



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio del efecto anti-*Helicobacter pylori* del extracto acuoso de
Artemisia ludoviciana subsp. *mexicana*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ARELI CORTÉS ALENCASER



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Adriana Guadalupe Mejía Chávez

VOCAL: Profesor: José Fausto Rivero Cruz

SECRETARIO: Profesor: Juan Francisco Palacios Espinosa

1er. SUPLENTE: Profesor: Martha Giles Gómez

2° SUPLENTE: Profesor: Mabel Clara Fragoso Serrano

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 2, EDIFICIO D, PRIMER PISO, DEPTO. DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

AV. UNIVERSIDAD No. 3000, COL. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, C.U., DEL. COYOACÁN, MÉXICO, D.F.

ASESOR DEL TEMA: DR. JUAN FRANCISCO PALACIOS ESPINOSA

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

SUSTENTANTE: ARELI CORTÉS ALENCASER

DEDICATORIA

A mis padres Francisca y Javier:

Mami muchas gracias por estar siempre a mi lado y comprenderme en cada momento. Le agradezco que siempre me haya dejado tomar mis propias decisiones y apoyarme en ellas, por hacerme ver mis errores y aprender de ellos, por guiarme para llegar a ser lo que soy, por enseñarme a disfrutar y amar lo que hago. La vida me ha regalado la dicha de tenerla como madre y como ejemplo de lucha, paciencia y entrega.

Papi gracias por protegerme, impulsarme a lograr mis metas, por compartir conocimientos, experiencias y actitudes que uno debe tomar ante la vida, por su fortaleza y dedicación en todo momento. Doy gracias por tener un padre ejemplar.

Gracias papás por dedicar su vida al bienestar de mis hermanos y mio, por luchar día a día, incansablemente, por darnos las herramientas para construir nuestro futuro. Son ejemplo de perseverancia y grandeza. Los amo.

A mis hermanos: Madai, Javier y Francisco, gracias por todos los momentos de alegrías y enfado que hemos pasado juntos. Porque ustedes son mi inspiración, el motivo por el cual no desisto y continúo adelante.

A mi segunda mami Conchita, gracias por cuidarnos, educarnos y consentirnos, siempre viviré agradecida con usted.

A toda mi familia por creer en mí, apoyarme en todo momento y desearme lo mejor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México que mediante la Facultad de Química me brindó la oportunidad de formarme como profesionista y como persona, gracias a mi segunda casa por todas las experiencias vividas y gratos recuerdos que me acompañarán por siempre.

Al Dr. Juan Francisco Palacios Espinosa por su paciencia, confianza, orientación y comprensión en la elaboración de esta tesis. Gracias por todo el tiempo compartido, por tus consejos, tus enseñanzas, por tus consejos y esa actitud de seguir adelante con esfuerzo y dedicación. Te agradezco que mas allá de haber sido mi asesor, me hayas brindado la oportunidad de ganar un amigo en el que se puede confiar incondicionalmente, el que escucha y guía con base en las experiencias vividas.

A la Dra. Irma Romero Álvarez por haberme permitido realizar este proyecto en su laboratorio, formar parte de su equipo de trabajo e incorporarme a la convivencia grupal, gracias por su paciencia y supervisión a lo largo de mi estancia.

A la Profra. Adriana Guadalupe Mejía Chávez y al Dr. José Fausto Rivero Cruz por el tiempo, observaciones y valiosos comentarios en la revisión de este trabajo.

Este trabajo recibió financiamiento de PAPIT-DGAPA (UNAM).

A mis amigos de laboratorio con los cuales compartí grandes experiencias, Jazmín, Joel, Evelyn, Oscar, gracias por levantar mis ánimos, por sonreír conmigo, escucharme, aconsejarme y ayudarme, por compartir su tiempo conmigo y hacer de mi estancia en el laboratorio algo agradable.

A mi amiga Paloma Montero, gracias por compartir conmigo tu tiempo, tus alegrías, triunfos y fracasos. Te agradezco infinitamente todo el apoyo que me haz

brindado, por levantarme en los momentos más difíciles, por comprender mis ausencias y estar incondicionalmente junto a mí.

A mis amigos de la Facultad de Química: Guillermo García, gracias por ser un gran amigo y apoyo en mi estancia en la facultad; Julio César Ramírez por tu sinceridad y ayuda, Mayari Pérez y José Molina por todos los momentos tan agradables que hemos pasado juntos, por esas salidas que me dejan grandes experiencias y gratos recuerdos.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | 1 |
| Cuadros | 3 |
| Figuras | 3 |
| Diagrama | 3 |
| Resumen | 4 |
| | |
| 1. MARCO TEÓRICO | 5 |
| 1.1. <i>Helicobacter pylori</i> | 5 |
| 1.1.1. Antecedentes históricos | 5 |
| 1.1.2. Taxonomía | 6 |
| 1.1.3. Morfología | 6 |
| 1.1.4. Hábitat | 7 |
| 1.1.5. Especies del género <i>Helicobacter</i> patógenas para el hombre | 8 |
| 1.1.6. Modos de transmisión y reservorios | 10 |
| 1.1.7. Factores de virulencia y patogenicidad | 11 |
| 1.2. Patologías asociadas con la presencia de <i>H. pylori</i> | 17 |
| 1.2.1. Gastritis aguda | 17 |
| 1.2.2. Gastritis crónica activa | 19 |
| 1.2.3. Úlcera péptica | 19 |
| 1.2.4. Cáncer gástrico | 21 |
| 1.3. Métodos de diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i> | 22 |
| 1.4. Esquemas de erradicación | 25 |
| 1.5. Susceptibilidad y resistencia a antibióticos | 28 |
| 1.6. Epidemiología: prevalencia y distribución geográfica | 29 |
| 1.7. <i>H. pylori</i> en México | 30 |
| 1.8. Plantas medicinales empleadas en la medicina tradicional mexicana con actividad anti <i>H. pylori</i> | 31 |
| 1.9. Generalidades de <i>Artemisia ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> (Willd. | |

| | |
|--|----|
| ex Spreng.) D.D. Keck. | 34 |
| 1.9.1. Sinonimia popular | 36 |
| 1.9.2. Sinonimia botánica | 37 |
| 1.9.3. Etnobotánica | 38 |
| 1.9.4. Aspectos químicos | 39 |
| 1.9.5. Actividad biológica | 46 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 50 |
| 3. OBJETIVOS | 52 |
| 3.1. Generales | 52 |
| 3.2. Particulares | 52 |
| 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL | 53 |
| 4.1. Material vegetal | 53 |
| 4.2. Preparación y fraccionamiento primario del extracto acuoso de <i>A. ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> | 53 |
| 4.3. Fraccionamiento, aislamiento y caracterización de la Estafiatina | 54 |
| 4.4. Ensayos biológicos | 55 |
| 4.4.1. Evaluación del efecto anti- <i>H. pylori</i> <i>in vitro</i> del extracto acuoso íntegro, fracciones y producto puro | 55 |
| 4.4.1.1. Condiciones de cultivo y crecimiento de <i>H. pylori</i> | 55 |
| 4.4.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) | 56 |
| 4.4.3. Animales de experimentación | 57 |
| 4.4.4. Determinación de la toxicidad de ALI mediante los criterios de Lorke | 58 |
| 4.4.5. Evaluación de la actividad gastroprotectora de ALI | 58 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 60 |
| 5.1. Análisis del extracto acuoso íntegro | 60 |
| 5.1.1. Determinación de la actividad anti- <i>H. pylori</i> de ALI y fracciones primarias | 60 |
| 5.1.2. Aislamiento biodirigido por la actividad anti- <i>H. pylori</i> del compuesto Estafiatina | 63 |
| 5.2. Determinación de la toxicidad aguda de ALI | 68 |

| | |
|--|----|
| 5.3. Detección de la actividad gastroprotectora de ALI | 69 |
| 6. CONCLUSIONES | 72 |
| 7. PERSPECTIVAS | 74 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 75 |

Abreviaturas

| Abreviatura | Significado | Del inglés |
|-------------------------|---|---|
| A₆₀₀ | Absorbencia a una longitud de 600nm | |
| AcOEt | Acetato de etilo | |
| AGS | Línea celular de adenocarcinoma gástrico en humanos | Human Adenocarcinoma Gastric cell line |
| AINES | Antiinflamatorios no esteroideos | |
| ALI | Extracto Acuoso Íntegro de <i>A. ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> | |
| ALI 1-VIII | Reunión VIII obtenida del fraccionamiento secundario de ALI-1 | |
| ALI-1 | Fracción primaria diclorometánica | |
| ALI-2 | Fracción primaria de Acetato de etilo | |
| ALI-3 | Fracción primaria de n- Butanol | |
| ALI-4 | Fracción primaria Acuosa residual | |
| Cag A | Proteína asociada al gen <i>cagA</i> | |
| cag PAI | Isla de patogenicidad <i>cag</i> | |
| CAR | Carbenoxolona | |
| CCF | Cromatografía en Capa Fina | |
| CCL20 | Quimiocinas CC de tipo 20 | Chemokine (CC-modif) Ligand 20 |
| CDCl₃ | Cloroformo deuterado | |
| CLSI | Instituto de estándares clínicos y laboratorio | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CMI | Concentración Mínima Inhibitoria | |
| CMPH | Consenso Mexicano sobre <i>Helicobacter pylori</i> | |
| CONABIO | Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad | |
| DCM | Diclorometano | |
| DhL | Dehidroleucodina | |
| DL₅₀ | Dosis Letal Media | |
| DMSO | Dimetil sulfóxido | |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico | |
| GSH | Glutation | |
| Hex | Hexano | |
| HpSA | Antígeno de <i>H. pylori</i> en heces | <i>H. pylori</i> antigen in stool |
| IARC | Agencia Internacional de Investigación del Cáncer | International Agency for Research on Cancer |
| IBP | Inhibidores de la Bomba de Protones | |
| ICSP | Comité Internacional de Sistemática Procariótica | International Committee on Systematics of Prokaryotes |
| Ig A | Inmunoglobulina A | |

| Abreviatura | Significado | Del inglés |
|---------------------------|---|------------------------------------|
| Ig G | Inmunoglobulina G | |
| Ig M | Inmunoglobulina M (opsonizante) | |
| IL-8 | Interleucina 8 | |
| IU | Índice de Úlcera | |
| L-NAME | Éster Metílico de L-Nitroarginina | L-Nitroarginine Methyl Ester |
| MALT | Tejido Linfoide Asociado a Mucosa | Mucosa- associated lymphoid tissue |
| MeOH | Metanol | |
| MEXU | Herbario Nacional de México (MEXU, según el acrónimo establecido en el Índice Internacional de Herbarios) | |
| MH | Mueller- Hinton Agar | |
| NF-κB | Factor nuclear Kappa B | Nuclear Factor-kappa B |
| NIH | Instituto Nacional de Salud | National Institutes of Health |
| NOM | Norma Oficial Mexicana | |
| OMS | Organización Mundial de la Salud | |
| p.o. | Vía oral | |
| PBPs | Proteína de unión a penicilinas | Penicillin-Binding Protein |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa | Polymerase Chain Reaction |
| PMEs | Proteínas de membrana externa | |
| RMN-¹³C | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 | |
| RMN-¹H | Resonancia Magnética Nuclear de Protón | |
| RNAr | Ácido Ribonucléico ribosomal | |
| rpm | Revoluciones por minuto | |
| SIIT | Sistema Integrado de Información Taxonómica | |
| SSI | Solución Salina Isotónica | |
| subsp. | Subespecie | |
| TMS | Tetrametilsilano | |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral alfa | Tumor Necrosis Factor-alpha |
| UBT | Prueba de aliento con urea | Urea Breath Test |
| UFC | Unidades Formadoras de Colonias | |
| UNAM | Universidad Nacional Autónoma de México | |
| Vac A | Citotoxina vacuolizante A | |
| VEH | Vehículo | |
| λ | Longitud de onda | |

Cuadros

| Cuadro | Título |
|--------|--|
| 1a | Especies patógenas gástricas del género <i>Helicobacter</i> . |
| 1b | Especies patógenas enterohepáticas del género <i>Helicobacter</i> . |
| 2 | Pruebas para la detección de la infección por <i>H. pylori</i> . |
| 3 | Pruebas bioquímicas básicas y análisis microscópico de <i>H. pylori</i> . |
| 4 | Medicamentos eficaces en la erradicación de <i>H. pylori</i> . |
| 5 | Compuestos aislados de <i>A. ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> . |
| 6 | Efecto sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i> del extracto acuoso y fracciones primarias, y su comparación con los antibióticos de referencia. |
| 7 | Reuniones obtenidas del fraccionamiento secundario de ALI- 1. |
| 8 | Toxicidad aguda del extracto acuoso íntegro. |

Figuras

| Fig. | Título |
|------|---|
| 1 | Micrografía electrónica de <i>H. pylori</i> . |
| 2 | Factores de colonización de la bacteria <i>H. pylori</i> . |
| 3 | Actividad de ureasa de <i>H. pylori</i> . |
| 4 | Principales factores de virulencia y colonización de <i>H. pylori</i> . |
| 5 | Patogénesis de la infección por <i>H. pylori</i> . |
| 6 | Representación de la estructura gástrica. |
| 7 | Glándulas gástricas colonizadas con <i>H. pylori</i> . |
| 8 | Estructura química de los principales antibióticos utilizados en las terapias de erradicación de <i>H. pylori</i> . |
| 9 | Análisis de la distribución de proporciones de mortalidad de cáncer gástrico y la seroprevalencia de <i>H. pylori</i> en la República Mexicana. |
| 10 | Ejemplares de la especie <i>Artemisia ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> |
| 11 | Distribución geográfica de la especie medicinal <i>Artemisia ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> . |
| 12 | Perfil cromatográfico de ALI y sus fracciones primarias (ALI 1-4). |
| 13 | Efecto de ALI y sus fracciones primarias (ALI 1-4) sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i> . Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). |
| 14 | Muestra del compuesto aislado (Estafiatina) obtenido de la fracción secundaria VIII. |
| 15 | Espectros correspondientes de RMN ¹ H y ¹³ C correspondientes a la Estafiatina. |
| 16 | Efecto gastroprotector del extracto acuoso (ALI) de <i>A. ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> . |

Diagrama

| Fig. | Título |
|------|---|
| 1 | Fraccionamiento de ALI para la obtención de la Estafiatina. |

RESUMEN

Debido al importante papel patogénico que recientemente se le ha dado a *Helicobacter pylori* en el desarrollo de enfermedades gastrointestinales, tales como la gastritis y el cáncer gástrico, así como los resultados en la práctica clínica debida a los problemas que representan el uso de fármacos para combatir la infección por esta bacteria; han hecho necesaria la búsqueda de nuevas terapias que permitan el tratamiento de la infección y las enfermedades relacionadas de una manera integral. Una de las fuentes más importantes de metabolitos activos son las plantas medicinales, recurso que ha sido utilizado desde tiempos inmemoriales y nuestro país no ha sido la excepción.

En nuestro grupo de trabajo se realizó el análisis de 53 plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de desórdenes intestinales con la finalidad de encontrar nuevas opciones que coadyuven a la erradicación de *H. pylori*. En esa ocasión se encontró que varios extractos, entre ellos el acuoso de *A. ludoviciana* subsp. *Mexicana*, presentaban actividad importante contra el crecimiento de la bacteria.

Debido a que la infusión es una de las formas más populares que se le da a esta especie en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales además de su efecto anti-*H. pylori* demostrado, se dispuso realizar estudios toxicológicos, farmacológicos y químicos del extracto acuoso de la planta.

La presente disertación describe los resultados obtenidos del estudio para establecer el potencial anti-*H. pylori* de la infusión de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* (**ALI**) así como de su fraccionamiento biodirigido. De igual forma, el aislamiento y evaluación del producto puro estafiatina (**10**). Adicionalmente, se estudiaron los efectos tóxicos agudos utilizando el modelo de Lorke (1983) y finalmente se evaluó, de manera preliminar, su posible actividad gastroprotectora en animales de laboratorio siguiendo el protocolo de Bucciarelli (2009).

