



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ACUOSO DE
CUACHALALATE (*Amphipterygium adstringens*) EN BACTERIAS
GRAM (+), GRAM (-) Y *Helicobacter pylori*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MIRSHA MIRANDA MALVAEZ

ASESORES: M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ
M.V.Z. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉX,

2006.



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.

AGRADECIMIENTO.

A **DIOS:** por permitirme vivir y disfrutar cada momento con
la mayor intensidad...

**Y POR QUE SIN TI, NO HABRIA PODIDO
LOGRAR NADA EN LA VIDA.**

MIL GRACIAS...

DEDICATORIAS.

A mis **PADRES: HÉCTOR MIRANDA SERRANO Y MARÍA DE JESÚS MALVAEZ MENDOZA**, por el gran amor desinteresado, el esfuerzo, entereza y dedicación que me han brindado todos los años de mi vida **y por que todo lo que soy es gracias a ustedes y con nada podré devolverles algo de lo mucho que me han dado. En serio mil gracias por todo...** y por que a pesar de que no soy la mejor hija que hubieran esperado, ni tal vez nunca llegué a serlo, con todo y eso, ustedes pa'mi, si son los mejores. **Los amo...**

A mis **HERMANOS**, Aldo Axel, Frida y Yuhanna, por que sin ellos no podría haber logrado todo lo que me he propuesto en la vida y por compartir su niñez conmigo.

A cada uno de mis Brother's (hermanos que solo yo pude haber elegido... y vaya que fue una gran elección) ya que sin su ayuda, consejos y opiniones, no habría pasado por el gran camino que cuesta el llegar aquí. Gracias sobre todo a ti: Olga, Edgar, Arturo, Carlos, Aideé, Eli y Deisy, son inigualables...

A todas las personas maravillosas que he conocido en el mundo, las cuales hemos coincidido en algún punto de nuestras vidas (que no podría mencionar una por una ya que nunca acabaría) pero sobre todo a las que me han ofrecido su AMOR y amistad y me han enseñado lo valioso que es tener alguien en quien apoyarte cuando lo necesitas...
Muchas gracias por cruzarse en mi camino...

Pero sobretodo al ser que me ha dado tanto y me ha enseñado a soñar... bebé pingü de veras que te amo con todo mi corazón... y esto y todo lo que hago es en gran medida, gracias a que me has permitido ser parte de tú vida. **TE AMO POR SIEMPRE...**

A mis asesores **M.V.Z. GERARDO CRUZ JÍMENEZ y M.V.Z. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA**, por que sin su apoyo y ayuda incondicional no habría podido terminar esta tesis, además gracias por su tiempo, conocimientos, enseñanzas, paciencia, atención y amistad, pero sobre todo les agradezco de todo corazón, ya que sin su ayuda no hubiera llegado hasta este momento tan importante.
Profe. Gerardo en serio usted se va a ganar el cielo...

A todos los Profesores del la FES-Cuautitlan por sus enseñanzas y consejos.

Al Honorable jurado por la mejor disposición que prestaron
en la revisión de este trabajo

A mí amada **UNIVERSIDAD** que me ha dado mucho de lo que soy y que me ha enseñado tanto.

MIL GRACIAS

ÍNDICE:

	Páginas
i.- Índice de figuras.....	1
ii.- Índice de cuadros.....	1
iii.- Índice de gráficas.....	2
iv.- Abreviaturas.....	3
1.- Resumen.....	5
2.- Introducción.....	7
3.- Generalidades.....	9
3.1. La Herbolaria.....	9
3.2. Cuachalalate (<i>Amphipterygium adstringens</i>).....	12
3.2.1. Antecedentes Históricos y Descripción.....	12
3.2.2. Composición Química y Metabolitos Activos.....	13
3.2.3. Actividad Farmacológica.....	16
3.2.4. Acción Tóxica.....	17
3.2.5. Aprovechamiento y Conservación del cuachalalate.....	18
3.3. <i>Helicobacter pylori</i>	19
3.3.1 Antecedentes Históricos y Características Descriptivas.....	19
3.3.2. Patología Digestiva.....	21
3.3.3. Respuesta Inmune.....	25
3.3.4. Factores de Patogenicidad.....	26
3.3.5 Formas de Transmisión.....	30
3.3.6. Diagnóstico de Laboratorio.....	30
3.3.7. Epidemiología.....	33
3.3.8. Factores de Riesgo.....	33
3.3.9. Tratamiento.....	34
3.4. Antimicrobianos.....	36
3.4.1. Definición.....	36
3.4.2. Tipos de Agentes Antimicrobianos.....	37
3.4.3. Clasificación y Descripción.....	38
3.4.4 Resistencia Bacteriana y Origen.....	41
3.5. Actividad Antimicrobiana.....	43

3.5.1. Métodos para determinar La Actividad Antimicrobiana.....	43
3.5.1.1. Métodos <i>in vitro</i>	43
3.5.1.2. Métodos de La Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	47
3.5.1.2. Métodos <i>in vivo</i>	48
4.- Justificación.....	49
5.- Hipótesis.....	49
6.- Objetivos.....	50
7.- Materiales y Métodos.....	51
7.1. Preparación del Extracto Acuoso de cuachalalate.....	51
7.2. Cepas.....	51
7.3. Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana.....	52
7.3.1. Método de Dilución en Tubo.....	52
7.3.2. Método de Dilución en Placa.....	53
7.3.3. Método de Kirby-Bauer.....	54
7.3.4. Método de Difusión en Agar Cilindro Placa.....	56
8.- Resultados.....	59
8.1. Identificación de Microorganismos.....	59
8.2. Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana.....	60
8.2.1. Método de Dilución en Tubo.....	60
8.2.2. Método de Dilución en Placa.....	61
8.2.3. Método de Difusión en Disco (Kirby-Bauer).....	62
8.2.4. Método de difusión en Agar (Cilindro-Placa).....	65
9.- Discusión.....	69
10.- Conclusiones.....	74
11.- Anexos.....	75
12.- Bibliografía.....	77

i.- ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1.- Distribución geográfica del cuachalalate.....	12
FIGURA 2.- Árbol de cuachalalate.....	13
FIGURA 3.- Corteza de cuachalalate.....	14
FIGURA 4.- Estructuras químicas propuestas para los compuestos de cuachalalate.....	14
FIGURA 5.- Estructuras básicas de los triterpenos.....	15
FIGURA 6.- Imagen de <i>Helicobacter pylori</i> por microscopia electrónica.....	20
FIGURA 7.- Invasividad de <i>Helicobacter pylori</i> en la patología digestiva.....	22
FIGURA 8.- Invasión de <i>H. pylori</i> , para provocar úlcera gástrica y úlcera duodenal.....	24

ii.- ÍNDICE DE CUADROS.

CUADRO 1.- Esquemas de tratamiento de siete días contra la infección por <i>H. pylori</i>	35
CUADRO 2.- Clasificación y descripción de antimicrobianos.....	40
CUADRO 3.- Resultados de la prueba de sensibilidad de dilución en tubo.....	60
CUADRO 4.- Resultados de la prueba de sensibilidad de dilución en placa.....	61
CUADRO 5.- Resultados obtenidos de la CMI.....	61
CUADRO 6.- Resultados de los halos de inhibición obtenidos por Kirby Bauer.....	62
CUADRO 7.- Resultados de la prueba de difusión en agar cilindro placa.....	65

iii.- ÍNDICE DE GRÁFICAS.

GRÁFICA 1.- Porcentaje de bacterias utilizadas, divididas en Gram (+) y Gram (-).....	59
GRÁFICA 2.- Resultados obtenidos por Kirby Bauer.....	62
GRÁFICA 3.- Resultados obtenidos por Kirby Bauer con extracto de [4572.13 µg/ml].....	63
GRÁFICA 4.- Resultados obtenidos por Kirby Bauer con extracto de [2285.06 µg/ml].....	63
GRÁFICA 5.- Resultados obtenidos por Kirby Bauer con extracto de [1143.73 µg/ml].....	63
GRÁFICA 6.- Resultados obtenidos por Kirby Bauer con extracto de [571.51 µg/ml].....	64
GRÁFICA 7.- Resultados obtenidos por Kirby Bauer con extracto de [285.76 µg/ml].....	64
GRÁFICA 8.- Resultados obtenidos por la técnica de difusión en agar “cilindro-placa”....	65
GRÁFICA 9.- Resultados obtenidos por cilindro-placa con extracto de [4572.13 µg/ml]...	66
GRÁFICA 10.-Resultados obtenidos por cilindro-placa con extracto de [2285.06 µg/ml]...	66
GRÁFICA 11.-Resultados obtenidos por cilindro-placa con extracto de [1143.73 µg/ml]...	67
GRÁFICA 12.-Resultados obtenidos por cilindro-placa con extracto de [571.51 µg/ml].....	67
GRÁFICA 13.-Resultados obtenidos por cilindro-placa con extracto de [285.76 µg/ml].....	68

iv.- ABREVIATURAS.

°C	grados centígrados
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
AINE	antiinflamatorio no esteroideo
ATCC	American Type Culture Collection (colección americana de cepas de referencia)
ATPasa	adenosintrifosfatasa
BHI	agar infusión cerebro-corazón
cagA	proteína asociada a citotoxicidad
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida
ELISA	Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay (test de enzima inmuno absorción)
FDA	Food and Drug Administration (administración de drogas y alimentos de Estados Unidos de Norteamérica)
GTP	guanidintrifosfato
Gram (-)	Gram negativas
Gram (+)	Gram positivas
H ⁺	iones hidronio
HaspA	proteínas de choque térmico
H. pylori	<i>Helicobacter pylori</i>
Hrs	horas
Ig's	inmunoglobulinas
IgG	inmunoglobulina G
IgM	inmunoglobulina M
Il-8	inter leucina 8
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
KDa	Kilo daltons
Log ₂	logaritmo de dilución doble

LPS	lipopolisacáridos
MALT	Mucosal Associated Lymphoid Tissue (tejido linfoide asociado a mucosas)
MH	Müller-Hinton
ml	mililitros
mm	milímetros
m.o.	microorganismo
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards (comité nacional para la estandarización de laboratorios clínicos)
NCTC	National Collection of Type Cultures (colección nacional de cultivos tipo)
NKC	Natural Killer Cells (células asesinas naturales)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAF	factor de activación plaquetaria
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pH	potencial de hidrógeno
PMN	linfocitos polimorfonucleares
PPIs	Proton Pump Inhibitors (inhibidores de bombeo de protones)
SSF	solución salina fisiológica
UFC	unidades formadoras de colonias
µg	microgramos
µm	micrómetros
vacA	gen asociado con la citotoxina vacuolizante

1.- RESUMEN.

Los estudios formales acerca de la actividad anticancerígena y antimicrobiana del cuachalalate son escasos; por lo que esta investigación trata de comprobar, si el extracto acuoso de esta corteza presenta a diferentes concentraciones, algún efecto antimicrobiano.

Esta experimentación se realizó con bacterias de distintos géneros, para posteriormente hacerlo contra *Helicobacter pylori*; ya que se conoce que esta bacteria, es uno de los factores predisponentes, causantes de la úlcera gástrica, gastritis y cáncer de estómago y se sabe que la corteza de cuachalalate tiene efectos curativos contra estas enfermedades, de aquí la relación que existe entre ambas; así como también, el de tener otras alternativas de terapéutica diferente a los antibióticos sintéticos e impulsar el aprovechamiento de nuestros recursos naturales.

Se utilizaron 12 cepas bacterianas, (*Salmonella spp*, *Morganella morgani*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella oxitoca*, *Streptococcus spp grupo D*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Corynebacterium spp* y *Helicobacter pylori*) que se hicieron crecer incubando a 37°C en agar Müller Hinton y para *Helicobacter pylori* se utilizó agar sangre de carnero al 5%, (en condiciones microaerófilas), con estas cepas completamente identificadas, (por morfología y pruebas bioquímicas) se efectuaron las diferentes pruebas de sensibilidad como son: dilución en agar, dilución en tubo, prueba de penicilindros (o prueba de difusión en agar “cilindro placa”) y el método de Kirby-Bauer (o prueba de sensidiscos).

De acuerdo a los resultados obtenidos por la técnica de dilución en agar (prueba presuntiva) y dilución en tubo, se puede observar que *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxitoca*, *Streptococcus spp grupo D* y *Escherichia coli*, no presentaron inhibición alguna ante el extracto.

Al realizar las pruebas de sensibilidad Kirby-Bauer y difusión en agar “cilindro-placa”, observamos que los halos de inhibición de las bacterias, *Morganella morgani*, *Proteus*

mirabilis, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Corynebacterium spp* y *Helicobacter pylori* si presentaron sensibilidad, obteniéndola en mayor grado los *Staphylococcus* y *Corynebacterium*, seguido de *Helicobacter pylori*, *Morganella morgani* y *Proteus mirabilis*.

Con las técnicas de dilución, también pudimos conocer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las bacterias que si son susceptibles al extracto, obteniendo para: *Morganella morgani* es de 285.75 µg/ml en la técnica de dilución en tubo y 571.51 µg/ml en la técnica de dilución en placa, *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, es de 571.51 µg/ml, *Staphylococcus epidermidis*, de 71.43 µg/ml, *Staphylococcus saprophyticus* y *Helicobacter pylori* de 285.75 µg/ml y para *Corynebacterium spp* de 571.75 µg/ml (en ambas técnicas).

Helicobacter pylori que si presento efecto inhibitorio ante el extracto acuoso de cuachalalate, nos permite entender la relación que existe en el uso que se le da en la medicina tradicional, como remedio para curar la úlcera y gastritis, enfermedades que tienen como uno de los principales agentes causales a esta bacteria.

2.- INTRODUCCIÓN.

El uso de las plantas medicinales ha sido muy amplio desde épocas antiguas en las que culturas como la Griega, China, India y la propia cultura Indígena Mexicana empleaban las flores, tallos, hojas y cortezas de las plantas, preparadas en forma de infusiones, tisanas, decocciones, maceraciones, zumos y tinturas, las cuales se usaban como remedios curativos para el hombre y los animales, sin saber a ciencia cierta qué efecto farmacológico provocaban y sí se presentaba o no algún efecto adverso o toxicológico (Mezquita, 2000).

Así, los antepasados utilizaban las plantas solo bajo el criterio de la intuición y tomando como referencia su propia experiencia, pero en el presente, estos criterios se han sustituido por constantes estudios científicos que pretenden que el producto a utilizar sea preferentemente conocido en todos sus aspectos, estos demuestran sobradamente la eficiencia de las plantas medicinales, así como también, que esta eficacia depende en gran parte de que su uso y preparación sean los correctos (Fernández, 2002).

En la actualidad el uso de las plantas medicinales se ha ampliado aún más, según la OMS el 80% de la población mundial continua empleando la medicina tradicional para curar sus enfermedades primarias (Zamudio, 2005).

El cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) es un árbol dióico de 5-10 m de altura y 40 cm de diámetro, con el tronco torcido, grandes escamas y hojas opuestas, lanceoladas, agrupadas en las puntas de las ramas, es de amplio uso en la República Mexicana como medicina tradicional (Martínez, 2003). Entre sus diversos efectos se atribuyen propiedades para: curar el cáncer de estómago, colelitiasis, úlcera, gastritis, cicatrizante, astringente y antiséptico natural, para lavar heridas y curar el acné, como antiinflamatorio e hipocolesterolemizante. Se ha comprobado la actividad antiúlceroza de los extractos acuosos de la corteza (Navarrete, 1990) y demostrado que varias fracciones de éste, tienen un efecto gastroprotector, el cual se postula como el mecanismo de acción de esta planta. Tal actividad se le ha atribuido a los ácidos masticadienónico y 3- β -hidroximasticadienónico (Navarrete, 1998).

A pesar del amplio uso y relevancia que tienen las plantas medicinales en la curación de la gastritis, existe muy poca información científica que establezca la eficacia de los extractos de estas plantas para su control clínico, aunado a que la infección por *Helicobacter pylori* es una de las infecciones de mayor prevalencia a nivel mundial, (aproximadamente el 70-90% de la población de países en vías de desarrollo cursa la infección de manera asintomática) y debido a que existe una relación directa entre la observación de la bacteria *Helicobacter pylori* en el estómago y la aparición de gastritis crónica (para el posterior desarrollo de cáncer de estómago) es por ello, que en el siguiente trabajo se evaluó la actividad que tiene el cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre la bacteria *Helicobacter pylori*, ya que esta planta se usa dentro de la medicina tradicional como agente para el tratamiento del cáncer de estómago, úlcera gástrica y gastritis (Navarrete, 1998). Sin embargo, no existe algún informe documentado en el que se indique la eficacia de esta planta en la inhibición de *Helicobacter pylori*, por lo que se consideró importante realizar el presente estudio.

Para esto, se utilizó extracto acuoso de cuachalalate a distintas concentraciones, para comprobar si esta corteza tiene efecto antimicrobiano sobre las diferentes bacterias usadas, tanto Gram (+) como Gram (-), y así conocer la acción que tiene sobre la bacteria *Helicobacter pylori*, por medio de pruebas de sensibilidad antimicrobiana como son: dilución en agar, dilución en tubo, prueba de penicilindros y el método de Kirby-Bauer, conociendo la CMI y relacionando así con los datos obtenidos, si este extracto presenta algún tipo de inhibición.

3.- GENERALIDADES.

3.1.- LA HERBOLARIA.

Desde la Antigüedad, el hombre ha utilizado las plantas que lo rodean para cubrir sus necesidades básicas como alimento, vestido, la recuperación y el mantenimiento de la salud.

La herbolaria, como se conoce a la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales, tiene gran arraigo en México, se tiene estimado que existen cerca de 30,000 especies de plantas, de las cuales en 1998 el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 con usos medicinales, lo que equivale al 10% de la riqueza florística del país y 100 de ellas registran una demanda comercial muy alta (Zamudio, 2005).

Las plantas medicinales constituyen un recurso muy conocido y accesible para grandes poblaciones. La OMS ha reconocido el valor de esta práctica terapéutica y otorga gran importancia para la salud pública (Betancourt, 2001).

La antigua fitoterapia, renovada por la ciencia moderna, conserva hoy como ayer, su poder curativo, sobre todo en afecciones crónicas, en enfermedades degenerativas y en numerosas enfermedades metabólicas provocadas por el estilo de vida que nos impone la sociedad moderna (Zamudio, 2005).

El valor de las plantas medicinales está dado por sus constituyentes químicos, de los cuales los metabolitos secundarios son responsables de los efectos fisiológicos que producen. Los alcaloides, terpenoides, glicósidos y flavonoides son algunas de las familias de compuestos con actividad biológica demostrada.

El uso de las plantas medicinales representa ciertas ventajas, por ejemplo al compararlas con los tratamientos químicos, en las plantas los principios activos se encuentran biológicamente equilibradas por la presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse entre si, de forma que en general, no se acumulan en el organismo

y sus efectos indeseables están limitados. Dentro de una planta pueden coexistir varios principios activos que pueden tener acción distinta a la que tendrían de manera separada. Entre estos componentes existen interacciones que producen potenciación o antagonismo, que da como resultado una acción conjunta. Las moléculas que guardan estos principios activos, al entrar en contacto con otras moléculas de un organismo, mediante el desplazamiento de iones energéticos, producen reacciones en su comportamiento químico, lo que consiste en una reacción bioquímica a nivel subatómico y micro celular, pero con efectos en todo el metabolismo (Plantas que curan, 2000).

Además de sus biomoléculas y compuestos energéticos, las plantas contienen sales minerales que también ejercen una acción energética y más activa, que si se emplearan las mismas sales obtenidas por procedimientos químicos. Esa diferente acción, se debe a que los iones de esas sales se encuentran en la planta viva en estados coloidales, con consistencia gelatinosa y cargas eléctricas que provocan equilibrios fácilmente dissociables, que al ser introducidos en otro organismo reaccionan de manera semejante a la de los fermentos, es decir, no solo por acción química sino biológica, son “moléculas vivas” (Fitoterapia, 2004).

Por otro lado, diferentes especies vegetales se han utilizado en el tratamiento de cáncer, por que algunas tienen sustancias capaces de detener el crecimiento de tumores malignos; entre estas especies capaces de tener efecto anticancerígeno están:

1) la zanahoria, ya que tiene caroteno, un antioxidante, precursor de la vitamina A, que es capaz de ayudar en la inmunidad celular, lo cual hace a las células más resistentes a la formación de tumores, además es un agente anti-radicales libres, siendo útil en el tratamiento de diferentes tipos de cánceres, otra propiedad es la de protector del organismo, del daño producido por rayos ultravioleta;

2) el ajo, cuyo principio activo es la alicina, y secundariamente contiene vitamina A, la cual ayuda a la prevención del cáncer de estómago y

3) la cebolla, colabora a prevenir el cáncer del intestino, ya que regula la flora intestinal y evita los procesos de putrefacción, etcétera (Plantas que curan, 2000).

Actualmente se sabe con exactitud la composición de algunas plantas de modo que podemos utilizarlas de manera racional. Sin embargo, solo se ha estudiado menos del 10% de ellas. El conocimiento de las sustancias activas de las plantas y el resultado que proporcionan a la investigación farmacéutica y clínica permiten deducir sus aplicaciones medicinales.

