H. pylori* (Goodwin *et al.*, 1985., 1989; Pearson *et al.*, 1984; Romaniuk *et al.*, 1987).

Actualmente el género *Helicobacter* se compone de 23 especies validadas y 2 candidatos propuestos las cuales fueron designadas por el Comité Internacional de Sistemática Bacteriológica (Solnick *et al.*, 2001; Don *et al.*, 2005; Garrity *et al.*, 2004).

III.1.3 Morfología

H. pylori es una bacteria Gram negativa, polimórfica, aunque la forma curvada es la que predomina cuando la bacteria se encuentra en condiciones óptimas de crecimiento, mide de 2 a 4 μm de largo y 0.5 a 1 μm de ancho (Fig. 2). Puede presentar la forma cocoide cuando es inducida a condiciones de estrés como alta temperatura, pH alcalino, aumento en la tensión de oxígeno (O_2), cultivo prolongado o la presencia de antibióticos. Actualmente existe la controversia sobre si estas formas son viables o no y se plantea que pueda ser un mecanismo de resistencia, así como de transmisión de la bacteria (O'Rourke y Bode, 2001). Presenta de 2 a 6 flagelos unipolares de 3 μm de longitud aproximadamente, que llevan un bulbo distintivo en el extremo; estos flagelos le confieren motilidad y permiten el movimiento rápido en soluciones viscosas tales como la capa del moco que cubre las células epiteliales gástricas (Jones *et al.*, 1987; Kusters *et al.*, 2006) facilitando así la colonización en el estómago (Eaton *et al.*, 1992).

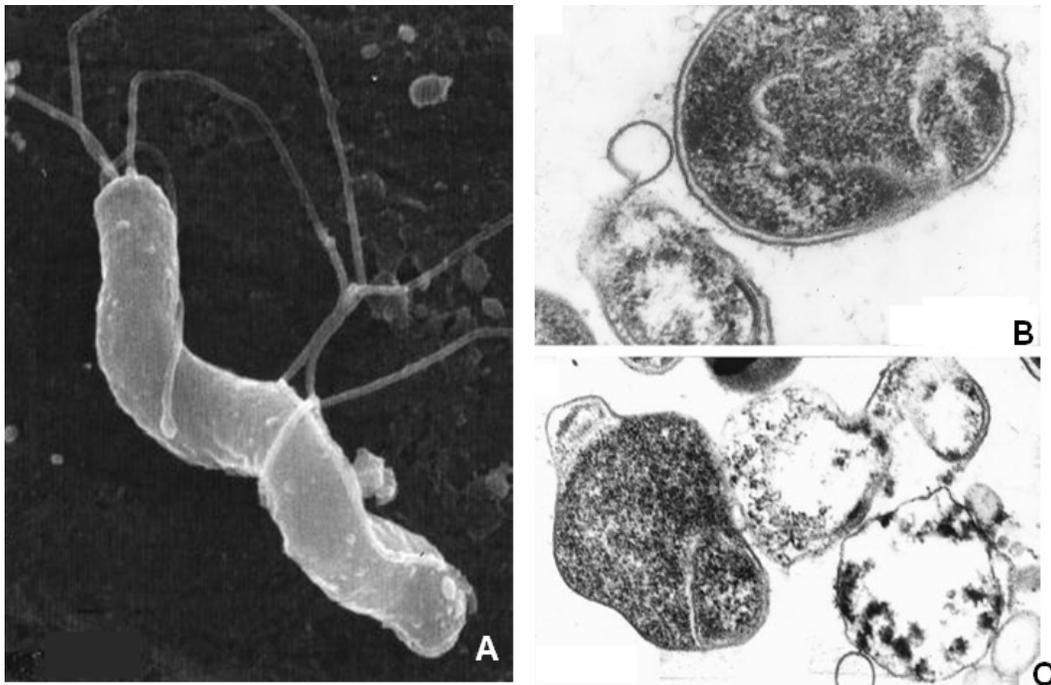


Figura 2. Micrografías donde se muestra la morfología de *H. pylori*. a) Morfología clásica en forma de “S”; b) Formación inicial de las formas cocoides; c) Conversión a la forma cocoide. (Tomadas de O'Rourke y Bode, 2001).

III.1.4 Hábitat

En cortes histológicos de estómago humano la bacteria presenta una forma bacilar, coloniza la capa del moco que cubre el epitelio gástrico humano, específicamente en el píloro y antro, donde está expuesta a gradientes de pH en un intervalo de 2 a 7 (Kusters *et al.*, 2006). Aunque el hospedero natural es el humano, se ha visto que habita en otros animales, en los que se encuentran ciertos grupos de monos, así como en perros y gatos (Fox y Lee, 1997). También existen publicaciones en las que se ha reportado que la bacteria es capaz de colonizar y producir gastritis, úlcera y cáncer gástrico en modelos animales utilizando ratones, cerdos, monos, jerbos, gatos y cobayos (Ferrero y Fox, 2001). En condiciones de laboratorio requiere de medios artificiales ricos en nutrientes como peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, suplementados con sangre y suero fetal bovino. También necesita de condiciones microaerófilas con una concentración de 10% de CO₂ y alrededor de 5% O₂. Es de lento crecimiento (de 3-7 días) y en medios sólidos las colonias son pequeñas y translúcidas (Dehesa, 1993).

III.1.5 Especies patógenas de *Helicobacter*

Además de *H. pylori*, existen otras especies del género *Helicobacter* que ocupan de hospedero natural al humano, como son *H. heilmannii*, *H. pullorum*, *H. rappini*, *H. fennelliae*, *H. cinaedi* que causan enfermedades diferentes a las relacionadas con *H. pylori* como son hepatitis, hepatocarcinomas, proctitis, colitis y necrosis hepática (Fox y Lee, 1997). Las especies de *Helicobacter* se subdividen en dos grupos:

- Las especies **gástricas**, que no pueden colonizar el intestino o hígado (Solnick y Schauer, 2001).
- Las especies **enterohepáticas** que sí lo hacen y que habitan la parte baja del tracto gastrointestinal, incluyendo íleon, colon y árbol biliar de humanos, asociándose con inflamación crónica e hiperproliferación de células epiteliales (Kuster *et al.*, 2006) (Tabla 1).

III.1.6 Modo de transmisión y reservorios

La infección por *H. pylori* se lleva a cabo durante la niñez y es la madre principalmente la que infecta al hijo durante los primeros años de vida, aunque también se puede dar por el contacto con otras personas y a otras edades. Se plantea que en estas primeras etapas de la infección es cuando la bacteria puede ser eliminada por el hospedero ya que apenas comienza a establecerse en la mucosa gástrica (Malaty *et al.*, 2000). Algunos estudios han propuesto que la adquisición de la bacteria se produce a través de una fuente ambiental común, en particular los animales y el agua han sido implicados como posibles fuentes infección (Mitchell, 2001). También se ha observado por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que las heces de las moscas caseras contienen a la bacteria, por lo que podrían actuar como reservorios y como vectores importantes para la transmisión (Argyros *et al.*, 2000).

Tabla 1. Principales especies patógenas del género *Helicobacter*

Especies Gástricas	Hospedero	Patología
<i>H. pylori</i> ¹	Humano, primates	Gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico, linfoma de MALT.
<i>H. felis</i> ¹	Perro, gato, ratón	Gastritis en hospedero natural; úlcera péptica o adenocarcinoma gástrico en ratón.
<i>H. mustelae</i> ¹	hurón	Gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico, linfoma de MALT.
<i>H. acinonychis</i> ¹	Tigre, guepardo, otros gatos de gran tamaño	Gastritis, úlcera péptica
<i>H. heilmannii</i> ¹	Humano, perro, gato, mono, guepardo, rata	Gastritis, síntomas de dispépticos, linfoma de MALT.
Especies Enterohepáticas	Hospedero	Patología
<i>H. hepaticus</i> ¹	Ratón, otros roedores	Tiflocolitis proliferativa, hepatitis, carcinoma hepatocelular.
<i>H. aurati</i> ²	roedores	Gastritis crónica y metaplasia intestinal.
<i>H. canadensis</i> ²	humano	Diarrea.
<i>H. bilis</i> ²	Ratón, perro, cerdo, humano	Hepatitis.
<i>H. canis</i> ²	Perro, humano	Hepatitis y diarrea.

1) Kuster *et al.*, 2006; 2) Hannula y Hänninen, 2007.

Por otra parte, se ha sugerido que la infección se da como consecuencia de transmisión directa de persona a persona por tres vías, la gástrico-oral, oral-oral y fecal-oral (Malaty *et al.*, 2000; Mitchell, 2001):

- Vía gastro-oral: el reflujo gastroesofágico, así como los vómitos en los niños, pueden ser vehículos de transmisión para la bacteria (Varoli *et al.*, 1991; Leung *et al.*, 1999).
- Vía oral-oral: ya que se ha detectado el ADN de la bacteria en placas dentales y saliva por la técnica de PCR (Cellini *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 1993).
- Vía fecal-oral: se ha aislado ADN de *H. pylori* en heces (Thomas *et al.*, 1992; Queralt *et al.*, 2005). Algunos investigadores afirman que esta es la principal vía de transmisión de la bacteria, en similitud con otros patógenos conocidos que se transmiten por vía fecal-oral (Lee *et al.*, 1991).

III.1.7 Epidemiología

La prevalencia de la infección por *H. pylori* muestra una gran variación geográfica. En el caso de los países en desarrollo, más del 80% de la población está infectado con *H. pylori*, presentándose a temprana edad (Pérez-Pérez *et al.*, 2004), mientras que este valor en países industrializados es de alrededor del 40% y es considerablemente menor en niños y adolescentes que en adultos y personas mayores (Pounder y Ng, 1995; Mitchell, 2001). Aún con este alto porcentaje, alrededor del 20% de las personas infectadas con la bacteria desarrolla alguna de las enfermedades y la patogénesis de la bacteria depende de la virulencia de la cepa, la susceptibilidad genética del hospedero y factores ambientales (Atherton, 2009).

La prevalencia de este microorganismo se correlaciona con el nivel socioeconómico, principalmente con las condiciones de vida durante la infancia, higiene y saneamiento, ya que en países desarrollados, *H. pylori* no parece ser adquirida del ambiente (Malaty y Graham, 2000; Marshall, 2002).

En **México**, la infección también se adquiere a edades tempranas, la seroprevalencia estimada es de 20% en niños de un año de edad alcanzando

un 80% en adultos jóvenes entre 18 y 20 años de edad, con una tasa de incremento del 5% anual durante los primeros 10 años de vida (Torres *et al.*, 2005). Dos estudios independientes referentes a países en desarrollo reportan que la reinfección en México después de erradicar la bacteria, es del 3.2% al año (Leal-Herrera *et al.*, 2003; Soto *et al.*, 2003). Esos resultados podrían reflejar la alta exposición de los pacientes a múltiples factores de infección después de erradicar a *H. pylori* en este tipo de países (Pérez-Pérez *et al.*, 2004). Se relaciona la frecuencia de la bacteria con el 85 al 90% de las úlceras pépticas y más del 90%, con el cáncer gástrico y se señala al adenocarcinoma gástrico como la neoplasia más frecuente del aparato digestivo con tasas de letalidad muy altas en algunos estados de la República (Torres *et al.*, 2005). En cambio, en países como Estados Unidos, la incidencia anual de infección es del 0.5% al 1% en individuos menores de 10 años y la infección aumenta hasta en un 50% en los adultos (Everhart *et al.*, 2000). Así, en contraste con informes de otros países, en México, la incidencia de cáncer gástrico va en incremento (Torres *et al.*, 2005).

En México, Torres y colaboradores, en el año de 1998, determinaron una seroprevalencia del 70% para *H. pylori* en una muestra de 11,605 personas de entre 1 y 90 años de edad, procedente de todo el país y correlacionaron estos datos con la tasa de mortalidad de cáncer gástrico. Con los resultados obtenidos fue posible dividir al país en cuatro grupos como se indica en la Fig. 3. En 4 estados de la República (Aguascalientes, Quintana Roo, Tabasco y Tlaxcala) se presenta el índice de mortalidad por cáncer gástrico más bajo (<4%), pero se encuentra el índice más alto de infección por *H. pylori* (70%). Por otro lado, 8 estados (Baja California Sur, Chiapas, Coahuila, Guerrero, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Yucatán y Zacatecas) tienen el índice de mortalidad más alta por cáncer gástrico ($\geq 6.0\%$) con una seroprevalencia del 66%.

Los autores indican que estos datos se podrían correlacionar de manera general con el desarrollo económico, los estados del norte tienen un índice más alto de mortalidad por cáncer gástrico que aquellos del sur, que tienen el desarrollo económico más bajo (Torres *et al.*, 2005).

Por otra parte, en el III Consenso Mexicano sobre *H. pylori* se identificó que se presenta infección por esta bacteria en el 90% de personas con cáncer

gástrico, en el 85-90% de sujetos con úlcera péptica y en el 51-80% de enfermos con dispepsia funcional (Sobrino, 2007).

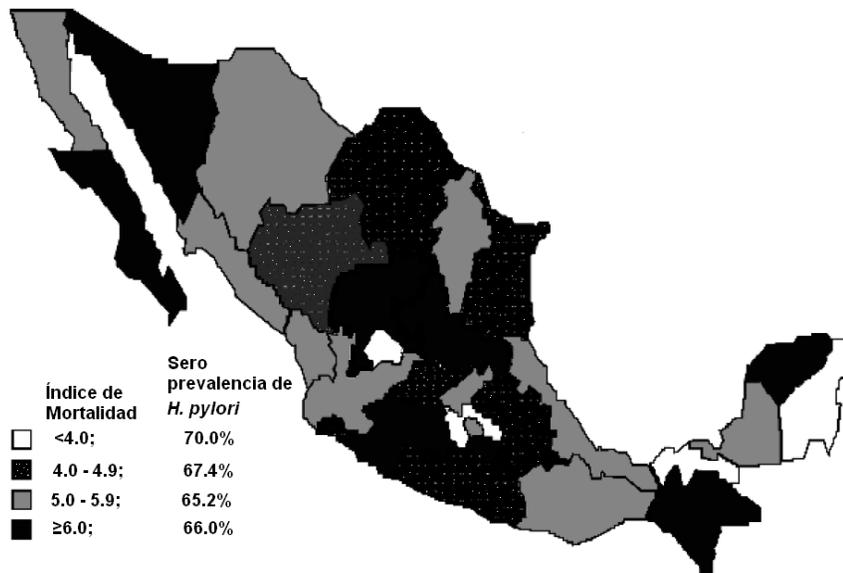


Fig. 3. Análisis de la distribución de proporciones de mortalidad de cáncer gástrico y la seroprevalencia de *H. pylori* en los 32 estados de México. Las proporciones de mortalidad de cáncer gástrico son aquellos informados por el INEGI, México (1991), considerando que los valores de seroprevalencia son de 1987 a 1988 en un estudio nacional. Tomado y modificado de Torres *et al.*, 2005.

En el año 2005, el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) registró a los tumores malignos como la tercera causa de muerte en México, de los cuales el cáncer de estómago ocupó la tercer causa de muerte en varones con una tasa de mortalidad de 9.1%, mientras en las mujeres fue la cuarta causa de muerte por tumores malignos con una tasa de mortalidad de 7.8%.

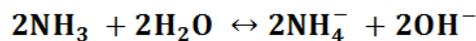
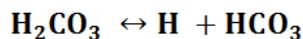
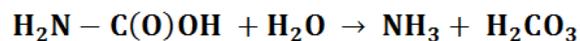
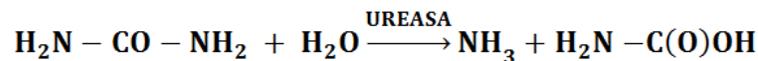
(<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf>, consultado el 4 de junio del 2012).

III.1.8 Mecanismos de virulencia.

Son varios los mecanismos de virulencia mediante los cuales *H. pylori* puede permanecer en un ambiente hostil como el gástrico y de esa forma adaptarse y colonizar la mucosa gástrica, provocar daño al tejido y sobrevivir; en donde al parecer el tipo de cepa bacteriana está estrechamente relacionado en el desarrollo de la enfermedad. Se puede entender como un factor de virulencia a todos aquellos mecanismos que le permiten a la bacteria colonizar la mucosa gástrica, sobrevivir en el ambiente ácido del estómago y evadir la respuesta inmune del huésped (Arévalo *et al.*, 2009). En términos generales se pueden subdividir en: a) *factores de colonización gástrica*, b) *factores involucrados en la inflamación y daño al tejido gástrico* y c) *factores de sobrevivencia* (Percival *et al.*, 2001).

De los principales factores de colonización (Fig. 4) se encuentran:

- Los flagelos, que le permiten tener movimiento en la capa de moco para colonizar la mucosa gástrica;
- La ureasa, una enzima que se encuentra tanto en el citosol como en la superficie de la bacteria, es de vital importancia para neutralizar el pH ácido del estómago y generar un ambiente idóneo para la bacteria, ya que cataliza la hidrólisis de urea para proporcionar amonio y carbamato, que a su vez se descompone para producir amonio y ácido carbónico, los cuales, en soluciones acuosas están en equilibrio en sus formas ionizadas. El efecto neto de esta reacción causa un incremento de pH, generando un ambiente neutro alrededor de la bacteria (Moblely, 2001), enseguida se muestra la reacción global de la hidrólisis de urea catalizada por la enzima ureasa de *H. pylori*:



➤ Las adhesinas, proteínas que le permiten anclarse al epitelio gástrico y las proteínas de choque térmico, que están involucradas en procesos de reparación en condiciones de estrés (Evans *et al.*, 1992; Mazari-Hirart *et al.*, 2001; Kusters, 2006). Se han estudiado con detalle dos adhesinas de *H. pylori*: la adhesina A (BabA2), de unión al antígeno de los grupos sanguíneos A, B y O (Aspholm-Hurting *et al.*, 2004; Ilver *et al.*, 1998) y la adhesina de unión al ácido siálico, SabA (Ilver *et al.*, 1998; Mahdavi *et al.*, 2002). BabA2 es una proteína de membrana externa que interactúa con el antígeno del grupo sanguíneo de Lewis^b, en las células epiteliales y está asociada con el riesgo de úlcera péptica y de cáncer gástrico y su ausencia se relaciona con formas no complicadas de gastritis (Gerhard *et al.*, 1999; Prinz *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha reportado que las proteínas de membrana externa AlpA y AlpB son necesarias para la adherencia antígeno-independiente de Lewis^b a las células de la línea de carcinoma gástrico Kato III y al tejido gástrico. La adherencia también está mediada por HopZ, ya que se ha visto que las cepas mutantes en *hopZ* han reducido su adherencia (Guruge *et al.*, 1998).

AlpA, AlpB, BabA y HopZ pertenecen a una gran familia de 32 proteínas de membrana externa (PMEs). El hecho de que las cuatro proteínas estén involucradas en la adherencia sugiere que la familia entera de proteínas puede tener un papel en este proceso (Mobley *et al.*, 2001).

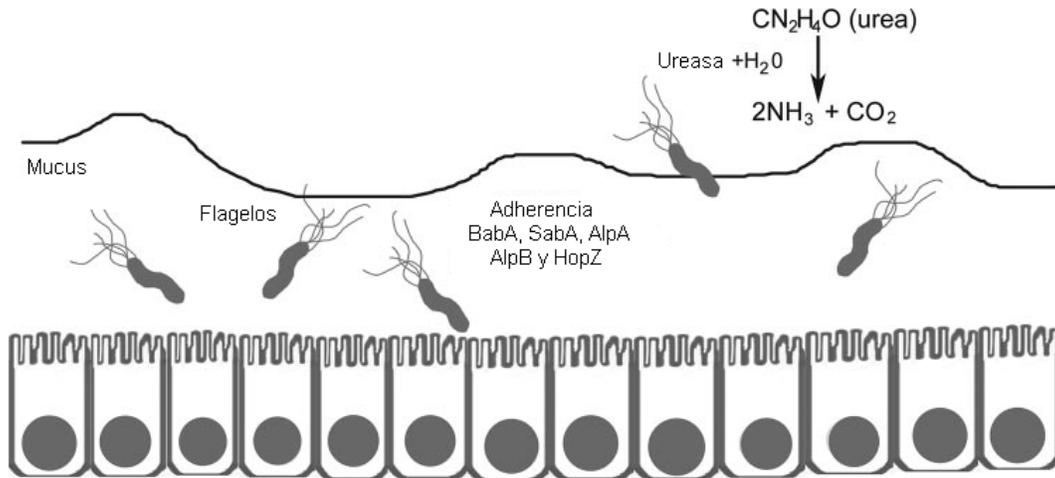


Fig. 4. Factores de colonización de la bacteria *H. pylori*. La ureasa contribuye en la resistencia al medio ácido, los flagelos permiten la movilidad y la penetración a la mucosa gástrica y algunas proteínas como BabA, SabA, AlpA, AlpB y HopZ, permiten la adhesión de la bacteria a las células epiteliales. (Tomado de Holly *et al.*, 2006).

Dentro de los factores de la bacteria que están involucrados en la inflamación y daño al epitelio gástrico, podemos mencionar a la citotoxina vacuolizante (VacA), la cual produce vacuolas en el epitelio gástrico conduciendo a la destrucción de la mucosa y está frecuentemente en aquellos pacientes con úlcera péptica, además de estar fuertemente ligada con el cáncer gástrico (Xiang *et al.*, 1995). Algunos de los mecanismos de acción propuestos son:

1. Una vez secretada Vac-A, se une a la superficie de células epiteliales a través de receptores de unión no específicos y específicos, por ejemplo, a Ptpz que pueden modular la señalización celular.
2. Unido a la membrana celular aumenta la permeabilidad celular formando poros provocando la salida de nutrientes
3. Después de la endocitosis de Vac-A, se induce la formación de grandes vacuolas en el citoplasma de células epiteliales que se originan a nivel perinuclear y terminan llenando el citosol,
4. Vac-A también induce la apoptosis, en parte por la formación de poros en la membrana mitocondrial,
5. Por último, Vac-A tiene efectos supresores sobre la función celular inmune. (Ver Fig. 5).