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Helicobacter pylori*.

1.1.1. Antecedentes históricos.

De los primeros reportes conocidos sobre microorganismos en la mucosa gástrica se encuentra el realizado en 1893 por Giulio Bizzozero, quien mediante observaciones anatómicas de la mucosa gástrica de perros, demostró que bacterias Gram negativas habitaban en las glándulas gástricas e incluso en algunos pequeños canales de las células parietales (Bizzozero, 1893).

En 1979, Robin Warren, por primera vez encontró la presencia de una bacteria en una biopsia gástrica procedente de un paciente con gastritis crónica activa, asociando la presencia de éste microorganismo con dicha patología. Posteriormente, en 1983, Barry Marshall en colaboración con Warren lograron aislar a la bacteria (Marshall y Warren, 1984). Realizaron experimentos de auto inoculación de cultivos para verificar su carácter patológico, demostrando que ésta bacteria puede colonizar el estómago humano, causar inflamación gástrica y ser eliminada con el uso de antibióticos adecuados con lo que se cumplían los postulados de Koch (Marshall *et al.*, 1985; van Amsterdam *et al.*, 2006). Años más tarde, estos científicos australianos fueron galardonados con el Premio Nobel en Fisiología y Medicina de 2005, por el descubrimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* y su papel en la gastritis y úlcera péptica (www.nobelprize.org; 20 Oct 2012).

Tiempo después quedaría de manifiesto la relación entre el cáncer gástrico y la presencia de esta bacteria. En 1994, se declaró a *H. pylori* como el principal agente causal de úlcera péptica (Conferencia Consenso de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos, NIH) y en ese mismo año, fue clasificada como carcinógeno tipo I por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (IARC, 1994).

1.1.2. Taxonomía

En 1983 esta bacteria fue colocada dentro del género *Campylobacter* al compartir con este grupo algunas de sus características como su morfología curvada, su crecimiento en medios enriquecidos y en una atmósfera microaerofílica, no ser sacarolítica, ser sensible a metronidazol, así como por su porcentaje de contenido de G-C en el DNA (34%). Fue originalmente nombrada *Campylobacter pyloridis* y luego renombrada como *C. pylori* (Warren, 1983).

Estudios de microscopía electrónica mostraron que la bacteria presenta múltiples flagelos unipolares, a diferencia de los bipolares de *Campylobacter*; mediante el análisis de la secuencias 16S de su RNAr se pudo comprobar la divergencia con otras especies de *Campylobacter* y así confirmar el hallazgo de un nuevo género (Goodwin *et al.*, 1985, 1989; Pearson *et al.*, 1984; Romaniuk *et al.*, 1987).

Clasificación taxonómica de *H. pylori*. (ICSP, 2012; Marshall, 2002).

Reino: Bacteria

División: Proteobacteria

Clase: Epsilonproteobacteria

Orden: Campylobacterales

Familia: Helicobacteraceae

Género tipo: *Helicobacter*

Especie tipo: *Helicobacter pylori*

1.1.3. Morfología

H. pylori es una bacteria polimórfica, Gram-negativa que mide de 2 a 4 μm de longitud y 0.5 a 1.0 μm de ancho y cuenta con 2 a 6 flagelos unipolares característicos de 3 μm de largo (**Fig. 1**), los cuales le confieren movilidad, lo que le permite penetrar a través de la mucosa gástrica (Goodwin *et al.*, 1989; Goodwin y Armstrong, 1990). Puede presentar la forma cocoide cuando es inducida alguna

condición de estrés, como el pH alcalino, alta temperatura, aumento en la tensión de oxígeno (O₂), cultivo prolongado o presencia de antibióticos. Se plantea que estas formas pueden ser un mecanismo de resistencia, así como de transmisión de la bacteria (O'Rourke y Bode, 2001).

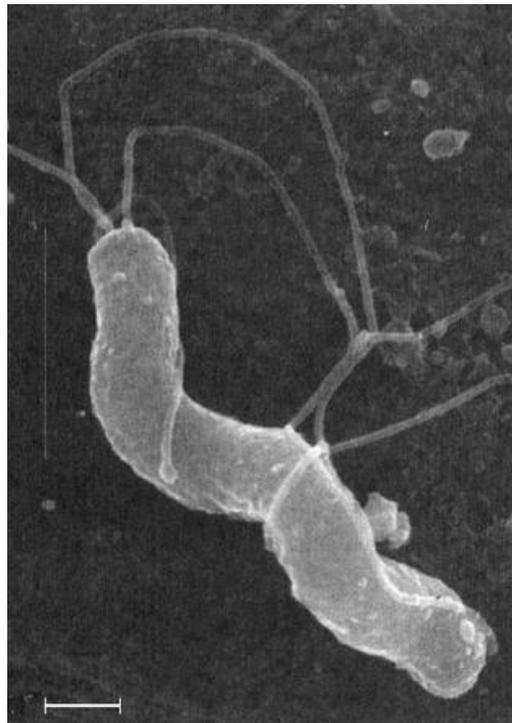


Fig. 1. Micrografía electrónica de *H. pylori*, en la que se aprecia la morfología en espiral típica de la bacteria y los flagelos unipolares. (Atherton, 2006).

Es un microorganismo de lento crecimiento (3 a 5 días), las condiciones microaerófilas bajo las cuales crece son O₂ de 2 a 5%, CO₂ entre 5 y 10%, con alta humedad, a 37 °C y a un pH cercano a 7. En condiciones de laboratorio requiere medios de cultivo enriquecidos como el agar Casman que tiene peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, suplementados con sangre o suero fetal bovino. En medios sólidos las colonias son pequeñas y translúcidas (Dehesa, 1993).

1.1.4. Hábitat

H. pylori vive en la capa de moco que recubre al epitelio gástrico humano, un nicho ecológico con un pH ácido, con un recambio celular elevado y un movimiento peristáltico continuo con una baja tensión de oxígeno (Cantón *et al.*, 1995). Este microorganismo puede atravesar las uniones intercelulares, probablemente por la expresión de moléculas que ligan proteínas séricas y de la matriz extracelular del hospedero y se considera rara la invasión celular (Dubreuil *et al.*, 2002). También se ha detectado en saliva y deposiciones de seres humanos (Namavar *et al.*, 1995; Parsonnet *et al.*, 1999; Burgers *et al.*, 2008). El análisis genético ha permitido comprobar que un individuo puede albergar en su estómago cepas distintas (el 14% de los infectados poseen múltiples genotipos) (Scholte *et al.*, 2002).

1.1.5. Especies del género *Helicobacter* patógenas para el hombre.

Actualmente el género *Helicobacter* consta de 33 especies reconocidas por el Comité Internacional de Sistemática Procariontes y 5 especies más incluidas en otra publicación (ICSP, 2003; Fernández, 2011). De acuerdo con el sitio habitual de colonización, las especies de *Helicobacter* se pueden subdividir en dos grupos; gástricas y enterohepáticas (**Cuadros 1a y 1b**):

Las especies **gástricas** colonizan la mucosa gástrica (Solnick y Schauer, 2001) y algunas especies de animales pueden infectar a los humanos (De Groote *et al.*, 2005).

Las especies **enterohepáticas** se han identificado en el tracto gastrointestinal (parte baja del tracto gastrointestinal inferior, incluyendo íleon, colon), el hígado (árbol biliar) de seres humanos y otros mamíferos, y se asocian con inflamación crónica e hiperproliferación de células epiteliales (Kusters *et al.*, 2006; Solnick y Schauer, 2001).

Cuadro 1a. Especies patógenas gástricas del género *Helicobacter*.

| GÁSTRICAS | | |
|--|---|---|
| Especies del género <i>Helicobacter</i> | Principal hospedero mamífero | Patologías asociadas |
| <i>pylori</i> ¹ | Humano, algunos primates | Gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico, linfoma tipo MALT |
| <i>felis</i> ^{1,28,29,30,31} | Gato, perro, ratón y guepardo | Gastritis en huésped natural, puede causar úlcera péptica o adenocarcinoma en ratón |
| <i>mustelae</i> ¹ | Hurón | Gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico, linfoma tipo MALT |
| <i>acinonychi</i> ¹ | Guepardo, tigre, otros grandes felinos | Gastritis, úlcera péptica |
| <i>heilmannii</i> ^{1,4,29,31,32,33} | Humano, perro, gato, mono, guepardo, rata | Gastritis crónica activa, síntomas dispépticos, linfoma tipo MALT |
| <i>bizzozeronii</i> ^{5,6,7,8} | Perro y humano | Gastritis |
| <i>salomonis</i> ^{7,8,9} | Perro | Gastritis |
| <i>suis</i> ^{7,8} | Cerdo, humano | Gastritis, úlceras |

Cuadro 1b. Especies patógenas enterohepáticas del género *Helicobacter*.

| ENTEROHEPÁTICAS | | |
|---|------------------------------|--|
| Especies del género <i>Helicobacter</i> | Principal hospedero mamífero | Patologías asociadas |
| <i>hepaticus</i> ^{1, 10} | Ratón, otros roedores | Proliferación de tiflocolitis, hepatitis crónica activa, carcinoma hepatocelular |
| <i>bilis</i> ^{2, 11, 12, 13} | Ratón, perro, humano | Hepatitis |
| <i>fennellinae</i> ^{2, 3, 14} | Humano | Diarrea, gastroenteritis, proctitis, proctocolitis. |
| <i>cinaedi</i> ^{2,15, 16, 17} | Humano, hámster | Proctitis, colitis, diarrea, gastroenteritis |
| <i>canis</i> ^{2,18, 19} | Perro y humano | Hepatitis, diarrea |
| <i>pollorum</i> ^{20, 21, 22, 23} | Humano | Gastroenteritis, diarrea, enfermedad de Crohn |
| <i>rappini</i> ²⁴ | Ratón, humano, perro | Gastroenteritis crónica, diarrea |
| <i>canadensis</i> ²⁵ | Humano | Diarrea, bacteremia |
| <i>westmeadii</i> ²⁶ | Humano | Fiebre, inmunosupresión |
| <i>winghamensis</i> ²⁷ | Humano | Gastroenteritis |

Kusters *et al.*, 2006¹; Totten *et al.*, 1985²; Hannula y Marja- Lisa, 2007³; De Groote *et al.*, 2005⁴; Hänninen *et al.*, 1996⁵; Jalava *et al.*, 2001⁶; Baele *et al.*, 2009⁷; van den Bulck *et al.*, 2005⁸; Jalava *et al.*, 1997⁹; Hamada *et al.*, 2009¹⁰; Fox *et al.*, 1995¹¹; Murata *et al.*, 2004¹²; Raman *et al.*, 2010¹³; Vandamme *et al.*, 1991¹⁴; Flores *et al.*, 1989¹⁵; Sacks *et al.*, 1991¹⁶; Matsumoto *et al.*, 2007¹⁷; Burnens *et al.*, 1993¹⁸; Foley *et al.*, 1999¹⁹; Stanley *et al.*, 1994²⁰; Burnens *et al.*, 1994²¹; Ceelen *et al.*, 2005²²; Karagin *et al.*, 2010²³; Romero *et al.*, 1988²⁴; Tee *et al.*, 2001²⁵; Trivett-Moore *et al.*, 1997²⁶; Melito *et al.*, 2001²⁷; Lee *et al.*, 1998²⁸; Otto *et al.*, 1992²⁹; Fox *et al.*, 1992³⁰; Eaton *et al.*, 1993³¹; Geyer *et al.*, 1993³²; Itoh *et al.*, 1994³³.

1.1.6. Modos de transmisión y reservorios

Se estima que aproximadamente el 50% de la población mundial está infectada por *H. pylori*. La bacteria tiene una estrecha gama de hospederos pero el ser humano es considerado el principal reservorio. En algunos estudios se ha propuesto que la adquisición de *H. pylori* se produce a través de una fuente ambiental común, en particular los animales y el agua han sido implicados como posibles fuentes de infección (Mitchell, 2001). Se ha aislado *H. pylori* de animales domésticos por lo que se ha considerado que la presencia de estos puede ser un factor de riesgo para la infección (Morris *et al.*, 2001; 2002).

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

- **Vía gastro-oral:** Debido a la presencia de *H. pylori* en el jugo gástrico de un 58% de los pacientes, se plantea la posibilidad de que el reflujo del jugo gástrico represente el vehículo de transmisión de esta bacteria (Varoli *et al.*, 1991). La posibilidad de que esta ruta sea importante en niños se debe a que las secreciones del estómago, vómitos y regurgitación de material gástrico son muy comunes en la infancia (Mitchell *et al.*, 1989; Mitchell *et al.*, 1992; Axon, 1995).
- **Vía oral-oral:** La cavidad oral es un reservorio temporal para la subsistencia de *H. pylori*. Cepas idénticas de éste patógeno han sido detectadas por PCR y cultivo en la boca y el estómago de individuos infectados sintomáticos infectados (Dowsett y Kowolik, 2003; Khandaker *et al.*, 1993), y se menciona que la colonización de la boca es sólo transitoria y se produce después del vómito (Dowsett y Kowolik, 2003; Olivier *et al.*, 2006). Así mismo se ha identificado la bacteria mediante técnicas de PCR a partir de la placa dental y de la saliva (Cellini *et al.*, 1995; Namavar *et al.*, 1995, Allaker *et al.*, 2002).

- **Vía fecal-oral:** Se sabe que esta bacteria no está bien adaptada para sobrevivir en el intestino, incluso hay reportes que demuestran que *H. pylori* es sensible a los efectos de la bilis (Mitchell *et al.*, 1992; Raedsch *et al.*, 1989). Sin embargo, *H. pylori* ha sido detectada en las heces, algunos estudios muestran la posibilidad de que la dispersión de éstas en el medio ambiente contamine el agua de consumo humano y alimentos y que esto podría estar asociado con la infección por *H. pylori* (Vale y Vítor, 2010).

Independientemente de la vía de transmisión, está demostrado que la infección se da principalmente en el entorno familiar. Los datos obtenidos en diversos estudios concluyen que la infancia es el periodo de mayor riesgo para la infección por *H. pylori* (Malaty y Graham, 1994).

1.1.7. Factores de virulencia y patogenicidad

La capacidad de *H. pylori* para sobrevivir en un ambiente tan hostil como el gástrico es atribuida al desarrollo de características especializadas que le permiten un alto nivel de adaptación. La colonización de la mucosa gástrica y el desarrollo posterior de la gastritis (daño al tejido y sobrevivencia) son dependientes de factores bacterianos

Los factores esenciales para la colonización de la mucosa gástrica se describen a continuación y se presentan en la **Fig. 2**.

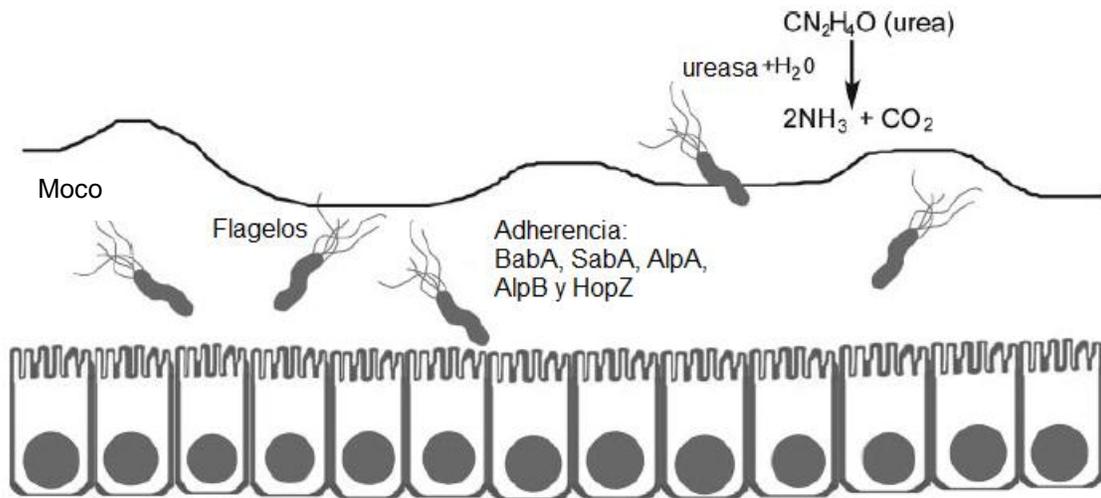
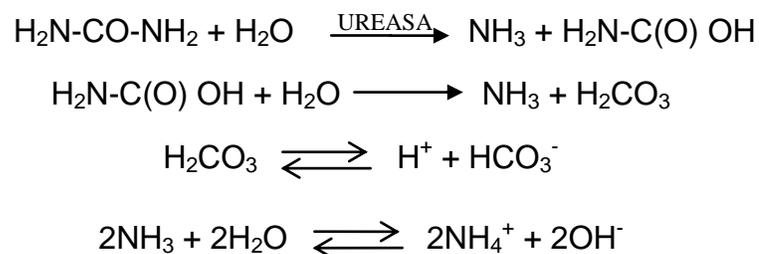


Fig. 2. Factores de colonización de la bacteria *H. pylori*. La ureasa contribuye en la resistencia al medio ácido, los flagelos permiten la movilidad y la penetración a la mucosa gástrica y algunas proteínas como BabA, SabA, AlpA, AlpB y HopZ, permiten la adhesión de la bacteria a las células epiteliales. (Tomado y modificado de Holly *et al.*, 2006).