Las propiedades de las plantas no solo son curativas sino que una de las grandes virtudes que poseen, es la capacidad de regular los procesos vitales y prevenir enfermedades. El buen uso de las plantas medicinales dentro de un conjunto de hábitos de vida sana, puede evitar que las debilidades de nuestro organismo y la predisposición a padecer ciertas dolencias evolucionen hasta convertirse en enfermedades declaradas (Herbolaria, 2005).

3.2.- CUACHALALATE (*Amphipterygium adstringens*).

3.2.1. ANTECEDENTES HISTORICOS Y DESCRIPCIÓN.

Clasificación taxonómica.

El cuachalalate, perteneciente a la familia Julianiaceae, a la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, subclase Rosidae y al orden de las Sapindales, posee el nombre científico *Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schelcht.

El nombre cuachalalate proviene de la etimología náhuatl Cuachalatl: árbol de la chachalaca del náhuatl Cuautl-chachalaca, que hace referencia a la Chachalaca, un ave de nombre científico *Ortalis poliocephala*, que gusta de comer los frutos y semillas del cuachalalate, y también kojchalalajtli, koj-kuautli- árbol; chalalajtli-chala-chichalaca-guajolote silvestre. Los nombres vulgares de esta planta son dados principalmente por los habitantes de los pueblos donde vegeta, que son: cuachalala, chalalate, chalalote, quetchalalatl, volador y cuachalalá (Álvarez, 1998 y Zamudio, 2005).

Distribución Geográfica.



Fig. 1.- Principales áreas que utilizan el Cuachalalate en la República Mexicana (Zamudio, 2005).

El género es de origen americano y crece desde México hasta Perú. Se distribuye en la vertiente del Pacífico desde Nayarit hasta Chiapas, incluyendo la cuenca del río Balsas. Esta especie es originaria de México y se puede encontrar en los estados de Guerrero, Morelos, Michoacán, México, Nayarit, Jalisco, Puebla, Chiapas y Oaxaca a 800 m sobre el nivel del mar. Habita en climas cálidos, semicálidos y templados (FIG.1).

Descripción botánica.

Amphipterygium adstringens es un árbol dióico de aproximadamente 5-10 m de altura y 40 cm de diámetro, con el tronco torcido, de corteza color moreno grisáceo o gris plomizo con grandes escamas, hojas opuestas, oblongas, lanceoladas de 6 a 15 cm, agrupadas en las puntas de las ramas en número de 3 a 5, en el haz son de color verde opaco y en el envés verde grisáceo (Martínez, 1991). (FIG. 2)



Fig. 2.- Imagen del árbol de cuachalalate.

(Tomada www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/amphipterygium_adstringens.htm).

3.2.2.- COMPOSICIÓN QUÍMICA Y METABOLITOS ACTIVOS.

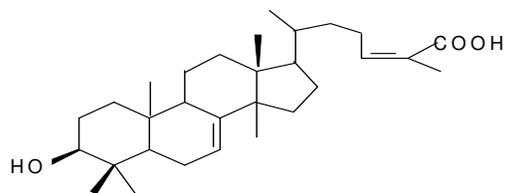
Las investigaciones del cuachalalate en fitoquímica se han realizado principalmente en la corteza del árbol, (FIG. 3) ya que es la parte de la planta que se emplea para ejercer su efecto terapéutico. Esta corteza es en general lisa, de pigmento rosado pardo rojizo muy intenso y cuando se prepara el extracto acuoso, queda muy concentrado. De dicha corteza, se han identificado a la sapogenina, y se han aislado e identificado varios ácidos triterpénicos como el ácido masticadienónico, el 3 α -dihidroxi-masticadienónico (Navarrete, 1982); el ácido cuachalático (Watson, 1987); el esteroide, β -sitosterol (Navarrete, 1989); el triterpeno: 27-acetoxi-3 α -15 α -dihidroxi-damara-12,24-dieno (Pérez, 1993), ácido alquilfenólicos y aldehídos alquilfenólicos (Navarrete, 1990).



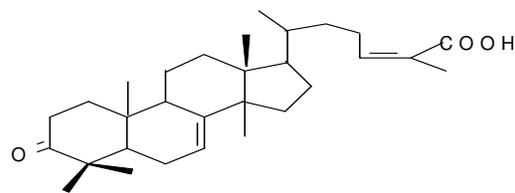
Fig. 3.- Imagen de la corteza del cuachalalate.
(Tomada de www.latinmerchant.com/productcategory).

De compuestos triterpénicos aislados de la corteza, se ha demostrado que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, (FIG. 4) el β -sitosterol y el ácido 2-epi-oleanólico poseen el efecto gastroprotector (Navarrete, 1998). La cantidad de los compuestos, depende del sexo de la planta (presentándose un mayor proporción en plantas femeninas), de la época del año en que se cosecha, habiendo una mayor concentración de ácido masticadienónico en febrero y ácido α -hidroximasticadienónico, en noviembre (Jiménez, 2004).

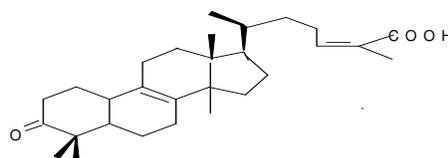
En 2001, Fernández y Navarrete evaluaron la acción cicatrizante de la corteza, donde observaron, recuperación del tejido en un 80%, de tal manera que el cuachalalate puede utilizarse con fines estéticos pues no deja cicatriz en el tejido.



Ácido 3 α -hidroximasticadienónico



Ácido masticadienónico



Ácido isomasticadienónico

Fig. 4.- Estructuras químicas de algunos componentes de *Amphypterygium adstringens* (Jiménez, 2004).

Triterpenoides.

Los triterpenoides son compuestos (ésteres libres, glucósidos) formados por la unión de 6 unidades de isopreno. Los triterpenoides naturales tienen 30 átomos de carbono y una estructura que deriva de las 6 unidades de isopreno (FIG. 5).

Los triterpenos de *Amphipterygium adstringens* son tetracíclicos los cuáles se dividen en subgrupos según las variaciones de su esqueleto, de los principales son: Damarano-Eufano (en el cual se encuentran los ácidos masticadienónico e iso-masticadienónico del cuachalalate), Escualeno, Fusidano-Lanostano (Barton, 1956).

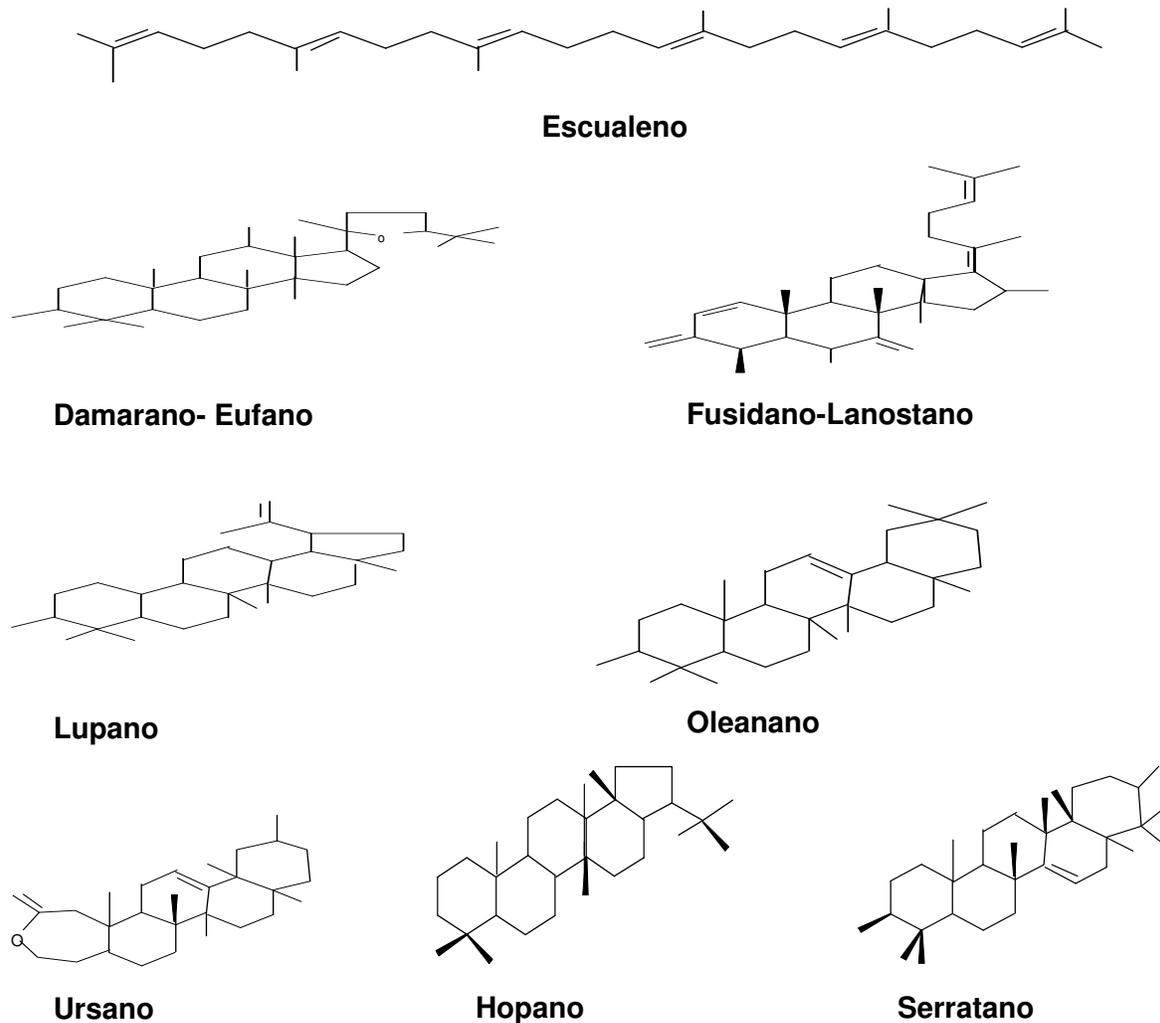


Fig. 5.- Estructuras básicas de los triterpenos (Jiménez, 2004).

3.2.3.- ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA.

El cuachalalate es usado comúnmente en la República Mexicana; su corteza se expende en la mayoría de los mercados debido a que le atribuyen las propiedades curativas cicatrizantes, para curar el cáncer de estómago, la coleditiasis, la úlcera, gastritis, es un astringente y antiséptico natural para lavar heridas y curar el acné, como antiinflamatorio e hipocolesterolemiante y muchas otras más (Mata, 1993 y Zamudio, 2005).

Mediante estudios experimentales, se ha comprobado la actividad antiúlceroza de los extractos acuosos de la corteza, la cual no se relaciona con el efecto antagonista de los receptores H₂ de la histamina (Navarrete, 1990). También se ha demostrado que varias fracciones del extracto metanólico de la corteza de esta planta tienen un efecto gastroprotector, el cual se postula como el mecanismo de acción (Navarrete, 1998). Además se han estudiado sus propiedades para actuar como filtro solar. El extracto de cuachalalate tiene la capacidad de absorber las radiaciones ultravioleta (Quintanar, 1994).

El efecto antiulceroso y anticancerígeno del cuachalalate ha sido comprobado por diversos investigadores en distintos años. Sin embargo cabe destacar que en cuanto a su acción anticancerígena, las investigaciones formales son escasas; no obstante, este efecto se atribuye a una saponina del tipo esteroideal denominada sarsagenina, González y col, en 1962, sugiriendo el efecto anticarcinógeno (Jiménez, 2004).

Como en el caso del cuachalalate, el estudio de plantas con características antimutagénicas y anticarcinogénicas, ha aumentado en las últimas fechas, debido al interés que se tiene en obtener nuevos fármacos capaces de eliminar o disminuir los diferentes tipos de cánceres, sin que se presenten reacciones secundarias como con los fármacos existentes en el mercado (Martínez, 2003).

Navarrete ha mencionado que el cuachalalate tiene un alto contenido de ácido tánico que tiene acción astringente, por lo que resulta un excelente cicatrizante interno y externo, ya que los derivados taninos tienen la propiedad de coagular las albúminas de las mucosas y de los tejidos, creando una capa de coagulación aislante y protectora. A nivel

de piel lesionada y mucosas, se forma una capa de proteína precipitada en la superficie celular. Esta capa de proteína celular es protectora sobre la mucosa y la piel inflamada frente a los agentes irritantes (Zamudio, 2005).

Dentro de las publicaciones importantes acerca de los usos del cuachalalate, existen algunas patentes registradas en Japón, en las cuales se reporta la invención de productos preparados con esta planta. Una de esas patentes se refiere a un tónico para el cabello, cuyo efecto principal es para detener y evitar la caída del cabello (Tsuru, 1993). En otra patente del cuachalalate, se reporta la invención de una composición herbal, en la que se emplea el cuachalalate en combinación con otra planta del género *Equisetum*, preparados en bolsas para té, útil para el tratamiento de las hemorroides. También se reportan otras patentes de lociones y cremas en las que se hace uso del cuachalalate (Shisheido, 1998), sin embargo, ninguna de éstas se han registrado en México.

3.2.4.- ACCIÓN TÓXICA.

Los taninos dada su acción astringente, también pueden provocar intoxicación cuando la superficie de aplicación del cuerpo humano es muy grande y en exposiciones muy largas.

En cuanto a las saponinas, también pueden provocar intoxicaciones cuando se administran por vía oral a dosis altas, debido a que son irritantes locales de la mucosa por lo que producen vómitos por la irritación gástrica.

Se ha demostrado, que la aplicación del extracto de cuachalalate sobre la piel sana, no presenta ningún efecto fisiológico adverso, ya que no introduce la formación de edema o eritema por lo cual es una sustancia segura que puede ser empleada para la elaboración de productos de uso externo (Zamudio, 2005).

En cuanto a la citotoxicidad del extracto etanólico de la corteza de cuachalalate, se demostró que sólo no provoca ningún efecto, pero en combinación con la ifosfamida presenta un efecto sinérgico, aumentando la citotoxicidad (Martínez, 2003).

3.2.5.- APROVECHAMIENTO Y CONSERVACIÓN DEL CUACHALALATE.

El cuachalalate es una especie amenazada, en peligro de extinción dado el uso intensivo, debido a las múltiples propiedades que se le atribuyen, el crecimiento de la mancha urbana, incendios, cambios del uso del suelo por ganadería, agricultura y contaminación. Además el tipo de descortezamiento que los campesinos realizan, se hace de una forma inadecuada destruyendo así tejidos vitales, lo que provoca que entre el 60-80% de los casos se cause muerte al árbol.

Hasta ahora la obtención de la corteza de *Amphipterygium adstringens* se ha realizado en poblaciones silvestres, por lo que esta, se realiza sin ningún control que garantice la conservación de la especie. Dado lo anterior se han elaborado técnicas de descortezamiento para hacer uso sustentable de la corteza de cuachalalate al manipular adecuadamente la profundidad, longitud y ancho de la placa de la corteza que se separa del tronco del árbol, permitiendo así su regeneración hasta tres veces más rápido que en un descortezamiento tradicional (Zamudio, 2005).

3.3.- *Helicobacter pylori*.

3.3.1.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS.

Doenges, en 1939, publica un estudio donde describe la presencia de microorganismos espirales en un 43% de los estómagos procedentes de autopsias. En 1975 Steer y Colin-Jones, asociaron la presencia de una bacteria curva Gram negativa con las biopsias gástricas procedentes de pacientes con úlcera gástrica y gastritis. Sin embargo errores en el cultivo del organismo provocaron que el hallazgo fuera ignorado (Drumm, 1990 y Monés, 1994).

En 1982, Warren y Marshall en Perth (Australia) lograron identificar en cultivos de muestras de biopsia gástrica de pacientes con gastritis histológica, un bacilo curvo microaerófilo Gram negativo, esta bacteria fue denominada inicialmente como un organismo similar a *Campylobacter jejuni*. Después del exitoso cultivo en 1984, fue asignado al organismo el nombre de *Campylobacter pyloridis* el cual se cambió posteriormente, a *Campylobacter pylori* en 1987 (Owen, 1995 y Murray, 1994). El cultivo de esta bacteria, fue seguido por un intenso escrutinio de sus características taxonómicas, especialmente comparado con otras bacterias del género *Campylobacter*. Los resultados de estos estudios delinearon mayores diferencias entre ésta y verdaderas bacterias del género *Campylobacter* en ultra estructura, composición celular ácido graso, características del desarrollo, secuencia del ARN, etc. A diferencia de los verdaderos organismos del género *Campylobacter* ésta posee una potente actividad ureasa, propiedad que puede tener importantes implicaciones patogénicas. Por estas características únicas, a *Campylobacter pylori* se le asignó un nuevo nombre; *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa en forma helicoidal de S o bastón curvado de 0.5-0.9 μm de ancho por 2-4 μm de largo, normalmente móvil. Su morfología colonial y microscópica varía de acuerdo a las condiciones del medio de cultivo. Por ejemplo en cultivos viejos presenta formas cocoides. Sin embargo puede observarse también en forma de V, forma de U y en línea recta (Owen, 1995, Marshall, 1984, Goodwin, 1990) (FIG. 6).



Fig. 6.- Imagen de *H. pylori* ampliada 10,000x. Forma encorvada y flagelar, que le permite impulsarse en la mucosa gástrica.

(Tomada de Research Laboratory website: www.hpylori.com.au).

A los 2 días de crecimiento y visto con microscopio electrónico *H. pylori* tiene típicamente de 5 a 6 filamentos flagelares polares y por lo tanto es móvil (Noach, 1994).

El aislamiento primario de *H. pylori* en agar sangre a 37°C requiere de 3 a 4 días, pero si no se observa crecimiento se continua la incubación hasta por 7 días. Las colonias son pequeñas, circulares, convexas, húmedas y translúcidas de 2mm de diámetro, alrededor de las cuales se presenta una ligera hemólisis de color gris en agar sangre. Crece en medios selectivos y enriquecidos como Shirrow, Marshall, agar infusión cerebro corazón, agar brucella y medios que contengan hemina o de 5 a 10% de sangre de carnero o caballo (Drumm, 1990).

Todas las cepas crecen en un rango de 33-40°C y algunas pobremente a 30 y 42°C pero ninguna a 25°C, *Helicobacter pylori*, crece dependiendo del medio de cultivo, a pH de 5.5 a 8.5 con buen desarrollo a pH 6.9-8.0. Se desarrolla mejor en una atmósfera de 5 a 6% de O₂, 7 a 12% de CO₂, 85% de N₂, 8% de H₂ y alta humedad (Goodwin, 1990 y McNulty, 1984).

Produce enzimas como oxidasa, catalasa y ureasa. La hidrólisis de la urea por la ureasa produce amonio, el cual se ha propuesto que neutraliza el ácido clorhídrico del estómago y puede dañar directamente a las células epiteliales gástricas (Covacci, 1995 y Jawetz, 1996).

No produce indol, tampoco H₂S, reduce nitratos a nitritos, fermenta la glucosa e hidroliza el hipurato, (Murray, 1994). Produce una citosina que forma vacuolas en cultivos celulares y fosfolipasa. El contenido de C+G en el DNA de *H. pylori* es de un 35 a 44% mol (Cover, 1992 y Blazer, 1992).

La bacteria es sensible *in vitro*, a la penicilina, ampicilina, amoxicilina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, rifampicina, metronidazol, tetraciclina y cegatlotina. También es sensible a las sales de bismuto y se ha documentado la resistencia a la vancomicina, sulfonamidas, trimetoprim y el ácido nalidíxico (Marshall, 1985).

3.3.2.- PATOLOGÍA DIGESTIVA.

Gastritis.

La infección por *Helicobacter pylori* es la principal causa de gastritis crónica B o antral y no se relaciona con la gastritis A autoinmune ni con otras gastritis específicas. La morfología de la gastritis asociada a *Helicobacter pylori* es característica, crónica, con leve o moderada actividad, grado variable de atrofia, presencia de folículos linfoides y con el predominio en antro. (FIG.7).

La gastritis es una reacción inflamatoria aguda o crónica de la mucosa gástrica. En la gastritis aguda el infiltrado inflamatorio está constituido por polimorfonucleares y suele reducirse a la mitad de la luz de la mucosa gástrica. Cualquier pérdida de epitelio es superficial con múltiples úlceras de tamaño pequeño. La superficie epitelial perdida se reemplaza por una mezcla de fibrina y células inflamatorias agudas (Hov-Ac, 1995).

No existe fibrosis y cuando se cura, la mucosa vuelve a la normalidad. Las características clínicas de la gastritis aguda no son específicas y muchos pacientes pueden estar asintomáticos. Las náuseas, vómitos y el dolor epigástrico son características clínicas frecuentes. *H. pylori* puede provocar cuadros clínicos de dispepsia y la aparición brusca e histológica de gastritis aguda.

La gastritis crónica se caracteriza morfológicamente por la presencia de inflamación de la mucosa, acompañada o no de alteración de la arquitectura glandular. Los diversos grados de gastritis crónica representan probablemente diferentes estadios de un proceso dinámico.