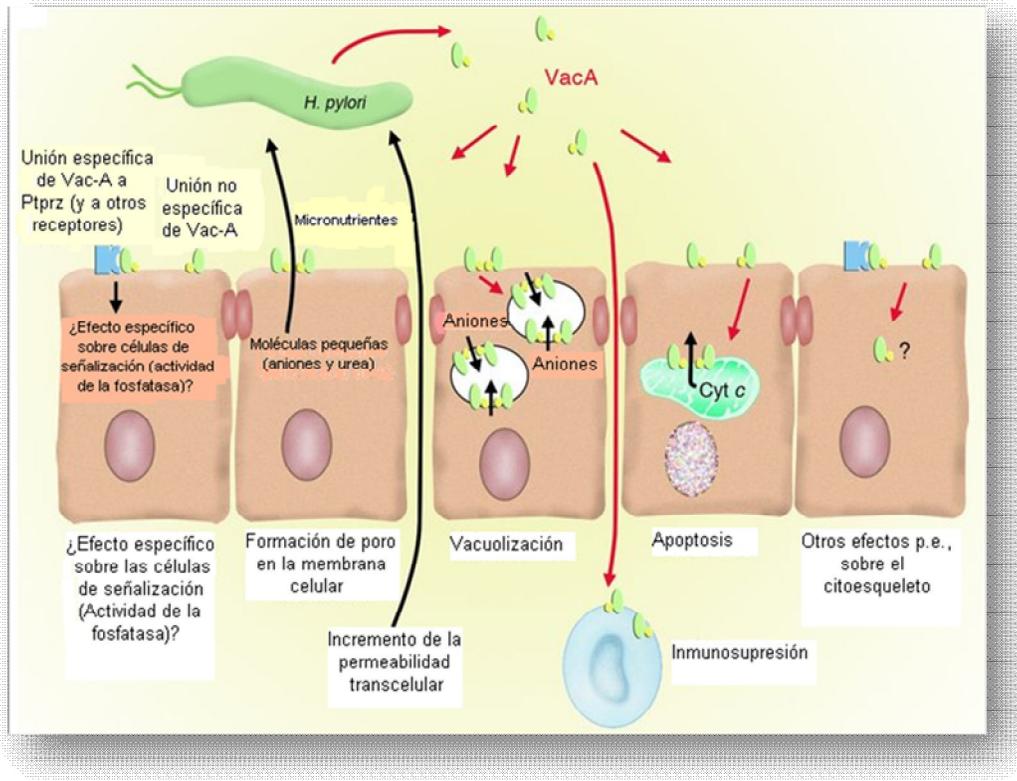


Fig. 5. Actividades biológicas de la citotoxina vacuolizante Vac-A de *H. pylori*. (Tomado y modificado de Blaser *et al.*, 2004).

Por otro lado los lipopolisacáridos (**LPS**) juegan un papel muy importante en la inflamación a través de la inducción de la respuesta inmune, vía CD4 leucocítica. De manera adicional, algunos autores proponen que la presencia de las enzimas fosfolipasa A2 y alcohol deshidrogenasa son responsables directas del daño a la mucosa gástrica, en parte por dañar a los fosfolípidos de la membrana que le proporcionan integridad (Langton *et al.*, 1992; Roine *et al.*, 1992). Se ha visto que la ureasa induce fuertemente la aparición de macrófagos al producir especies reactivas de oxígeno y citocinas proinflamatorias como son IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α (Sawai *et al.*, 1999; Ogura *et al.*, 2000). En la mayoría de las cepas de *H. pylori* los antígenos-O de los LPS expresan los carbohidratos de Lewis x (Le^x), Lewis a (Le^a), tipo H-1, antígeno-i, sialil Le^x y grupo sanguíneo A (Monteiro *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2003).

Los antígenos de Lewis también se expresan en las células epiteliales. Los carbohidratos de los LPS son similares a los antígenos de los grupos

sanguíneos. La cadena-O específica de los LPS se mimetiza en su estructura con los antígenos de Lewis del grupo sanguíneo humano (Moran, 1997). Es posible que el fenotipo del antígeno de Lewis de una cepa de *H. pylori* sea igual al que se encuentra presente en las células de la mucosa gástrica del hospedero (Appelmelk *et al.*, 2000), lo que permite que la bacteria pueda evadir la respuesta inmune (Moran, 1996) y esta similitud puede llevar a una respuesta autoinmune por parte del hospedero contra sus propias células gástricas (Appelmelk *et al.*, 2000).

Todos los factores mencionados son importantes en el daño, pero se plantea que el factor determinante en la patogenicidad de la bacteria, está dado por un conjunto de genes que constituyen una isla de patogenicidad (*cag* PAI), con un elevado polimorfismo y que codifica para varias proteínas, entre ellas el sistema de secreción tipo IV, que utiliza *H. pylori* para inyectar la proteína **CagA** (proteína asociada al gen *cag A*) a las células epiteliales gástricas (Kusters *et al.*, 2006). Aproximadamente el 60% de los aislados clínicos de *H. pylori* producen proteínas codificadas por esta isla, la mejor caracterizada hasta el momento es **CagA**. Aunque aun la función de esta proteína no está completamente comprendida, se considera que es altamente inmunogénica, así como un marcador de virulencia (Hacker *et al.*, 1997; Covacci *et al.*, 1993). Los demás genes de la isla están involucrados en la fosforilación de tirosinas para la internalización de **CagA** en las células epiteliales gástricas, así como en la inducción del proceso inflamatorio (Ogura *et al.*, 2000; Morales, 2000). Las cepas de *H. pylori* *cagA*⁺ inducen la secreción de interleucina-8 (IL-8) un mediador inflamatorio, que contribuye al reclutamiento local de neutrófilos y a la activación de macrófagos (Harris *et al.*, 1997).

Los pacientes infectados con cepas que portan el gen *cagA* y expresan la proteína **CagA** se les ha asociado con el desarrollo de gastritis crónica activa, gastritis atrófica, úlcera péptica y un aumento en el riesgo de desarrollar adenocarcinoma o linfoma gástrico (Higashi *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 1998).

Dentro de los **factores de sobrevivencia**, la bacteria posee a las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, ambas previenen la fagocitosis (Hazell *et al.*, 1991; Spigelhalter *et al.*, 1993). También, se encuentran las formas cocoides, las cuales se presentan en cultivos viejos o cuando las

condiciones del medio son desfavorables para la bacteria. Aunque se discute mucho acerca de su viabilidad, estas estructuras podrían darle una ventaja para permanecer en un estado de latencia, del cual podría salir cuando las condiciones vuelven a ser favorables. Se ha reportado que la forma cocoide es capaz de reinfectar ratones, por lo que podría también ser un medio de transmisión (Wang *et al*, 1997).

III.1.9 Patologías

Dentro de las patologías o enfermedades más frecuentemente asociadas con la infección por *H. pylori* están la gastritis crónica activa, la úlcera gástrica y duodenal y ciertos tipos de cánceres. A continuación se describe la participación de la bacteria en cada patología y sus características:

Gastritis y úlceras.

La gastritis se puede clasificar de acuerdo a varios criterios y por la combinación de los mismos según el Sistema Sidney (Price, 1991), el cual define la atrofia como la pérdida de tejido glandular que lleva a adelgazamiento de la mucosa y es común denominador a todos los procesos patológicos que causa daño mucoso intenso. El sistema Sidney es empleado ampliamente en la práctica común del servicio de patología del Hospital de especialidades, Centro Médico Nacional La Raza, Distrito Federal, México, para hacer el diagnóstico histopatológico, incluyendo la evaluación de la atrofia gástrica (Ramírez-Mendoza *et al.*, 2008), pero para el caso de la patología desarrollada por *H. pylori*, solo consideramos las gastritis agudas y crónicas.

Gastritis aguda.

Producida por varios factores como son *H. pylori*, autoinmunidad, reflujo biliar, fármacos y sustancias tóxicas, e incluye procesos inflamatorios en la mucosa y submucosa. En el caso de la producida por la colonización por *H. pylori* se puede asociar con náuseas, vómitos y con la inflamación de la

mucosa proximal y distal del estómago. La fase aguda esta también ligada a hipoclorhidria, que puede durar meses (Kusters *et al.*, 2006).

Cuando se ingiere *H. pylori*, esta penetra a través de la capa de mucosa del estómago y se multiplica en proximidad cercana a las células epiteliales (Dixon, 2001). Primero coloniza el antro (Fig. 6), debido a que no existen células parietales que secreten ácido (Gur *et al.*, 1999; Innocenti *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1995). En esta fase inicial aguda de la infección existe una intensa proliferación de la bacteria e inflamación gástrica que es disparada por componentes de la membrana externa de la bacteria como los lipopolisacáridos (LPS) que inducen la producción de las citocinas, interleucina 8 (IL-8) y la relacionada al crecimiento GRO α (Actividad Estimuladora del Crecimiento de Melanoma \square), las cuales promueven el influjo de neutrófilos a la mucosa gástrica infectada (Innocenti *et al.*, 2001). Cuando la bacteria empieza a colonizar la mucosa gástrica, el huésped presenta en general dos mecanismos de defensa; uno inflamatorio en la fase aguda y uno inmune (folicular) en la crónica. En la fase aguda, *H. pylori* penetra a la capa mucosa del estómago, principalmente en las faveolas y muy cerca de la superficie del epitelio (Fig. 6). El epitelio responde a la infección con depleción de mucinas, exfoliación celular y con cambios regenerativos compensatorios, además, comienzan a presentarse células del sistema inmune como polimorfonucleares dentro de las faveolas y lámina propia. Esta fase es acompañada por hipoclorhidria, así como de una disminución del ácido ascórbico en el jugo gástrico. Se ha visto que esta fase esta mediada por la liberación de lipopolisacáridos bacterianos que penetran por el epitelio dañado, induciendo la migración de los polimorfonucleares. Esto va acompañado de otros productos bacterianos que liberan diversos mediadores inflamatorios que incrementan la permeabilidad vascular. (Dixon, 2001).

Esta fase es de vida corta y en una pequeña parte de la población, particularmente en los niños, la bacteria puede ser controlada espontáneamente y la morfología del estómago retornar a su normalidad. Sin embargo, en la mayor parte de las personas, la respuesta inmune del hospedero es incapaz de eliminar la infección y en tres o cuatro semanas se manifiesta la acumulación de células inflamatorias, para dar origen a una gastritis crónica activa (Dixon, 2001).

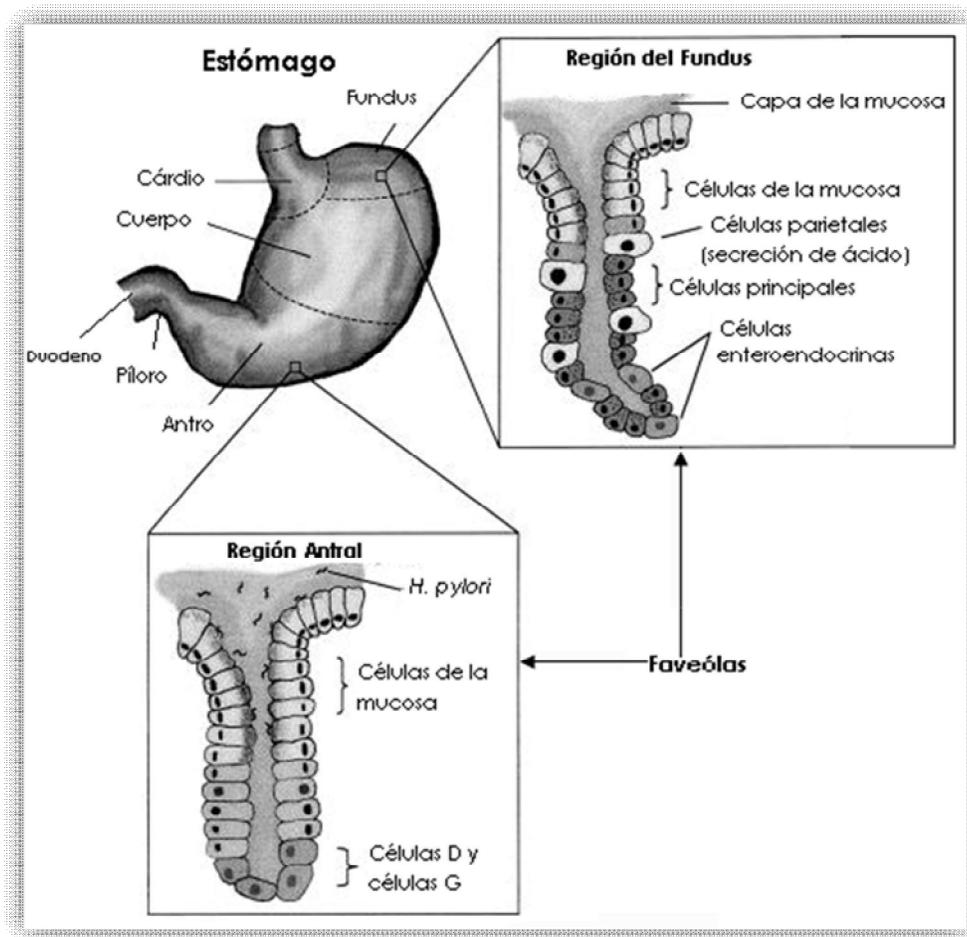


Fig. 6. Representación esquemática de la estructura gástrica. El estómago se divide en cinco regiones: cardio, fundus, cuerpo, antro y píloro. El epitelio gástrico está recubierto por una capa protectora de moco secretado por células epiteliales especializadas. Las faveolas contienen varios tipos de células, incluyendo las células secretoras de moco. La colonización por *H. pylori* se limita en gran medida al antro, que carece de secreción de ácido por las células parietales (Tomado de Testerman *et al.*, 2001).

Gastritis crónica.

Se caracteriza por el incremento de células linfoides y plasmáticas en la mucosa como respuesta a la gran producción de citocinas. La proliferación de células B y su subsiguiente diferenciación en células plasmáticas, producen la síntesis de IgM y anticuerpos que amplifican la reacción inflamatoria. La consistente presencia de *H. pylori*, hace que aparezca una segunda línea de defensa de las células B, las cuales se presentan en forma de folículos linfoides con la producción de células plasmáticas y la síntesis de IgA. Cuando llega a

este nivel la respuesta inmune es insuficiente para erradicar a la bacteria en la mayoría de los casos y si la aparición de los folículos linfoides continua, ya se habla de una gastritis crónica activa. La adquisición de tejido linfoide organizado en la mucosa gástrica constituye lo que se denomina MALT (del inglés mucosa-associated lymphoid tissue) (Dixon, 2001). La infección crónica afecta la liberación de gastrina y en consecuencia, la secreción de ácido clorhídrico (Gur *et al.*, 1999). El mecanismo que conduce a una exagerada secreción de gastrina en la infección crónica por *H. pylori* no es muy claro; una posibilidad es que la generación de amonio por la ureasa de *H. pylori* crea un ambiente alcalino en la vecindad de las células G, que pueden estimular la liberación de gastrina (Mckoll, 1992). Aproximadamente el 90% de las personas con gastritis crónica activa están infectadas con *H. pylori* (Nagorni, 2000).

Gastritis crónica atrófica.

Consiste en la alteración de la estructura y pérdida del tejido glandular, esto provoca que se deje de producir moco y sustancias elementales para mantener la funcionalidad de la mucosa y se empiezan a formar úlceras (Logan y Walker, 2001). Las personas infectadas que no han presentado síntomas asociados en la mayoría de los casos, la consecuencia final es una inflamación crónica asintomática que eventualmente progresa a gastritis crónica atrófica. La gastritis crónica atrófica asociada con la infección por *H. pylori* comúnmente es un proceso multifocal que involucra el antro y el cuerpo gástricos. La gastritis crónica atrófica es una lesión premaligna, en donde la mucosa sufre alteraciones progresivas ligadas a un estado inflamatorio crónico, hay adelgazamiento de la mucosa (Correa, 1992; Correa *et al.*, 1994) y pérdida de células glandulares gástricas (Fig. 6) (Correa, 1992; Correa *et al.*, 1994; Dixon, M. 2001), después de la pérdida de las glándulas (se deja de secretar moco y sustancias elementales importantes en la función de la mucosa) puede presentarse erosión o ulceración de la mucosa (Dixon, 2001). La atrofia de la mucosa gástrica es el último paso del proceso crónico (Correa, 1992; Correa *et al.*, 1994), es una lesión que se encuentra presente en el 90% de los cánceres gástricos (Kato *et al.*, 1992).

Úlceras.

Las úlceras consisten en una rotura de la mucosa (Fig. 7) que protege al estómago de la acción del ácido y de las enzimas, sobrepasando la submucosa o *muscularis mucosae* y pueden presentarse en la curvatura menor del estómago o en el duodeno. La infección por *H. pylori* es la causa más común de las úlceras gástricas y duodenales. El riesgo de desarrollar úlceras entre las personas infectadas con *H. pylori* es del 10-15% (Logan y Walker, 2001), normalmente la bacteria no coloniza el duodeno, pero en los pacientes con hiperclorhidria, el ácido llega al duodeno y las células intestinales son reemplazadas por células gástricas que permiten la colonización por *H. pylori* (Cover y Blaser, 1996; Godoy *et al.*, 2003). *H. pylori* es la responsable del 85% de las úlceras gástricas y del 95% de las duodenales (Dixon, 1994; Kuipers *et al.*, 1995; Ferlay *et al.*, 2004).

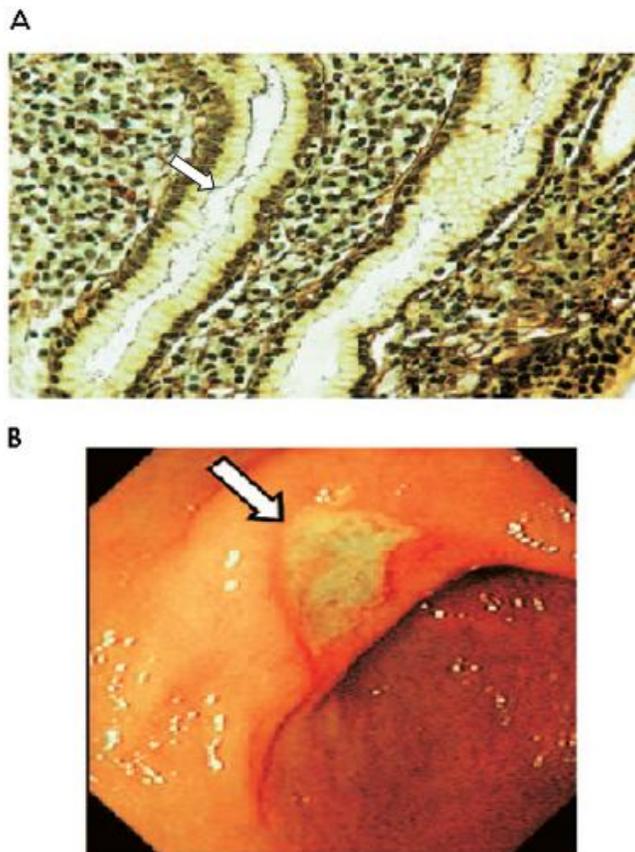


Fig. 7. (A) Glándulas gástricas colonizadas abundantemente con *H. pylori*, mostrado como bacilos curvo negros alineados cerca de la superficie de la mucosa, (B) imagen endoscópica de una úlcera gástrica, con una base blanca. (Tomado de Kusters *et al.*, 2006)

Metaplasia intestinal.

Se ha encontrado que en un estado de infección muy avanzado, *H. pylori* juega un papel importante en el desarrollo de metaplasia intestinal que consiste en el cambio de células propias del estómago (epitelio cúbico simple) por células presentes en el intestino (epitelio cilíndrico simple con células calciformes y microvellosidades). Este tipo de metaplasia es muy común en la gastritis crónica y está relacionada con la edad del huésped, la cual se presenta principalmente en el antro aunque también se ha visto en el cuerpo y está asociada con úlceras gástricas y duodenales. Se plantea la posibilidad de que la metaplasia intestinal sea otro mecanismo de defensa del hospedero, ya que la bacteria no se puede adherir al epitelio intestinal pues no cuenta con los receptores que la bacteria necesita para tal propósito. La metaplasia intestinal se considera como un factor de riesgo para la progresión a cáncer gástrico (Dixon, 2001).

Displasia epitelial gástrica.

Es una lesión precancerosa, evoluciona generalmente de una gastritis crónica atrófica y suele acompañarse de metaplasia intestinal. Frecuentemente se encuentran áreas de displasia alrededor de los adenocarcinomas gástricos (Rugge *et al.*, 1995), siendo la única lesión histopatológica que se asocia específicamente con el cáncer gástrico. Los cambios displásicos se definen por la presencia de atipias celulares (modificaciones nucleares con pleomorfismo, hiperchromatismo, aumento de la relación núcleo/citoplasma, pérdida de polaridad), anomalías de diferenciación (disminución total o parcial de la secreción de mucosa y aumento del número de células indiferenciadas) y desorganización de la morfología de criptas y glándulas. Por lo general, se clasifica en ligera, moderada y severa. La primera tiende a permanecer estable, mientras que las otras dos frecuentemente están relacionadas con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Aproximadamente 1-3% de pacientes con displasia epitelial desarrollan cáncer gástrico en un tiempo de 5 a 15 años (Rugge *et al.*, 1994).

Cáncer gástrico.

El cáncer gástrico es uno de los principales males que afectan a la población a nivel mundial, de ahí que la asociación entre cáncer gástrico y *H. pylori* trajera gran interés cuando la OMS, definió a esta bacteria como un carcinógeno del grupo 1, es decir; que hay pruebas suficientes que confirman que directamente puede causar cáncer a los humanos (IARC, 1994). Los posibles mecanismos por los que se asocia a *H. pylori* con este padecimiento son dos: el primero corresponde a un efecto carcinogénico de la bacteria y el segundo por el establecimiento de un ambiente carcinógeno producto de una infección prolongada por *H. pylori*, ya que la bacteria puede causar inflamación de la mucosa gástrica, la infección crónica causa atrofia, que a su vez, puede generar metaplasia intestinal y estos cambios son considerados precursores del cáncer gástrico (Asaka *et al.*, 1997).