- **Ureasa.** Esta enzima es central en el metabolismo y virulencia de *H. pylori*, se encuentra tanto en el citosol de la bacteria como en su superficie, es de vital importancia ya que crea un microambiente relativamente alcalino que protege a las bacterias de la agresividad del ácido gástrico, catalizando la hidrólisis de la urea para producir dos moléculas de amonio y una de ácido carbónico (**Fig.3**).



En soluciones acuosas, el ácido carbónico liberado y las dos moléculas de amonio están en equilibrio con sus formas ionizadas y como consecuencia de esto hay un incremento de pH (Moblely, 2001).

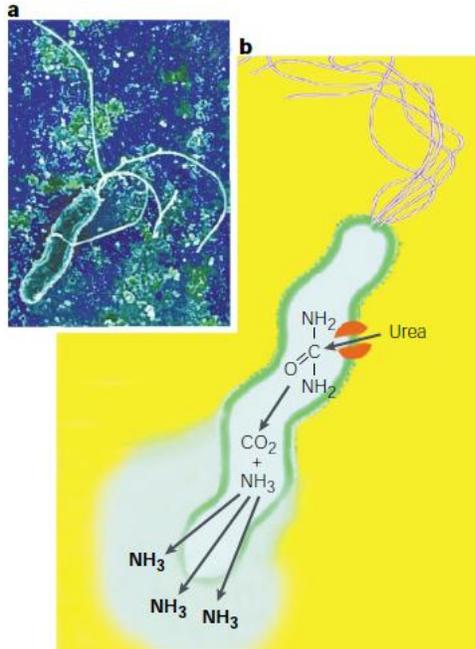


Fig. 3. Actividad de la ureasa de *Helicobacter pylori*. **(a)** Micrografía electrónica de *H. pylori* y **(b)** representación esquemática que muestra los flagelos polares, ureasa, canal de urea- H^+ y la producción de amoníaco, que neutraliza el ambiente ácido (amarillo) y el citosol y el entorno inmediato a la bacteria (luz azul). (Montecucco y Rappuoli, 2001).

- Flagelos y movilidad:** Normalmente *H. pylori* tiene de 2 a 6 flagelos unipolares que le permiten avanzar en su nicho ecológico, además permite el movimiento rápido hacia el pH neutro de la mucosa gástrica. Cada flagelo muestra una típica estructura similar a una bombilla en su extremo distal conocida como vaina lipoprotéica, la cual es una extensión de la membrana externa y se cree que esta estructura protege del ataque del ácido del estómago (Geis *et al.*, 1993). Las inmunoglobulinas humanas están dirigidas contra proteínas flagelares de esta bacteria. Las cepas de *H. pylori* con flagelos mutados son menos virulentas que las del tipo silvestre, lo que indica que los flagelos son cruciales en el proceso patogénico. Cada flagelo está compuesto por dos flagelinas, FlaA y FlaB (Kostrzynska *et al.*, 1991), característica inusual distinta del resto de proteínas flagelares, las cuales son homopoliméricas. FlaB se localiza en la base del flagelo, mientras que la más abundante, FlaA, se encuentra en el exterior. La eliminación de

ambas flagelinas (FlaA-/FlaB-) da como resultado bacterias inmóviles (Josenhans *et al*, 1995), que sin embargo conservan una capacidad de adherencia similar a la del tipo silvestre (Evans *et al.*, 2000), pero tan sólo capaces de infectar de manera eficiente en los estadios tempranos de la infección.

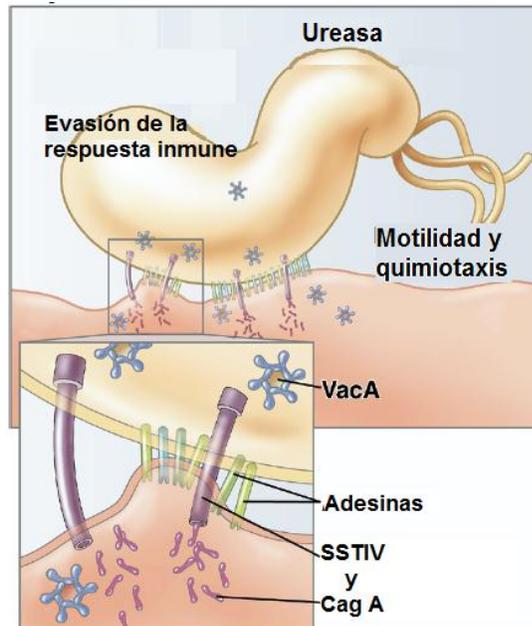


Fig. 4. Principales factores de virulencia y colonización de *H. pylori*. SSTIV: sistema de secreción tipo IV. Vac A: citotoxina vacuolizante. Cag A: proteína asociada al gen A. (Amieva y El-Omar, 2008).

- **Adherencia:** La colonización de la mucosa lleva implícita, como paso previo, la capacidad de la bacteria para adherirse al epitelio gástrico; esto sucede por la interacción entre las adhesinas bacterianas y los receptores del hospedero como son algunas proteínas de la matriz celular. Así, las lesiones inducidas son de tipo adhesión-desprendimiento que se caracterizan por la pérdida de microvellosidades del epitelio gástrico en el sitio de adhesión. La adherencia es necesaria para la inducción y liberación de citocinas pro-inflamatorias (Smoot *et al.*, 1993).

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

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

La infección genera una respuesta inflamatoria local caracterizada por la infiltración del epitelio gástrico de neutrófilos, linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, produciendo un daño tisular permanente de diversa magnitud.

Entre los factores involucrados en la **inflamación y daño al epitelio gástrico** se encuentra la proteína vacuolizante (VacA) (**Fig. 5**), una proteína inmunogénica secretada por alrededor del 50% de las cepas y que provoca la formación de grandes vacuolas en el citoplasma de las células epiteliales, posee múltiples actividades celulares, incluyendo la formación de canales a través de la

bicapa lipídica, la liberación del citocromo *c* de la mitocondria que conduce a la apoptosis y la unión a receptores de membrana celular seguido por la iniciación de una respuesta inflamatoria (Cover y Blanke, 2005; Kusters *et al.*, 2006; Atherton y Blaser, 2009).

Se plantea que el determinante de la patogenicidad está dado por un conjunto de genes agrupados en la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*) con un elevado polimorfismo y que codifica para un sistema de secreción tipo IV (Kusters *et al.*, 2006). Se sabe que el 60% de las cepas de *H. pylori* producen proteínas codificadas por esta isla, como son CagA (proteína asociada al gen A), así como otras involucradas en la formación del sistema de secreción y la inducción de IL-8 (Kusters *et al.*, 2006). La proteína CagA es fosforilada por cinasas y se une a varias proteínas blanco que afectan a su vez las uniones intercelulares y una serie de señales diversas en la célula hospedera (Ogura *et al.*, 2000).

Dentro de los factores de **sobrevivencia**, la bacteria posee una superóxido dismutasa y una catalasa, que le ayudan a prevenir la fagocitosis.

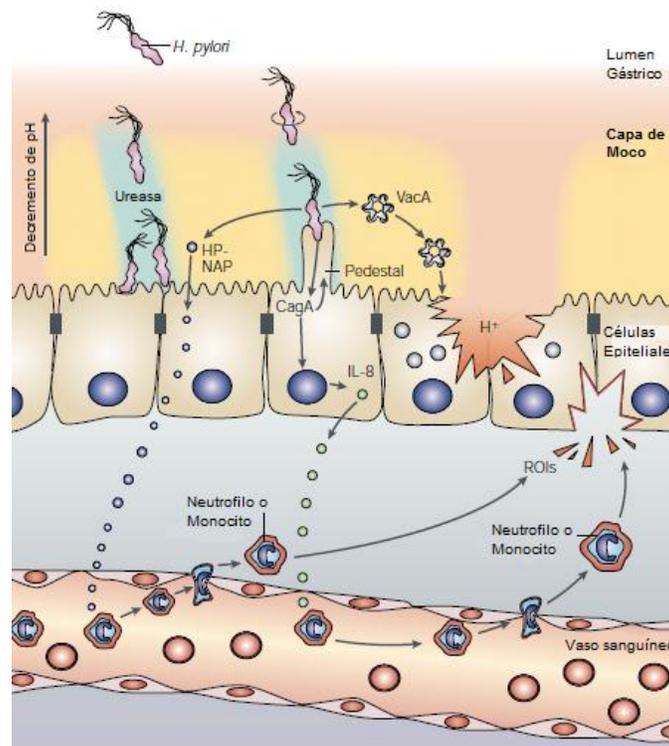


Fig. 5. Patogénesis de la infección por *H. pylori* (Montecucco y Rappuoli, 2001).

1.2. Patologías asociadas con la presencia de *H. pylori*.

1.2.1. Gastritis aguda

La gastritis se puede clasificar de acuerdo a varios criterios y por la combinación de los mismos según el Sistema Sydney (Price, 1991), pero para el caso de las patologías desarrolladas por *H. pylori*, solo consideraremos las gastritis agudas y crónicas que es donde la bacteria está involucrada.

La gastritis aguda incluye procesos inflamatorios en la mucosa y submucosa, que pueden desaparecer en días si se encuentra en una fase aguda y es retirado el factor causal. Existen una serie de factores ligados etiopatogénicamente a las gastritis como el alcohol, los fármacos, el estrés y *H. pylori* (NIH, 1994; Valle *et al.*, 1996).

Cuando la bacteria empieza a colonizar, en el huésped se presentan en general dos mecanismos de defensa, uno inflamatorio en la fase *aguda* y uno inmune (folicular) en la *crónica*. En la fase *aguda*, el organismo penetra a la capa mucosa del estómago, principalmente en las faveolas y muy cerca de la superficie del epitelio (**Fig. 6**). Este último responde a la infección con depleción de mucinas, exfoliación celular y con cambios regenerativos compensatorios, además, comienzan a presentarse células del sistema inmune como polimorfonucleares dentro de las faveolas y lámina propia. Esta fase es acompañada por hipoclorhidria, así como una disminución del ácido ascórbico en el jugo gástrico.

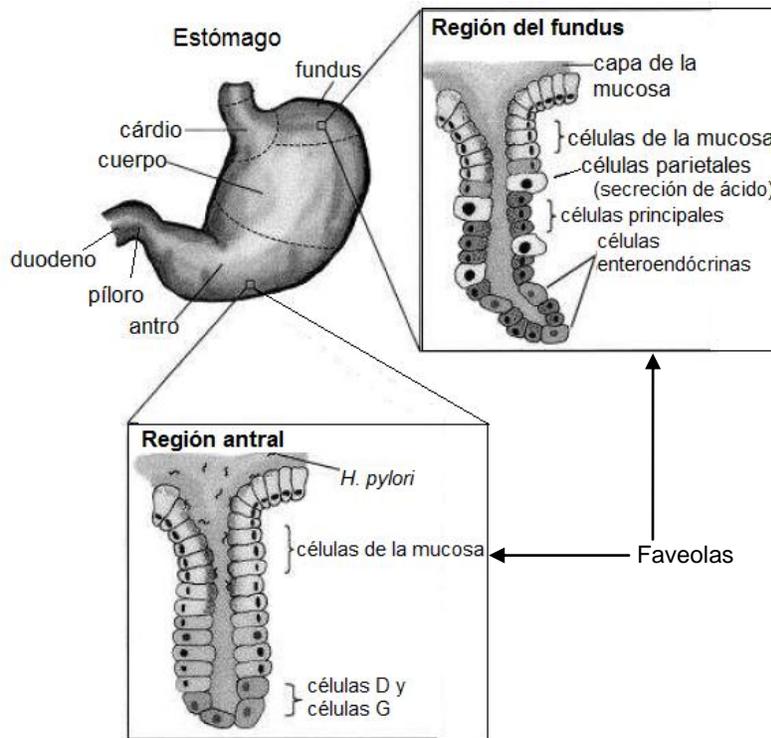


Fig. 6. Representación de la estructura gástrica. El estómago se divide en 5 regiones: cardío, fundus, cuerpo, antro y píloro. El epitelio gástrico está recubierto por una capa protectora de moco secretada por células epiteliales especializadas las faveolas contienen varios tipos de células, incluyendo las células secretoras de moco. La colonización por *H. pylori* se limita en gran medida al antro que carece de secreción de ácido por las células parietales (Tomado y modificado de Testerman *et al.*, 2001).

Se ha visto que esta fase está mediada por la liberación de lipopolisacáridos bacterianos y un número de moléculas quimiotácticas, estas moléculas quimiotácticas penetran a través del epitelio dañado, induciendo la migración de los polimorfos. Esto va acompañado de otros productos bacterianos que liberan otros mediadores inflamatorios que incrementan la permeabilidad vascular. La bacteria estimula al epitelio provocando la liberación de la IL-8. Esta fase es de vida corta y en una pequeña parte de la población, particularmente en los niños, la bacteria puede ser controlada espontáneamente y la morfología del estómago retornar a su normalidad. Sin embargo, en la mayor parte de las personas, la respuesta inmune del hospedero es incapaz de eliminar la infección y

en tres o cuatro semanas se manifiesta la acumulación de células inflamatorias, para dar origen a una gastritis crónica activa (Dixon, 2001).

1.2.2. Gastritis crónica activa

La gastritis crónica activa se caracteriza por el arribo de linfocitos y células plasmáticas a la mucosa en respuesta a la producción de citocinas y anticuerpos específicos anti- *H. pylori*. La proliferación de células B y su subsecuente diferenciación en células plasmáticas, producen la síntesis de IgM (opsonizante) y anticuerpos que amplifican la reacción inflamatoria. La consistente presencia de *H. pylori*, hace que aparezca una segunda línea de defensa de las células B, las cuales se presentan en forma de folículos linfoides con la producción de células plasmáticas y la síntesis de IgA. Cuando llega a este nivel la respuesta inmune es insuficiente para erradicar a la bacteria en la mayoría de los casos y si la aparición de los folículos linfoides continúa, ya se habla de una gastritis crónica activa. La adquisición de tejido linfoide organizado en la mucosa gástrica constituye lo que se denomina MALT (del inglés mucosa-associated lymphoid tissue) (Dixon, 2001).

Si continúa la infección, el tejido gástrico sufre otro nivel más de daño, que es la *atrofia* y que consiste en la alteración de la estructura y pérdida de tejido glandular. La pérdida de glándulas provoca que se deje de secretar moco y sustancias elementales para mantener la funcionalidad de la mucosa, por lo que se empiezan a formar *úlceras*. Las úlceras consisten en una rotura de la mucosa que sobrepasa la *muscularis mucosae* y pueden presentarse tanto en el estómago como en el duodeno (López, 1992).