Histológicamente la gastritis crónica superficial se caracteriza por la presencia de un infiltrado inflamatorio que ocupa la porción superficial de la lámina propia, conservando la estructura glandular.



Fig. 7.- Imagen de la invasividad de *H. pylori* ampliada 10,000x, Muestra la forma en como entra *H. pylori* a la mucosa gástrica.

(Tomada: Research Laboratory website: www.hpylori.com.au)

En la gastritis crónica atrófica, el proceso inflamatorio se extiende con profundidad, afectando a las glándulas gástricas. Dependiendo de la intensidad del proceso se distinguen tres grados: leve, moderado y severo. En el grado severo existe una desaparición total del componente glandular, apareciendo epitelio metaplásico. La nueva mucosa se puede parecer a la pilórica o con más frecuencia ser semejante a la intestinal (metaplasia intestinal). Esta gastritis crónica atrófica activa corresponde a la denominada gastritis B. Cuando la atrofia es severa, pero los cambios inflamatorios y regenerativos son mínimos, se denomina inactiva, siendo este patrón el que se observa preferentemente en la gastritis tipo A o autoinmune, localizada en el cuerpo gástrico y que afecta a las glándulas oxínticas, donde se ubican las células parietales productoras de HCl y factor intrínseco, formando parte del síndrome de anemia perniciosa (Olbe, 1980).

Los cambios histológicos que se observan en la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* corresponden a una gastritis crónica atrófica activa, localizada preferentemente en el antro y de intensidad leve o moderada. Se observa la presencia de nódulos linfoides con centro germinal en un 80% de los casos de gastritis por *Helicobacter pylori* (Blazer, 1992).

Úlcera péptica.

Esta enfermedad es considerada una enfermedad de la civilización, ya que aumenta su frecuencia a medida que un país se desarrolla económicamente. Inicialmente se consideró que la enfermedad ulcerosa péptica era simplemente consecuencia de un problema de hipersecreción gástrica de ácido y pepsina. Sin embargo, actualmente está claro que una úlcera es el resultado final de una alteración en el equilibrio entre los factores agresores y los factores defensivos; *H. pylori*, los AINE's y las alteraciones en la secreción ácida son los principales factores que alteran este equilibrio. Mientras que el daño causado por el ácido es necesario para que se forme una úlcera, la secreción ácida es normal en la mayoría de los pacientes con úlceras gástricas y está aumentada en aproximadamente la mitad de los pacientes con úlcera duodenal.

En México la úlcera péptica no constituye un problema mayor, sin embargo tiene un orden de importancia dentro de las causas de mortalidad en hombres y mujeres de 65 años o más, además aumenta progresivamente con la edad a partir de los 20 años de edad. Según el INEGI, en el 2001 se reporta que la mortalidad por úlceras gástrica y duodenal, tienen un orden de importancia ya que las defunciones en hombres de 65 años o más, fueron de 989 mientras que en mujeres fueron de 1063 (Zamudio, 2005).

Úlcera duodenal.

Helicobacter pylori deteriora la barrera de la mucosa e induce hipergastrinemias postprandiales. El 90%-95% de los pacientes con úlcera duodenal están infectados por *Helicobacter pylori*; este encuentra su hábitat ideal en el moco gástrico en contacto con el epitelio de la superficie, que constituye la primera línea de defensa contra los agentes agresivos (ácido y pepsina). El m.o. halla en esta barrera sus nutrientes y se defiende de los iones H^+ hidrolizando la urea, logrando así un microentorno alcalino. *H. pylori*, posee enzimas capaces de degradar el moco gástrico, reduciendo su viscosidad y por tanto, su capacidad defensiva. También produce citotoxinas que lesionan a las microvellosidades de las células de la mucosa gástrica, interrumpiendo las uniones intercelulares, lo que debilita la segunda barrera defensiva, facilitando la posibilidad de aparición de erosiones superficiales y ulceraciones.

La interrelación entre la infección por *H. pylori* y la úlcera duodenal es debida a la actividad del m.o, en el debilitamiento de los factores defensivos, tanto de la mucosa gástrica como de la metaplasia gástrica en el duodeno. La enfermedad ulcerosa duodenal es un proceso crónico, con exacerbaciones y remisiones, que ocurren en largos periodos de tiempo, incluso 30 años o más. Desde la aparición de los antagonistas H₂ y más recientemente con los inhibidores de la bomba de protones como el omeprazol, se consigue la curación clínica y la cicatrización del cráter ulceroso en casi el 100% de los pacientes, con facilidad y mínimos efectos secundarios (Arnold, 1996).

Úlcera gástrica.

Mientras que la úlcera duodenal se asocia en un 95% con la infección por *H. pylori*, la úlcera gástrica lo hace en un 75%, aunque la mayor parte de las úlceras gástricas sin *H. pylori* tienen relación con la ingesta de aspirinas o AINE's. La recidiva en la úlcera gástrica, después de su curación, se estima en un 30% al 50%. Por ello, se han propuesto tratamientos de mantenimiento con bloqueadores H₂ que reducen la tasa de recidivas del 10% al 20%. (FIG 8).

Helicobacter pylori

– the bacterium causing peptic ulcer disease

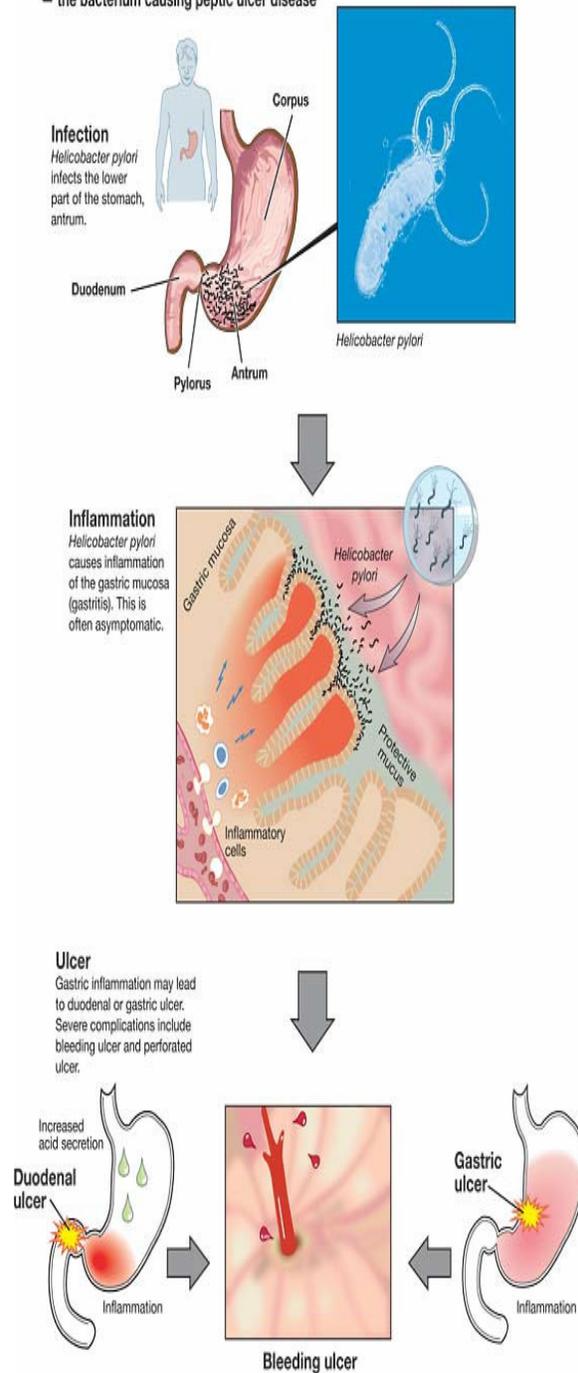


Fig. 8.- Imagen que muestra los pasos de la invasión de *H. pylori*, para provocar úlcera gástrica y úlcera duodenal. (Tomada: The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine. (nobelprize.org/medicine/laureates/2005/press.html).

Cáncer gástrico.

Helicobacter pylori es, sin duda, el factor etiológico más importante de la gastritis del antro y del cuerpo gástrico y la prevalencia de gastritis atrófica en las personas de edad se correlaciona con la prevalencia de infección en las primeras décadas de la vida, lo que sugiere que esta infección hace progresar la gastritis y con el paso de los años, inducir gastritis atrófica (Hov-Ac, 1995).

El descenso de la prevalencia de la gastritis atrófica, consecuencia de la menor prevalencia de infección por *H. pylori* condiciona, en el transcurso de los años y sólo en una parte de los pacientes infectados, el desarrollo de una gastritis atrófica, entidad con cierto potencial de malignidad. Simultáneamente se han publicado dos extensos estudios epidemiológicos que parecen confirmar la sospecha de que la infección, de alguna forma, incrementa el riesgo de cáncer gástrico.

La infección por *H. pylori* está significativamente asociada a un mayor riesgo de cáncer gástrico, aunque la mayoría de las personas infectadas no llegan nunca a desarrollar un carcinoma gástrico, probablemente porque la etiopatogenia de esta entidad es multifactorial y otros muchos factores se interrelacionan con la infección, siendo ésta, en todo caso, condición necesaria pero nunca suficiente para el desarrollo de un carcinoma gástrico (Ojeda, 1998).

3.3.3.- RESPUESTA INMUNE.

Los pacientes infectados con *H. pylori* desarrollan una respuesta de anticuerpo IgM en la primoinfección; después se produce IgG e IgA, los cuales persisten, tanto en vía sistémica como en la mucosa, en personas infectadas de manera crónica (Jawtz, 1996 y Nomura, 1994). *H. pylori* induce la liberación de factor de activación plaquetaria (PAF), leucotrienos y citocinas, mismos que median una respuesta inflamatoria en la mucosa, la cual se manifiesta histológicamente como una gastritis superficial difusa (Rioux, 1994). El PAF es un potente mediador inflamatorio que induce quimiotaxis de leucocitos y cambios

en la permeabilidad vascular, los leucotrienos son potentes factores quimiotácticos además de inducir daño a la mucosa (Fukuda, 1990).

3.3.4.- FACTORES DE PATOGENICIDAD.

Entre los principales factores de virulencia de *H. pylori* se encuentran la producción de ureasa, catalasa, citotoxina (*vacA*), gen *vacA*, proteína de choque térmico (Heat Shock Protein) movilidad, capacidad para adherirse a la mucosa gástrica, presencia del gen *cagA*, proteína CagA y lipopolisacáridos (Drouet, 1993 y Macchia, 1993).

Ureasa.- Enzima más importante producida por *H. pylori*, mediante la hidrólisis de la urea le permite la colonización en la mucosa gástrica por la producción de amonio que amortigua los hidrogeniones, además de inducir inflamación. Su actividad es en el citoplasma, coloniza el moco secretado por la mucosa gástrica, el pH del estómago se neutraliza por la producción de amonio, lo cual permite sobrevivir a *H. pylori*. Está asociada con la superficie bacteriana y tiene un papel en la asimilación de nitrógeno. Aunque la asociación entre la ureasa y la superficie bacterial se estabiliza por cationes bivalentes como el Ca^{2+} y Mg^{2+} , la ureasa recombinante se expresa de manera óptima cuando no se inhibe la producción de Ni^{2+} *in vitro* y cuando se permite la síntesis suficiente de subunidades de ureasa UreA y UreB (Moran, 1994).

Citotoxina vacuolizante (*vacA*)- Las cepas citotóxicas secretan una proteína que induce la formación de vacuolas en el citoplasma de líneas celulares *in vitro*. Aunque *vacA* está presente en casi todas las cepas de *H. pylori* sólo un 50% de las cepas expresan la citotoxina.

Las vesículas se originan por invaginación de la membrana para formar endosomas, los cuales se fusionan con lisosomas o con el aparato de Golgi. El objetivo del VacA es la ATPasa de tipo V que está presente en los últimos endosomas. Una vez que ha

reaccionado con su objetivo, la bomba de protones hidrogeno, estimulada por la toxina, crea un ambiente ácido dentro de las vacuolas y sustancias ambientales básicas, como el amoniaco, cruzan las membranas y son protonadas en el pH ácido. Las vacuolas originadas en el área perinuclear, se incrementan en número y tamaño y se fusionan unas con otras, la membrana celular se rompe y las células mueren. Las bases débiles, como el amoniaco y la nicotina, incrementan la actividad vacuolizante de la toxina. Los niveles de nicotina en la saliva de fumadores son menores a aquellos que son necesarios para potencializar la actividad de la toxina *in vitro*. Sin embargo, la actividad sinérgica de la nicotina debería ocurrir *in vivo*, a menores concentraciones que *in vitro*; esto ayuda a explicar, porque los fumadores tienen mayor riesgo de desarrollar úlcera duodenal; el amoniaco también potencializa la actividad vacuolizante de VacA y bajo ciertas condiciones *in vitro* con altas concentraciones de urea en el medio, la vacuolización es tan intensa que las células se fusionan una con otras (Figura, 1990).

La vacuolización de células inducida por VacA es potencializada por exposición de la citotoxina a pH bajo. La inducción de la activación toma lugar a un pH de 5.5; a valores de pH “normales” del estómago (alrededor de pH 2), el proceso de activación se lleva a cabo en segundos. Una vez ácido-activada, VacA retiene su actividad a pH neutro y se vuelve resistente ante el ataque de la pepsina. La inhibición de secreción ácida de los inhibidores de bombeo de protones (PPIs; Proton Pump Inhibitors) en el tratamiento de la úlcera péptica previene la ácido-activación de la toxina. Los inhibidores de la bomba de protones, también interfieren con la ATPasa de tipo vacular, que es el objetivo de VacA y en consecuencia inhibe la vacuolización. Las cepas de *H. pylori* activan los linfocitos polimorfonucleares (PMN) y obtienen una explosión oxidativa. Los PMN activados, en adición a aniones súperoxido generados y otros metabolitos reactivos, también secretan iones H⁺ dentro de los fagolisosomas, en respuesta a la estimulación por la ATPasa H⁺ asociada a la membrana. La infección por cepas productoras de toxina vacuolizante también está asociada positivamente con la ulceración gastroduodenal (Goossens, 1992 y Owen 1994).

El gen vacA codifica una protoxina que es fundamental para la secreción de la toxina. Aunque no todas las cepas de *H. pylori* expresan la actividad citotóxica *in vitro*, esencialmente todas poseen el gen vacA (Cover 1993 y Phadnis 1994). La observación de que la vacuolización *in vitro* es potenciada por la exposición de la toxina a bajos

valores de pH y que, una vez activada *vacA* se convierte resistente al efecto de la pepsina es un indicio adicional de *H. pylori* para adaptarse al medio ambiente gástrico del estómago (Moran, 1994 y Cover, 1994).

Proteínas de choque térmico.- Juegan un papel en la patogénesis e inmunología de la infección por *H. pylori*. La proteína de choque térmico, HaspA de *H. pylori*, protege exitosamente en contra de una infección por *H. pylori* en el modelo de *H. felis* del ratón. Se ha clonado y secuenciado un nuevo gen de *H. pylori*, que codifica una proteína de choque térmico, homóloga a ClpB de *E. coli* y otras proteínas Clp. Las proteínas constituyen una familia, de proteasas dependientes de ATP, que son oblicuas tanto en procariontes y eucariontes (Ojeda, 1998).

Movilidad.- Está dada por dos o seis flagelos polares cubiertos, cuyo filamento consta de dos tipos de flagelinas, codificadas por genes *flaA* y *flaB*. Ambos genes han sido clonados y mutaciones inducidas han mostrado que *flaA* es esencial para la movilidad. Las envolturas de los flagelos son membranas y contienen proteínas y lipopolisacáridos, sugiriendo que el papel de la cubierta es el de proteger el filamento del flagelo y promover la adhesión (Moran, 1994).

Proteína del gen asociado a citotoxina (CagA).- Muchas cepas citotóxicas, también producen una proteína altamente inmunogénica, llamada CagA. Cerca del 10% de cepas de *H. pylori* que portan *cagA* son no citotóxicas, y una producción similar de cepas no citotóxicas no llevan *cagA*. No se han encontrado correlación entre la expresión de los genes *vacA* y *cagA* (Ojeda, 1998).

La infección por cepas *cagA*⁺ induce a que las células epiteliales secreten cantidades incrementadas de interleucina 8 (IL-8), que tiene un papel clave en la respuesta inflamatoria celular de neutrófilos y mononucleares. El gen *cagA* ha mostrado que es parte de un operón que incluye dos genes designados *picA* y *picB*, este último producto del gen ha sido directamente implicado en la inducción de la expresión de IL-8 por células epiteliales gástricas colonizadas *in vitro*, además la infección experimental ha demostrado

que otros factores diferentes de *cagA* están involucrados en la respuesta inflamatoria, todavía no es claro si existe una relación entre este operón y dos regiones genómicas llamadas *cagI* y *cagII* descritas recientemente en cepas *cagA*⁺ (Ojeda, 1998).

Cualquiera que sea el papel de *cagA* numerosos estudios microbiológicos y serológicos indican que la infección por cepas de *H. pylori* que poseen *cagA* o expresan el producto genómico, incrementan el riesgo de desarrollar gastritis activa, lesiones de mucosas neoplásicas y preneoplásicas en adultos, gastritis hemorrágica e inflamación activa y severa inflamación activa de las mucosas en niños. En contraste linfomas de células B de bajo grado del tipo de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) no parecen estar asociadas con el estatus de *cagA* del organismo infectante. También se encontró que los pacientes con alergia alimenticia fueron más probablemente infectados por cepas *cagA* (Moran, 1994).

Lipopolisacáridos.- *H. pylori* al igual que otras bacterias Gram (-), presenta lipopolisacáridos (LPS) en membrana externa. El LPS de *H. pylori* destruye la cubierta de mucosa gástrica interfiriendo con la interacción entre *Munich* y su receptor en la mucosa; el agente antiulceroso abrotidina inhibe este efecto. Sin embargo, la característica más importante de *H. pylori* es su baja actividad proinflamatoria. Este fenómeno está mediado por su singular estructura de lípido A y afecta a la unión CD-14. El hallazgo de los antígenos Lewis son expresados sobre una parte de las cadenas laterales de los polisacáridos que concuerda con que la molécula de LPS tenga un bajo perfil en su especificidad huésped (Drouet, 1993).

Se han identificado como receptores de lípidos en la mucosa para *H. pylori* a la fosfatidiletanolamina y la gangliotetrasilceramida. La adhesina bacteriana de *H. pylori* que reconoce estos lípidos es una exoenzima de 63 kDa, proteína con forma de S. Otros receptores potenciales para *H. pylori* lo constituye la matriz extracelular, componentes que pueden llegar a ser expuestos debido a la actividad microbiana, la alimentación o una gran producción de células en el epitelio gástrico (Ojeda, 1998).

3.3.5.- FORMAS DE TRANSMISIÓN.

Los mecanismos específicos de transmisión de la bacteria siguen sin determinarse, pero por el hecho de ser tan común la infección y su amplia distribución, se ha postulado que tanto el agua como los animales son fuente de infección, sin embargo, la vía de transmisión que está claramente establecida es la oral-fecal, esto se sustenta en la identificación de *H. pylori* en heces, reportada en los estudios realizados por Thomas y col (1992), en los que se demostró su presencia en 1 adulto y 9/23 niños, o el de Nelly y col (1994) en 12/25 adultos, positivos comprobada por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), prueba de urea y primers específicos *cagA*. Se ha descartado la transmisión oral-oral en adultos, esto basado en la discordancia de infección en parejas, si bien se mencionan estudios en los cuales se comprobó la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral, saliva y placas dentales por PCR, no se han recuperado en cultivo, esto debido a que la saliva humana muestra actividad inhibitoria *in vitro* frente a la bacteria y parece estar relacionado con la presencia de la flora normal de la cavidad oral. Se mencionan en algunos trabajos, factores de riesgo propios del huésped, destacando el papel de la herencia como determinante de la susceptibilidad a la infección, demostrando en investigaciones realizadas en pares de mellizos (57%).

La tasa de reinfección en adultos después de la erradicación es muy baja (0.5-10% por año), sin embargo, en la población pediátrica son elevadas y este fenómeno posiblemente obedezca al seguimiento de hábitos higiénicos (Guerrero, 2002).

3.3.6.- DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.

Los métodos que permiten el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se pueden sistematizar en dos grandes grupos; los que requieren endoscopia y toma de biopsias de la mucosa gástrica y los métodos no endoscópicos, fundamentalmente técnicas serológicas y prueba de aliento (Ojeda, 1998).

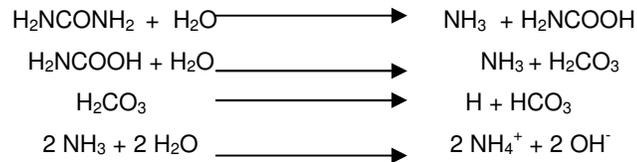
METODOS QUE REQUIEREN ENDOSCOPIA.

Cultivo de biopsias.- Es el método de elección, aunque presenta ciertas dificultades técnicas. Las muestras deben ser procesadas con rapidez en el laboratorio de microbiología, requiriendo para el cultivo una atmósfera microaerofílica y medios enriquecidos, agar sangre o Skirrow (medio selectivo con antibióticos).