El cáncer gástrico solo se presenta en una minoría de la gente infectada con *H. pylori* (1%), ya que la mayoría permanece asintomática a lo largo de su vida (Blaser, 1992; Creanen *et al.*, 1992; Valle *et al.*, 1996) y se ha visto que se presenta más en países desarrollados que en los no desarrollados (Gill y Desai, 1993; Glupczynski *et al.*, 1992). Una explicación para este fenómeno se basa en las diferencias de toxicidad entre las cepas.

Otro hecho importante en la génesis del cáncer gástrico es la disminución de vitamina C en el jugo gástrico provocado por la bacteria. Esta vitamina tiene propiedades antioxidantes, en consecuencia, su disminución en el jugo gástrico favorece el desarrollo de tumores (Gil *et al.*, 1990; Besasso, 1996). Existe una fuerte asociación entre *H. pylori* y el aumento del pepsinógeno II y de hipergastrinemia en pacientes infectados con la bacteria, por lo que la determinación de niveles altos de pepsinógeno II y de gastrina sérica en pacientes sería un indicativo de riesgo de neoplasia gástrica (Parsonnet *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1994).

Linfoma gástrico tipo MALT.

Es un tipo de linfoma que se localiza preferentemente en el antro del estómago, dado que es la zona donde existe más tejido linfoide. En el curso de la gastritis crónica pueden aparecer folículos linfoides y agregados linfáticos en la base de la mucosa gástrica, lo que constituye el llamado tejido MALT. Este es el substrato anatómico necesario para que se desarrolle un linfoma MALT. La presencia de tejido MALT en el estómago, parece estar relacionada con fenómenos inmunológicos. La proliferación tumoral de los linfocitos B es secundaria a una activación específica de linfocitos T reactivos. Estos linfocitos T son activados específicamente por *H. pylori* y las citocinas del hospedero (Du *et al.*, 1996).

La infección con *H. pylori* progresa con dos patrones topográficos que conlleva a diferentes resultados clínicos (Fig. 8).

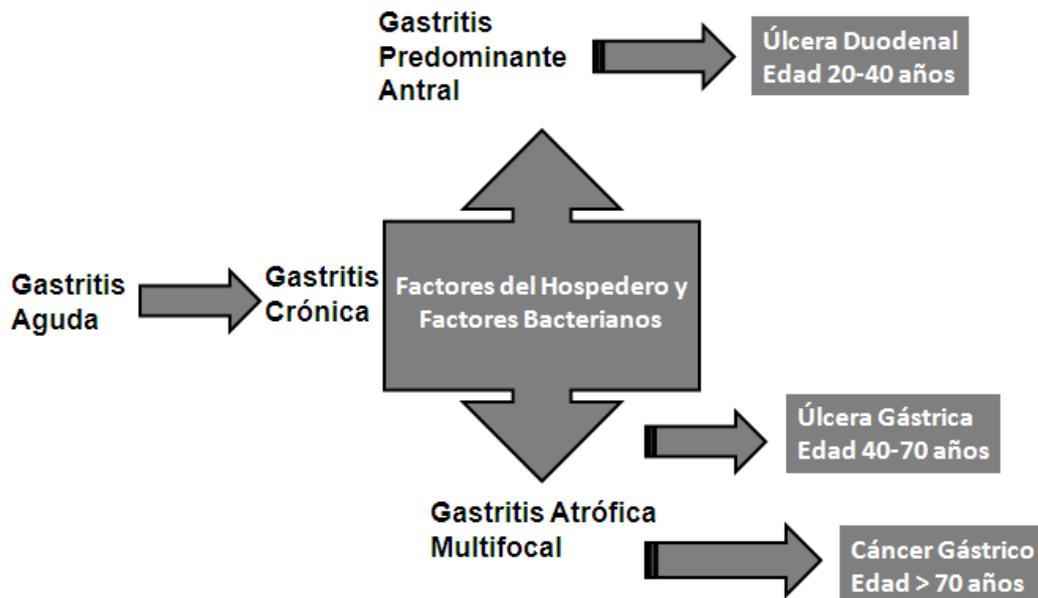


Fig.8. Patologías asociadas a *H. pylori* (Consultado y modificado de Egan *et al.*, 2007).

III.2. Diagnóstico de la infección por *H. pylori*.

El diagnóstico de la infección puede realizarse de manera invasiva y no invasiva (Tabla 2). Las técnicas invasivas son cuando se utiliza una muestra obtenida por endoscopia y se detecta la presencia de la bacteria por cultivo bacteriológico, tinciones histológicas, técnicas moleculares, etc (Cohen y Laine. 1997), mientras que las no invasivas utilizan alguna propiedad de la bacteria, como la reacción de la enzima ureasa en la prueba del aliento con urea-¹³C o urea-¹⁴C o los antígenos de superficie (Atherton, 1997).

Inicialmente, en pacientes menores de 50 años con enfermedades dispépticas no complicadas, deben realizarse pruebas serológicas para detectar la presencia de anticuerpos anti-*H. pylori* en suero o sangre total. En caso de que los resultados de IgG resultaran negativos y persista la sintomatología, se recomienda realizar la prueba del aliento o la prueba del antígeno fecal (Versalovic, 2003). También debe considerarse el uso de pruebas en suero de IgA (Graham *et al.*, 1996), si existen señales de alarma como sangrado gastrointestinal o pérdida de peso, es recomendable realizar una endoscopia, obteniendo una biopsia de la mucosa gástrica (Versalovic, 2003).

Tabla 2. Métodos de detección de *H. pylori*

TÉCNICAS INVASIVAS	TÉCNICAS NO INVASIVAS
Cultivo	Serología
Pruebas bioquímicas	Prueba del Aliento
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	Detección de Antígenos en Heces
Pruebas Histológicas	

III.2.1. Tratamientos.

A nivel mundial se utiliza principalmente la denominada **terapia triple** para erradicar a la bacteria, la cual consiste en la combinación de dos antibióticos a elección (amoxicilina, claritromicina, tetraciclina, metronidazol) y un inhibidor de la secreción de ácido (inhibidores de la bomba de protones, IBP; o bloqueadores de los receptores de histamina, H2) de 7 a 14 días (Dehesa *et al.*, 1998; Goodwin, 1997) (Tabla 3). Este tratamiento se reporta que no es efectivo en alrededor del 10 al 20% de los casos debido a la aparición de cepas resistentes, por lo que en estos casos se procede a utilizar la **terapia cuádruple**, en la que se maneja además bismuto (Tabla 3) y la combinación de otros antibióticos diferentes a los previamente utilizados (Di Mario *et al.*, 2006; Ford *et al.*, 2006; Guerrits *et al.*, 2006; Parente *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2010). La elección de los antibióticos a usar inicialmente en la terapia triple viene determinada por la prevalencia local en las resistencias microbianas, las cuales no solo varían entre países, sino también entre las distintas zonas geográficas de un mismo país. Si esta segunda terapia de erradicación falla la recomendación es realizar un cultivo y antibiograma a fin de pautar un tercero e incluso cuarto tratamiento de rescate para lograr tasas de erradicación próximas al 100% (Di Mario *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2010).

Para México el Consenso Mexicano sobre *H. pylori* (CMHP) indica la erradicación de la bacteria únicamente en los casos en el que se presente:

- Úlcera péptica activa o no, con o sin complicaciones.
- Gastritis atrófica y Metaplasia intestinal.
- Linfoma gástrico tipo B en la zona marginal (tipo MALT).
- Después de una resección gástrica parcial por cáncer
- Familiares cercanos a personas que han tenido cáncer gástrico y tienen *H. pylori*.
- Personas con uso crónico de IBP's ó AINE's.
- Pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática y anemia de hierro de causa no explicada. (Abdo-Francis *et al.*, 2007).

Tabla 3. Medicamentos empleados en las terapias de erradicación de *H. pylori*.

Antibióticos	Amoxicilina Claritromicina Metronidazol Tetraciclina
Antagonistas de los receptores de la histamina	Cimetidina Ranitidina Famotidina Nizatidina
Inhibidores de la bomba de protones (IBP)	Omeprazol Lanzoprazol Pantoprazol
Protector de la mucosa	Subsalicilato de bismuto

III.2.2. Mecanismo de acción de los principales antibióticos empleados en la terapia contra *H. pylori* y resistencia.

En países industrializados los tratamientos actuales tienen una eficacia que va del 85 al 90% de éxito en la erradicación de cepas de *H. pylori*. Pero, como ya se comentó, existen casos en los que la terapia falla debido a algunos factores como pueden ser, la existencia de cepas resistentes debido al mal uso de antibióticos, lo cual está contribuyendo al incremento en la velocidad de aparición y selección de cepas (Kim *et al.*, 2003).

Claritromicina (macrólido). Es uno de los antibióticos más empleados en la terapia de erradicación de *H. pylori*. Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas, al unirse directamente a la subunidad mayor del ribosoma ARNr 23s (Occhialini *et al.*, 1997). Actualmente se reporta un incremento en la resistencia en un 10% y en algunas regiones ha alcanzado hasta el 50% (Guerrits *et al.*, 2006). Se plantea que la resistencia es debida a mutaciones puntuales en el gen ARNr 23S, en la región de la actividad peptidil-transferasa en el dominio V (Vandoorn *et al.*, 1999; Versalovic *et al.*, 1996). Esta mutación estaría provocando una disminución en la capacidad de unión del antibiótico al ribosoma (Occhialini *et al.*, 1997).

Metronidazol (nitromidazol). El metronidazol es una pro-droga que necesita ser activada intracelularmente para ser efectiva, es muy estable a pH

bajo (Walsh y Peterson, 1995). El metronidazol se activa reduciendo su grupo nitro al llegar a la célula blanco, dando como resultado la generación de un radical libre, el cual oxida al ADN bacteriano provocando la ruptura de la doble hélice (Sisson *et al.*, 2001). Se han encontrado varias enzimas en *H. pylori* involucradas en la activación del metronidazol como la piruvato-flavodoxina oxidoreductasa y la nitroreductasa insensible a oxígeno (Goodwin *et al.*, 1998). La resistencia al antibiótico varía entre 10 y 50% pero en algunas regiones puede alcanzar hasta un 95% (Chiba *et al.*, 1992; Gerrits *et al.*, 2006; Graham, 1993). En México se ha reportado que la resistencia a metronidazol alcanzó valores del 80% en 1997 (Torres *et al.*, 2001). Mutaciones en el gen *rdrA* que codifica para la nitroreductasa, producen proteínas inactivas y conducen por tanto a la resistencia, sin embargo, se piensa que este no es el único mecanismo involucrado, ya que existen cepas resistentes al metronidazol que no presentan mutaciones de este gen (Debets-Ossenkopp *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2000).

Amoxicilina (penicilina). La amoxicilina es un derivado semisintético de la penicilina, es el único antibiótico β -lactámico empleado para tratar la infección por *H. pylori* (Megraud, 1998). Se une a las proteínas de pegado a penicilinas (PBP) y de esta manera interfiere con la síntesis de pared celular produciendo lisis en las bacterias que se están replicando (Campo *et al.*, 2007; Gerrits *et al.*, 2006). Es al antibiótico al que menor resistencia se ha encontrado que va del 0 al 1.3%, aunque Gerrits y col.(2006) reportan que puede llegar hasta el 30%. Algunos mecanismos propuestos para la resistencia a β -lactámicos son mutaciones en las PBP, decremento en la permeabilidad de la droga a través de la pared celular y alteraciones en las bombas y porinas (Gerrits *et al.*, 2006). Las PBP son un grupo de enzimas involucradas en la síntesis de peptidoglicano de la pared celular y para el caso de *H. pylori* se ha demostrado que algunos cambios en PBP1 genera resistencia a amoxicilina (Okamoto *et al.*, 2002).

Tetraciclina. La actividad de este antibiótico es debida a su unión a la subunidad 30s ribosomal, bloqueando la fijación del aminoacil ARNt al sitio del complejo ARN mensajero-ribosoma (Triber y Taylor, 2002). La resistencia a

este antibiótico se puede considerar baja y es menos del 2%, aunque la tasa más elevada reportada es de 5% (Kwon *et al.*, 2000). El mecanismo de resistencia aun no se determina, pero se ha visto que mutaciones en el ARNr 16S, impiden la unión del antibiótico al ribosoma (Triber y Taylor, 2002).

A continuación se muestran las estructuras químicas de los principales antibióticos empleados en las terapias de erradicación contra *H. pylori* (Fig. 9).

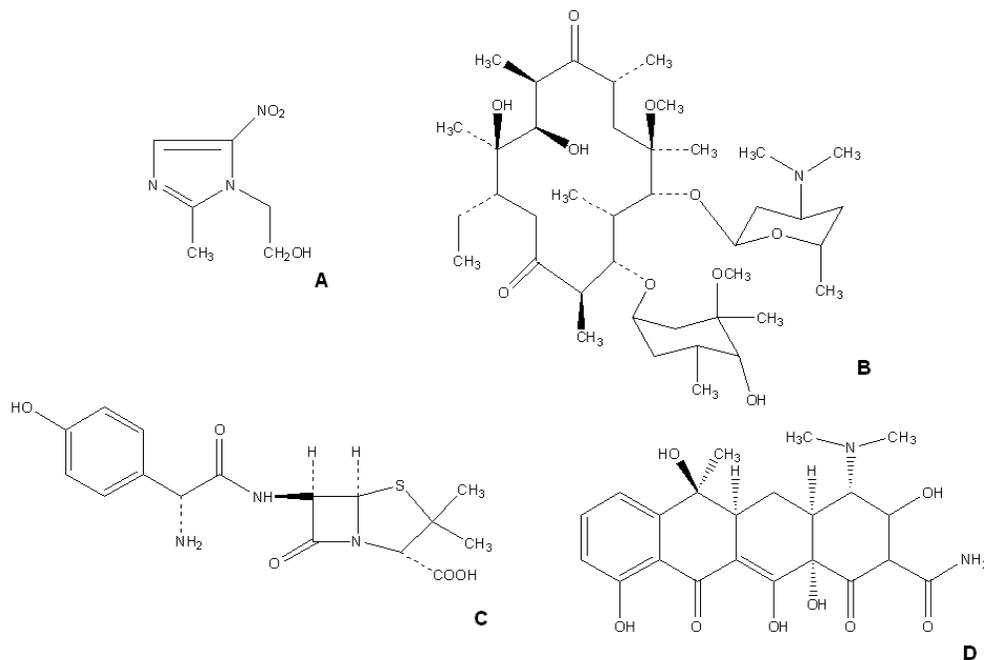


Fig. 9. Antibióticos más utilizados para la erradicación de *H. pylori*: (A) metronidazol; (B) claritromicina; (C) amoxicilina; (D) tetraciclina.

III.2.3. Uso de las plantas medicinales.

México cuenta con una gran diversidad y tradición ancestral en el uso de plantas medicinales y se estima que en la actualidad cerca de 4000 especies (15% de la flora total) son empleadas con esta finalidad (Linares *et al.*, 1999). Sin embargo, se calcula que en México, y en todo el mundo, la validación química, farmacológica y biomédica sólo se ha llevado en 5% de estas especies (Huerta, 1997).

Junto a la gran variedad de condiciones ambientales que existen en nuestro territorio, en las plantas se encuentra también una amplia gama de sustancias químicas. Los principios activos se deben precisamente a los compuestos químicos de algunas plantas que las hacen útiles como medicamento y pueden encontrarse en todo el individuo o sólo en algunas de sus estructuras. Su concentración y calidad dependen de diversos factores como la edad del organismo, el clima, la época del año, el tipo de suelo y la humedad, entre otros. Para que una planta conserve sus propiedades medicinales se deben respetar ciertas reglas de recolección, desecación, almacenamiento y finalmente de presentación (Ocegueda *et al.*, 2005).

Las plantas producen diversos compuestos (metabolitos secundarios) que, en su mayoría no participan en el desarrollo y crecimiento de la planta, sin embargo, le proporcionan virtudes culinarias, medicinales o venenosas (Croteau *et al.*, 2002; Trease y Evans, 1987). La actividad biológica de estos metabolitos secundarios (antimicrobiana y antifúngica), muchas veces coincide con la actividad farmacológica en los seres humanos (Croteau *et al.*, 2002; Wink, 1999; Harbone y Tomas-Barberan, 1991; Harbone y Dey, 1989). Por este motivo los estudios fitoquímicos son una parte esencial en las investigaciones encaminadas a encontrar nuevos compuestos y estructuras químicas bioactivas (Harbone, 1973).

***H. pylori* y plantas medicinales.**

La resistencia de *H. pylori* a los antibióticos, ha sido un problema creciente los últimos años, lo cual hace necesario que se investiguen o propongan terapias alternativas y la búsqueda de nuevos compuestos o

metabolitos que tengan actividad anti *H. pylori* y tratar aquellos padecimientos relacionados a la bacteria.

Varios estudios *in-vitro* han demostrado el efecto de extractos de plantas sobre *H. pylori* (Cowan, 1999). Hasta 2006, a nivel mundial, se habían descrito 328 plantas, tanto de uso medicinal como comestible, a las que se les había analizado su potencial anti-*H. pylori* (de las que se han empleado diferentes partes como: raíz, hojas, corteza, flores y frutos). Al 48% de ellas se les identificó alguna actividad anti-*H. pylori* (Castillo-Juárez y Romero, 2007), sin embargo, en México este enfoque había estado poco desarrollado.

Los efectos o mecanismos de acción propuestos de las plantas sobre *H. pylori* y sus patologías son (Castillo y Romero, 2007):

a) Preventivo: en este caso se incluirán a las plantas que se consumen en la dieta, como algunos frutos o especias y su función sería evitar la infección.

b) Atenuante: probablemente este sea el principal mecanismo de acción de las plantas usadas tradicionalmente y que actúan sobre *H. pylori* directamente, disminuyendo el número de bacterias o retrasando su crecimiento (extractos y mezclas herbales).

c) Protector: algunos extractos y compuestos son capaces de atenuar el daño causado por la infección, al disminuir la inflamación o el daño a la mucosa. Se ha reportado que disminuyen el infiltrado de polimorfonucleares, atenúan la expresión o secreción de IL-8; reducen el daño al ADN, favorecen la proliferación epitelial y reducen la apoptosis.

d) Eliminador: es el principal mecanismo que se ha buscado. Se han encontrado diversos agentes derivados de plantas que presentan esta actividad en estudios *in vitro*, pero hasta la fecha, ninguno de ellos ha demostrado que elimine completamente a la bacteria *in vivo*. No obstante, los compuestos puros tienen un gran potencial para ser incluidos en la terapia en combinación con otros agentes derivados de las plantas o antibióticos comerciales (Kawase y Motohashi, 2004).

Uno de los trabajos más completos acerca del potencial de las plantas medicinales mexicanas es el realizado por nuestro grupo de trabajo (Castillo-Juárez *et al*, 2009). En este trabajo se estudió la actividad anti *H. pylori* de

extractos acuosos y metanólicos de alrededor de 50 plantas utilizadas tradicionalmente contra enfermedades gastrointestinales, los resultados indicaron que el 77% de ellas tienen actividad de moderada a fuerte, en al menos uno de los extractos ensayados. Una de las plantas, cuyo extracto acuoso mostró buena actividad en este trabajo fue la corteza de *Cyrtocarpa procera*, por lo que sería importante realizar un estudio más profundo de ella.

III.2.4. *Cyrtocarpa procera*

III.2.5. Taxonomía

Al árbol de *Cyrtocarpa procera* se le sitúa dentro de la familia Anacardiaceae. Esta familia comprende unas 600 especies (árboles y arbustos principalmente) que viven en climas templados y subtropicales.

De acuerdo a la base de datos del Herbario del Jardín Botánico de Missouri (Missouri Botanical Garden <http://www.tropicos.org/Name/50145943>), *C. procera* está clasificada de la siguiente manera:

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Anacardiaceae

Género: *Cyrtocarpa*

Epíteto: específico *procera*

Nombre científico: *Cyrtocarpa procera* Kunth

III.2.6. Nombres comunes y/o sinonimia popular

C. procera presenta varios nombres comunes dependiendo de la región en donde se encuentre: “chupandilla” en Puebla, “coco de cerro” (Alto Balsas), “baricoca”, “copalcojote” o “copalcocote” en Guerrero, “machocote” o “palo de chupandia” en Oaxaca. En el Estado de México se conoce como “chucum-

pum”, en Michoacán como “chucumpuz” o “chupandia” y en Nayarit como “chocote” o “puei” (lengua cora) (Ávila-Rámirez *et al.*, 2007; <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>, consultado el 04 de junio del 2012).

III.2.7. Descripción

Árbol de 6 m de alto, su tronco robusto con corteza es color grisáceo (Fig.10). Sus hojas parecen plumas que miden de 4-7 cm de largo, con abundante pelo (pubescencia) en ambas caras, parecen de terciopelo. Flores blancas de 3 mm de largo. Su fruto es de color amarillo, mide 1.5 cm de largo y tiene semilla. Su fruto es comestible, aunque tiene un sabor agarroso (INI, 1994).

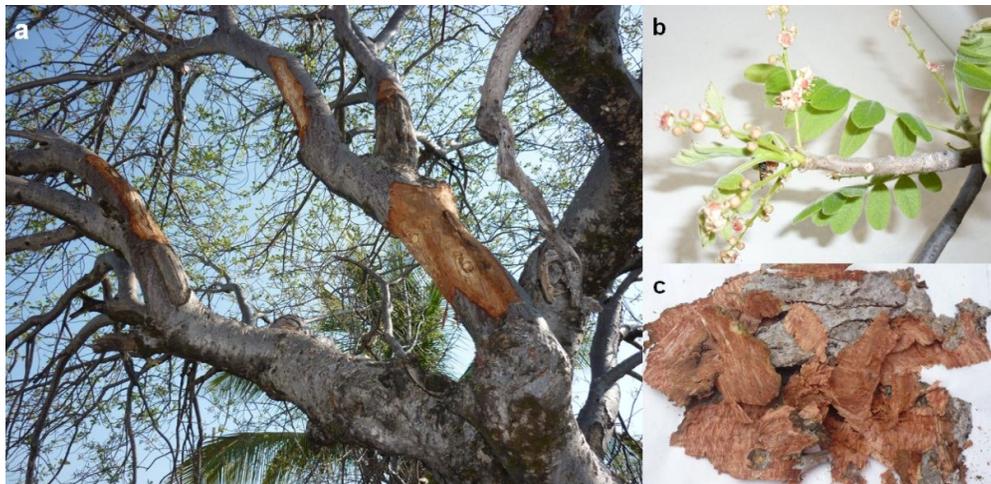


Fig. 10. *Cyrtocarpa procera* (Chupandilla): a) Árbol descortezado e inicio de la floración en el mes de abril; b) hojas y flores; c) corteza, (Fotografías obtenidas de la colecta realizada en Higuierón, Morelos).