1.2.3. Úlcera péptica

La infección por *H. pylori* está presente en el 85-100% de los casos de úlcera duodenal y en el 65-80% de los casos de úlcera gástrica (Pan *et al.*, 1991). La bacteria induce cambios significativos en la fisiología del estómago,

especialmente en la secreción de ácido. Aunque la mayor parte de los sujetos infectados presenta una secreción ácida normal, los pacientes con úlcera duodenal son frecuentemente hipersecretores, lo que se asocia a una inflamación predominante en el antro gástrico, un aumento en los niveles post-prandiales de gastrina y a una disminución en la actividad inhibitoria de la somatostatina (Hirschowitz *et al.*, 1994). Esto provoca una mayor carga ácida duodenal y favorece la aparición de metaplasia gástrica en la mucosa duodenal, que puede ser colonizada por *H. pylori*, lo que probablemente determina la aparición de la úlcera a ese nivel. En cambio, los sujetos con úlcera gástrica o cáncer gástrico tienden a ser hiposecretores, lo que se asocia a una inflamación gástrica más extensa y a la aparición de áreas de atrofia de la mucosa (Walker *et al.*, 1993). Estas variaciones en la distribución de la infección y en la secreción ácida dependen probablemente de la interacción entre factores del huésped y de la bacteria, como la edad al momento de la infección, el tipo de respuesta inmune y los factores de virulencia bacterianos mencionados (Hirschowitz *et al.*, 1994).

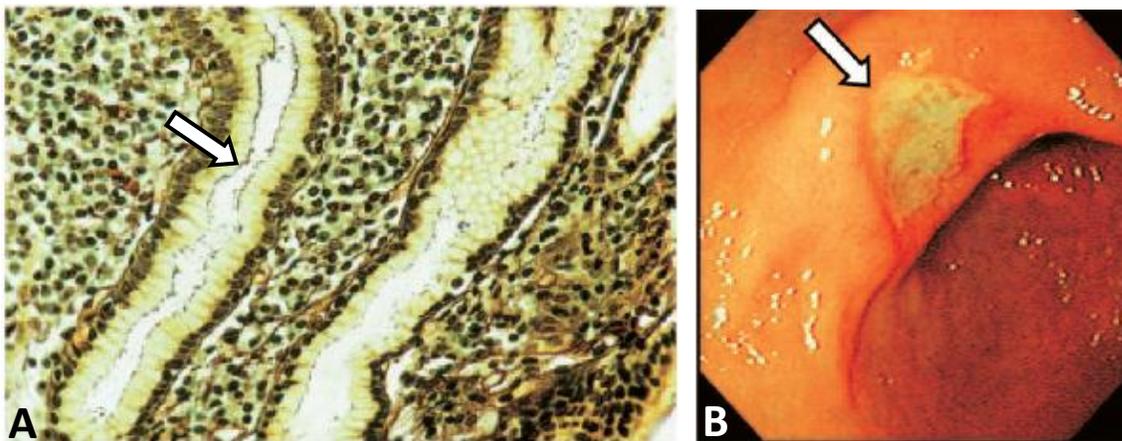


Fig. 7. (A) Glándulas gástricas colonizadas abundantemente con *H. pylori*, mostrado como bacilos curvos negros alineados cerca de la superficie de la mucosa, **(B)** Imagen endoscópica de una úlcera gástrica, con una base blanca. (Tomado de Kusters *et al.*, 2006).

1.2.4. Cáncer gástrico

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer y la OMS designaron a *H. pylori* como carcinógeno tipo I (Parsonnet, 1993a). De hecho, el cáncer gástrico es la segunda causa de muerte por este tipo de enfermedades y es considerada como la cuarta neoplasia más común en el mundo, detrás del cáncer de pulmón, mama y colo-rectal. Más del 70% de los casos ocurren en países en desarrollo y la mitad del total mundial se produce en el este de Asia (Globocan 2008; IARC, 2010).

En la actualidad, diversos trabajos tratan de asociar a la infección por *H. pylori* con el cáncer de estómago; a partir de evidencias epidemiológicas, anatomopatológicas y fisiopatológicas, lo que ha permitido crear varias hipótesis para explicar los mecanismos mediante los cuales la infección crónica del epitelio gástrico evoluciona hacia el cáncer gástrico (Katz *et al.*, 1993; Correa *et al.*, 1990).

La más aceptada es la planteada por Correa, quien sugiere que la bacteria, al infectar la mucosa gástrica, provoca una gastritis crónica atrófica multifocal, lo cual facilita el crecimiento bacteriano y el aumento de nitrosaminas y nitrosamidas, que tienen alta capacidad mutagénica, por lo cual son las responsables de las lesiones premalignas (Correa *et al.*, 1990); así mismo, la respuesta inmunológica local y sistémica durante la infección y el proceso inflamatorio, pueden inducir a la aparición de errores de replicación celular y facilitar el desarrollo del cáncer (Parsonnet, 1993b).

Otro hecho importante en la génesis del cáncer gástrico es la disminución de vitamina C en el jugo gástrico provocada por la bacteria. Esta vitamina tiene propiedades antioxidantes, en consecuencia, su disminución en el jugo gástrico favorece el desarrollo de tumores (Gil *et al.*, 1990; Besasso, 1996). Existe también una fuerte asociación entre *H. pylori* y la metaplasia intestinal, acompañado de aumento del pepsinógeno y de hipergastrinemia en pacientes infectados con la bacteria, por lo que la determinación de niveles altos de pepsinógeno y de gastrina

sérica en pacientes sería un indicativo de riesgo de neoplasia gástrica (Parsonnet *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1994).

Por otra parte, existen diferentes tipos de cepas de *H. pylori* con variado potencial cancerígeno, especialmente aquellas que presentan la citotoxina asociada al gen A (Cag A), las cuales favorecen el desarrollo de gastritis atrófica multifocal y metaplasia tipo I (Blaser *et al.*, 1995; Kutz, 1996).

1.3. Métodos de diagnóstico de la infección por *H. pylori*.

Existen diferentes métodos para diagnosticar la infección producida por *H. pylori*. Los métodos pueden diferenciarse según el tipo de muestra que se utiliza, si requieren o no la endoscopia (invasivos o no invasivos) y a la forma de detectar el microorganismo (directamente la propia bacteria o de forma indirecta, cuando se detecta alguna función) (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Pruebas para la detección de la infección por *H. pylori*.

| Técnicas invasivas | Técnicas no invasivas |
|---|--|
| <i>Basados en la obtención de biopsia</i> | <i>Basados en muestras periféricas como sangre, aliento, heces y saliva.</i> |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Cultivo ▪ Histología ▪ Prueba rápida de ureasa ▪ Hibridación <i>in situ</i> por fluorescencia (FISH) ▪ Enfoque molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de biopsia o jugo gástrico. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Prueba de antígeno de <i>H. pylori</i> en heces (HpSA) ▪ Serología de sangre total ▪ Prueba de aliento con urea (UBT) ▪ Anticuerpos en saliva (PCR) |

Fuente: Tomado y modificado de Guías Prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología, 2010.

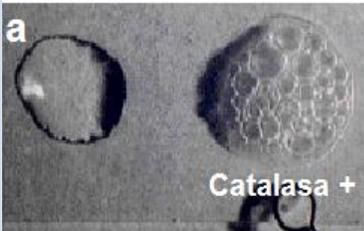
Los **métodos invasivos** requieren contar con una biopsia del paciente obtenida por medio de endoscopia. Una vez realizado esto, el principal método de diagnóstico es el cultivo en medios ricos suplementados con sangre, en los que al cabo de un tiempo de incubación de 5 a 10 días se identifican las colonias de *H.*

pylori por medio de tres pruebas bioquímicas básicas (ureasa, oxidasa y catalasa), así como por un análisis microscópico (**Cuadro 3**) (Mégraud y Lehours, 2007; Monteiro *et al.*, 2001). También se puede emplear la biopsia para realizar un estudio histopatológico, en el que se usan tinciones especiales para identificar a la bacteria en el tejido gástrico, como son las argénticas (Warthim-Starry), giemsa modificada o inmunohistoquímicas (Mégraud y Lehours., 2007). La prueba rápida urea-ureasa, es otro método que por su rapidez y sencillez es ampliamente utilizado el cual consiste en incorporar parte de la biopsia en una solución con urea y rojo de fenol, cuyo viraje a rosa indica un resultado positivo. Un método molecular que es empleado para analizar la biopsia es el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el que también se ha podido realizar el diagnóstico a partir del jugo gástrico (Mégraud y Lehours, 2007).

En cuanto a los **métodos no invasivos**, se encuentra la prueba de aliento con urea (UBT, por sus siglas en inglés), es la técnica más empleada y confiable para el diagnóstico inicial de la infección y puede ser utilizado para confirmar la erradicación de la bacteria después de la terapia antibacteriana, consiste en administrar al paciente [¹³C]-urea, la cual es hidrolizada por la ureasa de la bacteria liberando CO₂ marcado y posteriormente detectado en la exhalación (Marshall y Surveyor, 1988). Dicha prueba es menos costosa que la biopsia endoscópica del estómago y más precisa que la serología como un medio para detectar la infección por *H. pylori*. Igualmente, existen métodos basados en la detección de anticuerpos principalmente en sangre, e identificación de IgG en orina y en saliva. Los anticuerpos tipo IgG constituyen la respuesta inmune humoral frente a la infección a nivel sistémico, mientras que las IgA constituyen los anticuerpos en la respuesta a nivel local (mucosa gástrica) (Hirschl y Rotter, 1996). Se han ensayado el diagnóstico de *H. pylori* en muestras de heces por medio de PCR, así como por antígenos (útiles para el diagnóstico inicial, especialmente en niños), no obstante, aún no se encuentran completamente implementados y presentan problemas de especificidad (Mégraud y Lehours, 2007).

Se han realizado numerosos estudios sobre especificidad y sensibilidad a estas pruebas para determinar su precisión. En la práctica clínica, la combinación de varias de ellas permite dar un diagnóstico mucho más preciso. De acuerdo al III Consenso Mexicano sobre *H. pylori* (CMHP) se requiere de un estudio endoscópico si el cuadro clínico indica úlcera péptica o linfoma tipo MALT y debe de realizarse una prueba rápida de urea-ureasa. El estudio histológico estaría indicado si la prueba inicial es negativa y el índice de sospecha de tener estas enfermedades es elevado. En aquellos casos con una historia documentada de úlcera péptica, enfermos en tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (AINES) o inhibidores de bomba de protones (IBP), anemia por deficiencia de hierro, púrpura trombocitopénica idiopática o por deseo expreso de la persona, se debe utilizar la UBT (Abdo-Francis *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Pruebas bioquímicas básicas y análisis microscópico de *H. pylori*.

| Prueba | Fundamento y método | Resultado |
|-----------------|---|--|
| Catalasa | Descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. En un portaobjetos se ponen unas gotas de peróxido de hidrógeno al 40% y se le adiciona una asada del cultivo. |  <p>Prueba positiva producción de burbujas (O₂).</p> |
| Oxidasa | Procedimiento cualitativo para determinar la presencia o ausencia de la citocromo c oxidasa en las bacterias. En un cuadro de una placa de Dry Slide Oxidase (DIFCO), se coloca un poco de cultivo. |  <p>Prueba positiva, se observa una coloración azul intenso en unos cuantos segundos.</p> |

| | |
|---|--|
| <p>Ureasa</p> <p>La prueba consiste en detectar la actividad de la enzima ureasa. Se requiere una solución de urea 6 M a pH 7.0 y 0.005% de rojo de fenol (color canela). En un tubo se agregan 0.3 mL de solución y se añade una asada de bacterias.</p> |  <p>Prueba positiva con el viraje de la solución a un color rosa-rojo que indica alcalinización del medio.</p> |
| <p>Tinción de Gram</p> <p>A partir de un cultivo se toma una asada de bacterias extendiéndola sobre un porta objetos con una gota de agua o solución salina y se realiza una tinción de Gram estándar. También se verifica la morfología observando las formas típicas de la bacteria: bacilos curvos en cultivos frescos y en forma cocoide en cultivos viejos.</p> |  <p>La bacteria de tinte de color rojo por la safranina, indicando que la bacteria es Gram negativa.</p> |

1.4. Esquemas de erradicación

Se han analizado diferentes esquemas de tratamiento para la erradicación de la infección por *H. pylori*, llegando a la conclusión de que una terapia exitosa debe de cumplir los siguientes criterios (Boixeda y Argila, 2000):

- Lograr índices de erradicación superiores al 90%.
- Tratar que los efectos secundarios sean inferiores al 5%.
- Fáciles de cumplir por el paciente.
- Inducir bajas tasas de resistencia antibiótica.
- Ser de corta duración (entre 7-10 días).
- Ser de bajo costo.

Actualmente para eliminar a la bacteria se utiliza un procedimiento denominado triple terapia, el cual consiste en la combinación de dos antibióticos (a elegir entre amoxicilina, claritromicina, tetraciclina y metronidazol) y un inhibidor de la secreción de ácido (antagonistas de receptores de histamina o, en la mayoría de las veces, inhibidores de la bomba de protones) de 7 a 14 días (Goodwin, 1997; Dehesa *et al.*, 1998). Con esta terapia se tienen buenos resultados en la mayoría de los casos. Sin embargo, se ha encontrado que este tratamiento no es efectivo en alrededor del 10 al 20% debido a la aparición de cepas resistentes, además que, frecuentemente, estas terapias producen efectos secundarios para el organismo, tales como diarreas, náuseas, dolor abdominal, dispepsia, etc., (Boixeda y Argila, 2000), por lo que en estos casos se utilizan las terapias cuádruples, en la que se maneja además bismuto y la combinación de otros antibióticos diferentes a los previamente utilizados. La terapia cuádruple administrada durante 7-10 días es preferible respecto a la terapia triple con bismuto administrada durante 14 días (Vakil y Megraud, 2007).

Los factores principales que condicionan el éxito de un tratamiento son la duración del mismo, las resistencias antimicrobianas y el grado de cumplimentación por parte del paciente (Boixeda y Argila; 2000).

Aunque *H. pylori* es sensible *in vitro* a una gran variedad de fármacos antibióticos y no antibióticos cuando éstos han sido aplicados en la clínica, muchos de ellos no han resultado eficaces en la erradicación. Así, desde el descubrimiento de esta bacteria se han empleado múltiples combinaciones de uno o más fármacos con resultados muy desiguales. Sin embargo, actualmente tan sólo 3 grupos de medicamentos resultan ser realmente eficaces, utilizados en combinación, frente a *H. pylori* (**Cuadro 4**) (Boixeda y Argila, 2000).

Cuadro 4. Medicamentos eficaces en la erradicación de *H. pylori*

| | |
|--|---|
| Antibióticos | <ul style="list-style-type: none">▪ β-lactámico: amoxicilina▪ Macrólidos: claritromicina▪ Nitroimidazoles: metronidazol y tinidazol▪ Tetraciclina |
| Compuestos de Bismuto | <ul style="list-style-type: none">▪ Subsalicilato de bismuto▪ Citrato de bismuto |
| Inhibidores de la bomba de protones (IBP) | <ul style="list-style-type: none">▪ Omeprazol▪ Lansoprazol▪ Pantoprazol |

En nuestro país, el Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori* (CMHP) indica la erradicación de la bacteria únicamente en los casos en el que se presente:

1. Úlcera péptica activa o no, con o sin complicaciones.
2. Gastritis atrófica y metaplasia intestinal.
3. Linfoma gástrico tipo B en la zona marginal (tipo MALT).
4. Después de una resección gástrica parcial por cáncer.
5. Familiares cercanos a personas que han tenido cáncer gástrico y tienen *H. pylori*.
6. Pacientes con uso crónico de IBP's o AINES.
7. Pacientes con púrpura trombocitopenia idiopática y anemia por deficiencia de hierro de causa no explicada.

En relación a la **duración del tratamiento**, la mayoría de los estudios europeos concluyen que son suficientes 7 días de tratamiento; no obstante en Estados Unidos se ha propuesto prolongar la duración hasta 10-14 días (Lindt *et al.*, 1996; Laine *et al.*, 1996a).