Histología.- La observación de microorganismos de morfología espirilar en los cortes histológicos de biopsias endoscópicas de la mucosa gástrica es un método sencillo de diagnóstico de infección por *H. pylori*. Es característica su localización, en íntimo contacto con el epitelio de superficie, en plena barrera moco-bicarbonato. La tinción de plata de Warthin-Starry es la ideal para evidenciar los gérmenes, las bacterias se tiñen como espirales negras con un rodete amarillo, aunque en general las tinciones habituales, hematoxilina-eosina y Giemsa, son suficientes, pues permiten una correcta visualización.

Tinción de Gram.- Mediante una extensión y tinción de Gram se puede diagnosticar de una forma sencilla, rápida y económica la presencia de *H. pylori* en la biopsia endoscópica. La sensibilidad y especificidad del método es del 95% y 60%, respectivamente.

Prueba de la ureasa.- *H. pylori* posee una intensa actividad ureásica (conversión enzimática de la urea en amonio y CO₂). Esta característica se ha aprovechado para diseñar un sistema de diagnóstico rápido, que consiste en introducir una biopsia endoscópica en un caldo de urea de Christensen. Si la actividad ureásica es elevada, se produce un cambio cromático del amarillo al rosa. La prueba de la urea tiene la ventaja de ser sencilla, económica y rápida, ya que el cambio cromático habitualmente se produce en pocas horas. Así, a las tres horas la sensibilidad es del 97%, aunque la especificidad es del 60%. Si la lectura se practica a las 24 hrs, la especificidad es del 100% y la sensibilidad del 92%.



Catálisis de la hidrólisis de la urea para formar amonio y carbamato, y espontáneamente descompone dando otra molécula de amonio y ácido carbónico.

Reacción en cadena de la polimerasa.- La PCR permite la detección rápida de *H. pylori* de biopsias recién obtenidas de estómago. Esta prueba se basa en el análisis de una secuencia específica del DNA del genoma de *H. pylori*, es una técnica rápida, altamente sensible y específica; puede identificar DNA bacterial en fluidos obtenidos por métodos no invasivos como placa dental y saliva.

MÉTODOS NO ENDOSCOPICOS.- Son las técnicas de elección en los estudios epidemiológicos de población y en el seguimiento de pacientes en tratamiento.

Serología.- Se basa en que la infección por *H. pylori* provoca una respuesta inmune tanto local como sistémica. Se han evaluado y comparado la eficacia diagnóstica de dos pruebas serológicas comercializadas, un ELISA y una seroaglutinación mediante látex. (Pyloriset, Orion). El ELISA mostró una mayor eficacia diagnóstica (sensibilidad 100%, especificidad 72%) que el látex (46% y 82%, respectivamente).

Prueba del aliento.- Se basa, como la prueba de la ureasa, en la alta actividad ureásica de *H. pylori*, actividad que es posible cuantificar a través de la medida de CO₂ expirado marcado con ¹⁴C tras la administración oral de urea marcada con dicho isótopo. La dosis de radioactividad administrada es baja y la técnica es barata y al alcance de numerosos hospitales. La prueba del aliento con urea marcada con ¹³C no es radiactiva, pero esta técnica es más cara. La prueba del aliento es un excelente método diagnóstico con alta sensibilidad (95%) y especificidad (96%) (Zamora, 2003).

3.3.7.- EPIDEMIOLOGÍA.

H. pylori está presente en la mucosa gástrica en menos del 20% de personas menores de 30 años de edad, pero aumenta en frecuencia de 40% a 60% en personas de 60 años, incluyendo individuos asintomáticos. En los países en desarrollo, la incidencia de infección puede ser del 80%, en adultos (Guerrero, 2002).

En México se han realizado pocos estudios acerca de la seroprevalencia de *Helicobacter pylori* (Jiménez, 1996). Sin embargo estudios realizados en últimos años a 12,292 sueros indicaron que con ELISA, el 66% de la población mexicana esta infectada por *H. pylori*; la infección aumenta con la edad; en individuos de un año la seroprevalencia es de un 20%, a los 10 años es de 50% y a los 30 años casi del 90% (Hopkins, 1993).

3.3.8.- FACTORES DE RIESGO.

Los factores de riesgo asociados a esta infección son: **Herencia**: Se ha observado que los familiares de una persona que padece esta enfermedad tienen una mayor posibilidad de padecerla también. **Tabaquismo**: la nicotina procedente del tabaco altera la liberación de bicarbonato que sirve para frenar al ácido. Tener **grupo sanguíneo O**: ya que parece que este grupo sanguíneo, favorece la acción de *H. pylori*. Los estados de **estrés y ansiedad**, también se asocian a esta enfermedad debido a que afectan el movimiento del intestino, la mucosa gástrica y la inflamación. La ingesta de **alcohol**: que facilita la aparición de gastritis superficial, gastritis crónica y agruras. El **café y las comidas irritantes**, también se han asociado con la aparición de la enfermedad ácido péptica. También se ha asociado esta enfermedad a la presencia de **otras enfermedades** como: insuficiencia renal, enfermedad obstructiva crónica pulmonar y cirrosis alcohólica; estos ayudan al desequilibrio entre los factores agresivos (ácido y pepsina presentes en el jugo gástrico) y los protectores (barrera de la mucosa y bicarbonato).

3.3.9.- TRATAMIENTO.

La erradicación de *H. pylori* no es fácil y los estudios tampoco son al azar, la dosis de agentes antimicrobianos y la duración del tratamiento varían en amplio grado y la definición de erradicación difiere entre los estudios. Algunos consideran la ausencia de *H. pylori* inmediatamente después del tratamiento como una evidencia de la erradicación, mientras que otros insisten en que debe esperarse un mes para descartar a los sujetos en quienes el microorganismo sólo fue suprimido de manera temporal (Ojeda, 1998).

En los últimos años el tratamiento de elección para los pacientes con úlcera péptica infectados por *H. pylori*, tanto en la etapa inicial como para la recurrencia de la enfermedad incluye antimicrobianos junto con los fármacos antiseoretos de HCl. Los fármacos que han sido utilizados en diversas composiciones son: amoxicilina, metronidazol, tetraciclinas, eritromicina, claritromicina, así como sales de bismuto (peptobismol) y antagonistas de los receptores de H₂ o los inhibidores de la bomba de protones de las células parietales gástricas como el omeprazol o lansoprazol. (CUADRO 1). Estos compuestos se sabe que actúan sinérgicamente con los antimicrobianos, aunque no se conoce las razones de ello (Guerrero, 2002).

Algunos conceptos de los factores que influyen en la eficacia erradicadora de los antimicrobianos, incluyen al pH gástrico, la biodisponibilidad, penetración tisular y actividad antibiótica. Por otro lado los efectos de los inhibidores de la bomba de protones sobre el microorganismo, la cual produce una inhibición de la ureasa bacteriana, parecen ser dosis dependiente y probablemente estén relacionados con la unión covalente de estos fármacos con los grupos sulfhídricos de la enzima, debido a que la bacteria puede en parte depender de la actividad de ureasa, tanto para su actividad patógena como para obtener sus requerimientos metabólicos. En cuanto a la acción directa, se ha establecido que el incremento del pH gástrico ejerce una mayor eficacia y concentración local de los antimicrobianos, disminuyendo al efecto de las inmunoglobulinas y preservando la función leucocitaria (Guerrero, 2002).

ESQUEMA DE TRATAMIENTO	DOSIS
Inhibidor de la bomba de protones + Claritromicina + Amoxicilina	Dosis estándar 500 mg 1000 mg
Inhibidor de la bomba de protones + Claritromicina + Metronidazol	Dosis estándar 500 mg 400 mg
Ranitidina con citrato de bismuto + Claritromicina + Amoxicilina	400 mg 500 mg 1000 mg
Ranitidina con citrato de bismuto + Claritromicina + Metronidazol	400 mg 500 mg 400 mg

CUADRO 1.- Esquema de tratamiento de siete días contra la infección por *H. pylori*, más utilizados. Tomada de Pylopac, Medley México (2001).

3.4.- ANTIMICROBIANOS.

Desde el siglo XVII se han empleado sustancias químicas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas; en 1889 Vuillemin, en un trabajo titulado *Antibiose et symbiose*, crea el término antibiosis para describir la lucha entre seres vivos por la supervivencia. Mas tarde, Ward adopta esta palabra para describir el antagonismo microbiano. Con posterioridad, ya en plena era antibiótica, significó: sustancia extraída de seres vivos, ya fueran bacterias, hongos, algas, etcétera, con capacidad para anular la vida de diversos microorganismos, pero no fue sino hasta el siglo XX, que comienza la quimioterapia como ciencia con los estudios de Paúl Ehrlich quien fue el primero en formular los principios de la toxicidad selectiva y reconocer las reacciones químicas específicas entre los microorganismos y los medicamentos, ya que descubrió que las arsefaminas (compuestos con base en arsénico) atacan al *Treponema palidum*, causante de la sífilis en el hombre (Guerrero,2002).

Durante el transcurso del siglo pasado la investigación químico terapéutica se centró principalmente en las sustancias de origen microbiano. Además del desarrollo de la penicilina descubierta por Fleming en 1929, se dió el de otras sustancias como la estreptomcina, tetraciclina, cloramfenicol y otras (Guerrero, 2002).

3.4.1.- DEFINICIÓN.

Los antimicrobianos son un grupo de fármacos que están continuamente en uso pues constituyen la base fundamental del tratamiento de enfermedades infecciosas entendiéndose por antimicrobiano como aquellos compuestos obtenidos a partir de microorganismos ya sean bacterias, hongos, levaduras, etcétera, (antibiótico) y los producidos por síntesis química (quimioterapéutico).

El término antibiótico fue propuesto inicialmente para definir a sustancias que ocasionan la destrucción de la vida, tomando en cuenta lo anterior se puede decir que

cualquier agente mecánico, físico o químico capaz de matar sería un antibiótico, pero no puede tomarse en cuenta dicho concepto puesto que según los estudios de Waksman un “antibiótico” se define como una sustancia química derivada o producida por microorganismos que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo o destruir bacterias y otros microorganismos (Solano, 1995). Los microorganismos que producen los diferentes antibióticos tienen una amplia distribución en la naturaleza, sin embargo, de los varios cientos producidos de forma natural que se han purificado sólo un mínimo de ellos han resultado lo suficientemente poco tóxicos como para ser utilizados en la práctica médica (Guerrero, 2002).

3.4.2.- TIPOS DE AGENTES ANTIMICROBIANOS.

Desde el punto de vista práctico existen:

- a) **Desinfectantes:** sólo se aplican a sistemas inanimados y eliminan la carga microbiana.
- b) **Sanitizantes:** solo se aplican a sistemas inanimados y disminuyen la carga microbiana.
- c) **Antisépticos:** reducen y controlan la presencia de microorganismos potencialmente patógenos, solo se pueden aplicar externamente en seres vivos (piel y/o mucosas).
- d) **Antimicrobianos de uso sistémico:** reducen y controlan la presencia de microorganismos que han invadido los tejidos. Actúan en el organismo, pudiendo ser ingeridos (vía oral), absorbidos por piel (apósitos) y/o inyectados.

La mayoría de los antibióticos son moléculas complejas, con regiones hidrofóbicas que facilitan el transporte al interior de la célula. Muchos poseen varios anillos, algunos de los cuales mejoran la interacción de la molécula con la bacteria de manera que se pueden clasificar según su origen, efecto antimicrobiano, espectro de actividad y mecanismo de acción (CUADRO 2). Respecto a este último es preciso tener presente que puede haber un cierto número de estadios entre el efecto inicial o primario de la droga y la consiguiente muerte de la célula. Además algunos agentes pueden tener más de un sitio primario de ataque o mecanismo de acción (Guerrero, 2002).

3.4.3.- CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN.

a) Por su origen:

Natural o biológico: Cuando son obtenidos a partir de microorganismos, bien sean bacterias u hongos.

Semisintético: Es cuando el núcleo fundamental de un determinado antimicrobiano producido por un microorganismo, se modifica en el laboratorio para conseguir propiedades diferentes que mejoren el espectro, las características farmacocinéticas o disminuyen los efectos secundarios.

Sintético: Cuando se obtienen de manera total por procesos de síntesis químicas como por ejemplo: las sulfamidas y quinolonas.

b) Por su efecto antimicrobiano: bacteriostático, bactericida.

Bacteriostático: Este efecto se da cuando las concentraciones del antimicrobiano que se alcanzan en suero y tejido, detiene el desarrollo y multiplicación de las bacterias sin destruirlas, por lo que al retirar el medicamento el microorganismo puede multiplicarse nuevamente. Con este tipo de antimicrobianos, es fundamental la activación de los mecanismos defensivos del huésped.

Bactericida: En este efecto la acción es letal produciendo la lisis bacteriana, con efectos irreversibles para el microorganismo. El prototipo de agentes bactericidas lo constituyen los que actúan sobre la pared (betalactámicos) o sobre la membrana celular de la bacteria.

c) Por su mecanismo de acción:

- Los que actúan sobre la pared celular.
- Los que actúan sobre la membrana celular.
- Los que inhiben la síntesis proteica.
- Los que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos (Solano, 1995).

d) Por su espectro de actividad. Se denomina espectro bacteriano, a la agrupación de microorganismos constituida por *Rickettsias*, Bacterias Gram (-) y Gram (+), cocos Gram (-), cocos Gram (+), *Actinomicetos*, *Espiroquetas*, entre otros. Los agentes antimicrobianos se dividen por su espectro de actividad en:

Amplio espectro.- Moléculas activas sobre un gran número de especies bacterianas.

Espectro intermedio.- Tienen acción sobre un número limitado de especies bacterianas

Espectro reducido. Son activos sobre un número pequeño de especies bacterianas (Goodman-Gilman 1990).

e) Por su estructura química: Los diferentes antibióticos y quimioterapéuticos se agrupan en familias de acuerdo a las características que tienen en común, como son: composición química, efectos farmacológicos, mecanismo de acción, etc. Se dividen en: Betalactámicos, Lincosamidas, Aminociclítos, Rifampicinas y Quinolonas, Tetraciclinas, Fosfomicina, Polipéptidos, Nitroimidazoles, Sulfamidas, Poliénicos, Cloramfenicol y derivados, Pirimidinas, Macrólidos, Imidazólicos (Solano, 1995).

La eficacia de los fármacos antimicrobianos depende del grado de sensibilidad de los microorganismos blanco, de esta manera los antimicrobianos de uso sistémico deben reunir las siguientes características:

- 1.- Ser más bactericidas que bacteriostáticos.
- 2.- Mantenerse activos en presencia de plasma y líquidos corporales.
- 3.- Que sean efectivos frente a un amplio espectro de microorganismos.
- 4.- Los microorganismos susceptibles no se deben volver resistentes genética o fenotípicamente.
- 5.- No deben ser tóxicos y los efectos colaterales adversos tienen que ser mínimos para el huésped.

CLASIFICACIÓN	TIPO	DEFINICIÓN	EJEMPLOS
ORIGEN	naturales	a partir del m.o., bien sean bacterias u hongos	penicilinas, estreptomycinas, cefalosporinas
	sintéticos	síntesis química	sulfamidas y quinolonas
	semisintéticos	modificación química de antimicrobianos naturales	penicilinas de amplio espectro
EFECTO	bacteriostático	impide el desarrollo del m.o. sin destruirlo	sulfonamidas, tetraciclinas
	bactericida	acción letal sobre el m.o., perdiendo viabilidad	cefalosporinas, penicilinas
ESPECTRO DE ACTIVIDAD	amplio	actúan sobre un gran número de especies microbianas	tetraciclinas, cefalosporinas
	intermedio	actúan sobre un limitado núm. de m.o.	macrólidos
	reducido	actúan sobre un número pequeño de microorganismos	polimixinas, aminoglucósidos
MECANISMO DE ACCIÓN	inhibición de la síntesis de la pared celular	inhibe la síntesis de peptidoglicano mediante la inhibición de la incorporación de la D-alanina al pentapéptico y la inhibición de la transpeptidación que dan origen a la rigidez de la pared	penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, cicloserinas, vancomicinas, bacitracinas
	inhibición de la función de la membrana citoplasmática	altamente tóxicos, interfieren en la integridad de metabolitos y nutrientes de las bacterias	polimixinas
	inhibición de la síntesis proteica	inhiben a nivel de RNA polimerasa	actinomicina, tetraciclinas, nitrofuranos
	inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	actúan en la fase de duplicación y transcripción, que daña la multiplicación y metabolismo de la célula	quinolonas, mitomicinas, norfloxacin, metronidazol
	transformaciones metabólicas en el citoplasma		sulfonamidas

CUADRO 2.- Clasificación y descripción de antimicrobianos.

3.4.4.- RESISTENCIA BACTERIANA Y ORIGEN.

La síntesis de agentes quimioterapéuticos artificiales y el descubrimiento y mejora de los antibióticos han supuesto en este siglo una auténtica revolución médica en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Sin embargo, la extrema versatilidad y adaptabilidad de los microorganismos ha impedido que la victoria humana sobre las bacterias patógenas haya sido total, muchas bacterias han desarrollado en los últimos decenios mecanismos que las protegen frente a muchos fármacos. Así la capacidad de resistencia a antibióticos que presentan los microorganismos, puede ser una característica intrínseca, o bien puede resultar de la presión selectiva que surge en un ambiente alterado por el uso indiscriminado o exagerado de antimicrobianos, como se observa en situaciones clínicas.

Para comprender en qué forma los microorganismos manifiestan resistencia a los diversos antibióticos, es importante conocer:

- Las propiedades de dichos compuestos.
- La forma como son transportados al interior celular.
- Las alteraciones que provocan en la célula bacteriana.
- Las características que les confieren propiedades antibacterianas.
- Su mecanismo de acción.

En este contexto, es necesario considerar conceptos como:

Cepa insensible. Es aquella cuyo fenotipo silvestre le permite “resistir” de modo natural a un determinado antibiótico. La base de esta insensibilidad suele ser alguna estructura de la bacteria que actúa como barrera (como por ejemplo, la membrana externa de Gram-negativas, que dificulta el paso de muchos agentes antibacterianos).

Cepa resistente. Es una variante surgida por cambios genéticos a partir de un fenotipo silvestre originalmente sensible (Guerrero, 2002).

ORIGEN DE LA RESISTENCIA. Por algún tiempo se discutió si el origen de la aparición de formas resistentes a los fármacos quimioterapéuticos se debía a factores genéticos o de adaptación, pero actualmente se sabe que la resistencia se debe a factores genéticos, la resistencia se puede dar de dos tipos:

a) Resistencia cromosómica. Si una gran población de células bacterianas es poco resistente genóticamente (poseen resistencia constitutiva al antibiótico en cuestión) la habilidad de esas células para crecer en presencia del antibiótico conlleva a una nueva población de prole que son más resistentes genóticamente. La cuestión es que la resistencia genotípica está altamente relacionada al proceso de mutagénesis microbiana general.

Algunos agentes tales como radiaciones y luz ultravioleta, producen cambios genéticos espontáneos en el DNA, esto puede ocurrir como el resultado de la exposición al agente físico al cual la célula está expuesta.

Estos cambios mutacionales pueden darse en presencia o ausencia de un antibiótico, ocurriendo mutaciones en un solo punto. Si el cambio es de resistencia a un agente antimicrobiano, la resistencia puede aparecer por cualquiera de las dos siguientes vías:

1).- Si el cambio está específicamente relacionado al antibiótico (ejemplo: un aumento en la cantidad de una enzima, como la beta-lactamasa, la cual hidroliza a la penicilina) un alto nivel de resistencia puede ser observada inesperadamente.

2) Si el cambio genético está relacionado indirectamente a una acción bioquímica del antibiótico, pequeños aumentos en la resistencia pueden ocurrir, pero si el pequeño aumento aparece varias veces en la población bacteriana un desarrollo gradual de la resistencia al antibiótico puede ser observada (Sahm, 1988).

b) Resistencia extracromosómica. En este tipo de resistencia el DNA externo puede ser introducido a la célula bacteriana. Si esta codifica a enzimas que afectan la sensibilidad de los antibióticos se llega a un cambio en la resistencia del microorganismo, estos elementos extracromosómicos son llamados plásmidos (Solano, 1995).

3.5.- ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

La actividad antimicrobiana es el poder que presentan los diferentes antibióticos de atacar a microorganismos patógenos que se encuentren causando una infección en el huésped. Tal actividad se expresa generalmente como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del antimicrobiano que destruirá al microorganismo sometido a prueba. La actividad antimicrobiana puede determinarse, por métodos *in vitro* e *in vivo* (Solano, 1995).

3.5.1.- MÉTODOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

3.5.1.1.- MÉTODOS *in vitro*.

Los métodos de susceptibilidad o actividad antimicrobiana, son técnicas *in vitro* bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas, que reflejan la capacidad de uno o más antibióticos frente a una población bacteriana e incluyen las pruebas: difusión en agar (discos), dilución en agar, dilución en caldo (cinética de crecimiento), métodos automatizados, E-test, ensayo enzimático y cromatografía (Guerrero, 2002).