III.2.8. Distribución

C. procera es una planta originaria de México, habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, entre los 600 y los 1100 msnm. Planta silvestre, asociada a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y de pino (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>, consultado el 04 de junio del 2012). *C. procera* se distribuye ampliamente en los estados de Aguascalientes, Baja California Sur, Colima, Durango, Estado de México,

Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro y Tabasco (Fig.11).

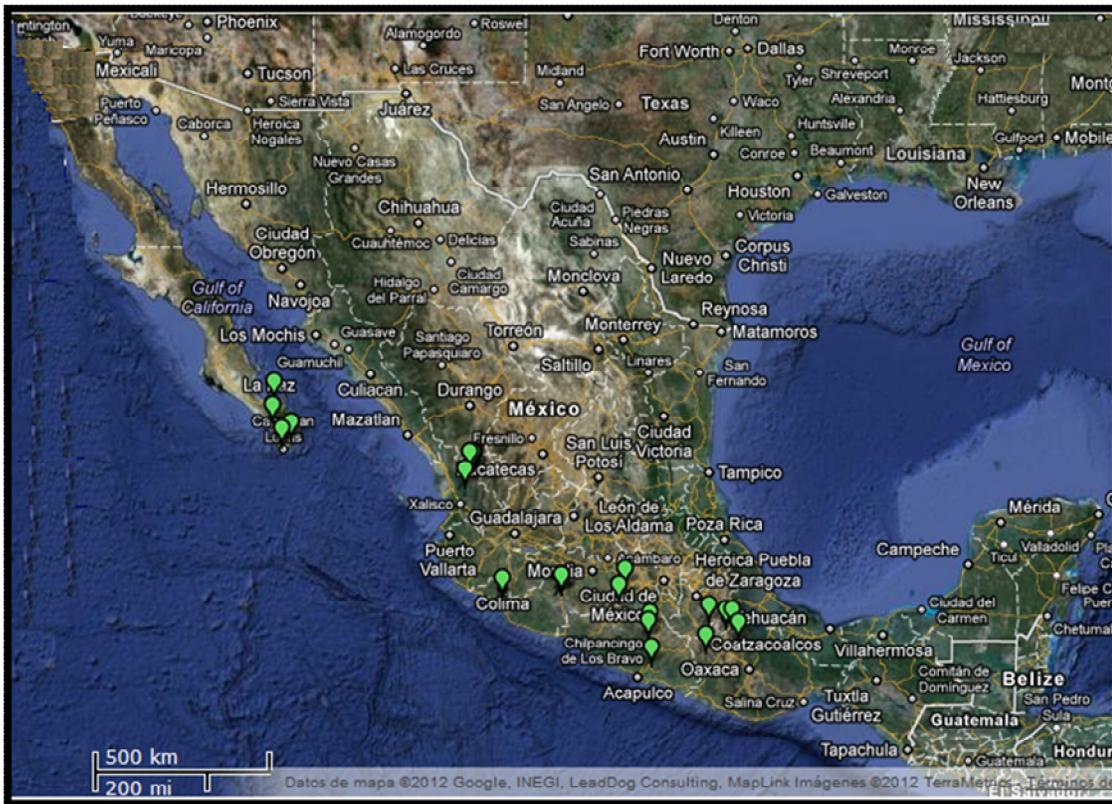


Fig. 11. Distribución de *C. procera* en la República Mexicana. Los símbolos verdes corresponden a los sitios de registro de la especie (<http://www.tropicos.org/LocationSubordinate.aspx?locationid=369>, consultado el 04 de junio del 2012).

III.2.9. Uso etnomédico

La corteza de *C. procera* es utilizada en algunos estados de la República Mexicana con fines terapéuticos y son los siguientes:

Estado de México: trastornos del aparato digestivo como diarrea y disentería.

Nayarit: dolor de cintura, cicatrización de heridas.

Michoacán: dolor de muelas y tos.

(<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>).

Morelos: diarrea, disentería, enfermedades de la piel y dolor de muelas (Rodríguez-López *et al.*, 2011).

Puebla: dolor de riñón (Canales *et al.*, 2005).

Por otro lado, la gente la consume de forma involuntaria, ya que es utilizada para adulterar la corteza del “Cuachalalate o cuachalala” (*Amphipterygium adstringens*), una especie medicinal ampliamente utilizada para tratar trastornos del aparato digestivo como la gastritis y las úlceras (Rosas-Acevedo *et al.*, 2011).

La corteza de la planta es la parte que más se utiliza y la forma en la que la gente la emplea varía, ya que en algunos lugares se cuece un puñito de la corteza en 1 litro de agua y se toma como agua de uso; durante cuatro días o el tiempo necesario (diarrea y soltura) (Argueta *et al.*, 1994). En San Rafael Coxcatlán, Puebla se utiliza en forma de té combinada con biznaga y el cuachalala para padecimientos renales (Canales *et al.*, 2005). En el estado de Nayarit se emplea junto con la corteza del cuachalalate para lavar heridas y llagas y lograr una cicatrización más rápida; preparada en forma de decocción (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>, consultado el 04 de junio del 2012).

III.3. Estudios fitoquímicos

Estudios fitoquímicos que se le han realizado a la corteza de *C. procera* reportan haber aislado una serie de compuestos (Fig.12) como la β -amirina, β -sitosterol y una mezcla de ácidos grasos, entre otros (Rosas-Acevedo *et al.*, 2011; Rodríguez-López *et al.*, 2006).

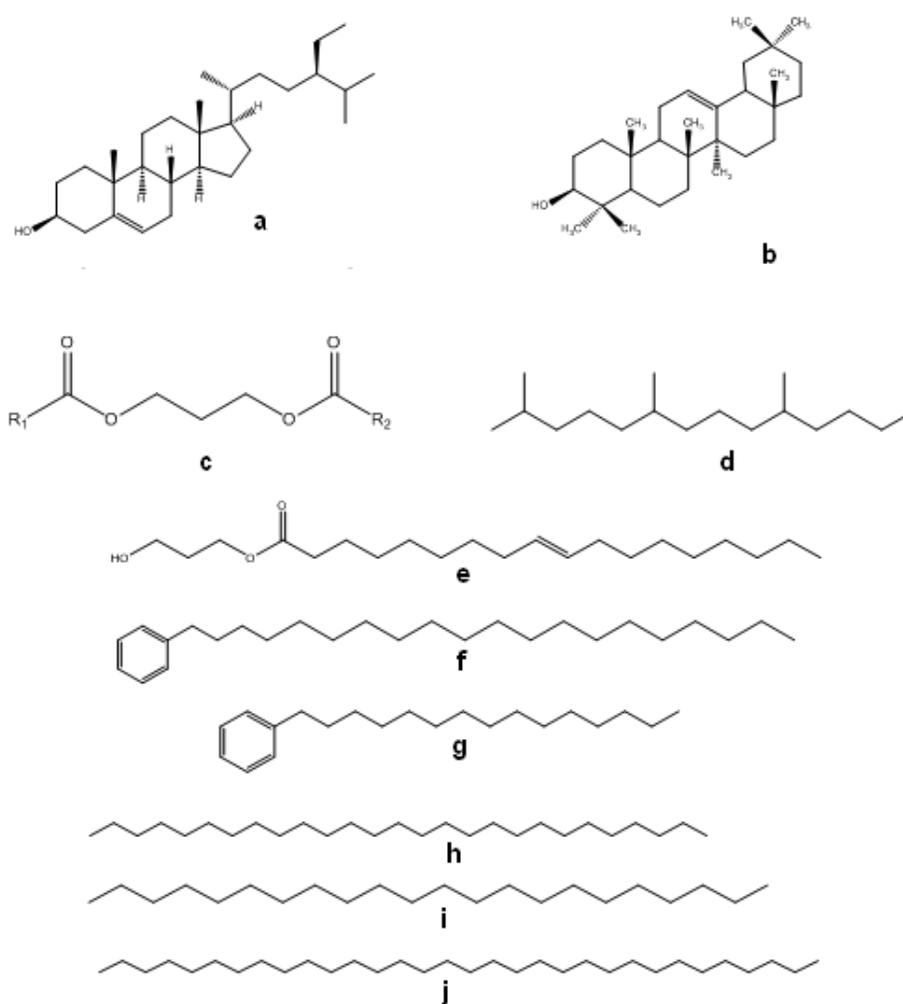


Fig. 12. Estructura química de compuestos aislados de *C. procera*: a) β -sitosterol; b) β -amirina; c) 1,3-propil-dipentadecanoato; d) 2, 6,10-trimetil-tetradecano; e) 3-hidroxipropil-9-octadecenoato; f) mezcla de eicosilbenzeno; g) pentadecilbenzeno; h) heptacosano; i) docosano; j) dotriacontano. (Consultado de Rodríguez-López *et al.*, 2006).

IV. Planteamiento del problema y objetivos

IV.1.1 Justificación

H. pylori es la bacteria principal responsable de la gastritis crónica activa, del 85-90% de las úlceras duodenales y del 75 al 85% de las gástricas y está ligada al cáncer gástrico.

Se calcula que la mitad de la población mundial está infectada con *H. pylori* y generalmente se contrae durante la infancia. Las personas que viven en países en desarrollo, en condiciones de hacinamiento o insalubridad tienen la mayor probabilidad de infectarse con la bacteria. Por otra parte, es interesante que muchas personas tienen este organismo en el estómago pero no desarrollan ninguna de las patologías asociadas (Moblely, 2001). En México la infección también se ha visto que se adquiere a edades tempranas, alcanzando un 80% en adultos jóvenes entre 18 y 20 años de edad, con una tasa de incremento del 5% anual durante los primeros 10 años de vida (Torres *et al.*, 1998).

En la actualidad, el régimen de tratamiento recomendado para la población mundial para combatir la infección por *H. pylori* es el uso de una terapia triple, la cual consiste en el uso de antibióticos en combinación con inhibidores de la secreción de ácido en el estómago (Malferttheiner *et al.*, 2007). Aunque esta terapia es efectiva en un 80% de los casos, existen varios problemas respecto a ellas. En primer lugar, son tratamientos complejos que conllevan efectos secundarios perjudiciales, lo que hace que los pacientes no los terminen, permitiendo la aparición de resistencia a los antibióticos comerciales. Por otra parte, se presenta reincidencia de la enfermedad en pacientes que han tenido un tratamiento previo y siguen viviendo bajo las mismas condiciones en las que se infectaron. Y por último, el elevado costo del tratamiento conduce a que no todos los pacientes diagnosticados puedan cumplir con el tratamiento prescrito por el médico.

Tomando en cuenta estos problemas, surge la necesidad de buscar nuevos antibióticos y/o terapias para el tratamiento de las enfermedades producidas por *H. pylori*. Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue:

IV.1.2. Objetivo General

Evaluar las actividades anti-*H. pylori in vitro*, gastroprotectora y antiinflamatoria *in vivo* del extracto acuoso de *Cyrtocarpa procera* con el propósito de encontrar terapias y principios activos alternos que puedan ser utilizados en el tratamiento de los diversos padecimientos producidos por *H. pylori*.

IV.1.3. Objetivos particulares

- Preparar el extracto acuoso de *C. procera* por infusión.
- Evaluar la actividad anti-*H. pylori* del *extracto acuoso* y de fracciones primarias obtenidas mediante particiones líquido-líquido con distintos disolventes.
- Evaluar la toxicidad aguda del extracto acuoso íntegro utilizando el protocolo de Lorke en ratones.
- Evaluar la actividad gastroprotectora del extracto acuoso íntegro mediante el modelo de úlcera inducida por etanol absoluto en ratón.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso íntegro empleando el modelo de edema agudo inducido por acetato de tetradecanoil-forbol (TPA) en oreja de ratón.

V. Materiales y Métodos

V.1.1 Material vegetal.

La corteza de *Cyrtocarpa procera* fue colectada en el Municipio de Higuierón en el Estado de Morelos. La identificación corrió a cargo de la Maestra Rosa María Fonseca Juárez de la Facultad de Ciencias, UNAM. Una muestra está depositada en el Herbario de la Facultad de Ciencias con número de registro FCME 125630.

V.1.2 Preparación y fraccionamiento primario del extracto acuoso

La infusión se preparó de la siguiente manera: 10 g de la planta molida se extrajeron con 250 mL de agua caliente, se agitaron y dejaron reposar por 30 min. Posteriormente, se retiró el material vegetal por filtración y se liofilizó. El extracto así obtenido se denomina **CPA** (extracto acuoso íntegro de *C. procera*). Este procedimiento se realizó hasta extraer 500 g de corteza.

El fraccionamiento primario se realizó mediante particiones sucesivas líquido-líquido con disolventes orgánicos de polaridad creciente para obtener las distintas fracciones: diclorometano (**CPA0**), acetato de etilo (**CPA1**), *n*-butanol (**CPA2**), acuoso residual (**CPA3**). Se eliminó el disolvente con un rotaevaporador a presión reducida y se dejaron secar las fracciones. De cada una de las estas se determinó el rendimiento y se evaluó su efecto sobre el crecimiento de *H. pylori*.

Debido a que algunas de las fracciones primarias presentaron una buena actividad, se decidió realizar un fraccionamiento secundario para tratar de ir reduciendo la complejidad metabólica de ellas, para lo cual se utilizó cromatografía en columna abierta (CCA) empacada con Sephadex LH-20 (45 x 5 cm). Se utilizó cromatografía en capa fina (CCF) en placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (sílica gel 60 F₂₅₄, Merck) para llevar a cabo el monitoreo del fraccionamiento secundario y se usaron diferentes sistemas de elución y sulfato cérico como agente cromógeno revelador. La detección de compuestos se hizo con luz ultravioleta (UV) a 254 y 365 nm. Una vez que se obtuvieron las fracciones secundarias se evaluó su actividad contra bacteria

con el fin de profundizar en el estudio de estas fracciones para en un futuro continua con la separación de los compuestos con actividad antibacteriana.

V.1.3 Material microbiológico.

Se utilizó la cepa de colección de *Helicobacter pylori* ATCC 43504.

V.1.4 Medios de cultivo y pruebas de identificación para *H. pylori*

V.1.5 Placas para cultivo de agar sangre: Consiste en agar Casman (BBL) 42 g/L en agua destilada, suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada (Microlab), 10 µg/mL de vancomicina, 5 µg/mL de trimetoprima, 2 µg/mL de anfotericina B y 2.5 µg/mL de polimixina. El medio base (agar Casman) disuelto en agua destilada se esteriliza a 121°C por 20 min en autoclave (Irayama H-M-II). Después de la esterilización, tanto la sangre como los antibióticos se deben de añadir cuando el medio alcance una temperatura alrededor de 45°C, para evitar que la sangre se aglutine, que los antibióticos pierdan su actividad al someterlos a altas temperaturas y evitar que el agar se solidifique (a temperaturas inferiores a 45°C). Se dejan las placas en una incubadora a 37°C por 24 h para descartar contaminación y para eliminar el exceso de humedad. Posteriormente, las placas se inoculan con la bacteria *H. pylori* o se guardan en envolturas de plástico a 4°C hasta su utilización.

V.1.6 Medio de cosecha: Este medio sirve para la cosecha de las placas en donde se cultivó la bacteria y para su almacenamiento en el ultracongelador a -70°C hasta su posterior uso. Se resuspende 28 g/L de caldo de Brucella (DIFCO) en agua bidestilada, se le agrega glicerol al 10% (J.T. Baker) y se esteriliza a 121°C durante 20 min, se deja enfriar y se agrega 10% de suero fetal bovino estéril (Gibco BRL) y 10 µg/mL de vancomicina.

V.1.7 Medio de cultivo líquido Müller-Hinton: Este medio se emplea para realizar los ensayos de actividad anti-*H. pylori* del extracto acuoso y de las fracciones de *C. procera*. Se resuspenden 21 g/L de Müller-Hinton Broth (DIFCO) en agua destilada y β-ciclodextrina al 0.2%. Se esteriliza a 121°C por

20 min, se deja enfriar y se agregan los antibióticos a las siguientes concentraciones: 10 µg/mL de vancomicina, 5 µg/mL de trimetoprina, 2 µg/mL de anfotericina B y 2.5 µg/mL de polimixina.

V.1.8 Placas para cuenta viable y determinación de unidades formadoras de colonia (UFC):

Se resuspenden 42 g/L de agar Casman en agua destilada y β-ciclodextrina al 0.2%. Se esteriliza a 121°C por 20 min, se deja enfriar y se agrega 2 µg/mL de anfotericina B y 10 µg/mL de vancomicina.

V.1.9 Condiciones de cultivo

H. pylori ATCC 43504, se sembró en placas de cultivo agar sangre durante un día a 37°C bajo condiciones microaerofílicas (10% CO₂) en una incubadora Nuair TS autoflow, modelo 3500 (Fig. 13). El CO₂ que se inyecta a la incubadora es de una pureza estándar (INFRA). Después de 24 h de incubación en las condiciones antes mencionadas, el cultivo se observa como un tapete translúcido, el cual es colectado en medio de cosecha y se guarda a -70°C hasta su utilización.



Fig. 13. (a) Incubadora Nuair empleada para el cultivo de *H. pylori*, a la derecha se muestra el sistema de inyección de CO₂; (b) vista interna de la incubadora, en la parte inferior se muestra el sistema de agitación para el cultivo de *H. pylori* en medio líquido y en la parte superior el área para cultivo en placa; (c) placa para el cultivo líquido de *H. pylori* (d) crecimiento de *H. pylori* en forma de tapete.

V.2.1 Pruebas de identificación para *H. pylori*

La cepa bacteriana de *H. pylori* fue identificada sistemáticamente mediante tinción de Gram, pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa y ureasa) y moleculares (PCR), para verificar la pureza, enseguida se describen las características a tomar en cuenta para considerar como positiva cada una de las pruebas:

- Actividad catalasa (Fig. 14): En un portaobjetos se ponen unas gotas de peróxido de hidrogeno al 11% y se les adiciona con el asa de siembra una pequeña cantidad de cultivo. La prueba es positiva si hay producción de burbujas, debido a la descomposición del peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua.

- Actividad oxidasa (Fig. 14): En un cuadro de una placa comercial Dry Slide Oxidase (Difco) se pone un poco de cultivo de la placa. Si la bacteria es oxidasa positiva, se observa una coloración azul intenso en unos cuantos segundos. Esta prueba se basa en la capacidad que tiene el citocromo *c* de oxidar al aceptor de electrones artificial, tetrametil o dimetil-*p*-fenilendiamina. La prueba es un procedimiento cualitativo para determinar la presencia o ausencia de la citocromo *c* oxidasa en las bacterias. Esta actividad depende de la presencia de la enzima citocromo oxidasa intracelular que cataliza la reducción del oxígeno molecular por el citocromo *c*, último paso del sistema de transporte de electrones del organismo. Organismos que contiene citocromo *c* como parte de su cadena respiratoria son oxidasa positivos y llevan a cabo el vire del aceptor de electrones artificial a un color azul intenso.

- Actividad ureasa (Fig. 14): Se requiere de la preparación de una solución de urea 6 M a un pH de 7.0 y se le agrega 0.05% de rojo de fenol hasta obtener un color amarillo. Esta prueba se basa en la característica del rojo de fenol de ser un indicador de pH ácido-base que vira cuando hay un cambio en el pH, la liberación de amonio eleva el pH, ocasionando

que el rojo de fenol pase de amarillo a rojo intenso. En un tubo se agregan 300 µl de esta solución y se añade una asada de bacterias, la prueba se considera positiva si hay un viraje de la solución a un color rojo que indica la alcalinización del medio y por ende actividad ureasa.

- Tinción de Gram: A partir de un cultivo se toma una asada de bacterias y se extiende sobre un portaobjetos con una gota de agua o solución salina. Se realiza la tinción de Gram estándar. Si la bacteria se tiñe de color rojo por la Safranina, indica que la bacteria es Gram negativa. La morfología también se verifica, observando las formas típicas de la bacteria: forma de bacilos curvos en cultivos frescos y en cultivos viejos se hace evidente la forma cocoide.



Fig. 14. Pruebas bioquímicas para la tipificación de *H. pylori*. **a)** prueba de la catalasa, a la izquierda control negativo, prueba positiva (derecha); **b)** prueba de la oxidasa, muestra positiva (recuadro superior derecha); **c)** prueba de la actividad ureasa, control negativo (izquierda), muestra positiva (derecha).

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Como una prueba contundente para verificar la identidad de la bacteria se realiza una amplificación por PCR del gen *ure-A*, (el cual codifica para una de las subunidades de la enzima ureasa) de *H. pylori* utilizando ADN procedente del cultivo bacteriano. Los desoxinucleótidos que se utilizan tienen la secuencia exacta de segmentos del gen *ure-A* de la bacteria, por lo que la amplificación en condiciones astringentes indicará que el ADN amplificado proviene de *H. pylori*. El fragmento que se amplifica tiene un peso aproximado de 400 pb (Fig. 15).

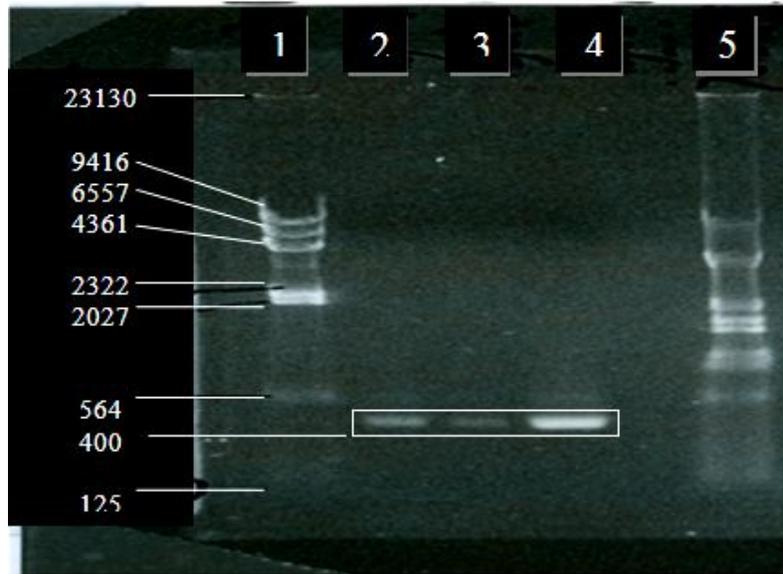


Fig. 15. Gel de agarosa en donde se analizan los productos de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Carril 1 y 5: Marcadores de peso molecular λ Hind III y λ Hind III/EcoRI; los carriles 2-4, corresponden a tres muestras de la amplificación procedentes de cultivos de *H. pylori*. La prueba fue positiva ya que, como se ve en el recuadro, está presente el fragmento de 400 pb.