El tratamiento utilizado en México, generalmente consiste en una triple terapia en la cual se prescriben inhibidores de la bomba de protones para eliminar la acidez del estómago y una combinación de antibióticos como la amoxicilina y la

claritromicina. Su efectividad alcanza entre un 70 y un 80% (Ladrón de Guevara *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2005).

1.5. Susceptibilidad y resistencia a antibióticos

La claritromicina y amoxicilina (**Fig. 8 b y c**, respectivamente), son los antibióticos más utilizados para el tratamiento contra *H. pylori*. En cuanto a la resistencia, la más frecuente es al metronidazol y es excepcional encontrar las resistencias a la amoxicilina y a la tetraciclina (Boixeda y Argila, 2000). Para el caso del metronidazol (**a**) la resistencia al antibiótico varía entre 10 y 50% pero en algunas regiones puede alcanzar hasta un 95% (Chiba *et al.*, 1992; Graham, 1993; Gerrits *et al.*, 2006).

La amoxicilina (**c**) es el antibiótico al que menos resistencia se ha encontrado, del 0 al 1.3%, aunque existen reportes que mencionan que la resistencia puede llegar hasta el 30% (Gerrits *et al.*, 2006). Se sabe que las bacterias Gram negativas frecuentemente se hacen resistentes a los β -lactámicos por la producción de la β lactamasa (rompe el anillo β -lactámico de las penicilinas), sin embargo, no se ha reportado ninguna cepa de *H. pylori* que produzca esta enzima (Okamoto *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2009). Se han descrito mutaciones en las proteínas de unión a penicilinas (PBPs), las cuales producen un decremento en la permeabilidad del antibiótico a través de la pared celular y alteraciones en las bombas y porinas. En cuanto a la tetraciclina (**d**), la resistencia a este antibiótico es menor de 2%, aunque la tasa más elevada reportada es del 10% (Kwon *et al.*, 2000; Gerrits *et al.*, 2006). Se ha visto que mutaciones en el RNAr 16S, impiden la unión del antibiótico al ribosoma.

Existen otros antibióticos contra *H. pylori* como es el caso de las fluoroquinolonas, sin embargo, son poco utilizadas por su bajo efecto en la erradicación de la bacteria, ya que son inactivadas por el jugo gástrico (Campo *et al.*, 2007).

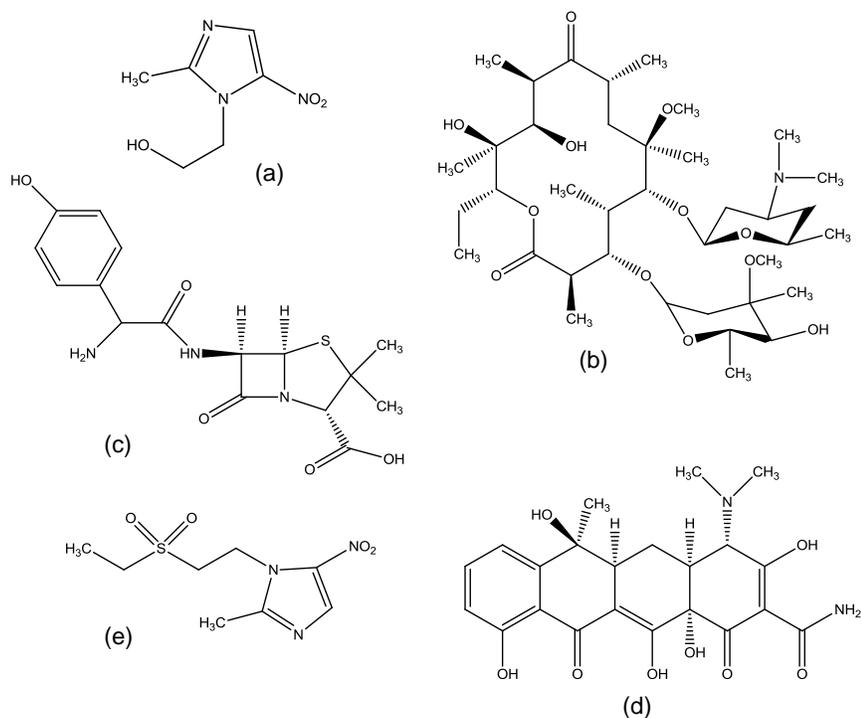


Fig. 8. Estructura química de los principales antibióticos utilizados en las terapias de erradicación de *H. pylori*. (a) Metronidazol, (b) Claritromicina, (c) Amoxicilina, (d) Tetraciclina y (e) Tinidazol.

1.6. Epidemiología: prevalencia y distribución geográfica

La infección por *H. pylori* es común, con un potencial de prevalencia de más del 50%, pero con importantes variaciones de país en país; las tasas de prevalencia difieren con la edad, raza/origen étnico y características socioeconómicas (Suerbaum y Michetti, 2002). Como regla general las tasas son más altas en países en desarrollo.

La prevalencia de *H. pylori* muestra una gran variación geográfica. En países en desarrollo, más del 80% de la población está infectada por *H. pylori*, presentándose a edad temprana (Pérez-Pérez *et al.*, 2004), mientras que en países industrializados alrededor del 40% de la población tiene la infección, y es considerablemente menor en niños y adolescentes que en adultos y personas mayores (Pounder y Ng, 1995; Mitchell, 2001).

1.7. *H. pylori* en México

En México, de acuerdo con la encuesta nacional de salud en la cual se utilizó serología como método de escrutinio en población abierta mostró una frecuencia global de 66%. Los resultados positivos se incrementaron en proporción directa a la edad y fue mayor al 80% en personas de 26 años o más (Torres *et al.*, 1998). Así mismo, se ha identificado que el 90% de personas con cáncer gástrico presentan infección por esta bacteria, el 85-90% de sujetos con úlcera péptica y 51-80% de enfermos con dispepsia funcional (Sobrino-Cossio *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha observado que en algunas regiones consideradas de mayor riesgo, como las zonas altas del estado de Chiapas donde existen grupos indígenas, se presenta alta incidencia de cáncer gástrico asociado a la bacteria (Molhar *et al.*, 2002). Mientras que en otros estados, como Morelos, se tiende a la disminución de la proporción de sujetos infectados en diferentes grupos de edades (Torres *et al.*, 2005).

El estudio realizado por Torres y colaboradores permitió la división del país en cuatro grupos tal como se indica en la **Fig. 9**, encontrando que en 4 estados de la República (Aguascalientes, Tabasco, Tlaxcala y Quintana Roo) se presenta el índice de mortalidad por cáncer gástrico más bajo (<4.0%), pero se encuentra el índice más alto por infección de *H. pylori* (70%). Por otra parte, 8 estados (Baja California Sur, Chiapas, Coahuila, Guerrero, Tamaulipas, San Luis Potosí, Sonora, Yucatán y Zacatecas) presentan el índice de mortalidad más alta por cáncer gástrico ($\geq 6.0\%$) con una seroprevalencia del 66%. De estos datos, el autor sugiere que el índice de mortalidad está íntimamente relacionado con el desarrollo económico en las diferentes zonas de nuestro país; los estados del norte tienen un índice más alto de mortalidad por cáncer gástrico que aquellos del sur, que poseen un desarrollo económico más bajo (Torres *et al.*, 2005).

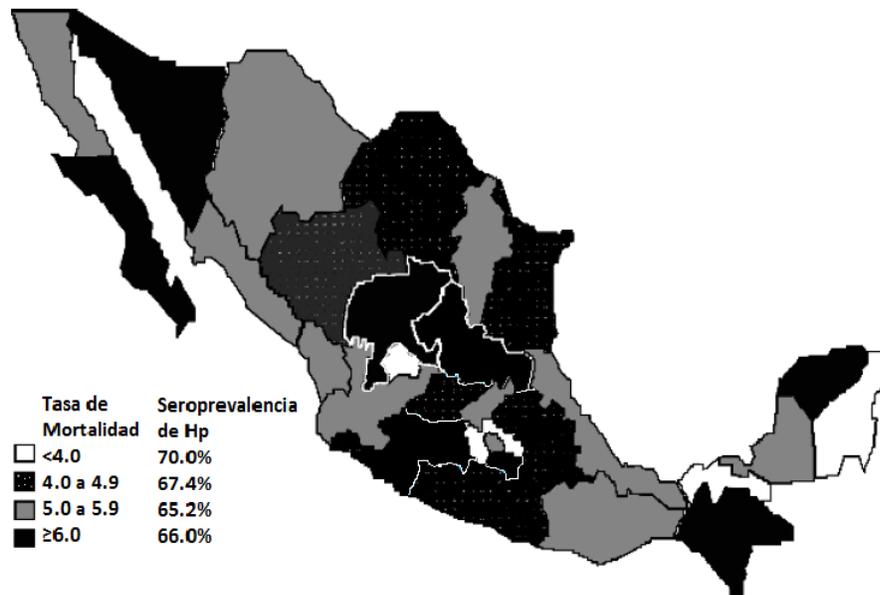


Fig. 9. Análisis de la distribución de proporciones de mortalidad de cáncer gástricas y la seroprevalencia de *H. pylori* en los 32 estados de México. Las proporciones de mortalidad de cáncer gástricas son aquellos informados por el Instituto Nacional de Geografía y Estadísticas, México (1991), considerando que los valores de seroprevalencia son de 1987 a 1988 en un estudio nacional (Tomado de Torres *et al.*, 2005).

1.8. Plantas medicinales empleadas en la medicina tradicional mexicana con actividad anti- *H. pylori*.

Las plantas han sido utilizadas durante siglos por distintos grupos humanos, ya que representan la principal fuente de productos naturales que, por sus propiedades terapéuticas, han sentado las bases de la medicina empírica, la que se ha mantenido vigente durante siglos sin que los conocimientos científicos modernos hayan podido prescindir de ellas (Linares *et al.*, 1999).

Las plantas medicinales tienen propiedades curativas que ya eran conocidas en la antigüedad, aunque también se han añadido al arsenal terapéutico otras plantas cuya utilidad ha sido descubierta recientemente. Las plantas medicinales continúan teniendo una gran importancia para personas que no tienen acceso a las medicinas modernas y además, muchos medicamentos utilizados hoy en día fueron desarrollados en gran medida sobre los mismos principios activos de origen vegetal (Gupta, 1995).

Hoy en día, la medicina oficial está incorporando el uso de las plantas curativas, por lo cual ya se puede contar con el valioso asesoramiento de médicos y farmacéuticos para tratamientos medicinales con hierbas y no arriesgarse a una total automedicación, de dudosas consecuencias (Guerra, 1990; Martínez *et al.*, 1994).

En México se cuenta con una vasta herencia prehispánica, mesoamericana, evidenciada por el abundante recurso de hierbas medicinales que se describe, por ejemplo, en el Códice de la Cruz-Badiano, que contiene 185 plantas con la descripción de sus características físicas, el modo de preparación como remedio y la manera de empleo en diversas situaciones patológicas.

Se tiene estimado que existen cerca 30,000 especies de plantas de las cuales, en 1997, el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 con usos medicinales, esto es el 10% del total de la riqueza florística del país (Argueta *et al.*, 1994).

Existe un amplio cúmulo de especies vegetales, cuya acción terapéutica aún no se ha confirmado, por lo que es necesario revalorar el saber tradicional popular con respecto al uso de plantas. La investigación científica de las propiedades medicinales de estas ayudará a promover el uso sustentable de especies de plantas con potencial farmacológico de una forma racional, al igual que el desarrollo de fitomedicamentos.

Antes del descubrimiento de *H. pylori* como un agente etiológico de la gastritis crónica y úlcera péptica, se creía que estas patologías se debían únicamente a un desequilibrio entre los factores defensivos y los agresivos de la mucosa gástrica, causado básicamente por el exceso de acidez, el estrés, la ingesta de algunos productos como el alcohol, los irritantes y algunos medicamentos. Los estudios de plantas con potencial anti-ulceroso eran realizados, por lo tanto, en modelos de daño gástrico producidos por métodos químicos y físicos (ligadura del píloro, estrés, administración de antiinflamatorios no esteroideos, ácido clorhídrico o etanol) y las actividades que se reportan tenían

que ver únicamente con efectos gastroprotectores y/o inhibidores de la secreción de ácido (Castillo-Juárez y Romero, 2007).

Hace 29 años que Marshall y Warren propusieron que la gastritis y la úlcera péptica eran producidas principalmente por *H. pylori*. Actualmente se están buscando agentes derivados de plantas (extractos, fracciones o compuestos puros) con una acción directa sobre ella, y de igual manera, se han desarrollado modelos animales, en el que la gastritis y úlcera péptica se producen únicamente por la infección de la bacteria (Borelli e Izzo, 2000).

El primer reporte que se tiene sobre la búsqueda de propiedades anti- *H. pylori* de plantas es el de Cassel-Beraud y colaboradores en 1991, quienes observaron que de trece plantas medicinales estudiadas, cinco presentaron una actividad contra la bacteria. Es a partir de los últimos 10 años, que este tipo de estudios ha aumentado considerablemente.

Cabe señalar que en México, no obstante su gran diversidad biológica y su amplia cultura tradicional en el uso de plantas medicinales, se han realizado pocos estudios que evalúan la actividad anti-*H. pylori* de especies vegetales; el primero de ellos realizado por un grupo de investigadores europeos, sobre algunas plantas utilizadas en la medicina Maya Yucateca, en el cual identificaron extractos de tres especies con actividad contra la bacteria (Ankli *et al.*, 2002). El segundo y tercero fueron realizados por nuestro grupo de trabajo; en uno de ellos se analizó el potencial de 53 plantas medicinales de todo el país, de las cuales el 77% mostró alguna actividad contra la bacteria (Castillo-Juárez *et al.*, 2009), en el otro se identificó a los ácidos anacárdicos del cuachalalate como los principales productos anti- *H. pylori* (Castillo-Juárez *et al.*, 2007). Por último, el realizado por Robles-Zepeda y col. en el cual se evaluó la actividad anti- *H. pylori* de los extractos metanólicos de 17 plantas mexicanas utilizadas principalmente en la parte noroeste de México (Sonora) para el tratamiento empírico de los trastornos gastrointestinales, obteniendo concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) que oscilan entre menos de 200 a 400 µg/mL para 10 especies, mayores de 800

µg/mL para 6 especies y una no mostró actividad contra la bacteria. (Robles-Zepeda *et al.*, 2011).

Castillo-Juárez y Romero reportan que hasta el 2007 se había estudiado un total de 327 plantas a nivel mundial, tanto de uso medicinal como comestible y de las cuales al 60.8% se les encontró un efecto anti-*H. pylori*. El principal inconveniente sobre estos trabajos es que en su mayor parte sólo se han realizado *in vitro* y las condiciones que se han utilizado presentan una gran variación (tamaño del inóculo, cepa bacteriana, tiempo de incubación, falta de uso de antibióticos de referencia, entre otras) que dificulta la realización de un análisis comparativo de efectividad, o la definición de un intervalo de inhibición significativo (Castillo-Juárez, 2005; Castillo y Romero, 2007).

Como se ha mencionado previamente, muchas de las plantas que han resultado activas contra *H. pylori* tienen una larga historia de uso tradicional como remedios a base de agua para el tratamiento de afecciones gastrointestinales (Argueta *et al.*, 1994). Tal es el caso de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* la cual fue estudiada por Castillo-Juárez y col. (2009) y de la que el extracto acuoso presentó buena actividad anti- *H. pylori* respecto a los antibióticos de referencia (CMI= 125 µg/mL). Con base en estos datos es que en la presente tesis se ha planteado el fraccionamiento biodirigido y la determinación de los constituyentes activos del extracto acuoso de esta especie utilizada en la medicina tradicional mexicana. Puesto que la resistencia de *H. pylori* a los antibióticos, ha sido un problema creciente en los últimos años, los resultados obtenidos también contribuirán en la búsqueda y desarrollo de nuevas terapias contra la bacteria.