Estos son útiles para determinar:

- 1.- La potencia de un agente antibacteriano en solución.
- 2.- Su concentración en los líquidos corporales o en los tejidos
- 3.- La sensibilidad de un microorganismo dado, a concentraciones conocidas de antibiótico.

El descubrimiento y ensayo de antibióticos y la determinación de la sensibilidad a ellos por parte de las bacterias llevan consigo generalmente la exposición de una suspensión estandarizada de bacterias a los efectos de diversas concentraciones del antibiótico o sustancia sospechosa de contenerlo (Solano, 1995).

MÉTODOS DE DILUCIÓN.

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estas técnicas son utilizadas para medir semi-cuantitativamente la actividad *in vitro* de un agente antimicrobiano frente a un cultivo de una cepa bacteriana y permiten determinar la CMI que es la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Estos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).

La reproducibilidad de estas pruebas es de ± 1 dilución y para evitar una gran variabilidad, estas deben ser estandarizadas y controladas cuidadosamente, son muy útiles en el estudio de nuevos agentes antimicrobianos y en la confirmación de resistencia a aminoglucósidos determinada por pruebas de difusión de discos (Guerrero, 2002).

Dilución en caldo. Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos por dilución en caldo, han sido empleadas durante décadas y representan sólo una modificación menor del método de dilución en agar; sin embargo, algunas características son exclusivas de las pruebas de caldo. La prueba de susceptibilidad por dilución en caldo fue utilizada primero en tubos grandes, el cual se estandarizó hasta finales de 1977 y después se popularizó el procedimiento de dilución en caldo con volúmenes menores de 1 ml.

Este método proporciona un resultado cuantitativo de la concentración del agente antimicrobiano necesario para inhibir el desarrollo de un organismo dado. Así mismo, este método sirve para determinar la susceptibilidad *in vitro* de un microorganismo a un antibiótico.

En este método se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano, generalmente diluciones al medio de factor 2 (1:2), en tubos con un caldo de cultivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. El caldo comúnmente usado para esta

prueba es Müller-Hinton (MH) El último tubo no recibe agente antimicrobiano y sirve de control de crecimiento. Luego se prepara un inóculo ajustándolo a un estándar de turbidez (0.5 de Mac Farland) y se añade a cada tubo el inóculo ajustado para después incubar. Más tarde, se determina la CMI, que se lee como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibió el crecimiento visible del m.o. También se determina la Concentración Mínima Bactericida (CMB), subcultivando a un medio sólido libre de antibióticos el contenido de los tubos en que no se observo crecimiento y después de un periodo adicional de incubación la CMB será la dilución más baja que haya impedido el desarrollo de colonias (Calderón, 2001).

Dilución en agar. Es considerado el método de referencia. En éste se pueden probar muchas cepas simultáneamente, por su capacidad de detectar heterogeneidad o contaminación microbiana y por su reproducibilidad, además de que tiene la capacidad de detectar contaminación microbiana. La única desventaja es que no se puede determinar la CMB. Aquí no se diluye el agar sino el antimicrobiano. De esta forma las placas que contienen una determinada concentración de un antibiótico son inoculadas con el microorganismo en estudio y luego incubadas por 16 a 18 hrs. Después de la incubación, se examina si el organismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se obtiene la CMI para el antibiótico, en esta dilución el compuesto presenta un efecto bacteriostático (Guerrero, 2002).

MÉTODOS DE DIFUSIÓN.

Difusión en agar. Este método, (también llamado difusión por disco, antibiograma o Kirby-Bauer), es cuantitativo y requiere la medición de los diámetros de la zona de inhibición que suministran estimaciones reproducibles de la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos; este es uno de los métodos que el Nacional Comité for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los microbianos. Estos procedimientos estandarizados requieren el uso de concentraciones inoculadas estandarizadas (Solano, 1995).

El microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con diferentes concentraciones conocidas del antibiótico. Las placas se incuban por 16-24 horas a 35 °C. Durante la incubación, el antibiótico difunde en forma radial desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco (formándose un gradiente de concentración), en un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio, el diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de susceptible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a las tablas publicadas por el NCCLS. La interpretación requiere la correlación entre el diámetro obtenido en el disco y la concentración del antimicrobiano en el disco. Si las recomendaciones para realizar este método son fielmente seguidas, las categorías se correlacionan muy bien con los resultados de los otros métodos. El diámetro de la zona de inhibición tiene una relación inversamente lineal con la CMI, ya que, a mayor zona de inhibición mayor será la susceptibilidad del organismo y, en consecuencia, la concentración necesaria del antimicrobiano para inhibir su crecimiento será menor (Calderón 2001 y Guerrero, 2002).

Método de cilindro placa. Depende de la difusión del antibiótico que se encuentra en un cilindro de metal, a través de una capa de agar contenido en una caja petri, de tal modo que el crecimiento del microorganismo inoculado se impide completamente en un área o zona circular alrededor del cilindro que contiene el antibiótico (García 2005).

E-test. Este método ha sido descrito recientemente y representa una sofisticada combinación de los anteriormente descritos. El E-test es más simple que otras técnicas para obtener una CMI. Utiliza una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones que van desde 0.016 µg/ml hasta 256 µg/ml. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Esta tira se pone sobre una placa de agar que ha sido inoculada con el organismo en estudio. Después de incubar la placa por 16 a 18 hrs, se forma un área de inhibición de forma elíptica y simétrica, en la cual la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira y puede ser leída directamente. Ha sido utilizado en estudios de susceptibilidad en

gérmenes problemáticos o con requerimientos especiales, como: *H. pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* y m.o. anaeróbios.

El E-test se considera como método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de CMI.

La meta principal del estudio de susceptibilidad es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica. No obstante, la correlación exacta entre los resultados in vitro y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que existen numerosos factores tanto del agente antimicrobiano como del huésped y del microorganismo que influyen en su interacción en un determinado paciente (Guerrero, 2002).

3.5.1.2.- MÉTODO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA.

La Concentración Mínima Bactericida (CMB) de un antibiótico es aquella que mata por lo menos el 99.9% de un inóculo bacteriano estandarizado. Su objetivo es determinar la menor concentración de un antimicrobiano que es capaz de matar una cepa bacteriana. Para calcularla se emplean procedimientos en los que la bacteria y antimicrobiano se enfrentan en un caldo. Se parte de los mismos métodos utilizados para obtener la CMI por dilución en caldo y sus modificaciones para bacterias exigentes. Se puede obtener empleando el procedimiento de macrodilución en tubo o microdilución en placa.

En general la CMI y la CMB, en los antibióticos considerados bactericidas, están próximas. Habitualmente difieren en una o dos diluciones. En ocasiones esto no ocurre y estamos ante los fenómenos: paradójico de tolerancia y de persistencia. El fenómeno paradójico o de Tagle consiste en la presencia de un mayor número de bacterias supervivientes a concentraciones superiores a la CMB. Parece ser que no tiene trascendencia en los tratamientos antimicrobianos. La tolerancia es la disminución o desaparición de la capacidad de matar de un antibiótico bactericida en un determinado

aislamiento o especie. Su significado clínico es dudoso aunque puede determinar en algunas infecciones la necesidad de asociar este antimicrobiano con otro. La persistencia refleja el hecho de que una pequeña población resiste a la acción bactericida. Su número suele ser menor del 0.1% y por eso, la definición de CMB se refiere a la muerte del 99.9% del inóculo, aparece sobre todo con β -lactámicos (García, 2005).

3.5.1.2.- MÉTODOS *in vivo*.

La actividad *in vivo* y la toxicidad de nuevos antibióticos es un estudio rutinario en modelos experimentales usando animales pequeños tales como ratones, ratas, cobayos o conejos, estos estudios no son directamente transferibles al hombre, pero éste es poco común que se le utilice como modelo experimental debido al costo y a la poca disposición por parte del ser humano.

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana son un dato importante a considerar para la elección terapéutica, aunque por sí mismas se deben manejar cuidadosamente de acuerdo a su farmacocinética, tomando en cuenta que la concentración de un antibiótico puede verse afectada (Toshiaki, 1980).

4.- JUSTIFICACIÓN.

En México se han realizado muy pocos estudios acerca del efecto que provoca el extracto acuoso de cuachalalate en diferentes bacterias tanto Gram positivas, como Gram negativas, pero sobre todo contra *Helicobacter pylori*; ya que la infección que causa esta bacteria es un problema de salud para toda la población, (sobre todo en lugares de bajo nivel socioeconómico) y gracias a que nuestro país cuenta con una amplia variedad en plantas medicinales y su uso es muy común, además de que existe una relación directa entre la observación de la bacteria *H. pylori* en el estómago y la aparición de gastritis crónica, por ello, en el siguiente trabajo se evalúa el efecto antimicrobiano del extracto acuoso del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) primeramente en bacterias de diferentes géneros (Gram positivas y negativas) para posteriormente probarla contra *Helicobacter pylori*, ya que esta planta se usa dentro de la medicina tradicional como agente para el tratamiento del cáncer de estómago, para la úlcera gástrica y gastritis. Sin embargo, no existe algún informe documentado en el que se indique la eficacia de esta planta en la inhibición de *Helicobacter pylori*, por lo que se consideró importante realizar el presente estudio.

5.- HIPÓTESIS.

Si el extracto acuoso de cuachalalate es un agente con actividad potencialmente antimicrobiana *in vitro*, entonces es posible que este extracto, inhiba el crecimiento de cepas de *Helicobacter pylori*.

6.- OBJETIVO GENERAL.

- Comprobar si existe efecto antimicrobiano del extracto acuoso del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), en diferentes cepas y *Helicobacter pylori*, por medio de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, para conocer si esta planta medicinal puede actuar como remedio en infecciones causadas por estas bacterias.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Identificar cepas de *Helicobacter pylori*, *Salmonella spp*, *Morganella morgani*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus ATCC 6538*, *Klebsiella oxitoca*, *Streptococcus grupo D*, *Escherichia coli ATCC 25922* y *Corynebacterium spp*, por medio de pruebas bioquímicas primarias y secundarias, para afrontarlas posteriormente contra el extracto acuoso de cuachalalate utilizado en esta investigación.

- Realizar el extracto acuoso de cuachalalate; purificarlo a través de filtros estériles con membranas de 0.8, 0.4 y 0.22 μm , para posteriormente cuantificarlo por medio de la evaporación de líquidos, con la finalidad de conocer con que concentraciones se realizan todas las pruebas.

- Realizar diferentes pruebas de sensibilidad (dilución en agar, dilución en tubo, Kirby Bauer y prueba de penicilindros) a bacterias Gram positivas y Gram negativas, para comprobar el efecto que provoca en estas, para después aplicarlas en *Helicobacter pylori*.

- Determinar la CMI de las diferentes bacterias del extracto acuoso del cuachalalate utilizando la prueba de dilución en tubo y dilución en agar para conocer cual es la menor concentración del extracto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

7.- MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Preparación del extracto de cuachalalate. La preparación del extracto acuoso, se realizó con cuachalalate en trozos pequeños, (comprándolo en la plaza de Santo Domingo de la Ciudad de México), se usaron 45g de cuachalalate y 1 litro de agua destilada, se filtró con membranas de acetato de celulosa con poros de 0.8 μm y 0.4 μm . Para la esterilización, se filtró con membranas estériles de 0.22 μm y se realizan pruebas de control de calidad. Sembrando 1 ml del extracto en una caja de agar sangre y dejándolo incubar por 24 hrs.

El extracto final (con volumen de 100 ml) se coloca en diferentes tubos estériles y se almacena a 4°C, utilizándose dentro de los siguientes días después de su preparación.

Para conocer la concentración del extracto, se cuantifica el producto seco (eliminando toda el agua) agregando 1 ml del extracto acuoso en 1 vial (esto se hace por triplicado), y se dejan en el horno a 56°C hasta la desecación total, se pesan y se hacen cálculos específicos.

7.2. Cepas. Las cepas que se utilizaron fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Morganella morgani*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium spp*, *Salmonella spp*, *Streptococcus grupo D*, *Klebsiella oxitoca*. (Donados por el Laboratorio de Bacteriología de la FES-Cuautitlan) y *Helicobacter pylori* (Donado por el Instituto Nacional de Cancerología).

Estas se tomaron de cepas liofilizadas, a las cuales para su utilización, se reactivaron con 2 ml de caldo BHI y se dejaron en la estufa a 37°C durante 20 minutos, para posteriormente sembrarlas en cajas con agar enriquecido y tenerlas así en óptimas condiciones para ser identificadas, realizando tinción de Gram y pruebas bioquímicas primarias y secundarias y haciéndolas crecer en medios selectivos y diferenciales. En el caso de *Helicobacter pylori* se realizaron pruebas específicas como fueron tinción de Gram, oxidasa, catalasa, motilidad en gota suspendida y ureasa, se cultivó en agar

sangre al 5%, incubando a 37 °C bajo condiciones microaerofílicas, durante 5 días por ser una bacteria con requerimientos específicos.

7.3 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

7.3.1. Método de dilución en tubo. En relación con los métodos para estudiar la sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos, se han publicado muchas revisiones y hay recomendaciones del NCCLS aprobado, desde 1990 y revisado en 1997 (Documento M11-A4).

Medio de cultivo. Se utilizó caldo MH ya que la NCCLS recomienda que para la mayoría de los m.o. a estudiar se utilice este medio, al que se le pueden añadir suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes, (este medio fue el que se utilizó en todas las pruebas, con el fin de lograr que estas sean completamente reproducibles), el cual se sirvió en tubos limpios que se esterilizaron a condiciones estándar, y dejándolos enfriar a temperatura ambiente. Antes de utilizar los tubos con el medio, se incubaron a 35 °C por 24 hrs, para eliminar aquellos que se hubieran contaminado.

Preparación del inóculo. La cosecha de los microorganismos se realizó una vez que se verificaron por pruebas bioquímicas la pureza de los cultivos, de acuerdo a los anexos.

En el caso de *Helicobacter pylori* se trató de manera diferente por ser una bacteria que se aísla y cultiva en condiciones especiales de acuerdo al anexo 1 y 2.

Con un asa se tomaron 5 colonias aisladas de la bacteria a probar, la cual provenía de un cultivo joven de 18-24 hrs, de crecimiento en agar MH y se inocularon en 5 ml de SSF. Se incubaron a 35 °C con agitación (200 rpm) hasta que apareció una leve turbiedad, se ajustó esta tomando como referencia el tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1×10^8

UFC/ml). Este ajuste se realizó por comparación visual, agitando los tubos antes y durante el proceso con ayuda de un vortex, utilizando un fondo blanco con una línea negra contrastante.

Preparación de diluciones del extracto. Se tomó el extracto acuoso ya preparado, de concentración inicial: 4572.13 µg/ml, de esta solución se efectuaron diluciones dobles (Log_2) con caldo MH hasta llegar a la concentración de 35.72 µg/ml, después de esto, se agregó a cada tubo el inóculo bacteriano antes preparado y se incubaron los tubos a 37°C durante 18 hrs (y de 24 a 72 hrs en condiciones microaerofílicas, para *Helicobacter pylori*, como en cada una de las pruebas realizadas), para su posterior observación.

Se realizaron controles negativos sin inoculación del microorganismo y controles positivos sin extracto, solo caldo MH e inoculación de bacterias.

Esto se realizó para cada una de las bacterias por separado.

Interpretación. La menor concentración de antimicrobiano que mostró la inhibición completa del desarrollo visible representa la CMI. También se determina la CMB, subcultivando a un medio sólido libre de antibióticos el contenido de los tubos en que no se observó crecimiento y después de un periodo adicional de incubación la CMB será la dilución más baja que haya impedido el desarrollo de colonias (que en este caso no se determinó) (Calderón, 2001).

7.3.2. Método de dilución en placa. La NCCLS en el documento M100-S9 (1999) recomienda un método de dilución en agar, de las pruebas de susceptibilidad in vitro contra diferentes bacterias (incluyendo *H. pylori*) se refiere a la incorporación de las sustancias a estudiar en el agar como si fueran soluciones acuosas (Guerrero, 2002).

Preparación de placas de dilución. Se realizaron diluciones dobles del extracto a partir de la máxima concentración (4572.13 µg/ml) hasta 35.72 µg/ml.

Se prepararon cajas de agar MH. Para ello se esterilizó previamente el medio bajo condiciones estándar y una vez que alcanzó una temperatura entre 45 y 50 °C, se incorporó la solución a cada una de las diluciones del extracto y se homogenizó.

Se distribuyó en cajas petri estériles, dejándolas en el horno 24 hrs, como prueba de esterilidad.

Inoculación de microorganismos. Se preparó una solución bacteriana en SSF estéril ajustada a la turbidez visual comparable al estándar de 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland y se inocularon 1 ml de esta suspensión a todas las diluciones por triplicado.

Se incubaron bajo las condiciones mencionadas para el método anterior durante 24 hrs (y 3 días para *H. pylori*).

Interpretación. Se registró la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano en cada dilución. La placa de concentración a la cual se observó ausencia total de m.o. se interpretó como valores de CMI en µg/ml.

7.3.3. Método de Kirby-Bauer (difusión en disco). Es el método de difusión en discos más utilizado en la práctica clínica, el cual ha sido aceptado por la Food and Drugs Administration (FDA) de USA y reportado como método estándar por la NCCLS descrito en el documento M2-A5 (1993).

Preparación de sensidiscos. Se utilizó papel filtro (Watman N°1) de un tamaño de 7 mm de diámetro, estos se esterilizaron en autoclave 15 minutos a 15 lb de presión y 121 °C.

Se tomo 1 ml del extracto ya preparado, de concentración: 4572.13 $\mu\text{g/ml}$. De esta solución se efectuaron diluciones dobles (Log_2) y se prepararon sensidiscos con un rango de concentraciones desde 4572.13 $\mu\text{g/ml}$ a 285.76 $\mu\text{g/ml}$, para lo cual se impregnó cada disco con 1 ml de cada dilución, utilizando micropipetas semiautomáticas en condiciones estériles. También se realizaron controles negativos impregnados con SSF estéril, dejándolos secar perfectamente y se guardaron para utilizarse dentro de los 3 días siguientes a su preparación, almacenándolos a 4 °C.

Medio de cultivo. El medio empleado para esta prueba fue MH, el cual se sirvió en cajas petri de 100 mm (25 ml aprox.) dejándolas enfriar a temperatura ambiente. Antes de utilizar las cajas con el medio, se incubaron a 35 °C por 24 hrs, para eliminar aquellas que se hubieran contaminado.

Preparación del inóculo. La cosecha de los microorganismos se realizó una vez que se verificaron por pruebas bioquímicas la pureza de los cultivos.

En el caso de *Helicobacter pylori* se trató de manera diferente por ser una bacteria que se aísla y cultiva en condiciones especiales, como ya se había mencionado.

Con un asa se tomaron 5 colonias aisladas de la bacteria a probar, la cual provenía de un cultivo joven de 18-24 hrs de crecimiento en agar MH y se inocularon en 5 ml de SSF. Se incubaron a 35 °C con agitación (200 rpm) hasta que apareció una leve turbiedad, se ajustó esta tomando como referencia el tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1×10^8 UFC/ml), agitando los tubos antes y durante el proceso con ayuda de un vortex. Posteriormente se colocó 1 ml de la suspensión bacteriana sobre las placas de agar MH, las cuales fueron esparcidas completamente, utilizando hisopos de madera con punta de algodón estériles. Se estrió el medio en tres direcciones, sobre toda la superficie del agar, incluido el borde, dejando secar el inóculo (2-5 min.) antes de colocar los discos.

Colocación de los discos. Se colocaron los discos que ya se habían impregnado con las diferentes concentraciones del extracto, sobre las placas inoculadas con pinzas

esterilizadas, más un disco control negativo (con SSF). Estos se presionaron suavemente sobre el agar, para asegurar un contacto completo con la superficie. Luego se incubaron las placas a 37°C durante 18 hrs. (y en condiciones microaerófilas con jarra Gaspac durante 3 días para *Helicobacter pylori*). Esto se realizó por triplicado para cada microorganismo, con la intención de obtener resultados favorables y sacar un promedio de los halos de inhibición.

Lectura e interpretación. A las 18-20 hrs. de incubación (y 72 hrs para *Helicobacter pylori*) se examinaron las placas y se midieron los diámetros de los halos de inhibición. Con los datos obtenidos se determinó la susceptibilidad de las bacterias al extracto de cuachalalate.

7.3.4. Método de difusión en agar “cilindro-placa”. Después de realizadas las pruebas de dilución y una vez que se comprobó cual de las bacterias utilizadas presentaban sensibilidad al extracto, se hizo conjuntamente con la prueba de Kirby Bauer la prueba de “difusión en agar o cilindro placa”, con la intención de conocer la susceptibilidad de los microorganismos sensibles al extracto.

Se realizó esta prueba a las cepas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Morganella morgani*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium spp* y *Helicobacter pylori*.