V.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

El efecto del extracto acuoso y fracciones sobre el crecimiento de la bacteria se determina a través del cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es decir la concentración más baja que provoque el 100% de inhibición del crecimiento del cultivo bacteriano de acuerdo al siguiente protocolo:

- Se prepara un cultivo de *H. pylori* en medio líquido Müller-Hinton ajustado a una $A_{600} = 0.2$ y se incuba en las condiciones microaerofílicas (10% CO_2) que previamente se indicaron, agitando el cultivo a 120 rpm, $37^\circ C$, por 5-6 h.
- Al mismo tiempo, se realizan diluciones de los extractos con DMSO para obtener concentraciones finales de 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 $\mu g/mL$, para probar su actividad inhibitoria contra la bacteria.
- Cuando el cultivo tiene una $A_{600} = 0.3$, es decir al comienzo de la fase crecimiento exponencial ($\sim 10^8$ UFC/mL), se incuban 1.5 mL de este cultivo con 10 μL de cada concentración de los extractos a probar por triplicado, o con 10 μL de DMSO como control.

- Se registra la lectura de la A_{600} inicial.
- Se incuba por 24 horas y se toma la lectura de A_{600} final.
- Se realizan cálculos del porcentaje de inhibición y de crecimiento.
- NOTA: Se utilizaron amoxicilina y metronidazol como antibióticos de referencia para validar los resultados.

La CMI se obtiene calculando primero el cambio de absorbancia (ΔA_{600}) de cada cultivo tanto en los controles como de los experimentales.

$$\Delta A_{600} = A_f - A_i$$

A_f = absorbancia del cultivo final

A_i = absorbancia del cultivo inicial

Posteriormente se obtiene el crecimiento bacteriano (%C), utilizando el valor promedio de los controles ($\bar{x} A_c$) y de los experimentales ($\bar{x} A_e$), mediante la siguiente formula:

$$\% \text{crecimiento} = (\bar{x} A_e \times 100) / \bar{x} A_c$$

$$\% \text{ de inhibición} = \% \text{crecimiento del cultivo bacteriano} - 100$$

Con el porcentaje de inhibición (%I) se obtiene la CMI.

V.2.3 Animales de experimentación. Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 en un intervalo de peso de 20-25 g para el estudio de toxicidad aguda así como para el ensayo antiinflamatorio y de 40-45 g para determinar el potencial gastroprotector. Estos animales fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar (temperatura 24°C, ciclos de 12 h luz/obscuridad, agua y alimento *ad libitum*) y de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana Nom-062-ZOO-1999 que indica las especificaciones técnicas para la reproducción, cuidado y uso de animales de laboratorio. La eutanasia, se llevó a cabo en cámara de CO₂. Previo al ensayo, los animales fueron privados de alimento por 12 horas para evaluar la toxicidad aguda ó 24 horas para los ensayos de gastroprotección pero con libre acceso de agua. Todas las muestras (CPA y fracciones) se suspendieron en una solución salina de NaCl (0.9%). En todos los ensayos biológicos se utilizaron controles positivo y negativo.

El bioterio en el que se tuvieron a los animales cuenta con las medidas sanitarias que asegura el control absoluto de los animales en experimentación, como son temperatura, ventilación, limpieza, etc. Las jaulas en el que permanecieron los animales proporcionaron el espacio adecuado para permitir los movimientos normales conforme a las necesidades biológicas de la especie. Se les proveyó de una alimentación (alimento genérico para roedores) y provisión de agua adecuada durante todo el tiempo de experimentación y el material de cama fue el conveniente para la especie.

V.2.4 Determinación de la Toxicidad Aguda del Extracto acuoso íntegro.

La toxicidad de tipo agudo del extracto íntegro se evaluó determinando la Dosis Letal Media (DL_{50}) utilizando la metodología reportada por Lorke (1983). De manera breve, el protocolo consta de dos fases: en la primera, 4 ratones con 12 h de ayuno y libre acceso a agua (*ad libitum*) fueron observados durante los 30 min previos a la administración oral de tres dosis distintas del extracto a evaluar (10, 100 y 1000 mg/kg). En la segunda fase del estudio, las dosis seleccionadas se eligen de acuerdo al número de animales muertos en la primera fase (criterios de Lorke) y se sigue el mismo procedimiento de la primera parte. En ambas fases y una vez administrado el extracto orgánico, el comportamiento de los animales fue registrado durante las primeras ocho horas y, posteriormente, a diario por un periodo 14 días; para así determinar algún cambio en su patrón conductual, efectos tóxicos o la muerte. De manera complementaria, tres animales más fueron administrados con el vehículo donde se suspendieron los tratamientos de prueba (1 mL/kg) como control negativo para cada fase. Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados.

V.2.5 Determinación del efecto gastroprotector

Se evaluó la actividad gastroprotectora mediante el modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón de acuerdo al método descrito por Bucciarelli y cols. (2007), con algunas modificaciones. De manera general, se distribuyen los ratones en grupos de 6 individuos cada uno. El extracto de

prueba (0.1-300 mg/kg, *p.o.*), el fármaco de referencia carbenoxolona (50 mg/kg, *p.o.*) y el vehículo (VEH) donde se disolvieron los tratamientos (7 mL/kg, SSI 0.9%, *p.o.*) fueron administrados 60 min antes de la administración de etanol (7 mL/kg, *p.o.*). Noventa minutos después de la administración del agente necrosante, los animales de experimentación fueron sacrificados. Inmediatamente, se realizó la disección del estómago; éste fue llenado con 5 mL de formaldehído al 2% y posteriormente se colocó en un recipiente que contenía formaldehído a la misma concentración por espacio de 15 min; todo esto con el objetivo de lograr la fijación tanto de la capa interna como de la externa del órgano. A continuación, el estómago se disecó a lo largo de su curvatura mayor, se lavó con SSI para eliminar el contenido estomacal y se colocó entre dos laminillas de vidrio para poder escanearse. Para calcular el área de daño en mm² se utilizó el software **ImageJ**[®]. Para determinar el porcentaje de gastroprotección, en primer lugar se determinó el índice de úlcera (IU) el cual se expresa como la sumatoria de área de todas las lesiones. Se calculó el IU promedio de cada grupo. El porcentaje de inhibición de úlcera se determinó mediante la siguiente fórmula:

% Inhibición de Úlcera =

$$\left[\frac{IU_{\text{promedio del grupo control}} - IU_{\text{promedio del grupo tratado}}}{IU_{\text{promedio del grupo control}}} \right] \times 100$$

V.2.6 Estudios preliminares del mecanismo de acción del efecto gastroprotector del extracto acuoso de *C. procera*

Para establecer el papel de las prostaglandinas endógenas, el óxido nítrico y los grupos sulfhidrilos en la acción gastroprotectora del extracto acuoso CPA de *C. procera*, se realizaron una serie de experimentos utilizando el mismo modelo con algunas modificaciones (Bucciarelli y cols., 2007). De manera general, se distribuyen los ratones en grupos de 6 individuos cada uno. Los pretratamientos incluyeron indometacina (INDO) a una dosis de 30 mg/kg-r, *s.c.*; N-etilmaleimida (NEM) a una dosis de 1 mg/kg-r, *s.c.* y el éster metílico de la L-nitroarginina (L-NAME) a una dosis de 10 mg/kg-r, *i.p.* INDO y NEM fueron administrados 30 min antes del extracto (100 mg/kg-r, *p.o.*) y el fármaco de referencia carbenoxolona (50 mg/kg-r, *p.o.*), mientras que L-NAME se

administro solo 15 min antes que ellos. El vehículo donde se suspendieron los tratamientos (7 mL/kg-r) fueron administrados 60 min antes de la administración de etanol (7 mL/kg ratón, *p.o.*). Noventa minutos después de la administración del agente necrosante, los animales de experimentación fueron sacrificados. Inmediatamente, se realizó la disección del estómago y el porcentaje de inhibición de úlcera se calculó como se describió anteriormente.

V.2.7 Lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratones pretratados con indometacina.

Para determinar el papel que juegan las prostaglandinas en la actividad gastroprotectora del extracto íntegro CPA, se administró por vía subcutánea con INDO (30 mg/kg) disuelta en una solución de NaCl al 0.9% conteniendo 5% de NaHCO₃. Transcurridos 30 min se les administró CPA (100 mg/kg, *p.o.*) y 60 min después etanol absoluto (7 mL/kg, *p.o.*). De ahí en adelante se continuó con el método descrito anteriormente. A un grupo control se le administró el vehículo (salina al 0.9%) más etanol y a un segundo grupo INDO más etanol.

V.2.8 Lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratones pretratados con L-NAME

Para investigar la participación del óxido nítrico (NO) en el efecto gastroprotector de CPA, los animales fueron pretratados con L-NAME (10 mg/kg, *i.p.*), 15 min antes de la administración de CPA, 60 min después se les administró etanol a cada grupo de animales. En esta prueba se incluyeron dos grupos de controles uno tratado con etanol y otro con L-NAME mas etanol.

V.2.9 Lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratones pretratados con NEM

Para determinar el papel de los grupos sulfhidrilos en la actividad gastroprotectora de CPA, se administró a los animales NEM (1 mg/kg, *s.c.*), 30 min después CPA (100 mg/kg, *p.o.*) y 60 min después etanol. En esta

evaluación se incluyeron dos grupos, a uno se le suministró el vehículo (salina 0.9%) más etanol y al otro NEM más etanol.

En cada una de las pruebas los animales fueron sacrificados en cámara de CO₂, 90 min después de que se les administró etanol absoluto.

V.3.1 Determinación de la actividad antiinflamatoria

Se evaluó la actividad antiinflamatoria mediante el modelo de edema agudo inducido por el TPA en oreja de ratón (De Young *et al.*, 1989). Los animales fueron sedados previamente con pentobarbital sódico (al 10%, *i.p.*). Se utilizó acetona al 70% como control negativo, dexametasona (DEX, 0.05 mg/oreja-r) e indometacina (0.5 mg/oreja-r) como controles positivos. Las dosis probadas del extracto estuvieron en el intervalo de 0.1-1 mg/oreja-r. Para los ensayos, los fármacos de referencia y las muestras fueron preparados frescos y administrados en etanol al 70%. A cada animal se le administró tópicamente en la oreja derecha 20 µl/oreja del extracto de prueba a las concentraciones ensayadas o los fármacos de referencia; 30 min después se administró en ambas orejas 2.5 µg/oreja (10 µL de acetona al 70%), del agente edematogénico TPA y cuatro horas después, los animales fueron sacrificados en cámara de CO₂. Se tomaron biopsias de 7 mm de cada oreja para determinar el peso de cada una. (De Young *et al.*, 1989).

VI. Resultados y Discusión

Con el antecedente de un trabajo realizado acerca de la actividad anti-*H. pylori* de plantas de la medicina tradicional mexicana, en el que se determinó que los extractos acuoso y metanólico de la corteza de la planta *C. procera* presentan actividad contra la bacteria (Castillo-Juárez *et al.*, 2009), se decidió continuar con el estudio del extracto acuoso con la finalidad de obtener, en un futuro, los compuestos o metabolitos responsables de la actividad antibacteriana.

VI.1.1 Obtención del extracto acuoso íntegro de *C. procera* y fraccionamiento.

En primer lugar, se preparó el extracto acuoso por infusión y posteriormente se realizó un fraccionamiento primario mediante particiones sucesivas líquido-líquido con disolventes orgánicos de polaridad creciente.

En la Tabla 4 se muestran los rendimientos obtenidos del extracto acuoso íntegro (CPA) y de las fracciones primarias (CPA0, CPA1, CPA2 y CPA3).

Tabla 4. Rendimiento del extracto acuoso (CPA) y de sus fracciones primarias.

Extracto o fracción	Extracto o fracción (g)	% Rendimiento
Extracto acuoso íntegro (CPA)	22.07	17.74
Fracción de diclorometano (CPA0)	0.00	0.00*
Fracción de acetato de etilo (CPA1)	2.38	16.39*
Fracción butanólica (CPA2)	6.78	38.25*
Fracción residual (CPA3)	10.01	45.36*

* Rendimiento respecto CPA.

El extracto acuoso íntegro (CPA) presentó un color rojo oscuro, el cual una vez liofilizado, presentó color café de apariencia cristalina. Por su parte, la fracción CPA1 presentó un color naranja (ladrillo) y aspecto terroso al igual que CPA2; mientras que la fracción CPA3 presentó un color rojo oscuro, similar a CPA y de aspecto denso (Fig. 16).



Fig. 16. Extracto acuoso (CPA) y fracciones primarias (CPA1, CPA2 y CPA3).

El fraccionamiento con diclorometano no extrajo nada del CPA, indicando la alta polaridad de sus componentes.

Posteriormente, se realizó una CCF para analizar la complejidad metabólica de cada una de las fracciones obtenidas con respecto a CPA y con ello poder determinar si con el fraccionamiento primario disminuyó su complejidad (Fig. 17).

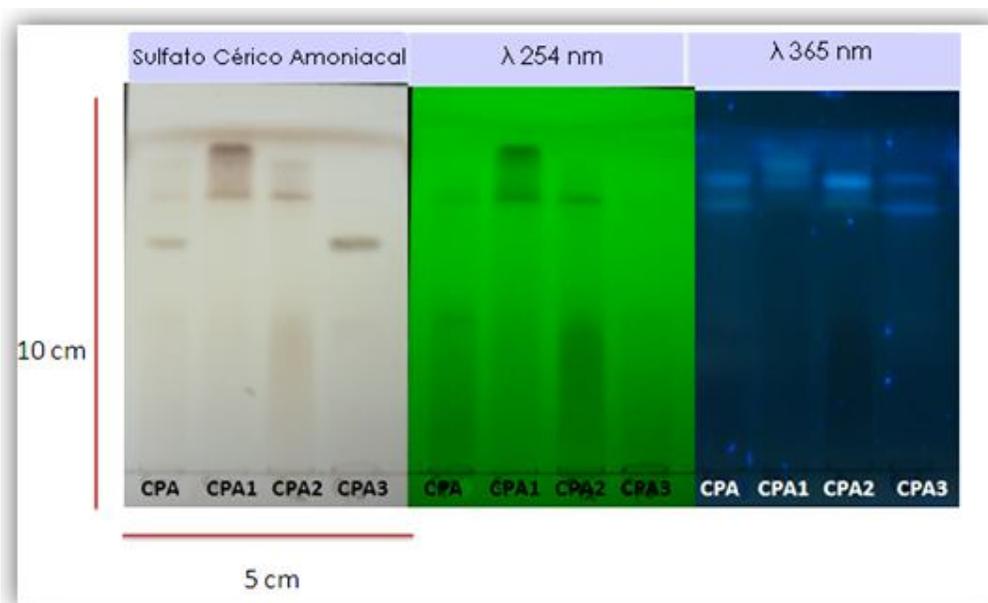


Fig. 17. Perfil cromatográfico del extracto acuoso íntegro y de sus fracciones primarias. El agente cromógeno utilizado se indica en la parte superior de la figura. El sistema de elución es AceEto-MeOH-H₂O (4:5:1) + 5 gotas de ácido fórmico.

De acuerdo al perfil cromatográfico mostrado en la Fig. 17, se concluye que el fraccionamiento primario de CPA fue satisfactorio, a pesar de que algunas bandas se comparten entre las fracciones primarias.

VI.1.2 Actividad anti-*H. pylori* del extracto acuoso íntegro de *C. procera* y de sus fracciones primarias

Una vez obtenido el extracto y sus fracciones primarias se procedió a evaluar su actividad contra la bacteria. En la Fig. 18 se muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento de los cultivos de *H. pylori* en función de la concentración del extracto o fracciones añadidas y en la Tabla 5 se presentan los valores de CMI. Como puede observarse, el extracto íntegro presentó una CMI de 125 $\mu\text{g/mL}$ y la fracción más activa fue la butanólica con una CMI de 62.5 $\mu\text{g/mL}$, mejorando la actividad del extracto que le dio origen. La fracción de acetato de etilo mantuvo la actividad inhibitoria del extracto total y la fracción residual resultó inactiva hasta la concentración ensayada (250 $\mu\text{g/mL}$).

En la Tabla 5 también se presentan los valores de CMI obtenidos con los antibióticos de referencia. Tanto el extracto, como las fracciones activas mejoraron la actividad inhibitoria del antibiótico metronidazol; sin embargo, ninguno mejoró la actividad inhibitoria de la amoxicilina.

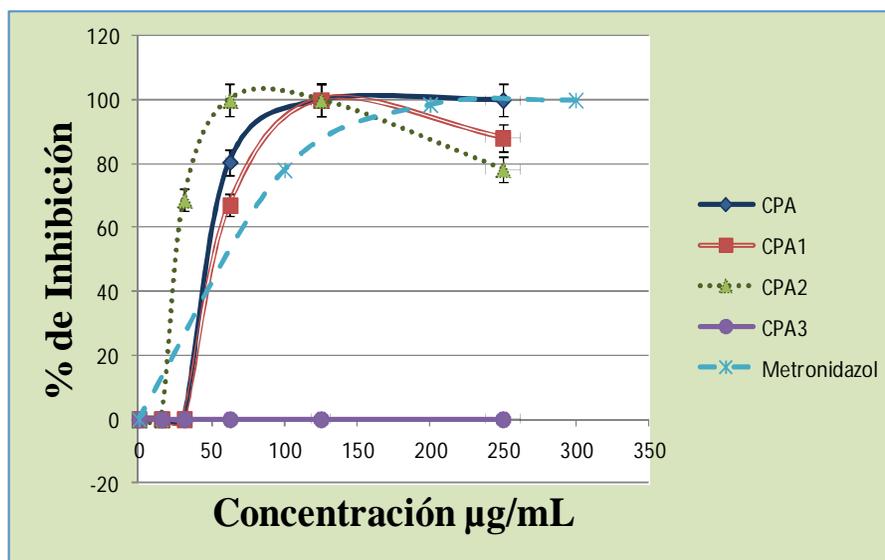


Fig. 18. Efecto del extracto acuoso íntegro (CPA), de las fracciones primarias (CPA1-3) de *C. procera* y del metronidazol sobre los cultivos de *H. pylori*.

Tabla 5. Efecto del extracto acuoso íntegro y fracciones primaria de <i>C. procera</i> sobre <i>H. pylori</i>	
Extracto o Fracción ensayada	CMI (µg/mL)
Extracto de acuoso íntegro CPA	125
Fracción de acetato de etilo CPA1	125
Fracción butanólica CPA2	62.5
Fracción residual CPA3	>250
Metronidazol	300
Amoxicilina	0.05

Por otra parte, aunque la fracción de acetato de etilo no mostró mejorar la actividad anti-*H. pylori* de CPA, provocó la formación de un precipitado bacteriano. Esto probablemente indica alguna propiedad aglutinante de la fracción que tal vez pudiera provocar la disminución de la propagación de la infección y como consecuencia, poder ser eliminada con mayor facilidad del organismo.

VI.1.3 Fraccionamiento secundario de las fracciones primarias de acetato de etilo y butanólica

Debido a los efectos inhibitorios de las fracciones CPA1 y CPA2 sobre el crecimiento de la bacteria, fueron elegidas para continuar con su fraccionamiento secundario biodirigido por la actividad anti-*H. pylori*, mediante columna de Sephadex LH-20. Como se muestra en las Tablas 6 y 7, solo algunas fracciones secundarias conservaron la actividad inhibitoria. En las Figuras 19 y 20 se muestran los perfiles cromatográficos del fraccionamiento secundario de las fracciones CPA1 y CPA2. Hay que hacer notar, que la alta polaridad de estos extractos sugeriría el uso de soportes de fase reversa, sin embargo, dado que no se disponía de ellos se utilizó la cromatografía en fase

normal, como lo es la sílica gel para darnos una idea de la composición metabólica

A pesar de que algunas bandas se comparten entre las fracciones secundarias; lo importante radica en que la actividad inhibitoria se concentró solo en algunas de ellas, en el caso de CPA1 en la fracción secundaria I y en CPA2 en las fracciones C y G, lográndose también una reducción en la complejidad metabólica.

Debido a que la purificación de compuestos no era uno de los objetivos de esta tesis no se continuó con la purificación de los compuestos bioactivos, sin embargo, se tiene planeado continuar con el aislamiento de dichos compuestos.

De manera interesante, la fracción secundaria CPA1-VIII no inhibió el crecimiento bacteriano, sin embargo, en los cultivos donde se evaluó se presentó aglutinación de la bacteria. Para descartar que esa precipitación se debiera a un posible efecto de la fracción sobre el medio de cultivo, se mezclaron ambos sin incluir a las bacterias en las mismas condiciones del ensayo. El resultado indicó que la aglutinación se presentaba únicamente en presencia de las bacterias. Hasta el momento no se ha determinado a que se debe el efecto de la fracción VIII de CPA1, pero se proponen tres posibles mecanismos de acción:

- a) **Efecto aglomerante.** El proceso de aglomeración consiste en esencia, en la adhesión de partículas finas a las más gruesas que actúan como núcleos. Para que se produzca la unión de partículas es necesaria la acción de un agente aglomerante o aglutinante que elimine la carga de superficie de las partículas. Por lo que la propuesta sería que la fracción CPA1-VIII tuviera algún metabolito aglomerante que pueda eliminar la carga de la superficie de las bacterias, ocasionado con ello que se elimine la repulsión natural de las bacterias y así se aglomeren hasta formar un precipitado bacteriano.