1.9. Generalidades de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) D.D. Keck.

El género *Artemisia* es una de los más grandes y más ampliamente distribuidos de la familia Asteraceae (Compositae). Es un género heterogéneo, que consiste en más de 500 especies distribuidas principalmente en las zonas templadas de Europa, Asia y América del Norte. Estas especies son perennes,

hierbas bienales y anuales o arbustos pequeños (Bora y Sharma, 2011). *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) D.D. Keck (a la que nos referiremos en adelante únicamente como *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*), es quizás la subespecie presente en el Valle de México más importante por su amplio uso medicinal y cultural (Colin, 2002).

A. ludoviciana subsp. *mexicana* (**Fig. 10**) es una planta herbácea, que puede alcanzar hasta 1.5 m de alto; es perenne, aromática, con varios tallos estriados; sus hojas miden hasta 15 cm de largo, de color blanco tomentosas en ambas caras; receptáculo hemisférico; flores periféricas. En México la planta florece entre los meses de agosto y noviembre.



Fig. 10. Ejemplares de la especie *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*. **A)** Imagen de la especie tomada del Atlas de plantas medicinales mexicanas, UNAM; CONABIO. **B)** Ejemplar de la especie *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* del Missouri Botanical Garden. (www.tropicos.org, 12 Feb 2012).

Es originaria de los Estados Unidos de América, México y Guatemala (**Fig. 11**). Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, desde el nivel del mar a los 3900 msnm. Cultivada en huertos familiares, crece a orillas de caminos, en terrenos de cultivo abandonados. (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM).



Fig. 11. Distribución geográfica de la especie medicinal *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*. El mapa esta basado en una marca de referencia estándar en base al número de bibliografías disponibles en W^3 tropicos (Tomada de: www.tropicos.org, Missouri Botanical Garden, 12 Feb 2012).

En cuanto a su distribución en México, se encuentra en el norte y centro del país, sobre todo en el altiplano: Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Villaseñor y Espinosa, 1998).

1.9.1. Sinonimia popular

Estafiate, ajeno, ajeno del país, altamiza, altaniza, artemisia, azumate de Puebla, cola de zorrillo, ensencio de mata verde, epazote de castilla, estomiate, hierba maestra, hierba maistra, incienso, incienso verde (Heike, 2009; Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, UNAM, 20 Oct 2012).

Se emplea una diversidad de nombres de acuerdo a la zona geográfica:

- Estado de México: ambfe (otomí), istafiatl
- Hidalgo: iztauhyaitl (planta que produce agua blanquecina) (náhuatl)
- Michoacán: iztauhyatl;
- Puebla: guietee, iztauhyatl, kamaistra (popoloca)
- Quintana Roo: haway, kaway si' isim ts'tsim, osomiate
- Veracruz: xun
- San Luís Potosí: tsakam ten huitz, ten ts'ojol (tenek)
- Chihuahua: ros'sabl'i (rarámuri)

1.9.2. Sinonimia botánica

Artemisia ludoviciana subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) D.D. Keck presenta varias sinonimias de acuerdo al Missouri Botanical Garden (www.tropicos.org, 12 Feb 2012), al Sistema Integrado de Información Taxonómica (SIIT) y CONABIO (www.conabio.gob.mx, 12 Feb 2012).

- *Artemisia ludoviciana* Nutt.
- *Artemisia ghiesbreghtii* Rydb.
- *Artemisia indica* var. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) Besser
- *Artemisia ludoviciana* var. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) Fernald
- *Artemisia mexicana* Willd. ex Spreng.
- *Artemisia muelleri* Rydb.
- *Artemisia neomexicana* Greene ex Rydb.
- *Artemisia revoluta* Rydb.
- *Artemisia vulgaris* subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) H.M. Hall & Clem.
- *Artemisia vulgaris* var. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) Torr. & A. Gray
- *Oligosporus mexicanus* (Willd. ex Spreng.) Less.

1.9.3. Etnobotánica

Son múltiples los padecimientos que conciernen al aparato digestivo y para los cuales el estafiate se emplea frecuentemente. Entre ellos está recomendada a nivel nacional para el tratamiento del dolor de estómago, retortijones, cólicos estomacales o intestinales, dolor e inflamación en la boca del estómago; problemas menstruales, como abortivo, durante el puerperio, en baños postparto; para el reumatismo; corrige la digestión, para el estreñimiento, gastritis, gastroenteritis, indigestión, disentería, empacho, aire, susto, coraje o nervios, para la vesícula, esterilidad femenina, para curar heridas, granos, circulación de la sangre, hemorroides, riñones, diabetes, dolor de oído; dolor de cabeza, mareos, retraso menstrual y dolor de ciática (Argueta *et al.*, 1994). El Instituto Médico Nacional lo considera como: antiparasitaria, eupéptica, antipalúdica, catártica, oxitócica, así como que produce parálisis.

Las partes aéreas del estafiate se ingieren, generalmente como infusión, solas o mezcladas, dependiendo del uso. Así, en el caso de diarrea, se ingiere el cocimiento solo o mezclado con otras plantas como hierbabuena (*Mentha piperita*), marrubio (*Marrubium vulgare*) y manzanilla (*Matricaria recutita*); otras especies con las que se mezcla son la hoja de aguacate (*Persea americana*) y la guayaba (*Psidium guajava*). Cuando hay parásitos intestinales, se recomienda beber el cocimiento del estafiate solo o acompañado de epazote (*Telexys ambrosioides*), ajeno (*Artemisia absinthium*) o con hierbabuena (*M. piperita*) en ayunas. En bilis o coraje (padecimiento que se origina según el reporte popular por un coraje fuerte) se toma la cocción igual que en padecimientos del hígado, ya sean dolores, inflamación o cualquier tipo de afección hepática. Se utilizan preparados alcohólicos con plantas como el albahaca (*Ocimum basilicum*) aplicando fomentos en caso de “aire” o “mal aire”; también se usan contra el reumatismo, frotando la parte afectada estos preparados hechos a base de hojas de estafiate, aguacate (*P. americana*), alcanfor, aceite de oliva, cempasúchil (*Tagetes erecta*), albahaca y jengibre (*Zingiber officinale*) (Heike, 2009).

Asimismo, se emplea en padecimientos respiratorios como anginas, bronquitis, catarros, resfríos, tos, tosferina y otros. El uso del estafiate para estos padecimientos, es en forma de gárgaras, frotado, inhalado o por vía oral.

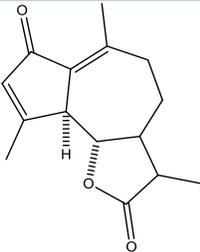
La Sociedad Farmacéutica de México la describe como: antiparasitaria y eupéptica (favorece digestión de los alimentos).

Esta especie no es considerada en peligro de extinción ya que es ampliamente cultivada.

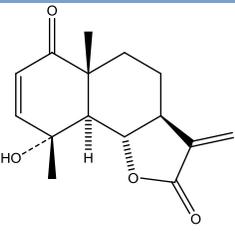
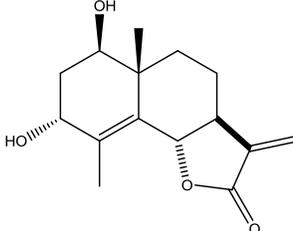
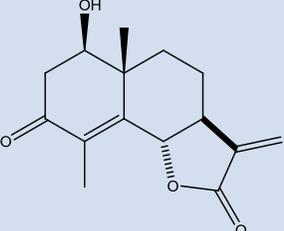
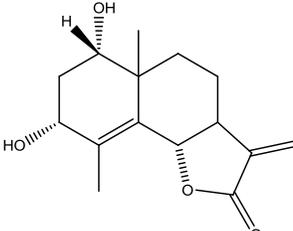
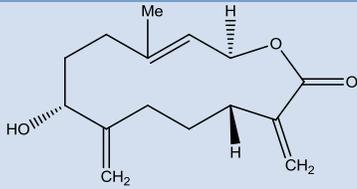
1.9.4. Aspectos químicos

A. ludoviciana subsp. *mexicana* presenta una gran variedad de metabolitos a los cuales se les atribuyen dichas propiedades curativas. Se han realizado trabajos en los cuales se han identificado que los metabolitos mas abundantes en esta planta se encuentran dentro de la categoría de los monoterpenoides que le dan un olor fuerte muy característico, lactonas sesquiterpénicas y flavonoides. En el siguiente cuadro se resumen los compuestos aislados presentes en la especie.

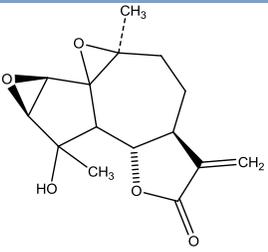
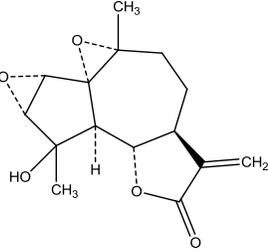
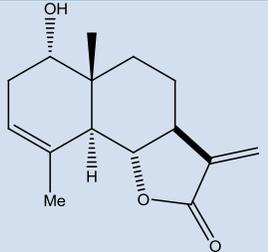
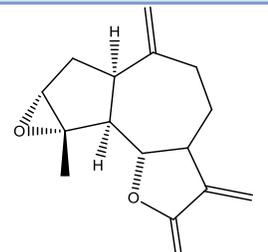
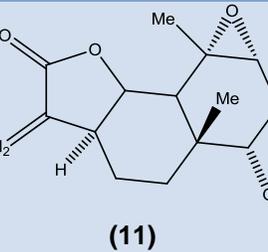
Cuadro 5. Compuestos aislados de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* y sinónimos.

| Lactonas sesquiterpénicas | | |
|--|-----------|----------------------|
| Estructura química | Nombre | Referencia |
|  <p>(1)</p> | Achillina | Balderas-López, 2006 |

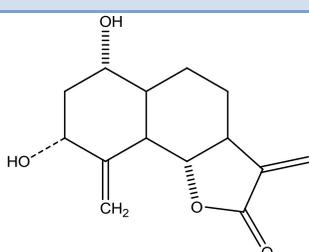
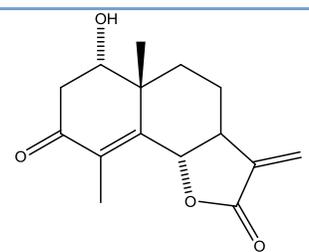
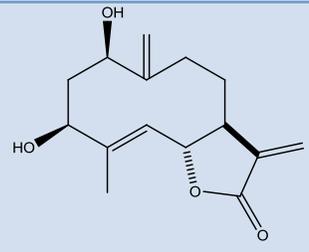
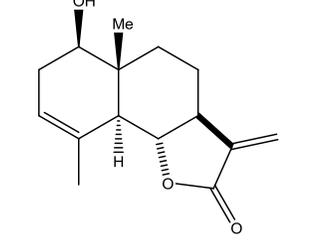
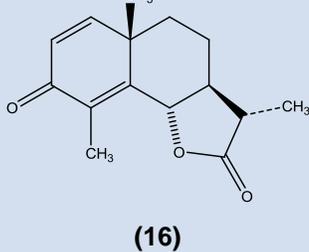
Continuación. Compuestos aislados de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* y sinónimos.

| Lactonas sesquiterpénicas | | |
|--|--------------------|---|
| Estructura química | Estructura química | Estructura química |
|  <p>(2)</p> | Arglanina | Ruiz-Cancino, 1993 Romo <i>et al.</i> , 1970 |
|  <p>(3)</p> | Armefolina | Ruiz-Cancino, 1993 |
|  <p>(4)</p> | Armexifolina | Irwin <i>et al.</i> , 1969 |
|  <p>(5)</p> | Armexina | Romo y Tello, 1972 |
|  <p>(6)</p> | Artemorina | Ruiz-Cancino, 1993 |

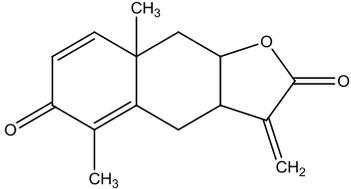
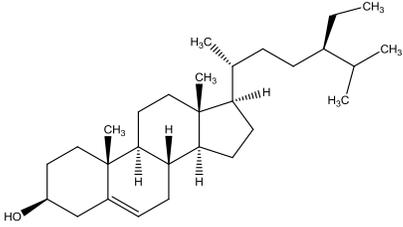
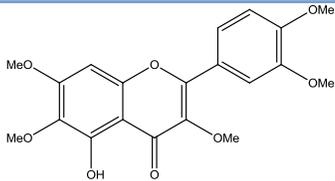
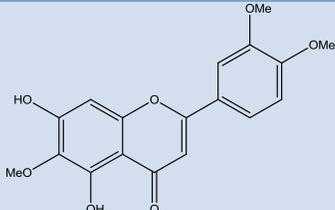
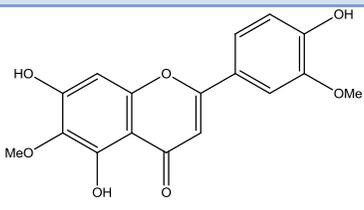
Continuación. Compuestos aislados de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* y sinónimos.

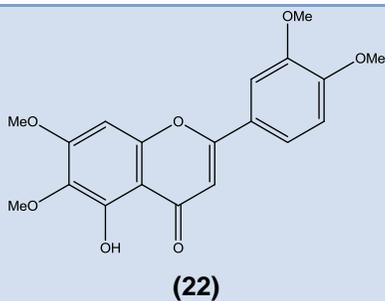
| Lactonas sesquiterpénicas | | |
|---|----------------|--|
| Estructura química | Nombre | Referencia |
|  <p>(7)</p> | Crisartemina A | Romo <i>et al.</i> , 1970 |
|  <p>(8)</p> | Crisartemina B | Ruiz-Cancino, 1993 Romo <i>et al.</i> , 1970 |
|  <p>(9)</p> | Douglanina | Ruiz-Cancino, 1993 Lee y Geissman, 1970 Sánchez-Viesca y Romo, 1963 Romo <i>et al.</i> , 1970 |
|  <p>(10)</p> | Estafiatina | Sánchez-Viesca y Romo, 1963 |
|  <p>(11)</p> | Ludovicina A | Ruiz-Cancino, 1993 Lee y Geissman, 1970 |

Continuación. Compuestos aislados de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* y sinónimos.

| Lactonas sesquiterpénicas | | |
|---|--------------|---|
| Estructura química | Nombre | Referencia |
|  <p>(12)</p> | Ludovicina B | Lee y Geissman, 1970 |
|  <p>(13)</p> | Ludovicina C | Lee y Geissman, 1970 |
|  <p>(14)</p> | Ridentina | Ruiz-Cancino, 1993 |
|  <p>(15)</p> | Santamarina | Ruiz-Cancino, 1993 |
|  <p>(16)</p> | Santonina | Lee y Geissman, 1970 Balderas-López, 2006 Kelsey y Shafizadet, 1979 |

Continuación. Compuestos aislados de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* y sinónimos.

| Estructura química | Nombre | Referencia |
|---|----------------------|----------------------|
|  <p>(17)</p> | Yomogina | Lee y Geissman, 1970 |
|  <p>(18)</p> | β - sitosterol | Ruiz-Cancino, 1993 |
| Flavonoides | | |
| Estructura química | Nombre | Referencia |
|  <p>(19)</p> | Artemetina | Balderas-López, 2006 |
|  <p>(20)</p> | Eupatilina | Ruiz-Cancino, 1993 |
|  <p>(21)</p> | Jaceosidina | Ruiz-Cancino, 1993 |



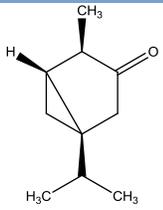
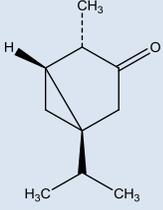
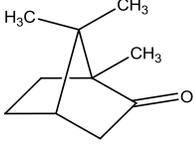
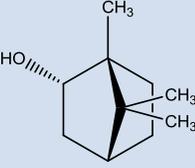
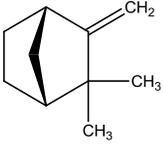
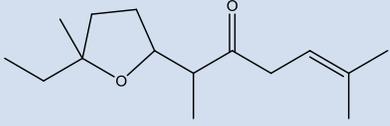
5'-hidroxi-3'4',6,7-
tetrametoxiflavona