Esta prueba consistió en determinar la susceptibilidad de los microorganismos, al extracto de cuachalalate, el cual consiste en la difusión del extracto por un cilindro vertical a una capa de agar solidificado en una caja de Petri, hasta una extensión tal que le crecimiento del m.o. adicionado se impide completamente en un área circular o zona alrededor del cilindro que contiene una solución de la sustancia antimicrobiana (Stryer Lumbert, 1990).

Medio de cultivo. Se utilizó agar MH, que se sirvió en cajas de Petri 20 mm x 100 mm, para obtener resultados reproducibles. Todo en condiciones completamente estériles.

Pocillos o cilindros. Estos son de acero inoxidable, con dimensiones de 10 mm de longitud, 6 mm de diámetro interno, 8 mm de diámetro externo, tienen una precisión de 1 mm, y se conocen como pocillos de Heatley.

Suspensión bacteriana. Se realiza la siembra bacteriana utilizando para tal efecto, colonias aisladas de la bacteria a probar, (que como todas las pruebas anteriores provienen de cultivos jóvenes de 18-24 hrs. de crecimiento en agar MH) y se inocularon en 5ml de SSF estéril, incubándose a 37°C con agitación, hasta observar turbiedad y se ajustó la turbiedad de la misma manera que en el caso de la prueba de Kirby-Bauer. Posteriormente se colocó 1 ml de la suspensión bacteriana sobre placas de agar MH, las cuales fueron esparcidas completamente y sembrándose de manera masiva sobre toda la superficie del agar, incluyendo el borde, dejando secar el inóculo (3-5 min.) antes de colocar los pocillos o cilindros.

Colocación de pocillos o cilindros. Se colocaron los pocillos, 6 por cada caja, según la técnica estandarizada.

Preparación de diluciones. Para la preparación de diluciones, se tomó 2 ml del extracto ya preparado, de concentración 4572.13 µg, (extracto concentrado) del cuál se tomó 1 ml y se agregó 1 ml SSF (dilución 1), de esta dilución se tomó 1 ml y se agregó 1 ml de SSF (dilución 2), y el mismo procedimiento se hizo para las demás diluciones, hasta obtener 5 diferentes concentraciones, las cuales se agregaron a cada uno de los pocillos, con un rango de concentraciones desde 4572.13 µg /ml a 285.76 µg/ml, utilizando micropipetas semiautomáticas en condiciones estériles. También se realizaron controles negativos con SSF estéril.

Lectura e interpretación. A las 18-20 hrs. de incubación (y 72 hrs para *Helicobacter pylori*) se examinaron las placas y se midieron los diámetros de los halos de inhibición alrededor de los cilindros. Con los datos obtenidos se determinó la susceptibilidad de las bacterias al extracto acuoso de cuachalalate, como se hizo para Kirby-Bauer.

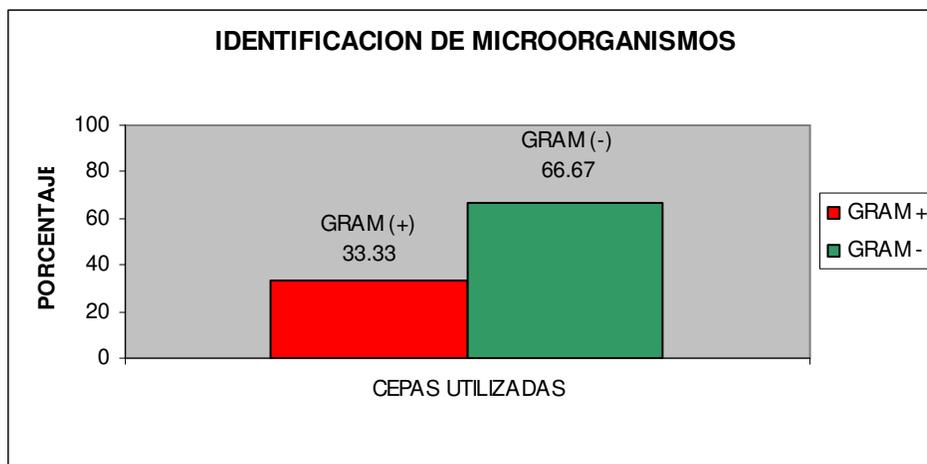
8.- RESULTADOS.

Estudio bacteriológico. Consistió en determinar la susceptibilidad de cepas bacterianas, frente al extracto acuoso de cuachalalate, empleando para tal efecto las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, como son: dilución en tubo, dilución en placa, Kirby-Bauer (o difusión en disco) y difusión en agar cilindro-placa, determinando con esto las bacterias susceptibles al extracto, así como la CMI.

8.1. Identificación de microorganismos. Después de la incubación a 37°C se examinaron las placas de las cepas liofilizadas y se identificaron por morfología colonial y mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias.

Para la cepa de *Helicobacter pylori* por ser esta una bacteria con características específicas se dejó 5 días a incubación a 37°C en condiciones microaerofílicas en un medio rico (agar sangre al 5%) y se hizo su identificación primeramente por morfología colonial (colonias pequeñas, translúcidas brillantes, con una elevación convexa y borde entero) y mediante las pruebas bioquímicas: Gram (-), oxidasa (+), catalasa (+), motilidad en gota suspendida (+) y ureasa (+).

Obteniendo para este estudio, que el 33.33% de las bacterias fueron Gram (+) y el 66.67%, Gram (-):



GRÁFICA 1.- Porcentaje de cepas utilizadas divididas en dos géneros, Gram (+) y Gram (-)

8.2. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

8.2.1.- Método de dilución en tubo. Los resultados obtenidos en esta técnica permiten conocer cuales de las bacterias utilizadas son sensibles al extracto acuoso del cuachalalate, esto con la finalidad de poder manejar las bacterias que presentan sensibilidad y utilizarlas en pruebas específicas y cuantitativas que determinan la CMI. En esta prueba se utilizaron controles negativos (a los que solo se les agregó el extracto) y controles positivos (a los que nada más se sembró la bacteria en cuestión).

Obteniendo los siguientes resultados:

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD DILUCIÓN EN TUBO.								
BACTERIAS	CONCENTRACIONES $\mu\text{g/ml}$							
	4572.13	2285.06	1143.73	571.52	285.76	142.88	71.44	35.72
<i>Salmonella spp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Morganella morgani</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Stap. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Stap. saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Stap. aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxitoca</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus gpo. D</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Corynebacterium spp</i>	-	-	-	-	+	+	+	+

CUADRO 3.- Resultados de la prueba de sensibilidad de dilución en tubo.

Donde (+) significa que existe desarrollo bacteriano y (-) que no existe desarrollo.

Se observa que las bacterias: *Klebsiella oxitoca*, *Streptococcus gpo D*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella spp*, presentaron desarrollo en todas las concentraciones del extracto acuoso. Mientras que las bacterias: *Morganella morgani*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* y *Corynebacterium spp* no obtuvieron desarrollo para ciertas concentraciones.

8.2.2.- Método de dilución en placa. En este método se considera la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano para determinar la CMI de cada una contra el extracto. Los resultados de la actividad inhibitoria, se resume en el siguiente cuadro en el cual se reporta:

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD DILUCIÓN EN PLACA.								
	CONCENTRACIONES $\mu\text{g/ml}$							
BACTERIAS	4572.13	2285.06	1143.73	571.52	285.76	142.88	71.44	35.72
<i>Salmonella spp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Morganella morgani</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Stap. Epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Stap. saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Stap. Aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxitoca</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus gpo D</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Corynebacterium spp</i>	-	-	-	-	+	+	+	+

CUADRO 4.- Resultados de la prueba de sensibilidad de dilución en placa.

Donde (+) significa que existe desarrollo bacteriano y (-) que no existe.

Los resultados arrojados por dilución en placa, son muy similares a los que se observan en la prueba de dilución en tubo; donde las mismas bacterias presentan desarrollo en todas las diluciones del extracto utilizado (*Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxitoca*, *Streptococcus spp grupo D* y *Escherichia coli*); en tanto que las bacterias restantes utilizadas en este experimento (*Morganella morgani*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* y *Corynebacterium spp*) no obtuvieron desarrollo bacteriano, presentando entonces sensibilidad. Conociendo que estas últimas, si son sensibles, entonces se puede conocer la CMI, que se describe en el cuadro siguiente:

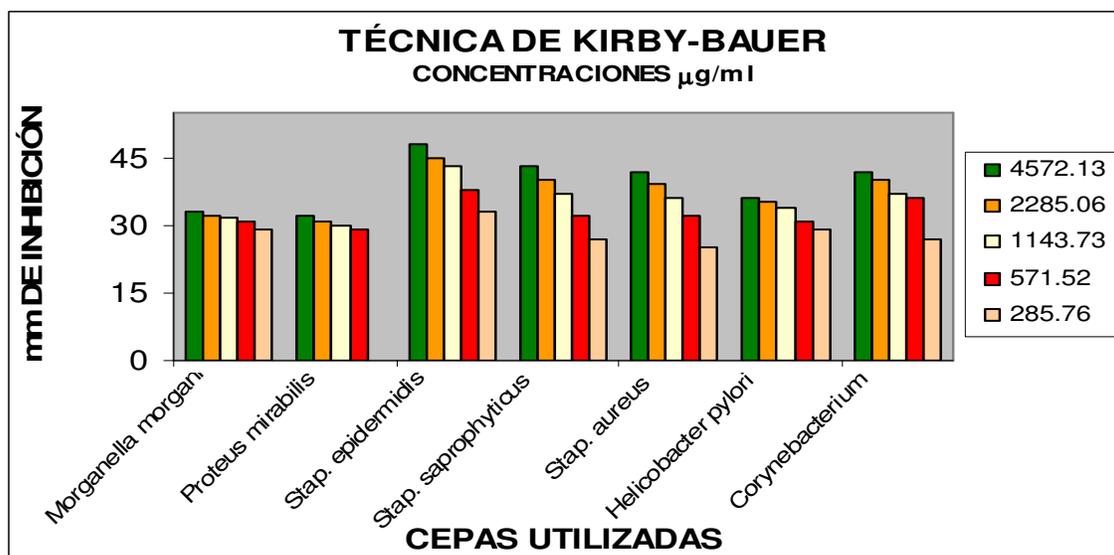
RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.		
	DILUCIÓN EN TUBO	DILUCIÓN EN PLACA
BACTERIAS SUCEPTIBLES	CMI $\mu\text{g/ml}$	CMI $\mu\text{g/ml}$
<i>Morganella morgani</i>	285.76	571.52
<i>Proteus mirabilis</i>	571.52	571.52
<i>Staphylococcus aureus</i>	571.52	571.52
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	71.44	71.44
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	285.76	285.76
<i>Corynebacterium spp</i>	571.52	571.52
<i>Helicobacter pylori</i>	285.76	285.76

CUADRO 5.- Resultados de CMI obtenidos por la prueba de dilución en tubo y dilución en agar.

8.2.3.- Método de Kirby-Bauer (difusión en disco). Los resultados de las pruebas de susceptibilidad por el método de difusión en disco del extracto acuoso de cuachalalate en estudio, se muestran en la siguiente tabla, observándose por medidas los diámetros de los halos de inhibición.

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA TÉCNICA DE KIRBY-BAUER.					
BACTERIAS	CONCENTRACIONES $\mu\text{g/ml}$				
	4572.13	2285.06	1143.73	571.52	285.76
<i>Morganella morgani</i>	33	32	31.5	31	29
<i>Proteus mirabilis</i>	32	31	30	29	00
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	48	45	43	38	33
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	43	40	37	32	27
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	39	36	32	25
<i>Helicobacter pylori</i>	36	35	34	31	29
<i>Corynebacterium</i>	42	40	37	36	27

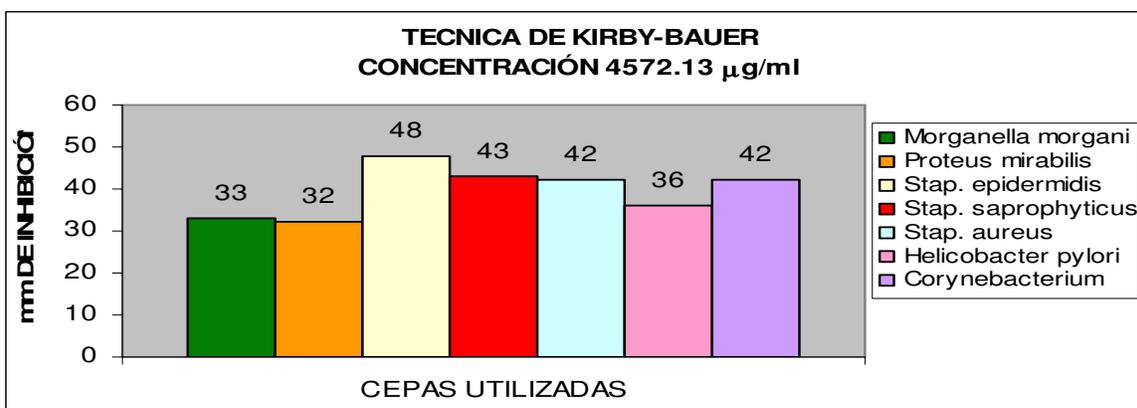
CUADRO 6.- Resultados de los halos de inhibición (en mm) de diferentes bacterias sensibles al extracto acuoso de cuachalalate. Por el método de Kirby-Bauer.



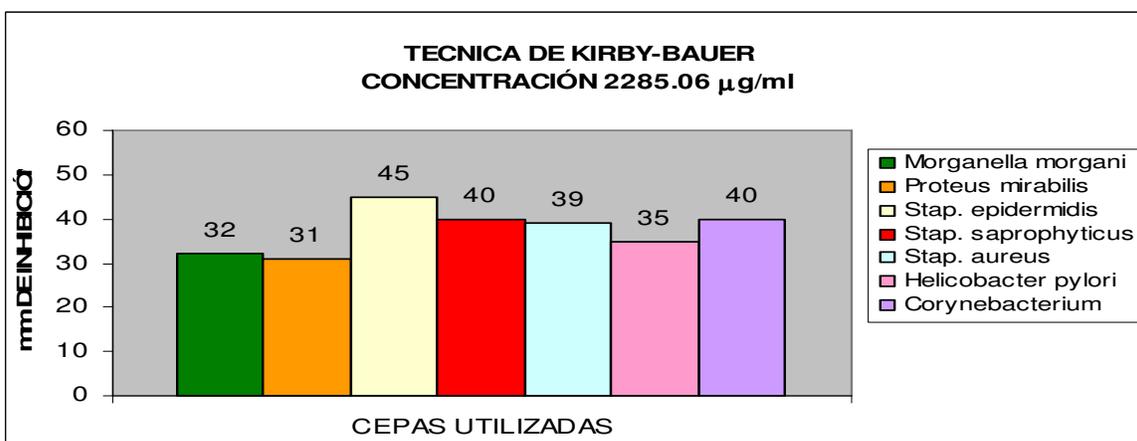
GRAFICA 2.- Resultados obtenidos con la técnica de Kirby –Bauer, en donde se puede observar de manera gráfica su comportamiento en general.

Se observa que las bacterias que presentan los mayores halos de inhibición son: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* y *Helicobacter pylori* (barras más altas, por arriba de 35 mm) que mientras que: *Proteus mirabilis* y *Morganella morgani*, tienen menores halos de inhibición (barras que miden menos de 30 mm).

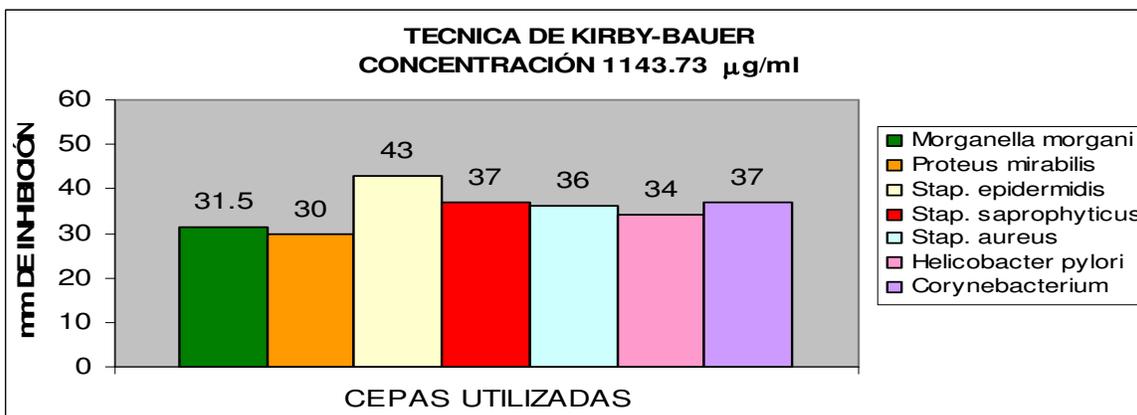
En las gráficas siguientes, se observa de manera detallada el comportamiento que tiene cada una de las bacterias utilizadas para cada concentración.



GRÁFICA 3.- Resultados obtenidos por Kirby-Bauer para la concentración del extracto de 4572.13 µg/ml

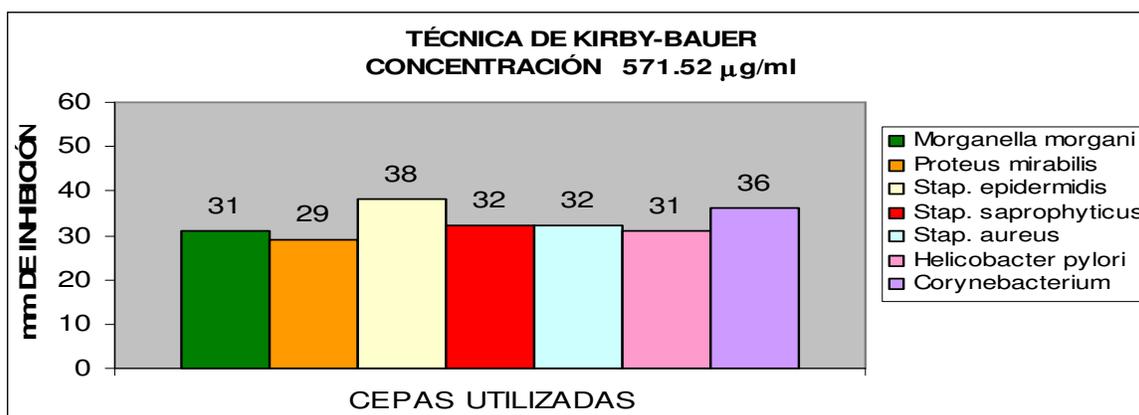


GRÁFICA 4.- Resultados obtenidos por Kirby-Bauer para la concentración del extracto de 2285.06 µg/ml

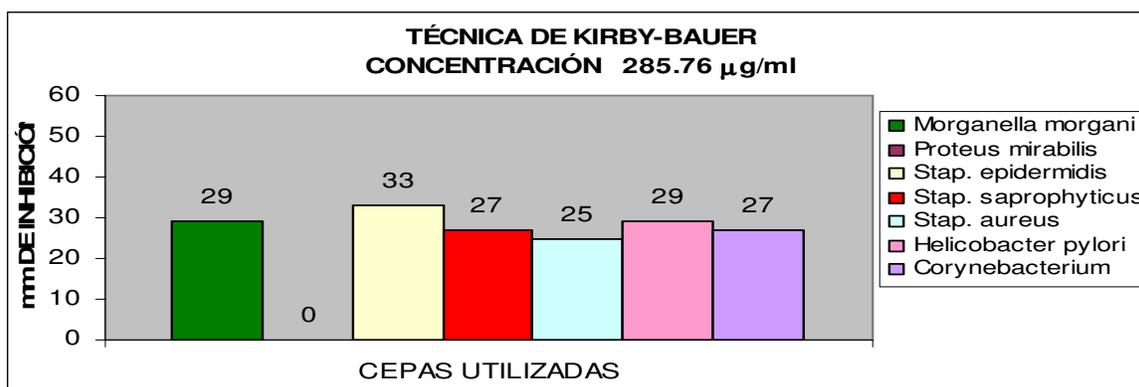


GRÁFICA 5.- Resultados obtenidos por Kirby-Bauer para la concentración del extracto de 1143.73 µg/ml

Las gráficas 3, 4 y 5 muestran cuales son las medidas de los halos de inhibición que obtuvieron las cepas al ser tratadas con el extracto acuoso de cuachalalate en concentraciones de 4572.13 $\mu\text{g/ml}$, 4572. 2285.06 $\mu\text{g/ml}$ y 1143.73 $\mu\text{g/ml}$; en donde se ve claramente que bacterias del género *Staphylococcus*, (en mayor grado *Staphylococcus epidermidis*) *Corynebacterium* y *Helicobacter pylori*, son las que más altos halos de inhibición alcanzaron, mientras que *Morganella morgani* y *Proteus mirabilis* presentan la menor inhibición.