Efecto sobre polisacáridos de *H. pylori*: El LPS es un componente esencial de la membrana externa de *H. pylori*. En la mayoría de las cepas de *H. pylori* los antígenos-O de los LPS expresan los

carbohidratos de Lewis x (Le^x), Lewis y (Le^y), Lewis a (Le^a), Lewis b (Le^b), tipo H-1, antígeno-i, sialil Le^x y grupo sanguíneo A. Si la fracción CPA1-VIII tuviera algunos metabolitos con afinidad por los antígenos-O de los LPS de *H. pylori*, cabría la posibilidad de que la bacteria se precipite de forma similar a los efectos de aglutinación en las reacciones antígeno-anticuerpo en las reacciones de tipificación.

Polimerización de CPA1-VIII: en este caso el efecto de CPA1-VIII, no sería sobre la bacteria, sino que ésta fracción formara un biopolímero insoluble, similar a un gel en el cual la bacteria quede atrapada.

Independientemente del mecanismo de acción de CPA1-VIII, quedaría por estudiar si este efecto tiene alguna importancia fisiológica.

Tabla 6. Efecto inhibitorio de *H. Pylori* de las fracciones secundarias de CPA1

Fracción CPA1	Anti- <i>H. pylori</i> CMI (µg/mL)	P.A. 1.00 g Rendimiento (mg)
I	125	38.2
II	>250	36.2
III	>250	29.7
IV	>250	12.3
V	>250	61.9
VI	>250	62.9
VII	>250	212
VIII	>250	69.4
IX	>250	39.6
X	>250	94.5
XI	>250	117.7
XII	>250	83.5

P.A. cantidad de muestra sembrada en la columna de Sephadex LH20 para realizar el fraccionamiento secundario.

Tabla 7. Efecto inhibitorio del crecimiento de *H. pylori* de las fracciones secundarias de CPA2

Fracción CPA2	Anti- <i>H.pylori</i> CMI ($\mu\text{g/mL}$)	P. A. 2.00 g Rendimiento (mg)
A	> 250	302.4
B	> 250	287.6
C	62.5	232.2
D	> 250	247.25
E	> 250	32.3
F	>250	17.8
G	62.5	132.4
H	> 250	35.4

P.A. cantidad de muestra sembrada en la columna de Sephadex LH-20 para realizar el fraccionamiento secundario.

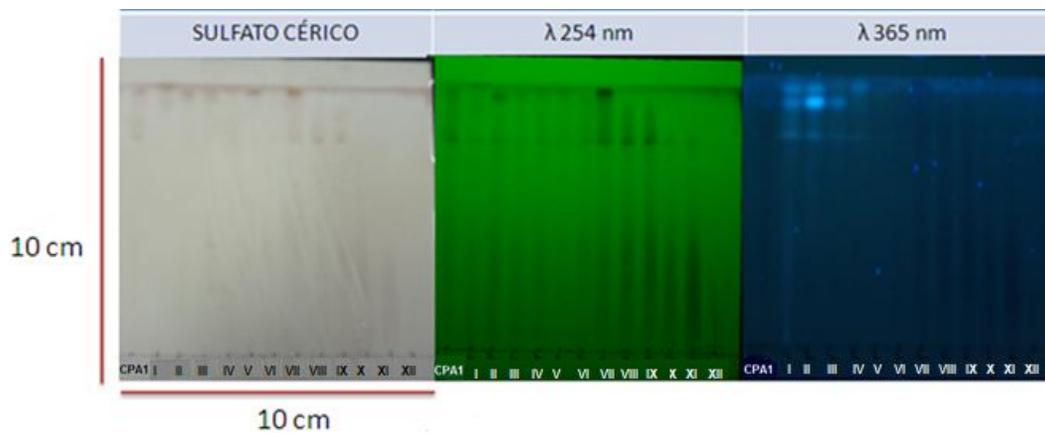


Fig. 19. Cromatografía en capa fina de las fracciones secundarias de CPA1. El agente cromógeno utilizado se indica en la parte superior de la figura. El sistema de elución es AceEto-MeOH-H₂O (4:5:1) + 5 gotas de ácido fórmico. Se usaron placas de 10 X 10 cm

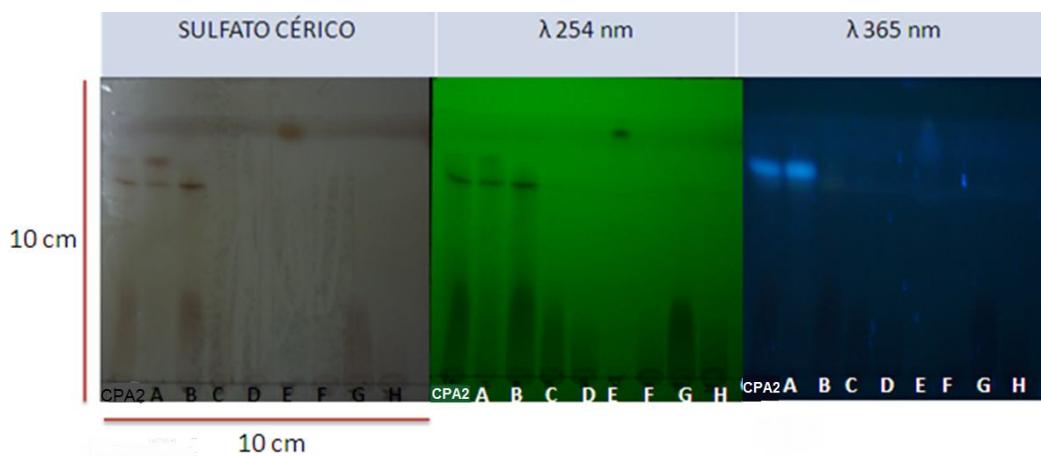


Fig. 20. Cromatografía en capa fina de las fracciones secundarias de CPA2. El agente cromógeno utilizado se indica en la parte superior de la figura. El sistema de elución es AceEto-MeOH-H₂O (4.5:5:0.5) + 5 gotas de ácido fórmico.

VI.1.4 Estudio de toxicidad aguda

Todo producto destinado al consumo humano debe demostrar su seguridad. Esto debe abarcar todos los aspectos de evaluación de inocuidad por los que pasa un medicamento. Aunque el uso por un periodo prolongado de tiempo de algún tratamiento con plantas medicinales, sin ninguna prueba de riesgo, puede indicar que un medicamento es inocuo, esto no siempre es cierto, ya que no se puede depender únicamente del uso a largo plazo para ofrecer garantías de inocuidad, por lo que es importante evaluar los posibles riesgos de consumir medicamentos a base de hierbas. Sin embargo, aun en los medicamentos o productos herbolarios utilizados durante un largo periodo, pueden haber ocurrido riesgos toxicológicos crónicos que hayan pasado inadvertidos. La evaluación de la inocuidad, ya sea dependiente o relacionada con la dosis, debe ser documentada. En este caso, la especificación de la dosis (DL₅₀) debe ser una parte importante de la evaluación de la inocuidad (OMS, 2000).

La investigación bibliográfica sobre antecedentes o estudios toxicológicos de *C. procera* solamente arrojan que los extractos de hexano, diclorometano y acetona son tóxicos en un modelo de estudio que utiliza *Artemia salina*, reportando una DL₅₀ ≤ 1000 ppm (Rodríguez-López *et al.*, 2011).

Este modelo no puede compararse directamente con la actividad en el ser humano ya que se trata de un crustáceo y no está relacionado evolutivamente con los mamíferos. Sin embargo, esta planta ha sido utilizada tradicionalmente sin que se haya reportado algún efecto tóxico (Argueta *et al.*, 1994).

Al no existir registros de efectos tóxicos de *C. procera in vivo*, se decidió evaluar la toxicidad aguda del extracto acuoso íntegro mediante la metodología de Lorke (1983). El ensayo de Lorke se realiza empleando ratones y permite el cálculo de la dosis letal media (DL₅₀) utilizando un número mínimo de animales en un tiempo relativamente corto.

El estudio de toxicidad aguda mostró que hasta la dosis de 5000 mg/kg de CPA administrada por vía intragástrica no se registraron muertes en los animales de experimentación, ni efectos tóxicos (peso y cambios conductuales) significativos comparados con el grupo testigo. Esto nos permitió establecer que la DL₅₀ es mayor a 5000 mg/kg, lo que indica no toxicidad bajo nuestro modelo y de acuerdo a los criterios de Lorke, mostrando hasta cierto punto su seguridad (Tabla. 8).

Tabla 8. Toxicidad aguda del extracto acuoso CPA de *C. procera*

FASE 1		FASE 2	
Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad
10	0/4	1600	0/4
100	0/4	2900	0/4
1000	0/4	5000	0/4

DL₅₀ > 5000mg/kg

VI.1.5 Actividad gastroprotectora del extracto acuoso íntegro y fracciones primarias

De acuerdo con la información bibliográfica, la corteza de *C. procera* es utilizada para adulterar a *Amphipterygium adstringens* “cuachalalate” (Hersch-Martínez *et al.*, 1995), una de las plantas medicinales más ampliamente

comercializadas (y sobreexplotadas) en México para el tratamiento de gastritis y úlcera. De esta especie se cuenta con numerosos estudios de actividades farmacológicas, entre las que figura el estudio de la actividad gastroprotectora (Navarrete *et al.*, 1998; Arrieta *et al.*, 2003) por lo que es posible que *C. procera* tenga esta característica.

Con respecto a *C. procera*, solamente hay un estudio relacionado con su actividad gastroprotectora (Rosas-Acevedo *et al.*, 2011). En ese estudio, comparó la actividad antiulcerosa de los extractos metánolico, hexánico y de acetato de etilo de *C. procera* con los extractos de *A. adstringens*, los resultados mostraron que los extractos de *C. procera* poseen actividad antiulcerosa. Por otro lado, los autores reportan haber aislado del extracto hexánico a la β -amirina, β -sitosterol y una mezcla de ácidos grasos. Se ha reportado que la mezcla de los triterpenos α y β -amirina posee propiedades gastroprotectoras (Navarrete *et al.*, 2002), además el β -sitosterol cuenta con una gran variedad de actividades farmacológicas reportadas, entre ellas la gastroprotectora (Navarrete *et al.*, 2006). Sin embargo, a la fecha no se ha abordado el estudio del efecto gastroprotector del extracto acuoso, por lo que su evaluación es de gran importancia ya que es la forma tradicional en la que la gente consume esta planta para tratar los diversos padecimientos gastrointestinales (Argueta, 1994) y por otra parte, dada la polaridad del extracto acuoso, se espera que las propiedades gastroprotectoras se deban a otro grupo de compuestos diferentes a los reportados por Rosas-Acevedo y colaboradores.

En la Fig. 21 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación del efecto antiulceroso del extracto íntegro CPA y el fármaco de referencia carbenoxolona (CAR) en el modelo de úlceras agudas inducidas por etanol absoluto en ratón. Como se puede observar, el extracto acuoso íntegro posee propiedades gastroprotectoras dependientes de la dosis y significativas con respecto al control negativo (agente injuriante), obteniendo un máximo de gastroprotección de 87% con 100 mg/kg, el cual no se incrementó al aumentar la concentración a 300 mg/kg. La dosis efectiva media fue de $DE_{50}=11.30$ mg/kg-r.

Los resultados de la evaluación de las fracciones primarias en el mismo modelo farmacológico se muestran en la Fig. 22. En este caso, la dosis

administrada de CPA1, CPA2 y CPA3 fue de 100 mg/kg y se determinó con base en la DE_{50} de CPA, de tal forma que nos garantizara que todos los individuos respondieran al tratamiento. Los resultados indican que la fracción CPA1 logró disminuir la formación de úlceras gástricas en aproximadamente un 50% con respecto al control negativo, la fracción CPA2 solo lo hizo en un 30%, mientras que la fracción CPA3 no solo no disminuyó las úlceras, sino que incluso aumentó la ulceración con respecto al control negativo. Sin embargo, ninguna de las fracciones primarias de CPA logró el efecto gastroprotector del extracto íntegro, sugiriéndonos que probablemente exista un efecto sinérgico de compuestos en el extracto.

Si comparamos la buena actividad gastroprotección obtenida con el extracto acuoso íntegro con el fármaco de referencia, carbenoxolona (Fig. 21) es claro el gran potencial que tiene para el tratamiento de úlceras. Por otro lado, aunque el modelo de úlcera empleado no es de etiología bacteriana, si consideramos que el extracto acuoso presenta una buena actividad anti-*H. pylori*, podríamos sugerir el empleo de este extracto de *C. procera* como un tratamiento integral de úlceras de cualquier origen, recordemos que *H. pylori* está presente en el 85-90% de personas con úlcera péptica (Sobrino, 2007)

Por otra parte, cabe recordar que la corteza de *C. procera* es utilizada para adulterar la corteza de *A. adstringens*, una especie medicinal ampliamente utilizada para tratar gastritis y úlceras. Sin embargo, esta última especie está sobreexplotada y en peligro de extinción (NOM-059-ECOL-2001), por lo que la validación del uso etnomédico de la corteza de *C. procera* representaría una opción para tratar dichos padecimientos y para la conservación de ambas especies.

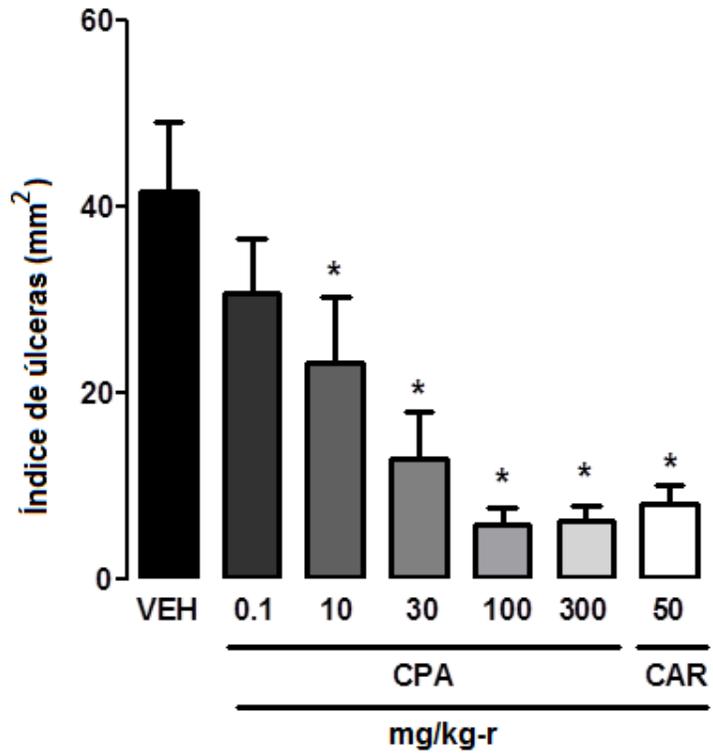


Fig. 21. Efecto gastroprotector del extracto acuoso (CPA, 0.1-300 mg/kg, *p.o.*) de *C. procera* y carbenoxolona (CAR, 50 mg/kg, *p.o.*) en el modelo de lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratones. Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm E.E. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVIA seguida de una prueba de Dunnet * $P < 0.05$.

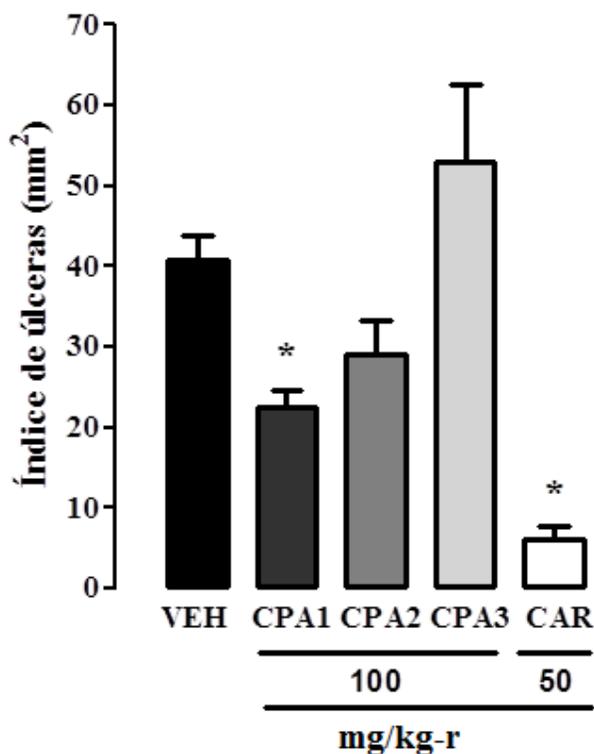


Fig. 22. Efecto gastroprotector de las fracciones primarias CPA1, CPA2 y CPA3 (100 mg/kg, *p.o.*) de *C. procera* en el modelo de lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratones. Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm E.E. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVIA seguida de una prueba de Dunnet * $P < 0.05$.

VI.1.6 Estudios preliminares del mecanismo de acción del efecto gastroprotector del extracto acuoso de *C. procera*

Con la finalidad de establecer el papel de las prostaglandinas endógenas, el óxido nítrico y los grupos sulfhidrilos en la acción gastroprotectora del extracto acuoso de *C. procera* se realizaron una serie de experimentos utilizando el mismo modelo *in vivo* con algunas modificaciones que se detallaron en el inciso 3.1.6.1. de la sección experimental.

Los resultados mostraron que en aquellos grupos donde los animales fueron pretratados con INDO (30 mg/kg, *s.c.*), inhibidor de la síntesis de prostaglandinas endógenas y con NEM (1 mg/kg, *s.c.*), un bloqueador de los grupos sulfhidrilos endógenos (tioles), se observó la reversión del efecto gastroprotector (IU) que provocaba la administración de 100 mg/kg vía oral de

CPA (Fig. 23 B y C). Solo en el caso del pretratamiento con L-NAME (10 mg/kg, *i.p.*), inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, no hubo reversión del efecto (Fig. 23 A).

Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción gastroprotector del extracto acuoso de *C. procera* podría estar mediado por la inducción en la síntesis de prostaglandinas endógenas y los grupos sulfhidrilos.

Generalmente la progresión del daño en la mucosa gástrica se acompaña por una disminución en la concentración de grupos sulfhidrilos. Estos grupos protegen a la mucosa gástrica, ya que participan en la producción de moco (Allen *et al.*, 1998; Salim, 1993), además se unen a los radicales libres y de esta forma evitan su acción nociva (Allen *et al.*, 1998). Por otro lado, la unión de las glicoproteínas (presentes en la mucosa) con lípidos y mucina participan en procesos involucrados en la eliminación de radicales libres (Oliveira *et al.*, 2004), que permiten un equilibrio entre factores agresivos y protectores.

Por otro lado, la generación continua de prostaglandinas por la mucosa es crucial para mantener la integridad de la mucosa y protegerla contra agentes ulcerogénicos y necrosantes. La mayoría de los mecanismos de defensa de la mucosa son estimulados o facilitados por las prostaglandinas inhibiendo la secreción de ácido gástrico, estimulando la secreción de moco, bicarbonato y fosfolípidos; aumentando el flujo sanguíneo de la mucosa, y acelerando la restitución epitelial y la cicatrización de la mucosa (Luis-Ferreira *et al.*, 2010; Ham *et al.*, 2007).

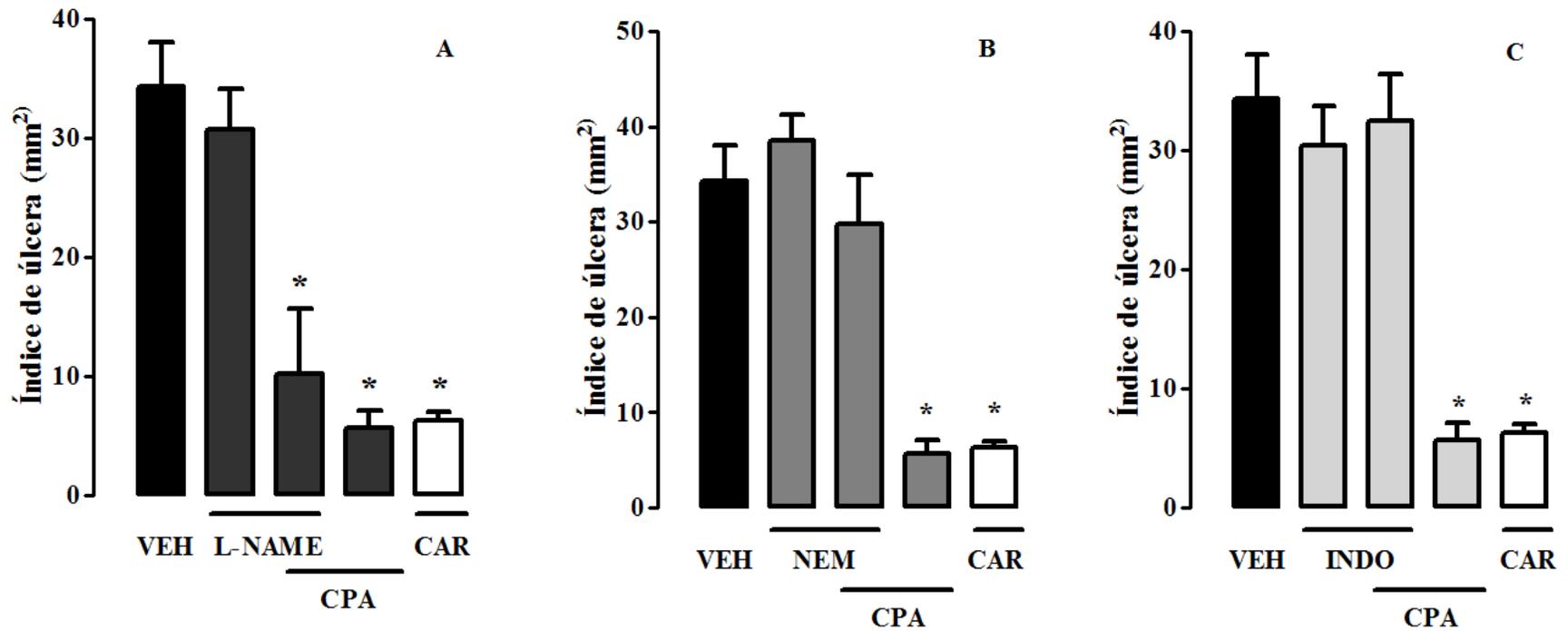


Fig. 23. Efecto gastroprotector del extracto acuoso de *C. procera* (CPA, 100 mg/kg-r, p.o.) y carbenoxolona (CAR, 50 mg/kg-r, p.o.) en el modelo de lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratones pretratados con (A) L-NAME (10 mg/kg-r, i.p.), (B) N-etilmaleimida (1 mg/kg-r, s.c.), (C) indometacina (30 mg/kg-r, s.c.). Cada punto representa la media de seis determinaciones (n=6) ± e.e. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVIA seguida de una prueba de Dunnet * P<0.05.