Balderas-López, 2006

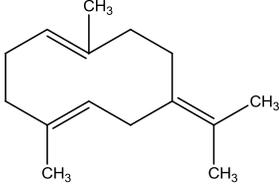
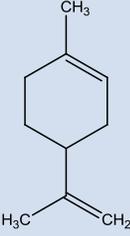
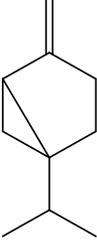
Continuación. Compuestos aislados de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* y sinónimos.

| Aceite esencial | | |
|--|--------------------------------|---|
| Estructura química | Nombre | Referencia |
| <p style="text-align: center;">(23)</p> | 1,8- cineol | Lopes-Lutz <i>et al.</i> , 2008 Blagojevic <i>et al.</i> , 2006 Govindaraj <i>et al.</i> , 2008 |
| <p style="text-align: center;">(24)</p> | α - pineno | Heike, 2009 |
| <p style="text-align: center;">(25)</p> | β - cariofileno | Govindaraj <i>et al.</i> , 2008 |
| <p style="text-align: center;">(26)</p> | β - óxido de cariofileno | Blagojevic <i>et al.</i> , 2006 |

Continuación. Compuestos aislados de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* y sinónimos.

| Aceite esencial | | |
|---|-------------------|---|
| Estructura química | Nombre | Referencia |
|  <p>(27)</p> | α - tujona | Govindaraj <i>et al.</i> , 2008 |
|  <p>(28)</p> | β - tujona | Blagojevica <i>et al.</i> , 2006 |
|  <p>(29)</p> | Alcanfor | Lopes-Lutz <i>et al.</i> , 2008 Blust y Hopkins, 1987 Govindaraj <i>et al.</i> , 2008 |
|  <p>(30)</p> | Borneol | Blust y Hopkins, 1987 |
|  <p>(31)</p> | Camfeno | Govindaraj <i>et al.</i> , 2008 |
|  <p>(32)</p> | Davanona | Lopes-Lutz <i>et al.</i> , 2008 |

Continuación. Compuestos aislados de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* y sinónimos.

| Aceite esencial | | |
|--|--------------|---------------------------------|
| Estructura química | Nombre | Referencia |
|  <p>(33)</p> | Germacrene D | Govindaraj <i>et al.</i> , 2008 |
|  <p>(34)</p> | Limoneno | Heike, 2009 |
|  <p>(35)</p> | Sabineno | Blust y Hopkins, 1987 |

1.9.5. Actividad biológica

Se han realizado diversos estudios científicos sobre la especie *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* que han permitido demostrar que algunos de sus extractos poseen diversas propiedades farmacológicas.

Es recomendado en padecimientos gastrointestinales como trastornos de la secreción, motilidad o sensibilidad gástrica que perturben la secreción, resulta útil ya que favorece la excreción de jugos gástricos y por su efecto antiespasmódico también se emplea para controlar dolores tipo cólico en casos de litiasis biliar (Rojas-Alva, 2006).

El mejor efecto que se ha observado de esta planta es el antihelmíntico puesto que se suministró la planta en diferentes formas (cápsulas, aceite esencial o polvo de flores) en pacientes con signos y síntomas de parásitos, obteniéndose una mejoría notable en ellos. Por lo tanto, se comprobó que el estafiate presenta efectos antiparasitarios y eupépticos (Terres, 1897; Castanedo, 1906).

Malagón y colaboradores (1997) demostraron que el extracto etanólico del estafiate presenta un efecto antimalárico del protozooario *Plasmodium yoelii*. Así mismo, a varios extractos (acuoso, metanólico, hexánico y acetónico) del estafiate se les comprobó su actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Fernández *et al.*, 2005; Calzada *et al.*, 2006). Se demostró que el nonanal del aceite esencial de *A. ludoviciana* es el responsable de la actividad antidiarreica de la planta (Zavala-Sánchez *et al.*, 2002). Se ha comprobado que el extracto metanólico del estafiate presenta un efecto antibacteriano puesto que inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* y *Shigella flexnery-2* (Alanís *et al.*, 2005; Dubal *et al.*, 2009) así como las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Navarro *et al.*, 1996). En otros estudios se demostró que el extracto etanólico presenta de igual manera efecto inhibitorio del crecimiento y producción de enterotoxinas en cepas de *Vibrio cholerae* (García *et al.*, 2006); en otro trabajo se demostró que presenta un efecto antiinflamatorio inhibiendo al factor de transcripción NF-κB (Bork *et al.*, 1996; 1997). Jiménez-Arellanes y colaboradores (2003) observaron que tanto el extracto hexánico como el extracto metanólico del estafiate inhibían el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis. Castillo-Juárez y colaboradores (2009) demostraron que el extracto acuoso de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* inhibe el crecimiento de *H. pylori*, principal agente causal de la gastritis y úlcera péptica. El estafiate también inhibe el crecimiento de *Candida albicans* (Navarro *et al.*, 1996), así como también inhibe el crecimiento de otras plantas (efecto alelopático atribuido a la presencia de la lactona sesquiterpénica achilina) (Rodríguez *et al.*, 1976).

En cuanto a la actividad gastroprotectora se han realizado estudios sobre otras especies de *Artemisia* en los cuales se demostró dicha actividad.

Penissi y colaboradores demostraron que una lactona sesquiterpénica dehidroleucodina (DhL), aislada de *A. douglasiana* Besser, conocida comúnmente como “matico”; previene el daño gástrico producido por agentes inductores de la necrosis como el etanol absoluto, evidenciando su actividad citoprotectora. Este efecto protector se relaciona con la capacidad del compuesto para estimular la producción de moco (Giordano *et al.*, 1990; Penissi *et al.*, 1998). Y en 2009 analizaron el extracto clorofórmico de esta especie evaluando a la DhL en la degranulación de mastocitos inducida por un compuesto denominado 48/80, los estudios de liberación de serotonina llevados a cabo mostraron la efectividad del compuesto como estabilizador de la respuesta de los mastocitos (estas células median los procesos inflamatorios y alérgicos) (Penissi *et al.*, 2009). Por otra parte, Repetto y colaboradores demostraron que el extracto acuoso de esta especie reduce o previene el estrés oxidativo en un modelo de úlcera gástrica inducida por etanol (Repetto *et al.*, 2003 y 2002).

Mediante estudios realizados en el modelo de úlcera inducida por indometacina en ratas, se demostró la actividad antiulcerogénica del extracto etanólico crudo y de la fracción de lactonas sesquiterpénicas de la parte aérea de la especie *A. annua* L. La cromatografía en columna de la fracción de lactonas sesquiterpénicas dio tres fracciones de diferente polaridad (no polar, polaridad media y fracción polar), resultando en diferentes niveles del índice de inhibición de lesión ulcerosa; sin embargo, la fracción de polaridad media mantiene su actividad gastroprotectora en un modelo de úlcera inducida por etanol cuando existe un tratamiento previo con el éster metílico de la L-Nitroarginina (L-NAME) o N-etilmaleimida (NEM) (Dias *et al.*, 2001; Falcão *et al.*, 2008).

Otra especie con estudios de actividad gastroprotectora es *A. asiática*. El extracto etanólico estandarizado de esta especie (DA- 9601) es considerado como gastroprotector, ya que inhibe al TNF- α inducido por las señales inflamatorias en la línea celular de adenocarcinoma gástrico (AGS). Se realizó un tratamiento previo de las células AGS con DA-9601 reduciendo así el TNF- α inducido por IL-8 y CCL20 así como el bloqueo de la activación de NF- κ B (Suck-Chei *et al.*, 2006).

En cuanto a la especie *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* no se han realizado estudios que denoten su actividad gastroprotectora ni se han identificado los compuestos responsables de la actividad antibacteriana, es por eso que en el presente trabajo se plantea evaluar estas actividades en el extracto acuoso de la especie.

2. JUSTIFICACIÓN

A partir de que se declara a *H. pylori* como el agente infeccioso causante de la gastritis se ha realizado una amplia investigación encaminada a la búsqueda de terapias adecuadas para su tratamiento. Actualmente se han tenido buenos resultados utilizando las terapias triple y cuádruple, así como también, se han planteado varios criterios para su erradicación. No obstante los tratamientos son complejos (dos antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones) y conllevan efectos secundarios perjudiciales, lo que hace que los pacientes no los terminen, permitiendo la aparición de resistencia a los antibióticos comerciales. Por otra parte, se presenta reincidencia de la enfermedad en pacientes que han tenido un tratamiento previo y siguen viviendo bajo las mismas condiciones en las que se infectaron.

Tomando en cuenta lo anterior, surge la necesidad de desarrollar mejores esquemas terapéuticos y sobre todo, de encontrar nuevos principios activos que ayuden a combatir los problemas de salud en los cuales *H. pylori* este relacionada.

La fuente original de muchos fármacos han sido los productos naturales y en particular las plantas medicinales, es por esta razón que se ha buscado en ellas algún agente para el control de los padecimientos antes mencionados.

En un trabajo previo del laboratorio se identificaron algunas plantas de la medicina tradicional mexicana cuyos extractos acuosos presentaron actividad contra *H. pylori* (Castillo-Juárez *et al.*, 2009). Una de ellas es *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*, una planta ampliamente utilizada en las prácticas médicas populares de nuestro país para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales (Argueta *et al.*, 1994; Alanís *et al.*, 2005).

Es de interés encontrar dentro de la flora medicinal de nuestro país especies que no solo ejerzan efectos inhibitorios sobre el crecimiento de la bacteria sino también que sean seguras para el paciente y ofrezcan beneficios adicionales como la protección de la mucosa gástrica. En este sentido, se planteó el presente proyecto de tesis, con la finalidad de evaluar la actividad anti-*H. pylori*

del extracto acuoso de esta especie medicinal y establecer si puede ser un candidato para la obtención de compuestos útiles en el tratamiento y/o erradicación de esta bacteria del ser humano. Así mismo, explorar su posible toxicidad aguda y su potencial efecto gastroprotector, ya que no existen reportes acerca de su evaluación antiulcerogénica. Esta información permitirá validar, de manera parcial, el uso etnofarmacológico que se le da a esta especie.

3. OBJETIVOS

3.1. Generales

Aislar, purificar y caracterizar, de manera biodirigida, a los principios responsables de la actividad anti-*Helicobacter pylori* del extracto acuoso de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* con el propósito de que estos nuevos principios activos puedan ser utilizados en el futuro para el tratamiento de los diversos padecimientos relacionados con la bacteria.

3.2. Particulares

- Preparar el extracto acuoso de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* (**ALI**) por infusión y evaluar su actividad anti- *H. pylori*.
- Evaluar los efectos tóxicos agudos de **ALI** en animales de laboratorio.
- Fraccionar de manera biodirigida el extracto acuoso mediante particiones líquido-líquido con distintos disolventes orgánicos y evaluar su actividad anti- *H. pylori*.
- De la fracción más activa, realizar los fraccionamientos sucesivos biodirigidos necesarios hasta aislar y purificar algún metabolito bioactivo.
- Evaluar la actividad anti- *H. pylori* de los compuestos puros.
- Evaluar de manera preliminar el potencial gastroprotector de la especie medicinal en el modelo de úlceras inducidas con etanol absoluto en ratones.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. Material vegetal.

Las partes aéreas de la especie medicinal *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) D.D. Keck utilizadas en esta investigación fueron obtenidas frescas en el Mercado de Sonora en el Distrito Federal, Delegación Venustiano Carranza. Posteriormente, el material fue secado y molido.

La clasificación botánica de esta especie estuvo a cargo de la Mtra. Edelmira Linares y del Dr. Robert Bye, del Instituto de Biología, UNAM. Un ejemplar de referencia se encuentra en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU) del Jardín Botánico del mismo Instituto con No. de registro 1259898.

4.2. Preparación y fraccionamiento primario del extracto acuoso de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana*.

La infusión se preparó de la siguiente manera: Se pesaron 10 g de material vegetal seco y molido, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL adicionándole 250 mL de agua hirviendo; la mezcla se dejó reposar durante 30 minutos. Posteriormente, se filtró por gravedad para obtener el extracto libre de material vegetal (**ALI**). Este proceso se escaló a 50 g por extracción y se repitió cuantas veces fue necesario hasta extraer un 1.5 kilogramos de material vegetal.

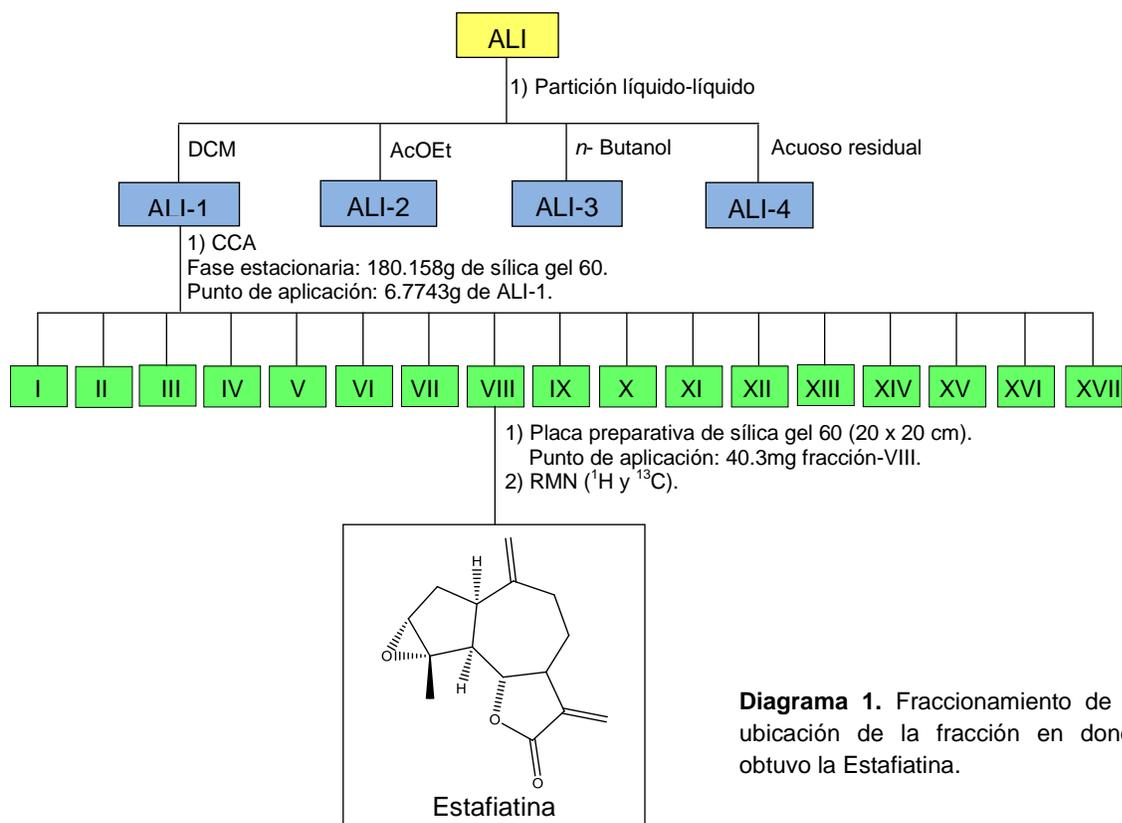
Posteriormente, la infusión se sometió a un fraccionamiento primario por particiones sucesivas con disolventes de distinta polaridad [diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOEt) y *n*-Butanol]. Las fases orgánicas y la acuosa residual obtenidas se concentraron a sequedad y se pesaron los residuos.

4.3. Fraccionamiento, aislamiento y caracterización de la Estafiatina (10).

Para el estudio fitoquímico de la fracción diclorometánica (**ALI-1**) se realizó un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta (CCA) siguiendo las técnicas convencionales, en una columna de vidrio empacada con 180.158 g de gel de sílice Merck 60, gránulo de 0.2-0.5 mm, malla 3.5 a 7.0 ASTM y utilizando 6.7743 g de **ALI-1**. La columna fue eluída con diferentes mezclas de disolventes desde Hexano-DCM [(1-0)→(0-1)] y DCM-MeOH [(1-0)→(0-1)].