GRÁFICA 6.- Resultados obtenidos por Kirby-Bauer para la concentración del extracto de 571.52 $\mu\text{g/ml}$



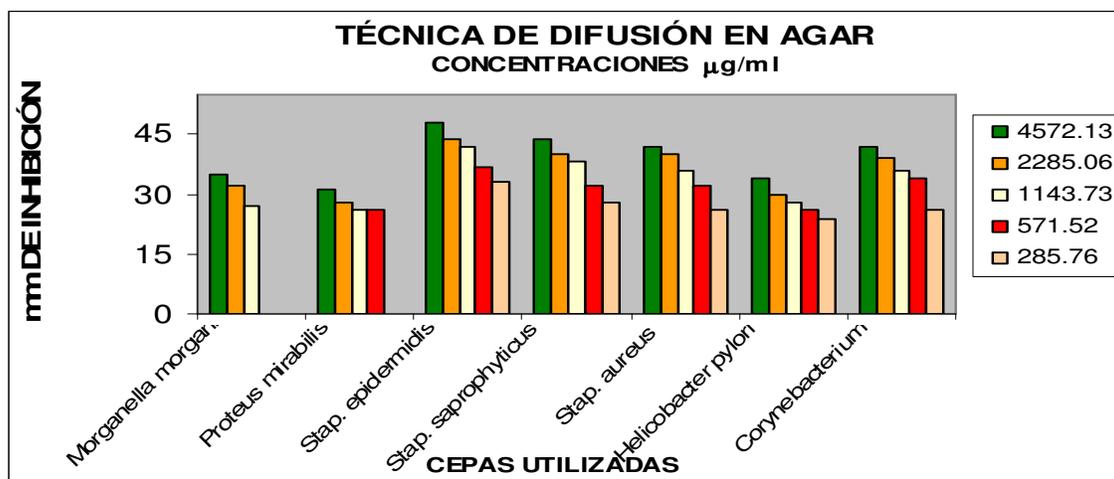
GRÁFICA 7.- Resultados obtenidos por Kirby-Bauer para la concentración del extracto de 285.76 $\mu\text{g/ml}$

En estas 2 gráficas, el comportamiento de las cepas, sigue siendo muy semejante, las únicas bacterias que tienen mayor grado de inhibición son *Staphylococcus epidermidis* y *Corynebacterium*; *Proteus mirabilis*, ya no presenta inhibición, (para la concentración de 285.76 $\mu\text{g/ml}$) creciendo alrededor del disco utilizado y las demás bacterias van disminuyendo considerablemente los milímetros de los halos de inhibición.

8.2.4.- Método de difusión en agar cilindro-placa. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad por el método de difusión en agar del extracto acuoso de cuachalalate en estudio, se muestran en la siguiente tabla, observándose por medidas los diámetros de los halos de inhibición:

RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR CILINDRO PLACA					
BACTERIAS	CONCENTRACIONES $\mu\text{g/ml}$				
	4572.13	2285.06	1143.73	571.52	285.76
<i>Morganella morgani</i>	35	32	27	00	00
<i>Proteus mirabilis</i>	31	28	26	26	00
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	48	44	42	37	33
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	44	40	38	32	28
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	40	36	32	26
<i>Helicobacter pylori</i>	34	30	28	26	24
<i>Corynebacterium</i>	42	39	36	34	26

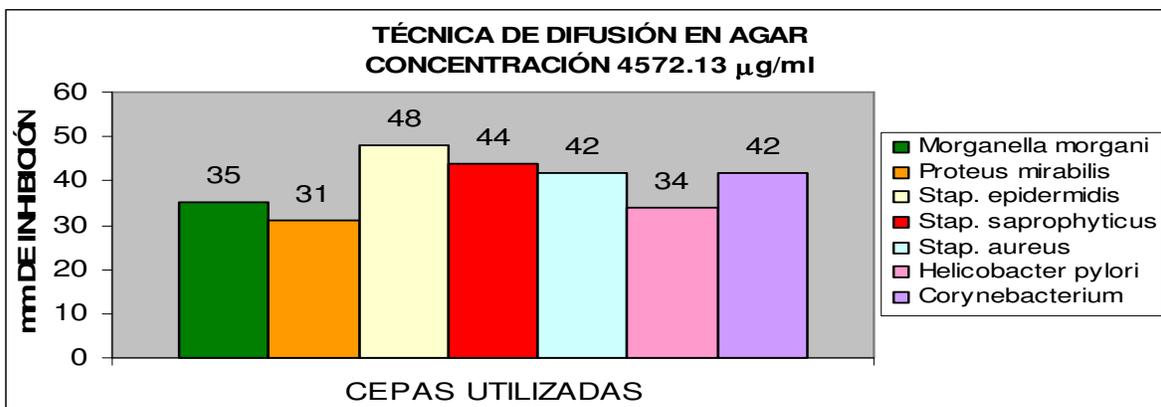
CUADRO 7.- Resultados de los halos de inhibición (en mm) de diferentes bacterias sensibles al extracto acuoso de cuachalalate. Por el método de difusión en agar cilindro-placa.



GRÁFICA 8.- Resultados obtenidos con la técnica de difusión en agar cilindro placa en donde se puede observar de manera gráfica su comportamiento en general.

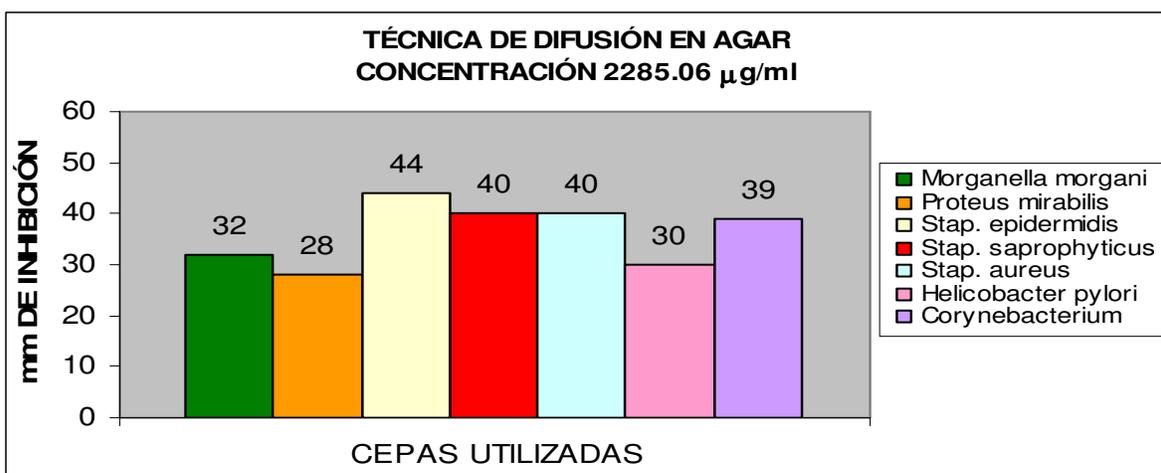
Esta gráfica muestra el comportamiento que tienen las cepas, al ser estudiadas por el método de difusión en agar, en donde se observa resultados muy similares a los obtenidos por Kirby-Bauer, ya que en esta, también el género *Staphylococcus* tiene los mayores halos de inhibición, seguido de *Corynebacterium* y *Helicobacter pylori*, mientras que *Proteus mirabilis* y *Morganella morgani*, se ven menos inhibidas por el extracto, puesto que a ciertas concentraciones hay desarrollo bacteriano (que se ve reflejado por que ya no tienen halos de inhibición alrededor del cilindro).

Estas gráficas indican de manera detallada el comportamiento que tiene cada una de las bacterias para cada concentración.



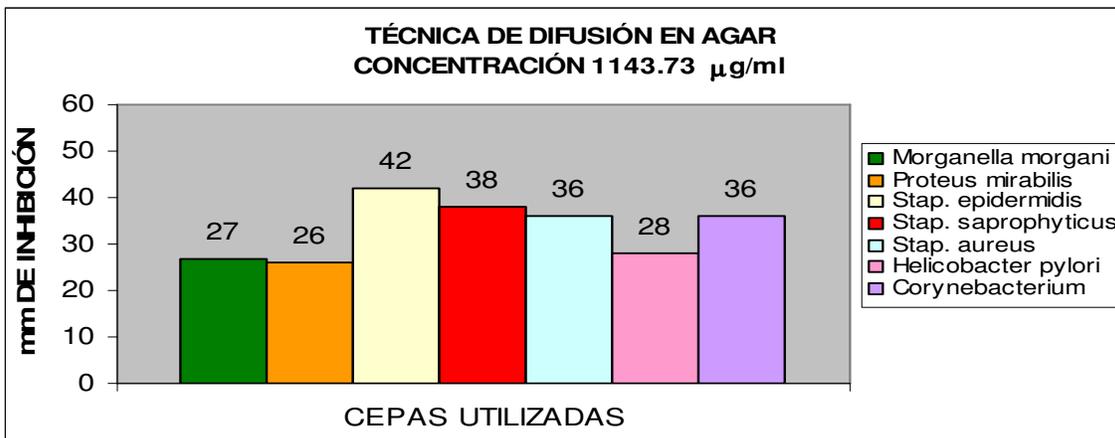
GRÁFICA 9.- Resultados obtenidos, para la concentración del extracto de 4572.13 µg/ml.

Para la técnica de difusión en agar en la concentración más alta, (4572.13 µg/ml) se observa que como en todas las pruebas antes estudiadas, el género *Staphylococcus* es el que tiene los más altos halos de inhibición (llegando a tener *Staphylococcus epidermidis* hasta 48 mm, seguido de *Staphylococcus saprophyticus* que obtuvo 44 mm).



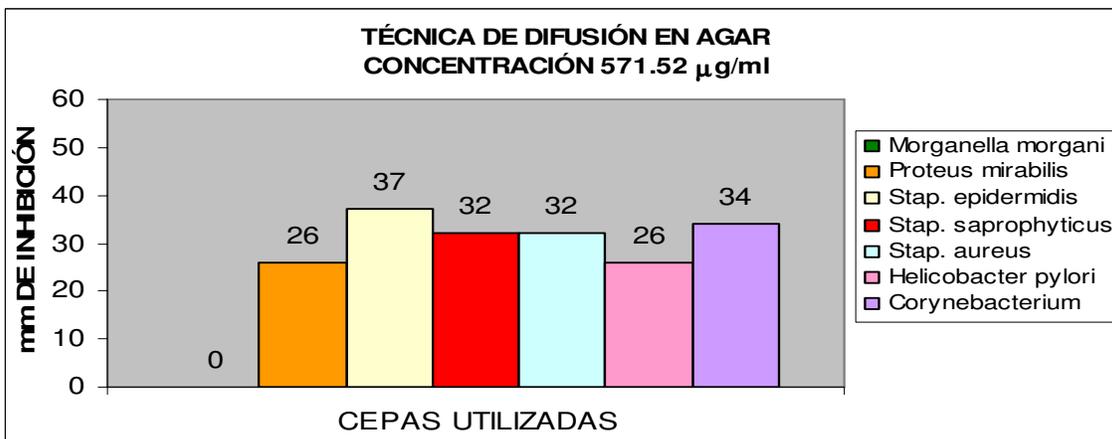
GRÁFICA 10.- Resultados obtenidos, para la concentración del extracto de 2285.06 µg/ml.

Esta gráfica muestra las mismas tendencias que la gráfica 9, ya que *Staphylococcus epidermidis* tiene los mayores halos de inhibición y *Proteus mirabilis* la mínima inhibición.



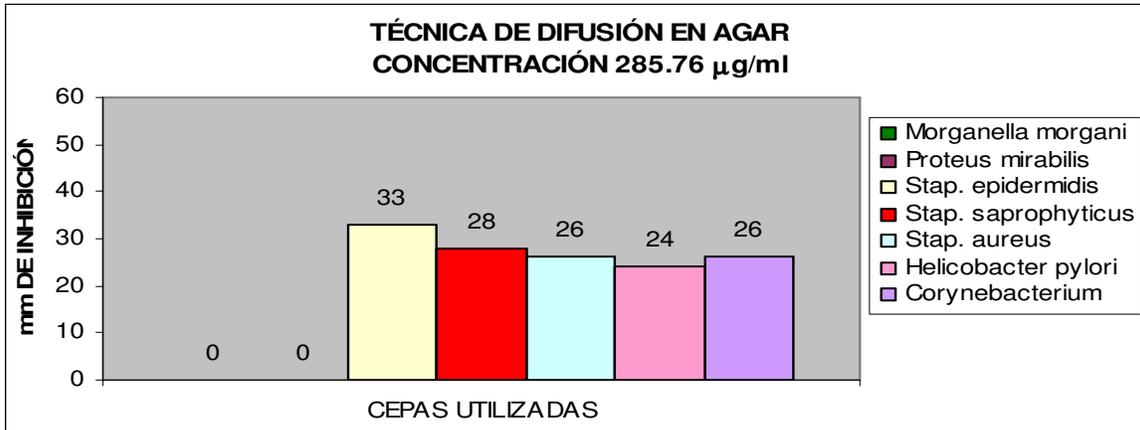
GRÁFICA 11.- Resultados obtenidos, para la concentración de 1143.73 $\mu\text{g/ml}$.

Para la concentración de 1143.73 $\mu\text{g/ml}$, las bacterias que presentan mayores milímetros de inhibición, son *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* *Corynebacterium* y *Helicobacter pylori*, mientras que *Morganella morgani* y *Proteus mirabilis*, presenta las menores inhibiciones.



GRÁFICA 12.- Resultados obtenidos por técnica de difusión en agar para la concentración del extracto de 571.52 $\mu\text{g/ml}$

Aquí se observa claramente que la bacteria *Morganella morgani*, en concentración de 571.52 $\mu\text{g/ml}$ es completamente resistente al extracto, ya que no se obtienen halos de inhibición y para las demás bacterias se obtiene los mismos comportamientos.



GRÁFICA 13.- Resultados obtenidos para la concentración de 285.76 $\mu\text{g/ml}$

En esta última gráfica muestra que, aparte de la bacteria *Morganella morgani*, la que también obtuvo resistencia a esta concentración es *Proteus mirabilis* ya que como la anterior, no tiene ningún tipo de inhibición ante el extracto, creciendo en toda la circunferencia del cilindro. También en esta, se puede observar que el género *Staphylococcus* (como en todas las pruebas antes analizadas) es el que presenta mayor inhibición, aunque las demás bacterias *Corynebacterium* y *Helicobacter pylori* también presentan inhibición.

9.- DISCUSIÓN.

La utilización de plantas medicinales en la terapéutica moderna han provocado una autentica revolución en el enfoque y la actitud, frente a enfermedades de primer orden en importancia mundial, como la gastritis, las úlceras duodenales y el cáncer de estómago (que en últimas fechas a adquirido una gran tasa de mortalidad). La implicación de *H. pylori* como agente etiológico de estas enfermedades, ha provocado que se busquen alternativas viables, que permitan ya sea, prevenir, tratar y/o aliviar estas, con o sin la ayuda de agentes antimicrobianos en el tratamiento; ya que actualmente es precisamente la utilización de estos medicamentos, la opción que se usa con mayor frecuencia (Calderón, 2001).

Para *H. pylori*, se utilizan antibióticos y antiseoretos de forma combinada. Sin embargo la eficacia del tratamiento, se ha visto reducida por diferentes factores, como por ejemplo: la recurrencia de la propia infección, la resistencia adquirida a través del tiempo a los distintos fármacos, así como también los cambios genéticos que la bacteria utiliza para seguir reproduciéndose. *H. pylori* adquiere resistencia de manera muy rápida a metronidazol (1-85%) y claritromicina (1-55%), esto de acuerdo a lo reportado por Piter, J. y col (1999) (Guerrero, 2002); este y otros fenómenos han aumentado la importancia de realizar nuevas investigaciones, con la finalidad de hallar distintas alternativas, que permitan erradicar y/o controlar la proliferación de esta y otras bacterias patógenas. Para tal caso es muy común la utilización de pruebas de susceptibilidad que nos ayuden a encontrar una combinación antibiótica eficiente, o bien al estudio (como es en este caso) de nuevos antimicrobianos eficaces.

Henriksen y col (1997) demostraron que las pruebas de resistencia dependen de la edad de las colonias utilizadas en los ensayos, siendo mayormente reproducibles los resultados cuando se utilizan colonias jóvenes (3 o 4 días), por lo tanto, en este trabajo se unificó la edad de las colonias a 3 días de incubación.

Como toda técnica, estas también tienen sus limitantes y este caso no es la excepción, ya que *H. pylori*, por ser una bacteria con características, requerimientos y condiciones especiales de crecimiento, se han estandarizado las pruebas para su estudio,

como una forma de hacer más sencilla la investigación y para hacer reproducibles los métodos (documentos que se observan en la NCCLS).

El extracto acuoso de cuachalalate, es ampliamente utilizado en repetidas investigaciones, (Fernández, 2002) ya que esta, es una planta medicinal con infinidad de propiedades farmacéuticas, por tal motivo y teniendo relación estrecha en el tratamiento para la gastritis y úlceras duodenales, se realizaron algunas pruebas que evidencian el efecto que provoca en diferentes bacterias.

Se utilizaron diferentes géneros de bacterias, (12 cepas, de las cuales el 33.33% fueron Gram positivas y el 66.67% Gram negativas) para reconocer en principio, si el extracto acuoso de cuachalalate, tiene efectos antimicrobianos y posteriormente examinar, sobre que género bacteriano tiene mayor efecto y si esto puede influir en los resultados obtenidos.

De acuerdo a los primeros resultados logrados por la técnica de dilución en agar, (prueba presuntiva) y dilución en tubo, (que nos permiten conocer cual bacteria es sensible al extracto), se observa que *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027*, *Klebsiella oxitoca*, *Streptococcus grupo D* y *Escherichia coli ATCC 25922*, no presentaron inhibición alguna, obteniendo para todos estos casos desarrollo bacteriano; estos resultados demuestran que estas bacterias son resistentes ante tales concentraciones, haciendo suponer que esta corteza afecta, sobre todo a las bacterias Gram negativas, puesto que la mayoría de las cepas que no son inhibidas por este extracto son Gram negativas.

Con las técnicas de dilución, también pudimos conocer la CMI de las bacterias que si sufrieron sensibilidad ante el extracto, obteniendo que para: *Morganella morgani* es de 285.76 µg/ml en la técnica de dilución en tubo y 571.52 µg/ml en la técnica de dilución en placa, *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus aureus ATCC 6538*, es de 571.52 µg/ml, *Staphylococcus epidermidis*, de 71.44 µg/ml, *Staphylococcus saprophyticus*, *Helicobacter pylori* de 285.76 µg/ml, y para *Corynebacterium spp* de 571.52 µg/ml (en ambas técnicas); estos resultados demuestran que las bacterias que mayormente son inhibidas por este extracto son: en primer lugar *Staphylococcus epidermidis*, seguido de *Staphylococcus*

saprophyticus, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* y *Helicobacter pylori* y las que menor sensibilidad presentan son: *Morganella morgani* y *Proteus mirabilis*.

Se observa con estos resultados, que el extracto acuoso de cuachalalate tiene gran efecto sobre el género *Staphylococcus*. (datos que son corroborados con las otras técnicas utilizadas en esta investigación); se han publicado artículos, donde se hacen investigaciones a distintas plantas utilizadas en la herbolaria mexicana, para curar enfermedades de la piel, que son excelentes antimicrobianos, en este se señala que la corteza de cuachalalate tiene gran efecto antimicrobiano sobre todo contra el género *Staphylococcus* (es *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* las bacterias que se encuentran principalmente en este tipo de infecciones) de aquí se le atribuya al cuachalalate, propiedades como cicatrizante, astringente y antiséptico (Ankli, 2002) lo que se confirma con los resultados obtenidos en esta investigación

Helicobacter pylori, también presenta inhibición ante el extracto acuoso utilizado, puesto que los resultados obtenidos, sugieren que el efecto que provoca este, tiene relación directa en la inhibición del desarrollo de esta bacteria en el tracto gastrointestinal.

Al realizar el método de Kirby-Bauer y difusión en agar, (que muestran de manera muy clara el efecto que provoca el cuachalalate en las bacterias utilizadas), podemos observar que se obtienen los mejores resultados en cuanto a las bacterias que son susceptibles al extracto, (puesto que son métodos mas cuantitativos, esto porque tanto los cilindros como los discos, tienen mayor contacto con la superficie del agar, permitiendo mayor grado de difusión) ya que *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, tienen la mayor inhibición, presentando los halos más grandes (de 48 mm, en la concentración más alta del extracto), *Corynebacterium spp* y *Helicobacter pylori* presentan también inhibición, pero en menor cantidad, sin embargo estas dos bacterias nunca llegan a ser resistentes ante las concentraciones mas diluidas del extracto, observándose para todas crecimiento bacteriano, caso contrario con *Morganella morgani* y *Proteus mirabilis* que presentan desde la primera concentración tratada, halos de inhibición menores, llegando a desaparecer en la última concentración (de 285.76 µg/ml); mostrando por lo tanto resistencia a esta.

Relacionando el hecho de que las bacterias resistentes al extracto acuoso de cuachalalate son en su mayoría Gram negativas (4 de 5) y dentro de las que si muestran inhibición, las que presentan resistencia a concentraciones más diluidas, son también de este mismo género (*Morganella morgani* y *Proteus mirabilis*) en esta investigación, este extracto, tiene mayor efecto antimicrobiano contra bacterias del género Gram positivo, ya que las bacterias que presentan mayor halos de inhibición son las del género *Staphylococcus*.