VI.1.7 Determinación de la actividad anti-inflamatoria

Los productos naturales ofrecen una gran diversidad química, ocupan una región complementaria en el campo de la química farmacéutica comparada con los compuestos de origen sintético. La actividad anti-inflamatoria ha despertado en los últimos años un gran interés científico en el área de la farmacológica, principalmente por la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios (Gómez-Estrada *et al.*, 2011). La respuesta inflamatoria ocurre en tres fases distintas, cada una mediada aparentemente por diferentes mecanismos:

- 1) Una fase transitoria aguda, caracterizada por la vasodilatación local e incremento en la permeabilidad capilar,
- 2) Una fase subaguda tardía, visiblemente caracterizada por un periodo de hiperemia pasiva, infiltración de leucocitos y fagocitos y,
- 3) Una fase proliferativa crónica, en la cual ocurre una degeneración de tejidos, lesión endotelial y fibrosis (Fridovich, 1997).

Existe una fuerte relación entre la infección persistente por *H. pylori*, la inflamación crónica y el cáncer gástrico. Este patógeno estimula a las células del epitelio gástrico para secretar IL-8, un quimioatrayente de leucocitos que infiltra el tejido afectado de manera persistente. También se observan concentraciones elevadas de citosinas inflamatorias que promueven la pérdida de la homeostasis celular. No está claro el mecanismo por el cual esta reacción inflamatoria lleva al cáncer gástrico, pero los radicales libres de oxígeno y nitrógeno (ERO's y ERN's) podrían contribuir de modo directo al daño genómico de la mucosa (Fuentes-Pananá *et al.*, 2009). Con respecto a *C. procera* no existen estudios de actividad antiinflamatoria, sin embargo, Rosas-Acevedo y colaboradores reportan haber aislado del extracto hexánico a la β -amirina y al β -sitosterol, compuestos que tienen diversos reportes de actividad antiinflamatoria (Gupta *et al.*, 1980; Gómez *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2004). No obstante, a la fecha no se ha abordado en el estudio del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso, por lo que su evaluación es de gran importancia ya que es la forma tradicional en la que la gente consume esta planta (Argueta, 1994) y por otra parte, dada la polaridad del extracto acuoso,

se espera que las propiedades antiinflamatorias se deban a otro grupo de compuestos diferentes a los reportados por dichos autores.

En este trabajo se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso íntegro de *C. procera* utilizando el modelo de edema agudo inducido por TPA en oreja de ratón

El extracto acuoso de *C. procera* presentó un efecto antiinflamatorio significativo, con respecto al vehículo (VEH), cuando de manera tópica se aplicaron dosis de 0.1 a 1 mg/oreja del extracto. No fue posible probar dosis mayores debido a que existen problemas de solubilidad del extracto. El efecto máximo se logró a la dosis de 1 mg/oreja e inhibió solo un 27% la formación del edema (Fig. 24). Como fármacos de referencia se utilizaron a la indometacina y a la dexametasona (0.5 y 0.05 mg/oreja, respectivamente) los cuales inhibieron la formación del edema en un 48.3 y 62.8% respectivamente (Fig. 24). Si comparamos el efecto inhibitorio del extracto acuoso de *C. procera* con los controles positivos de referencia, es evidente que su efectividad es menor, sin embargo, hay que tomar en cuenta que se trata de un extracto crudo y no de un compuesto puro como es el caso de dichos fármacos. Por otra parte, aunque no sea muy potente el extracto, su actividad antiinflamatoria se sumaría a las actividades biológicas que previamente hemos reportado en este trabajo.

Debido a que el efecto antiinflamatorio no fue muy sobresaliente, no se determinó el potencial de las fracciones primarias. Sin embargo, sería interesante corroborar estos datos utilizando otros modelos para evaluar la actividad antiinflamatoria, así como otras vías de administración para tener un panorama amplio y un estudio más profundo sobre la actividad antiinflamatoria de *C. procera*.

Contar con esta información es de gran importancia ya que la gastritis es un padecimiento que cursa con un cuadro inflamatorio, además una inflamación antral-predominante conduce a un aumento en la producción de ácido del corpus y predispone a la ulceración duodenal; y la gastritis con predominio en el corpus conduce a la hipoclorhidria y predispone a la ulceración gástrica y adenocarcinoma (Atherton, 2006).

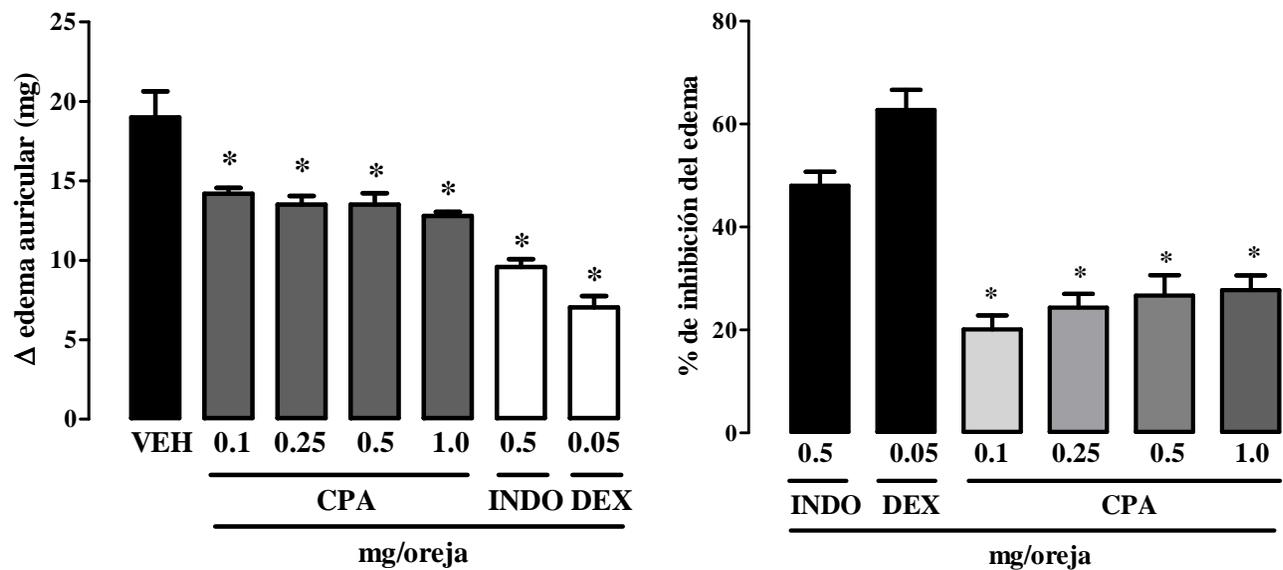


Fig. 24. Efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de *C. procera* en el modelo de formación del edema agudo inducido por aplicación tópica de acetato de tetradecanoilforbol (2.5 μg/oreja) en oreja de ratón, se considera el 100% de inflamación al edema presentado por la administración del vehículo y TPA. A) Diferencias de peso presentadas en biopsias del edema auricular de ratón. B) Porcentaje de inhibición del edema, utilizando los datos del panel A. Cada punto representa la media de seis determinaciones (n=6) ± e.e. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVIA seguida de una prueba de Dunnet * P<0.05.

VII. Conclusiones

México cuenta con una gran tradición en el uso de plantas medicinales, las cuales constituyen actualmente uno de los recursos más conocidos y accesibles para grandes núcleos de la población mexicana. La OMS reconoce el valor de esta práctica terapéutica y le otorga gran importancia en los esquemas o sistemas públicos para la salud. En este trabajo de Tesis utilizamos una de estas especies, *Cyrtocarpa procera*, conocida comúnmente como chupandilla y empleada para tratar diversos padecimientos gastrointestinales como la diarrea, disentería, dolor de estómago y padecimientos renales.

Helicobacter pylori ha tomado gran importancia en los últimos años por ser el principal agente etiológico de la gastritis crónica activa y de la úlcera péptica, además de estar vinculada con el carcinoma gástrico y de estar clasificada dentro de los carcinógenos del grupo 1 según la IARC. Debido a los problemas que se presentan con los fármacos utilizados para combatir la infección por *H. pylori*, se ha tratado de encontrar en las plantas de la medicina tradicional mexicana una alternativa para erradicarla. Castillo-Juárez y colaboradores (2009) reportaron que extractos acuosos y metanólicos de la corteza de *C. procera* presentan actividad inhibitoria sobre el crecimiento de la bacteria. Considerando que las preparaciones acuosas es la forma tradicional como se consume esta corteza para tratar enfermedades gastrointestinales, se decidió en este trabajo estudiar más a fondo y de manera integral las propiedades anti- *H. pylori*, gastroprotectoras, antiinflamatorias y la toxicidad del extracto acuoso de *C. procera*.

Con respecto a la actividad contra *H. pylori*, al comparar las CMI's obtenidas para los antibióticos de referencia metronidazol y amoxicilina (300 y 0.05 µg/mL, respectivamente) con las de las fracciones primarias de acetato de etilo (CPA1, CMI=125 µg/mL) y butanólica de *C. procera* (CPA2, CMI=62.5 µg/mL), concluimos que ambas presentan buena actividad contra la bacteria. Por su parte, la fracción secundaria de acetato de etilo (CPA1-I, CMI=125 µg/mL) y las fracciones secundarias butanólicas (CPA2-C y CPA2-G, CMI=

62.5µg/mL) mantuvieron esa buena actividad, por lo que se puede señalar que tienen un buen potencial para la obtención de compuestos con actividad anti-*H. pylori* a partir de ellas.

Los estudios de toxicidad aguda del extracto acuoso íntegro de *C. procera* indicaron que la planta no es tóxica con una $DL_{50} > 5000$ mg/kg de acuerdo al modelo de toxicidad que se empleó en este trabajo. Estos resultados son consistentes con el hecho de que no haya información bibliográfica de reportes de toxicidad por el empleo que se le da a la planta. Sin embargo, queda por estudiar el efecto del extracto a largo plazo en un modelo *in vivo* y en estudios clínicos.

La evaluación de la actividad gastroprotectora indicó que CPA presenta buena actividad anti-ulcerosa (87% con 100 mg/kg) y tiene un comportamiento dosis dependiente. Por su parte, los estudios preliminares del mecanismo de acción de CPA indicaron que los ratones que recibieron el pretratamiento con indometacina (INDO) y N-etilmaleimida (NEM) inhibieron la actividad gastroprotectora de CPA, lo cual sugiere que las prostaglandinas y los grupos sulfhidrilos endógenos juegan un papel muy importante en la actividad gastroprotectora del extracto acuoso CPA. Los ratones pretratados con L-NAME no inhibieron la actividad gastroprotectora, lo que sugiere que no hay participación del NO en la actividad gastroprotectora de CPA. Así mismo, la fracción primaria CPA1 mostró tener actividad gastroprotectora significativa inhibiendo el 50% de la formación de úlceras a la dosis de 100 mg/kg respecto al vehículo, sugiriendo que la mayoría de los metabolitos activos gastroprotectores podrían encontrarse en esta fracción.

Finalmente los estudios de actividad antiinflamatoria mostraron que CPA tiene un bajo, pero significativo efecto antiinflamatorio respecto al vehículo y comparándolo a su vez con los fármacos de referencia (INDO y DEX), obteniendo el máximo efecto a la dosis de 1 mg/oreja con una inhibición de la formación del edema del 27%. Sin embargo, sería interesante determinar el efecto anti-inflamatorio en otro modelo u otra vía de administración.

De manera general el conjunto de los efectos anti-*H. pylori*, antiinflamatorio y gastroprotector que presentó el extracto acuoso íntegro de *C. procera*, aunado a la inocuidad que se encontró en fase aguda, sientan las bases para una validación del uso tradicional de la especie y nos indican el potencial que tiene para ser considerada como un tratamiento integral en la erradicación de la infección por *H. pylori* y de las enfermedades relacionadas con la bacteria.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdo-Francis, J. M., Uscanga, D. L., Sobrino, C.S., Rivera, R. J. F., Huerta, I. F. y Tamayo de la Cuesta, J. L. 2007. III Consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 72: 137-153.
- Appelmelk, B. J., Martino, M. C., Veenhof, E., Monteiro, M. A., Maaskant, J. J., Negrini, R., Lindh, F., Perry, M., Del Giudice, G. y Vandenbroucke-Grauls, C. M. 2000. Phase variation in H type I and Lewis a epitopes of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 68:5928-5932.
- Arévalo, A., Trespalacios, A. y Otero, W. 2009. The importance of CagA protein in *Helicobacter pylori* infection. *Rev. Col. Gastroenterol.* 24: 388-395.
- Argueta, A. 1994. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Primera edición. México: INI. Vol. 1 y 2. Varias p.
- Argyros, F., Ghosh, M., Huang, L., Masubuchi, N., David R. Cave, D. y Grübel, P. 2000. Evaluation of a PCR Primer Based on the Isocitrate Dehydrogenase Gene for Detection of *Helicobacter pylori* in Feces. *J. Clin. Microbiol.* 38:3755-3758.
- Asaka, M., H. Takeda, T. Sugiyama, and M. Kato. 1997. What role does *Helicobacter pylori* play in gastric cancer. *Gastroenterol.* 113:S56-S60.
- Aspholm-Hurtig, M., Dailide, G., Lahmann, M., Kalia, A., Ilver, D., Roche, N., Vikstrom, S., Sjostrom, R., Linden, S., Backstrom, A., Lundberg, C., Arnqvist, A., Mahdavi, J., Nilsson, U. J., Velapatino, B., Gilman, R. H., Gerhard, M., Alarcon, T., López-Brea, M., Nakazawa, T., Fox, J. G., Correa, P., Dominguez-Bello, M. G., Pérez-Pérez, G. I., Blaser, M. J., Normark, S., Carlstedt, I., Oscarson, S., Teneberg, S., Berg, D. E. y Boren, T. 2004. Functional Adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO Blood Group Antigen Binding Adhesin. *Science* 305:519-522.
- Atherton JC y Blaser MJ. 2009. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J. Clin. Invest.* 119; 9:2475-2487.
- Atherton, J. C. 1997. Non-endoscopic tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11 Suppl. 1:11-20.
- Ávila-Ramírez, N. A., Ayala-Burgos, A., Gutiérrez-Vázquez, E., Herrera-Camacho, J., Madrigal-Sánchez, X. y Ontiveros-Alvarado, S. 2007. Taxonomy and chemical composition of the foliar necromasa from arboreal and shrubby species consumed during the drought in the low deciduous forest in La Huacana, Michoacán, México. *Livestock Research for Rural Development*, 19.
- Besasso, H. 1996. *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. *Acta Gastroenterol. Latinoam.* 26: 63.
- Bizzozero G. 1893. Ueber die schlauchformigen drüsen des magendarmkanals und die beziehungungen ihres epithels zu dem oberflachenepithel der schleimhaut. *Arch. Mikr. Anat.* 42:82.

- Blaser, M. J. 1992. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterol.* 102:720-727.
- Blaser J. M. y Atherton J. C. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest.* 113:321-333.
- Bucciarelli, A. y Skliar, M. I. 2007. Medicinal plants from Argentina with gastro protective activity. *Ars. Pharm.* 48:361-369.
- Campo, S. M., Zullo, A., Hassan, C. y Moroni, S. 2007. Antibiotic treatment strategies for *Helicobacter pylori* infection. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 2:11-17.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Ávila, G., Duran, A. y Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *J. Ethnopharmacol.* 97:429-439.
- Castillo-Juárez, I. y Romero, I. 2007. Plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*: una revisión. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 80:35-61.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. y Romero, I. 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 122:402-405.
- Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz F., Celis H. y Romero, I. 2007. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* 114:72-77.
- Castillo-Rojas, G., Mazari-Hiriart, M. y López-Vidal, Y. *Helicobacter pylori*: focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública de México.* 46:538-548.
- Cellini, L., Di Campi, E., Masulli, M., Di Bartolomeo, S. y Allocati, N. 1996. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extracts (*Allium sativum*). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13:273-277.
- Chiba, N., Rao, B.V., Rademaker, J. y Hunt, R. 1992. Meta-analysis of the efficacy of antibiotic therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. *Am. J. Gastroenterol.* 87:1716-1726.
- Cohen, H. y Laine, L. 1997. Endoscopic methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11 Suppl 1:3-9.
- Correa, P. 1992. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 52:6735-6740.
- Correa, P. and V. W. Chen. 1994. Gastric cancer. *Cancer Surv.* 19-20:55-76.

- Covacci, A., Censini, S. y Bugnoli, M. 1993. Molecular characterization of the kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori*: Associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:5791-5795.
- Cover, T. L. y M. J. Blaser. 1996. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. *Adv. Intern. Med.* 41:85-117.
- Cowan, M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 564-582.
- Creanen, M. E., Dekker, W., Block, P., Ferwerda, J. y Tytgat, G. N. 1992. Intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*: an endoscopic bioptic study of the gastric antrum. *Gut*. 33:16-20.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. y Lewis, N. G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). pp. 1250-1318. En: Buchanan, B., Grisse, W. y Jones R, R. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Vol. 24. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. 1367 p.
- Debets-Ossenkopp, Y. J., Herscheid, A. J., Pot, R. G., Kuipers, E. J., Kusters, J. G. y Vandenbroucke-Grauls, C. M. 1999. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and trovafloxacin in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 43:511-515.
- Dehesa, M., Larisch, J., Dibildox, M., Vega, B., Di Silvio, M., Rodríguez, L., Camorlinga, M., Almaguer, I., Ramírez-Barba, E. y Torres, J. 1998. Comparación de dos esquemas basados en pantoprazol para la erradicación de *Helicobacter pylori* en pacientes con úlcera duodenal activa. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 63:66-71.
- Dehesa, V. 1993. Métodos de diagnóstico en infección para *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol. Méx.* 2:87-95.
- De Young, L. y M Young, J. M. (1989) Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents, in *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation* (Chang J.Y. and Lewis, A.J., eds.), A.R. Liss, New York, pp. 215–231.
- Di Mario, F., Cavallaro, L. G. y Scarpignato, G. 2006. Rescue therapies for the management of *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Dis.* 24:113-130.
- Dixon, M. F. 2001. Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration. En: *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. (Eds. Mobley H. L. T., Mendz G. L. y Hazell S. L.). ASM Press, Washington, pp. 459-469.
- Don, J. B., Noel, R. K. y James, T. S. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Vol. 2. The Proteobacteria, Part C, pp. 1169.
- Du, M., Diss, T. C., Xu, C., Peng, H., Isaacson, P. G. y Pan, L. 1996. Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. *Leukemia*. 10:1190-1197.

- Eaton K. A. 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 37:123-127.
- Egan, B. J., Holmes, K., O'Connor, H. J. y O'Morain, C. A. 2007. *Helicobacter pylori* Gastritis, the Unifying Concept for Gastric Diseases. *Helicobacter* 12(Suppl. 2):39-44.
- Evans Jr, D., Evans, D., Moulds, J, Engstrand L. y Graham, D.Y. 1992. Urease-associated heat shock protein of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 60:2125-2127.
- Everhart, J., Kruszon-Moran, D., Pérez-Pérez G., Tralka T. y McQuillan, G. 2000. Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *J. Infect. Disc.* 181:1359-1363.
- Ferguson, D. A., Chuanfu, Li., Patel, N. R., Mayberry, W. R., Chi, D. S. y Thomas, E. 1993. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J. Clin. Microbiol.* 31:2802-2804.
- Ferlay, J., Bray, F y Pisani, P: GLOBOSCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Version 2.0. Lyon, IARC Press, 2004
- Ferrero, R. y Fox, J. 2001. *In vivo* modeling of *Helicobacter*-associated gastrointestinal diseases. En *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. (Eds. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L. y Hazell, S.L.) ASM Press Washington. pp 565-582.
- Ford, A. C., Delaney, B. C., Forman, D. y Moayyedi, P. 2006. Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori* positive patients. *Cochrane Database Syst Rev* (2) CD003840.
- Fox J. y Lee A. 1997. The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. *Lab. Anim. Sci.* 47:222-255.
- Fridovich, I. 1997. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272:18515-18517.
- Fuentes-Pananá, E., Carmolingo-Ponce, M. y Maldonado-Bernal, C. 2009. Infección, inflamación y cáncer gástrico. *Sal. Pub. Mex.* 51:427-433.
- Gerhard, M., N. Lehn, N. Neumayer, T. Boren, R. Rad, W. Schepp, S. Miehke, M. Classen, and C. Prinz. 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:12778-12783.
- Gerrits, M. M., van Vliet, A. H., Kuipers, E. J. y Kusters, J. C. 2006. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet. Infect. Dis.* 6:699-709.
- Gil, M. A., Beneyto, C. F., Calatayud, G. A., Giménez, F. F. J. y Cortina, B. P. 1990. Evolución de la mortalidad por cáncer de estómago en España (1951-1985). *Rev. Esp. Enf. Dig.* 78:61-66.

- Gilger, M. A. 2000. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in children. *Curr. Pharm. Des.* 6:1531-1536.
- Gill, H. H. y Desai, H. G. 1993. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disorders in India-lesson from epidemiology. *J. Clin. Gastroenterol.* 16:6-9.
- Glupczynski, Y., Bourdeaux, L., Verhas, M., DePrez, C., De Vos, D. y Devreker, T. 1992. Use of urea breath test versus invasive methods to determine the prevalence of *Helicobacter pylori* in Zaire. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:322-327.
- Godoy, A. P., Ribeiro, M. L., Y. Benvengo, H., Vitiello, L., Miranda, M. C., Mendonca, S., y Pedrazzoli, J. Jr. 2003. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol.* 3:20.
- Gómez-Estrada, H. A., González-Ruíz, K, N. y Domingo-Medina, J. 2011. Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 10: 182-217.
- Gómez, M., Saenz, M., García, M. y Fernández, M. 1999. Study of tropical antiinflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. *Zeit. fur Naturforsch.* 54:937-941.
- Goodwin, C. S. y Armstrong, J. A. 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur. J. Clin. Microbiol. & Inf. Dis.* 9:1-13.
- Goodwin C. S., Amstrong J. A., Chilvers T., Peters M., Collins M., Sly L., McConnell W. y Harper W.E.S. 1989 (a). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. Nov. as *Helicobacter pylori* comb. Nov. and *Helicobacter mustelae* comb. Nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:397-405.
- Goodwin, C., McCulloch, R., Amstrong J. y Wee, H. S. 1985. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J. Med. Microbiol.* 19:257-267.
- Goodwin, A., Kersulyte, D., Sisson, G., Veldhuyzen Van Zanten, S., Berg, D. y Hoffman, P. 1998. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol. Microbiol.* 28:383-393.
- Goodwin, C. S. 1997. Antimicrobial treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Infect. Dis.* 25:1023-1026.
- Graham, D. Y. and L. Rabeneck. 1996. Patients, payers, and paradigm shifts: what to do about *Helicobacter pylori*. *Am. J. Gastroenterol.* 91:188-190.
- Graham, D.Y., Lew, G.M., Klein, P.D., Alpert, L. C. y Genta R.M. 1992. Factors affecting the eradication of *Helicobacter pylori* infection with triple therapy. *Gastroenterol.* 192:163-167.

- Gupta, M. B., Nath, R., Srivastava, N., Shanker, K., Kishor, K. y Bhargava, K. P. 1980. Anti-inflammatory and antipyretic activity of β -sitosterol. *Plant. Med.* 39:157-163.
- Gur, G., S. Boyacioglu, C. Gul, M. Turan, M. Gursoy, C. Baysal, and N. Ozdemir. 1999. Impact of *Helicobacter pylori* infection on serum gastrin in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14:2688-2691.
- Guruge, J. L., Falk, P. G., Lorenz, L. G., Dans, M., Wirth, H. P. y Blaser, M. J. 1998. Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:3925-3930.
- Hacker J., Blum-Oehler G. y Muhidorfer, I. 1997. Pathogenicity Island of virulent bacterial structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23: 1089-1097.
- Ham, M. y Kaunitz, J. D. 2007. Gastroduodenal defense. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 57:495-505.
- Hänninen, M. y Hannula, M. 2007. Phylogenetic analysis of *Helicobacter* species based on partial gyrB gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:444-449.
- Harbone, J.B. 1973. *Phytochemical Methods*. Ed. Chapman and Hall. USA. 40pp.
- Harris, P. R. y Smith P. D. 1997. Role of mononuclear phagocytes in H. pylori-associated inflammation. En *The Immunobiology of Helicobacter pylori-From pathogenesis to Prevention*. P.B. Erns, P. Michetti, and P. D. Smith, eds. Lippincott-Raven, New York.
- Hazell, S. L., Evans, D. J. Jr. y Graham, D. Y. 1991. *Helicobacter pylori* catalase. *J. Gen Microbiol.* 137:57-61.
- Hersch-Martínez, P. 1995. Commercialization of medicinal plants from southwest Puebla, Mexico. *Econ. Bot.* 49:197-206.
- Hernández, H. E., Mendoza, C. I., Carmolina, M., González-Valencia, J., Torres, J., Kretschmer, R. y Pérez-Rodríguez, M. 2005. Frecuencias HLA-DQA1 y DQB1 en nahuas infectados con *Helicobacter pylori*. *Revista salud pública y Nutrición*. Edición especial No. 5-2005.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Fugita, A. y Yamasaki S. 2002. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine fosforilation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:14428-14433.
- Holly, M., Scott, A. y Timothy, L. C. 2006. *Helicobacter pylori* Persistence: an Overview of Interactions between H. pylori and Host Immune Defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(4):597-613.
- Huerta, C. 1997. La herbolaria: mito o realidad. *CONABIO. Biodiversitas* 12:1-7.

- <http://unibio.unam.mx>
- <http://unibio.unam.mx>
- <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf>
- <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
- <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
- <http://www.tropicos.org/LocationSubordinate.aspx?locationid=369>
- <http://www.tropicos.org/Name/50145943>
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1994. Infection with *Helicobacter pylori*. Schistosomes, Liver flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum.* 61:1-241.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ögren, J., Frick, I. M., Kerslyte, D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L., y Borén, T. 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated hysto-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279:373-377.
- INI, Instituto Nacional Indigenista. 1994. Atlas de las plantas medicinales tradicionales mexicanas. Tomo II. INI. México, D. F.
- Jeong, J. Y., Mukhopadhyay, A.K., Dailidiene, D., Wang, Y., Velapatino, B. y Gilman, R. 2000. Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 182:5082-5090.
- Jones, B. D. y Mobley, H. L. 1987. Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. *Infect. Immun.* 55:2198-203.
- Kawase, M. y Motohashi, N. 2004. Plant-derived leading compounds for eradication of *Helicobacter pylori*. *Curr. Med. Chem. Anti-infective Agents* 3:89-100.
- Kato, I., Tominaga, S., Ito, Y., Kobayashi, S., Yoshii, Y., Matsuura, A., Kameya, A., y Kano, T. 1992. Atrophic gastritis and stomach cancer risk: cross-sectional analyses. *Jpn. J. Cancer. Res.* 83:1041-1046.
- Kato, T., Sairo, Y., Niwa, M., Inove, M., Moroyama, N. y Ogoshi, K. 1994. *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinoma. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 6: 593-596.
- Kim, J. y Kwon, D. 2003. Mixed-infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolated in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. *Helicobacter.* 8:202-206.

- Kuipers, E., Pérez-Pérez, G., Meuwissen, S. y Blaser, M. 1995. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:1777-1780.
- Kusters, J. G., van Vliet AH. Y Kuipers EJ. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:449-90.
- Kwon, D., Kim, M., Lee, Y., Yamaoka, M., Kato, M. S., Osato, F., El-Zaatari, M. y Graham, D. 2000. Isolation and characterization of tetracycline-resistant clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3203-3205.
- Ladron de G. L., Gómez, P. A., Nicolas, P. L., Lichtinger, A., Figueroa, B. S., Shapiro, S. I., Rubinstein, M., Di, S. y López, M. 2004. Evaluación de la sintomatología y calidad de vida en la dispepsia funcional antes y después de tratamiento de erradicación de *H. pylori*. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 69:203-208.
- Langton, R. S. y Cesareo, S. D. 1992. *Helicobacter pylori* associated phospholipase A2 activity: a factor in peptic ulcer production? *J. Clin. Pathol.* 45:221-224.
- Leal-Herrera, Y., Torres, J. y Monath, T. P. 2003. High rates of recurrence and of transient reinfections of *Helicobacter pylori* in a population with high prevalence of infection. *Am. J. Gastroenterol.* 98:2395-402.
- Lee, J. H., Park, E. K., Uhm, C.S., Chung, M. S. y Kim, K. H. 2004. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharides from *Artemisia capillaries* and *Panax ginseng*. *Planta Medica.* 70:615-619.
- Leung, W., Siu, K., Kwok, C., Chan, S. y Sung, J. 1999. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro- oral transmission. *Am. J. Gastroenterol.* 94:2881-2884.
- Linares, D., Bye, R. y Flores, B. 1999. Plantas Medicinales de México. Usos y remedios tradicionales. Instituto de Biología, UNAM. pp. 155.
- Logan, R. P. H. y Walker, M. M. 2001. ABC of the upper gastrointestinal tract. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 323:920-922.
- Lorke, D. 1983. A new approach to partial acute toxicity testing. *Arch. of Toxicol.* 54:275-287.
- Luiz-Ferreira, A., Alves, A. C., Cola, M., Barbastefano, V., Albino, A. B., Batista, L. M., Farias-Silva, E., Pellizon, C. H., Hiruma-Lima, C. A., Campaner, L., Vilegas, W. y Monteiro, A. R. 2010. Mechanism of the Gastric Antiulcerogenic Activity of *Anacardium humile* St. Hil on Ethanol-Induced Acute Gastric Mucosal Injury in Rats. *Molecules.* 15:7153-7166.

- Maeda, S., Ogura, K., Yoshida, H. y Funai, F. 1998. Major virulence factors, VacA and CagA are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut*. 42:338-343.
- Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F. O., Forsberg, L., Roche, N., Årmströng, J., Larson, T., Teneberg, S., Karlsson, K. A., Altraja, S., Wadström, T., Kersulyte, D., Berg, D. E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, E. K., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B.B. y Arnqvist, A. 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 297:573-578.
- Malaty, H., Kugamagai, T., Tanaka, E., Ota, H., Kiyosawa, K., Graham, D., Katsuyama, T. 2000. Evidence from a nine-year birth cohort study in Japan transmission pathways of *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Microbiol.* 38:1971-1973.
- Malfertheiner, P. 2007. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 56:772-781.
- Marshall, B. J. y Goodwin, C. S. 1987. Revised nomenclature of *C. pyloridis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:68.
- Marshall, B. y Warren, J. 1984. Unidentified curved bacilli in stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1:1311-1315.
- Marshall, B. 2002. *Helicobacter pylori*: 20 years old on. *Clinical Medicine*. JRCPL. 2:147-152.
- Mazari-Hirart, M., López-Vidal, Y., Castillo-Rojas, G., Ponce de León, S. 2001. *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico City. *Arch. Med. Res.* 32:458-467.
- McColl, K. E. 1992. *Helicobacter pylori* colonization and alterations in gastric physiology, p. 198-208. En B. Rathbone. y R. V. Heatley (eds.), *Helicobacter pylori* and Gastrointestinal Disease. Blackwell Scientific, Oxford.
- Megraud, F. 1998. Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 115:1278-1282.
- Mitchell, H. M. 2001. Epidemiology of infection. En *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. (Eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L.) ASM press Washington. pp 7-18.
- Mobley, H. L. T. 2001. Urease. En: *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. (Eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L.). ASM Press. Washington. pp. 179-191.
- Monteiro, M. A., Chan, K. H., Rasko, D. A., Taylor, D. E., Zheng, P. Y., Appelmelk, B. J., Wirth, H. P., Yang, M., Blaser, M. J., Hynes, S. O., Moran, A. P., y Perry, M. B. 1998. Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. *Molecular*

mimicry between *H. pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *J. Biol. Chem.* 273:11533-11543.

- Monteiro, M. A., Zheng, P., Ho, B., Yokota, S., Amano, K., Pan, Z., Berg, D. E., Chan, K. H., MacLean, L. L. y Perry, M. B. 2000. Expression of histo-blood group antigens by lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains from asian hosts: the propensity to express type 1 blood-group antigens. *Glycobiology* 10:701-713.
- Morales M. R. 2000. Diversidad genética de *vacA* en cepas de *Helicobacter pylori* y su asociación con la vacuolización en las células HeLa. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Fac. de Medicina UNAM. 85 p.
- Moran, A. P. 1996. The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Aliment Pharmacol. Ther.* 10 Suppl 1:39-50.
- Moran, A. P. 1997. *Helicobacter pylori*: introduction and historical perspective, p. 1-5. In Moran AP and O'Morain CA (ed.), Pathogenesis and host response in *Helicobacter pylori* infections. Normed Verlag GmbH, Bad Homburg.
- Nagorni, A. 2000. *Helicobacter pylori* at the end of the second millennium. *Facta Universitatis* 7:15-25.
- Navarrete, C. A., Martínez-Urbe, L. S. y Reyes, B. 1998. Gastroprotective activity of the stem bark *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytother. Res.* 12:1-4.
- Navarrete, A., Trejo-Miranda, J. L., Reyes-Trejo, L. 2002. Principles of root of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *J. Ethnopharmacol.* 79:383-388.
- Navarrete, A., Sánchez-Meondoza, M. E., Castillo-Henkel, C. y Arrieta, J. 2006. Role of Endogenous Prostaglandins in Gastroprotection of β -sitosterol and Four Derivative esters on Ethanol-induced Gastric Mucosal Lesions in Rats. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 49:130-133.
- NHI (National Institutes of Health).1994. Consensus conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NHI Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. *Jama.* 272:65-69.
- NLCCS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth Informational Supplement. M100-S15, 25:135.
- O'Rourke y Bode (2001). Morphology and Ultrastructure. Physiology and genetics. (Eds. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L. y Hazell, S.L.) ASM Press Washington. pp 53-63.
- Occhialini, A., Urdaci, M., Doucet-Populaire, F., Bebear, C. M., Lamouliatte, H. y Megraud, F. 1997. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutation and assays of macrolide binding to ribosomes. *J. Antimicrob. Chemother.* 41: 2724-2728.

- Ocegueda, S., Moreno, E. y Koleff, P. 2005. Plantas utilizadas en la Medicina Tradicional y su identificación científica. CONABIO. Biodiversitas. 62:12-15.
- Ogura K., Maeda S., Nakao M., Watanabe T., Tada M., Kyutoku T., Yoshida H. Shiratori Y., Omata M. 2000. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian Gerbil. *J. Exp. Med.* 192:1601-1609.
- Okamoto, T., Yoshiyama, H., Nakazawa, T., Park, I. D., Chang, M. W. y Yanai, H. 2002. A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:849-856.
- Oliveira, F. A., Vieira-Junio, G. M., Chávez, M. H., Almeida, F. R. C., Florencio, M. G., Lima, R. C. P., Silva, R. M., Santos, F. A. y Rao, V. S. M. 2004. Gastroprotective and antiinflammatory effects of resin from *Protium hepatophyllum* in mice and rats. *Pharmacol. Res.* 49:105-111.
- OMS, 2002. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Págs. 5-6.
- Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T. y Martínez-Vázquez, M. 2004. Principles of the bark *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomed.* 11:436-445.
- Parente, F., Cucino, C. y Bianchi, P. 2003. Treatment options for patients with *Helicobacter pylori* infection resistant to one or more eradication attempts. *Dig. Liver Dis.* 35:523-528.
- Parsonnet, J., Samloff, I. M., Nelson, L. M., Orentreich, N., Vogelstein, J. H. y Friedman, G. D. 1993. *Helicobacter pylori*, pepsinogen, and risk for gastric adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomark.* 2:462-466.
- Percival, L., Wadström, T. 2001. Basic Bacteriology and Culture. En: *Helicobacter pylori*. Physiology and genetics. (Eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L.). ASM Press. USA, pp. 27-33.
- Pearson A. D., Bamforth J., Booth L., Holdstock G., Ireland A., Walker C., Hawtin P., Millward-Sadler H. 1984. Polyacrylamide gel electrophoresis of spiral bacteria from the gastric antrum. *Lancet* ii: 1349-1350.
- Pérez-Pérez, G., Rothenbacher, D. y Brenner, H. 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 9:1-6.
- Pinto-Santini, D. y Salama, N. R. 2005. The biology of *Helicobacter pylori* infection, a major risk factor for gastric adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14:1853-1858.
- Pounder, R. E. y Ng, D. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9:33-39.
- Prinz, C., Schoniger, M., Rad, R., Becker, I., Keiditsch, E., Wagenpfeil, S., Classen, M., Rosch, T., Schepp, W. and M. Gerhard. 2001. Key importance of

the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.* 61:1903-1909.

- Queralt, N., Bartolome, R y Araujo, R. 2005. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the North-east of Spain. *J. of Appl. Microbiol.* 98:889-895.
- Ramírez-Mendoza, P., Gonzalo-Angulo, J., Ángeles-Garay, U. y Segovia Cuevas, G. A. 2008. Evaluación Histopatológica de Gastritis Atrófica. Comparación de los sistemas Sydney y OLGA. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 46., 2:135-139.
- Rodríguez-López, V., Aguirre-Crespo, F., Salazar, L. y Estrada-Soto, S., 2011. Identification of fatty acid esters and hydrocarbon derivatives. *Nat. Prod. Res.* 20:1-7.
- Roine, R. P., Salmela, K. S., Hook-Nikanne, J., Kosunen, T. U. y Salaspuro, M. 1992. Alcohol dehydrogenase mediated acetaldehyde production by *Helicobacter pylori*-a possible mechanism behind gastric injury. *Life Sci.* 51: 1333-1337.
- Romaniuk P.J., Zoltowska B., Trus T. J., Lane D.J., Olsen G.J., Pace N.R. y Stahl D.A. 1987. *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter sp.* *J. Bacteriol.* 169:2137-2141.
- Rosas-Acevedo, H., Terrazas, T., González-Trujano, Ma. E., Guzmán, Y. y Soto-Hernández, M. 2011. Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. *J. Ethnopharmacol.* 134: 67-73.
- Rugge, M., Farinati, F., Baffa, R., Sonogo, F., Di Mario, F., Leandro, G. y Valiante, F. 1994. Gastric epithelial dysplasia in the natural history of gastric cancer: a multicenter prospective follow-up study. Interdisciplinary Group on Gastric Epithelial Dysplasia. *Gastroenterol.* 107:1288-1296.
- Rugge, M., Leandro, G., Farinati, F., Di Mario, F., Sonogo, F., Cassaro, M., Guido, M. y Ninfo, V. 1995. Gastric epithelial dysplasia. How clinicopathologic background relates to management. *Cancer* 76:376-382.
- Sawai, N., Kita, M., Kodama, T., Tanahashi, T., Yamaoka, Y., Tagawa, Y., Iwakura, Y. y Imanishi, J. 1999. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori* induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infec. Immun.* 67:279:285.
- Sisson, G., Jeong, J., Y., Goodwin, A., Bryden, L., Rossler, N. y Lim-Morrison, S. 2001. Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* and in *Escherichia coli* containing a cloned *H. pylori rdxA+* (nitroreductase) gene. *J. Bacteriol.* 182:5091-5096.
- Sobrino-Cossio, S., Rivera-Ramos, J. F., Ayala-Aguilar, G., Bosques-Padilla, F., Esquivel-Ayanegui, F., Herrera-Goepfert, R., Moreno-Terrones., Rodríguez-

- Magallán, A. y Torres-López, J. 2007. Epidemiología y Fisiopatogenia. III Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 72:137-153.
- Solnick y Schauer. 2001. Emergence of diverse *Helicobacter pylori* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:59-57.
 - Soto, G., Bautista, C.T. y Roth, D. E. 2003. *Helicobacter pylori* infection is common in Peruvian adults after antibiotic eradication therapy. *J. Infect. Dis.* 188:1263-75.
 - Spigelhalter, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E. y Kist, M. 1993. Purification of *Helicobacter pylori* Superoxide Dismutase and Cloning and Sequencing of the Gene. *Infect. Immun.* 61:5315-5325.
 - Suzuki, H., Nishizawa, T. y Hibi, T. 2010. *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Future Microbiol.* 5:639-646.
 - Testerman, T. L., McGee, D. J. y Mobley, H. L. T. 2001. Adherence and Colonization. En: *Helicobacter pylori*. Physiology and genetics. (Eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L.). ASM Press Washington, pp. 381-417.
 - Thomas, J. E., Gibson, G. R., Darboe, M. K., Dale, A. y Weaver, L. T. 1992. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 340:1194-1195.
 - Torres, J. 2000. *Helicobacter pylori*: ¿comensal, o patógeno o todo lo contrario? *Enf. Infec. Microbiol.* 20:1-2.
 - Torres, J., Camorlinga-Ponce, M., Pérez-Pérez, G., Madrazo-De la Garza, A., Dehesa, M., González-Valencia, G. y Muñoz, O. 2001. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 39:2677-2680.
 - Torres, J., Leal-Herrera, Y., Pérez-Pérez, G., Gómez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Conyer, R. y Muñoz, O. 1998. A Community-Based Seroepidemiologic Study of *Helicobacter pylori* Infection in Mexico. *J. Infect. Dis.* 178: 1089-1094.
 - Torres, J., López, L., Lazcano, E., Camorlinga, P. M., Flores, L. y Muñoz, O. 2005. Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14:1874-1877.
 - Trease, G. E. y Evans, W. Ch. 1987. Farmacognosia. 13ª edición. Editorial. Interamericana McGrawhill, México 901 pp.
 - Trieber, C. y Taylor, D. 2002. Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to Tetracycline. *J. Bacteriol.* 184:2131-2140.

- Valle, J., Kekki, M., Sipponen, P., Ihamäki, T. y Siurala, M. 1996. Long-term course and consequences of *Helicobacter pylori* gastritis. Results of a 32-year follow-up study. *Scand. J. Gastroenterol.* 31:546-550.
- Van Amsterdam K., van Vliet AH., Kusters JG., y van DER Ende A. (2006). Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*-related diseases. *FEMS Microbiol. Rev.* 30:131-56.
- Vandoorn, L. J., Debets-Ossenkopp, Y. J., Marais, A., Sanna, R., Megraud, F. y Kusters, J. G. 1999. Rapid detection, by PCR and Reverse Hybridization, of Mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1779-1782.
- Varoli, O., Landini, M.P., La Placa, M., Tucci, A., Corinaldesi, R., Paparo, G., Stanghellini, V. y Barbara L. 1991. Presence of *Helicobacter pylori* in gastric juice. *Am. J. Gastroenterol.* 86:249.
- Versalovic, J. 2003. *Helicobacter pylori*. Pathology and diagnostic strategies. *Am. J. Clin. Pathol.* 119:403-412.
- Versalovic, J., Shortridge, D., Kibler, K., Griffy, M., Beyer, J. y Flamm, R. 1996. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 477-480.
- Walsh, J. H. y Peterson, W. L. 1995. The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. *N. Engl. J. Med.* 333:984-991.
- Wang, X., Sturegard, E., Rupar, R., Nilsson, H., Aleljung, P., Carlén, B., Willen, R., Wadstrom, T. 1997. Infection of BALB/c A mice by spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 46:657-683.
- Wink, M. 1999. Function of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Sheffield Academic Press and CRC Press, Annual Plant Reviews, Vol. 3, 362 pp.
- Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P., Telford, J., Figura, N., Rappuoli, R. y Covacci, A. 1995. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating toxin. *Infect. Immun.* 63:94-98.
- Zheng, P. Y., Hua, J., Ng, H. C., Yeoh, K. Y. y Bow, H. 2003. Expression of Lewis^b blood group antigen in *Helicobacter pylori* does not interfere with bacterial adhesion property. *W. J. of Gastroenterol.* 9:122-124.