Se compararon las 4 técnicas utilizadas, para determinar la inhibición del extracto en bacterias Gram positivas, Gram negativas y *Helicobacter pylori*. Obteniendo resultados diferentes en cuanto a la inhibición, de tal forma encontramos, que para la técnica de dilución en placa, existen menos factores que intervienen en la difusión del extracto, con respecto a la técnica de cilindro placa, ya que al dejar caer 1 ml, sobre el tapiz de bacterias, esta se difunde con facilidad, originando zonas de inhibición grandes y amorfas, cuando realizamos la técnica de cilindro placa, obtuvimos resultados que nos indica que el extracto tiene menor grado de difusión, ya que el cilindro no permite que este salga tan fácilmente, por que se enfrenta a diferentes factores, como son: la dureza y el poro del agar, originando halos de inhibición bien definidos, pero de menor diámetro. Este análisis es muy importante, ya que esta investigación trata de conocer el efecto que provoca el cuachalalate en distintas bacterias, pero sobre todo a *Helicobacter pylori* y al enfrentar los resultados obtenidos por las diferentes técnicas, conocemos cuál de estas, tiene la mayor sensibilidad para conocer de manera correcta la inhibición que se obtiene para cada cepa

Respecto a la técnica de dilución en tubo, el extracto se pone en contacto directo con las bacterias, originando una inhibición que nos permitió conocer la CMI, (con un rango de concentración del 4572.12-35.71 $\mu\text{g/ml}$), que también con la técnica de dilución en agar pudimos conocer, mientras que con la técnica de cilindro-placa y Kirby-Bauer no logramos determinar la CMI, ya que usamos rangos de solo 5 diluciones del extracto (4572.12-285.75 $\mu\text{g/ml}$) que fueron escasos para determinarla; esto debido a que se debe de dejar un espacio suficiente en la colocación de los discos y cilindros para que el extracto pueda difundir de la mejor manera.

Ningún estudio consultado ha logrado detectar el efecto que tiene el cuachalalate sobre *H. pylori*, por lo tanto consideramos que este primer trabajo debe de continuar, con

técnicas más sensibles, como la de Mossman, que se fundamenta en que el colorante MTT (3- [4,5-dietiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolibromida-azul de tiazolil) ayuda a evidenciar la presencia de bacterias viables, debido a que estas producen deshidrogenasas capaces de reducir el MTT a formazan, cambiando el color amarillo a violeta y detectando este cambio por medio del espectrofotómetro (Montalvo, 2005 y Cordero-González 2005).

El problema que existe en cuanto al tratamiento que se utiliza para ayudar a curar enfermedades que son provocadas por *Helicobacter pylori*, es precisamente la resistencia que esta bacteria tiene en el estómago y que medicamentos que actualmente son utilizados, se enfrentan a esta problemática. Conocer que el extracto de cuachalalate tiene efecto inhibitorio ante *H. pylori*, da una alternativa, para que al utilizarse como agua de uso, permita al individuo infectado, combatir la enfermedad y disminuir la carga bacteriana, manteniendo así un equilibrio positivo para el paciente, ayudando a que pueda aliviarse de manera más rápida y eficaz, sin que presente reacciones adversas o de resistencia.

Al realizar un trabajo en paralelo, Vera y Gardea, sobre el efecto que tiene el extracto de cuachalalate y *Calendula officinalis* en diferentes líneas celulares, encontraron que a concentraciones elevadas, estas plantas medicinales, son tóxicas para las células, ya que inducen la formación de células espumosas, que conducen a apoptosis (o muerte celular programada), estos resultados son preliminares, ya que están en proceso de ser revisados. En relación estrecha con esto, se han publicado distintos artículos, que señalan que el extracto de cuachalalate no debe ser ingerido por largos periodos, ya que su uso en grandes dosis puede afectar la vista, (Boletín de la Academia General de Biología, 2004) por lo cual se recomienda que se debe de utilizar en ciclos de dos semanas con una semana de descanso y teniendo en cuenta que la población que usa cuachalalate para el tratamiento de la gastritis, ulcera gástrica y cáncer de estómago, desconoce la concentración diaria recomendada, podríamos intuir que existe gente que se trata con dosis que podrían ser dañinas para su salud, es por este motivo que recomendamos que también se realicen estudios farmacológicos que indiquen la dosis diaria permitida, así como también estudios de farmacocinética y farmacodinamia.

10.- CONCLUSIONES.

- Al evaluar la actividad antimicrobiana, el extracto acuoso de cuachalalate contra diferentes bacterias y *Helicobacter pylori*, se encontró que este, si presenta efectos antimicrobianos, sobre todo en cepas de: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus aureus*, ya que estas bacterias obtuvieron los halos de inhibición más grandes en las técnicas de difusión.
- El extracto de cuachalalate, entre más concentrado se encuentre, tiene mayor efecto sobre las bacterias tratadas, ya que conforme se diluye, se observa leve o ningún efecto.
- Este extracto debe ser utilizado después de haber sido elaborado, o por lo menos durante los primeros días posteriores a su elaboración, ya que conforme pasa el tiempo, va perdiendo sus propiedades, por tal motivo es que en la medicina tradicional se utiliza el mismo día en el que se prepara y se desecha el sobrante.
- El extracto acuoso de cuachalalate presenta mayor actividad inhibitoria *in vitro*, contra bacterias del género Gram positivo.
- En cada una de las pruebas de sensibilidad utilizadas, se obtuvieron similares resultados, observando así que estas son homogéneamente sensibles.
- El estudio de la actividad antimicrobiana del cuachalalate, requiere en futuros trabajos, del empleo de técnicas *in vivo*, que involucren una mayor investigación.
- En esta ocasión fue mejor la técnica de dilución en tubo, ya que nos permitió detectar la inhibición en 7 de 12 bacterias utilizadas (58.33%) conocimos la CMI y fue más fácil y rápida en su realización.

11.-ANEXOS.

BACTERIAS	MORFOLOGÍA		PRUEBAS BIOQUÍMICAS PRIMARIAS				
	Colonial	Microscópica	GRAM	OF	Catalasa	Oxidasa	Motilidad
<i>Salmonella spp</i>		Coco bacilos	-	Anaerobio facultativo	+	-	+
<i>Morganella morgani</i>		Bastones	-		+	-	
<i>Proteus mirabilis</i>		Bastones	-	Anaerobio facultativo	+	-	+++ (Swarm)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Grandes y mucoides	Bacilo rectos o curvados	-	Aerobio/No fermentativo	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pequeñas sin hemólisis	Cocos en pares, tetradas o racimos	+	Anaerobio facultativo	+	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		Cocos en pares, tetradas o racimos	+	Anaerobio facultativo	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Blancas-gris, hemólisis □	Cocos en pares, tetradas o racimos	+	Anaerobio facultativo	+	-	-
<i>Klebsiella oxitoca</i>	Grandes, mucosas, pegajosas	Bastones encapsulados	-		+	-	-
<i>Streptococcus Grupo. D</i>		Cadenas o cocos (capsulados)	+	Anaerobio facultativo	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>		Bacilo	-	Anaerobio facultativo	+	-	-
<i>Helicobacter pylori</i>	pequeñas, translúcidas brillantes, elevación convexa y borde entero	Helicoidal de S, V o bastón curvado	-	Anaerobio estricto	+	+	En gota suspendida +
<i>Corynebacterium spp</i>	Negras en agar telurito	Bastón en forma de V o L (Caracteres chinos)	-	Anaerobio facultativo	+		-

ANEXO 1.- Pruebas bioquímicas primarias, morfología colonial y microscópica, realizadas a cada bacteria utilizada

BACTERIAS	Lactosa	Urea	Indol	Citra	Coagu- lasa	Glucosa	MR / VP	NO ₃	S ₂ H	TSI
<i>Salmonella</i> <i>spp</i>	-	-	+	+		+	+/-	+	+	+
<i>Morganella</i> <i>morgani</i>		+	+	+		+		+	-	
<i>Proteus</i> <i>mirabilis</i>	-	+	-			+	+/-	+	+	Ác/Á c
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	-	-	-			-	-/-	+	-	Alc/a lc
<i>Stap.</i> <i>epidermidis</i>					-	+	+	+	-	
<i>Stap.</i> <i>saprophyticus</i>					-	+		+		
<i>Stap. aureus</i>	+				+	+	-/+	+	+	
<i>Klebsiella</i> <i>oxitoca</i>	+	+	+	+		+	-/+	+		
<i>Streptococcus</i> <i>Grupo D</i>					-			-		
<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	+	-	+	-		+	+/-	+	-	Ác/Á c
<i>Helicobacter</i> <i>pylori</i>		+++	-			+		+	-	
<i>Corynebacteri</i> <i>um spp</i>						+	+/-	+		

ANEXO 2.- Pruebas bioquímicas primarias y secundarias, realizadas a cada bacteria utilizada

NOTA.- Para la cepa de *Helicobacter pylori* por ser esta una bacteria con características específicas se dejó 5 días a incubación a 37°C en condiciones microaerófilas en un medio rico (agar sangre al 5%) y se hizo su identificación por morfología colonial y mediante las pruebas bioquímicas.

12.- BIBLIOGRAFÍA.

1. Álvarez JR., Enciclopedia de México. USA.1998.
2. Ankli A., Heinrich M., Bork P., Wolfram L., Bauerfeind, et al, "Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses", The Journal of Ethnopharm, 2002; 79(1):43-52.
3. Arnold R and Quina, M., "Peptic ulcer pathogenesis", Current Opinion in Gastroenterology, 1996: 12: 24-27.
4. Barton H and Seoane E., "The constitution and stereochemistry of masticadienónico acid", J. of Chemistry Society, 1956, 801:4150-60.
5. Betancourt Y., "1000 Plantas medicinales y aromáticas de México", Jardín Botánico de Tlaxcala, 2001.
6. Blazer MJ., "Hypotheses an the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation", Gastroenterology, 1992; 102:720-727.
7. Calderón Vargas, Blanca, E., "Estudio de la susceptibilidad antimicrobiana que presentan bacterias de importancia clínica ante una serie de 4-R-fenilcarbamatos de metilo", Tesis Profesional Q.F.B., FES-Cuautitlan, 2001, UNAM.
8. Cordero Sevilla, Angélica y González Morales, Anel G, "Reto microbiológico de extractos de *Calendula officinalis* con bacterias aisladas en casos de metritis y mastitis bovina", Tesis Profesional Q.F.B. FES- Cuautitlan, 2005, UNAM.
9. Covacci A, Ghiara P., "*Helicobacter pylori*: Pathogenesis and feasibility of vaccine development", Molecular and clinical aspects of bacterial vaccine development, 1995; 1:323-334.
10. Cover TL and Blaser MJ., "Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*", The Journal of Biological Chemistry, 1992; 267:10570-10575.
11. Cover TL., Cao P., Lind CD., Tham KT., Baser MJ., "Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates *in vitro* and *in vivo*", Infect Immun, 1993; 61:5008-5016.

12. Cover TL., Tummury MR., Cao P., Thompson SA. and Blaser MJ., "Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains", J. Biol. Chem., 1994; 269: 10566-10573.
13. Drouet EM., Monrelos HP., Andujar M., Boude M., Grimaud JA., Denoyel GA., "Partial characterization of an external polysaccharide of *Helicobacter pylori* by using and immunoglobulin M monoclonal antibody", Infect. Immun., 1993; 61:2732-2736.
14. Drumm B., "*Helicobacter pylori*", Archives of disease in childhood, 1990; 65:1278-1282.
15. Fernández RJ., "Valoración del efecto cicatrizante de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en lesiones cutáneas de rata Wistar", Tesis Profesional Q.F.B., FES- Zaragoza- Departamento de Farmacia de Facultad de Química, 2002, UNAM.
16. Figura N., Bugnoli M., Cusi MG, et al. "Pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori*: production of cytotoxin. In: Malfertheiner P. Ditschuneit H, eds. *Helicobacter pylori*", Gastritis and Peptic Ulcer. Berlin: Springer-Verlag, 1990:86-95.
17. Fukuda T., Kimura S., Arakawa T., Koboyashi, K., "Possible role of leukotenes in gastritis associated with *Campylobacter pylori*", J. Clin Gastroenterology, 1990; 12:131-134.
18. García Alcántara, Ángel, "Evaluación de la posible actividad antimicrobiana de un compuesto obtenido sintéticamente", Tesis Profesional Q.F.B. FES-Cuautitlan, 2005, UNAM.
19. Guerrero Olea, "Determinación de la concentración mínima inhibitoria de nuevos derivados del ácido carbámico contra *Helicobacter pylori*", Tesis Profesional Q.F.B. FES-Cuautitlan, 2002, UNAM.
20. Goodman-Gilman A., "Las bases farmacológicas de la terapéutica", Ed. Panamericana; 6a Ed. México, 1990; 150-170.
21. Goodwin CS and Armstrong J., "Microbiological aspects of *Helicobacter pylori*", Clin. Microbiol. Infec. Dis, 1990; 9:1-13.
22. Goossens H., Lupezynski Y., Burette A., Lambert JP., Vlaes L. and Butzler JP., "Role of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of duodenal and gastric ulcer", Med. Microbiol. Lett, 1992; 1:153-159.

23. Hov-Ac Chen JJ., "An epidemiological Survey on *Helicobacter pylori* infection on children", 1995; 16:237-239.
24. Hopkins R., Vial A., Pablo, et al., "Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: Vegetables May serve as one route of transmission", The Journal of Infectious Diseases, 1993; 168: 222-226.
25. Jawetz Melnick y Adelberg, Microbiología Médica, 15ª Ed., 1996:279-281.
26. Jiménez Aguilar MB., "Estudio de la capacidad apoptótica del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) evaluada con el ensayo cometa (electroforesis unicelular en gel)", Tesis Profesional Q.F.B. FES-Cuautitlan, 2004, UNAM.
27. Jiménez Ramírez, C., "Seroprevalencia de *Helicobacter pylori* en la Republica Mexicana en población de diferentes edades y nivel socioeconómico", Tesis Profesional Q.F.B. FES-Zaragoza, 1996, UNAM.
28. Macchia G., Massone A., Burroni D., Covacci A., Censini S. and Rappuoli, R., "The hps 60 protein of *Helicobacter pylori*: Structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases", Mol. Microbiol., 1993; 9:645-652.
29. Marshall BJ., Armstrong JA., Mc Geachie DB., Glaanog RJ., "Attempt to fulfill Koch's postulate for *Campylobacter pylori*", Med. J. Aust., 1985; 142: 436-439.
30. Marshall J., Warren J., "Unidentified curved bacilli in the stomach of patient's with gastritis and peptic ulceration", Lancet., 1984; 1: 1311-1315.
31. Martínez M., "Catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas", Fondo de cultura económica, 1991, México.
32. Martínez R y Flores G, "Estudio de la acción Anticlastogénica del Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre la inducción de micronúcleos producidos por ifosfamida", Tesis Profesional, Q.F.B., FES-Cuautitlan, 2003, UNAM.
33. Mata R., "Chemical studies and biological aspects of some Mexican plants used in traditional medicine", Recent advances in Phytochemistry, Phytochemical potential of tropical plants, 1993:27: 41-64.

34. Mc Nulty C and Watson M., "Spiral bacteria of the gastric antrum", *Lancet.*, 1984;1:1068-1069.
35. Mezquita M., "Control de calidad y formulación de tabletas de *Tanacetum parthenium* por compresión directa", Tesis de Maestría, Facultad de Química, 2000, UNAM.
36. Monés J., Sainz S y Sancho, F.J., "*Helicobacter pylori* en patología digestiva", *Medicina Integral*; 1994: 8: 435-447.
37. Montalvo P.; "Efecto inhibitorio de extracto de *caléndula officinalis* en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina, de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo", Tesis Profesional Q.F.B. FES Cuautitlan, 2005, UNAM.
38. Moran AP and Wadstroin T., "Bacterial pathogenic factors", *The year in Helicobacter pylori*, 1994:17-19.
39. Murray PR and Berron EJ., "Manual of clinical microbiology", 6^{ta} Edic. 1994:492-496.
40. Navarrete A., "Estudio Químico y pruebas farmacológicas preliminares de la corteza de *Julianea adstringens* (cuachalalate)", Tesis Profesional. Q.F.B., ENEP Zaragoza, 1982, UNAM.
41. Navarrete A., Mata R and Delgado G., "Alkylsuccinic acids from *Amphipterygium adstringens*", *Plant Medical.*, 1989; 55: 579.
42. Navarrete A., Reyes B., Silva A., Sixtos C., Islas P y Estrada E., "Evaluación farmacológica de la actividad antiúlceroza de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate)", *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 1990; 21: 28-32.
43. Navarrete A., Martínez L., Reyes B., "Gastroprotective Activity of the Stem Bark of *Amphipterygium adstringens* in rats", *Phytotherapy Research*, 1998; 12: 1-4.
44. Noach LA., Rolf T and Tytgat J., "Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa". *Clin Pathol.*, 1994; 47:699-704.
45. Nomura A., Stemmermann Grant N., et al., "*Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration", *Annals of Internal Medicine*, 1994; 120:977-981.

46. Olbe L and Malfertheiner P., "Gastric Pathophysiology-emphasis on acid secretion and gastrointestinal motility", *Current Opinion in Gastroenterology*, 1980; 1: 352-361.
47. Ojeda Herrera, RM., "Comparación del efecto citotóxico de sobrenadantes de cepas de *Helicobacter pylori*, aisladas de niños y adultos sobre células Hela", tesis profesional, Q.F.B., FES-Zaragoza, 1998, UNAM.
48. Owen RJ., "Bacteriology of *Helicobacter pylori*", *Bailliere's clinical gastroenterology*, 1995; 9: 415-430.
49. Owen RJ, Hurtado A, Banatvala N, et al. "Conservation of the cytotoxin-associated (cagA) gene of *Helicobacter pylori* and investigation of association with vacuolating-cytotoxin activity and gastroduodenal disease", *FEMS Immunol. Med. Microb.*, 1994; 9:307-316.
50. Pérez R, Pérez M., "A new triterpenoid from the bark of *Juliana Adstringens*". *International J. of Pharmacognosy*, 1993; 31: 185-188.
51. Phadnis SH., Ulver D., Jarzon L., et al., "Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*", *Infection and immunity*. 1994; 62:1557-1565.
52. Plantas que curan, *Enciclopedia de las plantas que curan*, Edit. Planeta, 2000, 855.
53. Quintanar D., Ávila J., Arroyo G., "Estudio de las propiedades fotoprotectoras-cosméticas del extracto de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate)", *Ciencia cosmética*, 1994; 1:16-17.
54. Riouy KP., Hogaboam CM., Wallace JL., "Gastric mucosal injury: interactions of mast cell, cytokines and nitricoxide. In *Helicobacter pylori* basic mechanisms to clinical cure", Klower Academic Publishers, 1994:188-197.
55. Sahm DF., "Current concepts and approaches to antimicrobial agent susceptibility testing", *J. American Society for Microbiology*, Washington D.C, 1988; 310-312.
56. Shisheido Co., LTD., "The hyaluronic acid promoter contains solvent extract of Cuachalalate. *Julianaia adstringens*", *Japón. Patent*. 1998; JP-0027762 19980126.
57. Solano-Méndez MV., "Efecto Antimicrobiano de los Extractos Metanólicos de *Aristolochia grandiflora* y *Aristolochia littoralis*", Tesis Profesional Q.F.B. FES- Cuautitlan, 1995, UNAM.

58. Stryer Lumbert, "Bioquímica", 3a Ed. Reverté, S.A.; Tomo 2; España 1990; 739-740.
59. Toshiaki Kamimura MY., "In vitro and in vivo Antibacterial Activities of FR-31564.A new fosfonic Acid Antibiotic". The Journal of Antibiotic, 1980; 33:1:36-43.
60. Tsuru T, Tshimi K, Kusama K, "Hair tonic agent contg. Extract of *Juliana plants*". Japan Patent, 1993, JP080792 18131392.
61. Watson W, Domínguez X, Vázquez G, García S., "Cuachalalic acid a new triterpene from *Amphipterygium adstringens*", Revista Latinoamericana de Química, 1987; 18:89-90.
62. Zamora AM., "Manejo Terapéutico en pacientes con Enfermedades gastrointestinales producidas por *Helicobacter pylori*", Tesis Profesional Q.F.B. FES- Cuautitlan, 2003, UNAM.
63. Zamudio Lara, LA., "Estudio hemero-bibliográfico del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en forma de fitofármaco", Tesis profesional, Q.F.B. FES- Cuautitlan, 2005, UNAM.

PÁGINAS WEB CONSULTADAS.

- www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/amphipterygium_adstringens.htm.
- www.latinmerchant.com/productcategory.
- www.hpylori.com.au.
- www.nobelprize.org/medicine/laureates/2005/press.html.
- www.fitoterapia.org.
- www.herbolaria.com.
- www.sdnpu.org.
- www.cib.uaem.mx/agebiol/bol_junio_julio2004.html.

Boletín de la Academia General de Biología. Cuernavaca Morelos N° 10 y 11, Junio-Julio 2004.