Para efectuar la cromatografía en capa fina (CCF) de la fracción **ALI 1-VIII** se utilizaron placas de vidrio y aluminio recubiertas de gel de sílice (Sílica gel 60 GF254, Merck), utilizando varios sistemas de elución y sulfato cérico como agente cromógeno.

Para la identificación del compuesto aislado se envió una muestra al Instituto de Química. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN-¹H) y de carbono (RMN-¹³C) se realizaron en un equipo Varian Inova 500 utilizando cloroformo deuterado (CDCl₃) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.



4.4. Ensayos biológicos

4.4.1. Evaluación del efecto anti- *H. pylori in vitro* del extracto acuoso íntegro, fracciones y producto puro.

4.4.1.1. Condiciones de cultivo y crecimiento de *H. pylori*.

Se utilizó la cepa de colección de *H. pylori* ATCC 43504. La bacteria se cultivó en cajas Petri con una base de agar Casman suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinado y 10 mg/L de vancomicina a 37°C bajo condiciones microaerófilas (10% de CO₂ y 5% O₂). Después de 24 horas de incubación en la atmósfera microaerófila descrita, el cultivo se observa como un tapete translúcido, el cual se colecta en medio de cosecha y se guarda a -80°C hasta su utilización. Las cepas se identificaron mediante su morfología en una tinción de Gram y por pruebas bioquímicas.

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y cosecha fueron los siguientes:

- **Placas para cultivo.** Se resuspenden 42 g/L de agar Casman en agua destilada. Se esteriliza a 121°C por 20 min en la autoclave, se deja enfriar y se agregan 4 antibióticos: vancomicina 10 mg/L, anfotericina 2 mg/L, polimixina B 2.5 mg/L, trimetoprima 5 mg/L y sangre de carnero al 5%.
- **Medio de cosecha.** Se resuspende 28 g/L de caldo Brucella (DIFCO) en agua bidestilada, se le adiciona glicerol al 10% y se esteriliza a 121°C durante 20 min, se deja enfriar y se agrega 10% de suero fetal bovino estéril y vancomicina 10 mg/L.
- **Placas para cuenta viable o determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC).** Se resuspenden 42 g/L de agar Casman en agua destilada y β-ciclodextrina al 0.2% se esteriliza al 121°C por 20 min, se deja enfriar y se agrega vancomicina 10 mg/L.

4.4.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

La evaluación del extracto acuoso íntegro, fracciones y el producto puro se realizó en caldo de cultivo de acuerdo a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). El medio de cultivo utilizado contenía caldo Mueller-Hinton (DIFCO) en agua destilada y β -ciclodextrina al 0.2%, se esteriliza a 121°C por 20 min, se deja enfriar y se agregan los siguientes antibióticos: vancomicina 10 mg/L (evita el crecimiento de bacterias Gram positivas), anfotericina 2 mg/L (evita el crecimiento de hongos), polimixina B 2.5 mg/L (evita el crecimiento de otras bacterias Gram negativas) y trimetoprima 5 mg/L (evita el crecimiento de bacterias Gram positivas).

El extracto, fracciones y la estafiatina se disolvieron en DMSO para obtener concentraciones finales de 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 $\mu\text{g/mL}$. De éstas diluciones, 10 μL fueron adicionados a 1.5 mL de cultivo conteniendo $\sim 10^7$ UFC/mL de *H. pylori* que se encontraba en la fase logarítmica de su crecimiento. La absorbencia de cultivo fue determinada al inicio y después de 24 horas de incubación en agitación (150 rpm) a 37°C bajo condiciones microaerofílicas. La diferencia en la absorbencia fue utilizada para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento de la bacteria en presencia de la muestra experimental con respecto a un control que creció solo con DMSO (10 μL , que no tienen efecto sobre el crecimiento de la bacteria). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Amoxicilina y metronidazol fueron usados como antibióticos de referencia para dar validez a los resultados.

La CMI se obtiene de la siguiente manera:

- Cálculo del cambio de absorbencia (ΔA_{600}) de cada cultivo tanto de controles como de los experimentales.

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

A_f = Absorbencia final del cultivo bacteriano

A_i = Absorbencia inicial del cultivo bacteriano

- Obtención del crecimiento bacteriano (%C), utilizando el valor promedio de los controles ($\bar{x} A_c$) y de los experimentales ($\bar{x} A_e$), mediante la siguiente fórmula.

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

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

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

NOTA 1. Los medios se dejaron enfriar (~50°C) antes de agregar los antibióticos y la sangre, para evitar la desnaturalización de los primeros y la coagulación de la sangre.

NOTA 2. La anfotericina se disuelve en DMSO, mientras que los otros tres antibióticos se disuelven en agua destilada estéril.

4.4.3. Animales de experimentación

Los ensayos se realizaron utilizando ratones macho de la cepa CD-1 con pesos entre 20-25 g para los ensayos de toxicidad aguda y 40-45 g para los ensayos de actividad gastroprotectora adquiridos en el Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

Todos los experimentos se realizaron conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 que indica las especificaciones técnicas para la reproducción, cuidado y manipulación de animales de experimentación. De igual forma, en concordancia con reglas internacionales sobre cuidado de los animales de laboratorio (NIH, 1994).

4.4.4. Determinación de la toxicidad aguda de ALI mediante los criterios de Lorke.

Para evaluar la toxicidad de tipo agudo del extracto acuoso íntegro se utilizó la metodología reportada por Lorke (1983). Esta constó de dos fases: en la primera, ratones con 24 horas de ayuno y libre acceso a agua (*ad libitum*) fueron observados durante 30 minutos previos a la administración oral de tres dosis distintas del extracto a evaluar (10, 100 y 1000 mg/kg). En la segunda fase del estudio, las dosis seleccionadas fueron de acuerdo al número de animales muertos en la primera fase (criterios de Lorke) y se siguió el mismo procedimiento. En ambas fases y una vez administrado el extracto acuoso, el comportamiento de los animales fue registrado durante las primeras 8 horas y, posteriormente, a diario por un periodo de 14 días; para así determinar algún cambio en su patrón conductual, efectos tóxicos o la muerte. De manera complementaria, tres animales más fueron administrados con el vehículo (7 mL/kg) donde se suspendieron los tratamientos de prueba como control negativo para cada fase. Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados en una cámara de CO₂.

4.4.5. Evaluación de la actividad gastroprotectora de ALI.

La evaluación del potencial gastroprotector de la especie objeto de estudio se realizó utilizando el modelo de inducción de úlceras gástricas con etanol absoluto en ratones. Las úlceras fueron inducidas de acuerdo a los protocolos experimentales reportados en la literatura (Bucciarelli *et al.*, 2007).

De manera general, ratones macho de la cepa CD1 fueron distribuidos en grupos de ocho individuos cada uno. Los extractos de prueba (10-300 mg/kg), el fármaco de referencia carbenoxolona (CAR) (50 mg/kg) y el vehículo (VEH) donde se suspendieron los tratamientos (1 mL/ratón) fueron administrados por vía oral 1 hora antes de la administración de etanol. (7 mL/kg, *p.o.*) Una hora y media después de la administración del agente necrosante, los animales de experimentación se sacrificaron en una cámara de CO₂. Inmediatamente se

realizó la disección del estómago, éste fue llenado con formaldehído al 2% y posteriormente se colocó en un recipiente que contenía formaldehído a la misma concentración por espacio de 30 minutos; todo esto con el objetivo de lograr la fijación tanto de la capa interna como de la externa del órgano. A continuación, el estómago se disecó a lo largo de su curvatura mayor, se lavó con solución salina isotónica (SSI) para eliminar el contenido estomacal y se colocó entre dos laminillas de vidrio para poder escanearse. Para calcular el área de daño en mm² se utilizó el software **ImageJ**[®]. Para determinar el porcentaje de gastroprotección, en primer lugar se determinó el índice de úlcera (**IU**) el cual se expresa como la sumatoria de longitud de todas las lesiones. Se calculó el IU promedio de cada grupo. El porcentaje de inhibición de úlcera se determinó mediante la siguiente fórmula (Bucciarelli *et al*, 2007):

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{(\text{IU}_{\text{promedio del grupo control}} - \text{IU}_{\text{promedio del grupo tratado}})}{\text{IU}_{\text{promedio del grupo control}}} \right] \times 100$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de corroborar e indagar los posibles efectos contra la bacteria del extracto acuoso de dicha especie y con el antecedente precedido en nuestro grupo de trabajo se hizo un análisis más a fondo de esta especie.

5.1. Análisis del extracto acuoso íntegro

5.1.1. Determinación de la actividad anti- *H. pylori* del ALI y fracciones primarias.

Como se mencionó anteriormente, *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* es una especie medicinal de amplio uso en nuestro país para el tratamiento de diversos padecimientos del tracto gastrointestinal como dolores abdominales y estomacales, la diarrea, úlceras pépticas entre otros (Argueta *et al.*, 1994). Con el objetivo de corroborar e indagar los posibles efectos anti- *H. pylori* de **ALI** y con el antecedente de nuestro grupo de trabajo (Castillo-Juárez *et al.*, 2009), se preparó por infusión y se realizó la evaluación de un extracto acuoso y sus fracciones primarias. Estas últimas se obtuvieron mediante un proceso de partición líquido-líquido con disolventes de polaridad creciente.

Se realizó un análisis cromatográfico preliminar para observar la composición metabólica de dichas fracciones primarias (**Fig. 12**); en este análisis se pudo observar que el fraccionamiento primario de **ALI** fue satisfactorio; ya que logró concentrar diferentes compuestos en cada una de las fracciones, al ir modificando la polaridad.

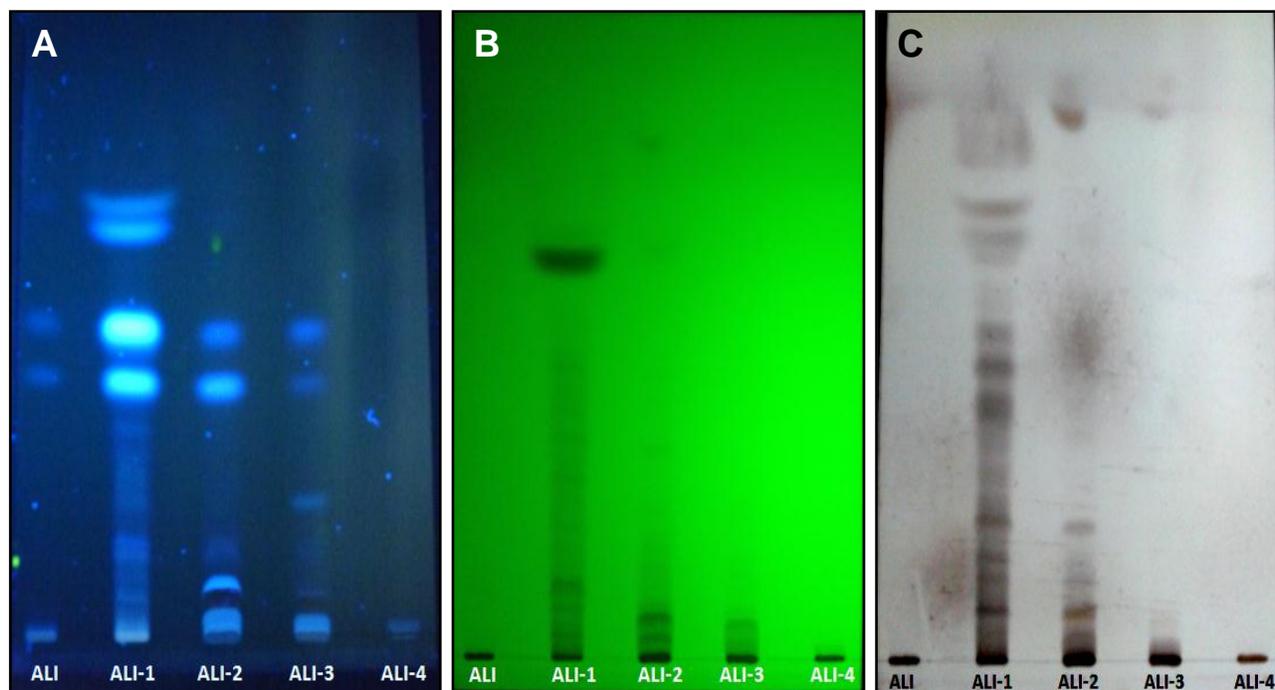


Fig. 12. Perfil cromatográfico de ALI y sus fracciones primarias (ALI 1-4), la placa cromatográfica fue observada a diferentes longitudes de onda (λ), **(A)** $\lambda = 365$ nm, **(B)** $\lambda = 256$ nm y **(C)** revelada con sulfato cérico. Placa cromatográfica (20 X 10 cm) de sílica gel 60 GF254, Merck. Sistema de elución DCM/MeOH, 95:5.

En la **Fig. 13** se muestra el efecto de ALI y sus fracciones primarias sobre el crecimiento de *H. pylori*. Al 50% de inhibición ALI tiene la misma efectividad que el antibiótico de referencia, metronidazol, pero ALI- 1 y 2, son más potentes. ALI- 1 es indiscutiblemente el más potente puesto que se obtiene el 100% de inhibición a una concentración de entre 31.25 y 62.5 $\mu\text{g/mL}$. Por otra parte, ALI- 3 fue el menos efectivo en inhibir el crecimiento de la bacteria (máxima inhibición 33.31%) y ALI- 4 no presentó inhibición del crecimiento de la bacteria.

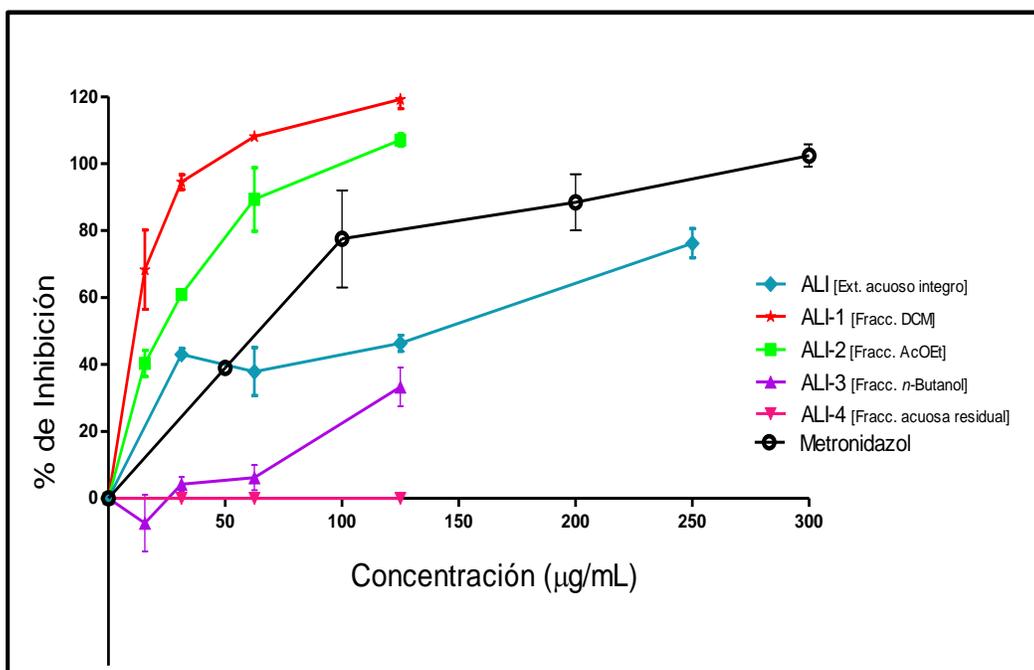


Fig. 13. Efecto de ALI y sus fracciones primarias (ALI 1-4) sobre el crecimiento de *H. pylori*. La actividad se determinó utilizando el método de microdilución en cultivo líquido Mueller- Hinton, se adicionan 10 µL de las muestras disueltos en DMSO a 1.5 mL de cultivo líquido de *H. pylori* en fase logarítmica ($A_{600}= 0.3$) y posteriormente se midió la A_{600} inicial y se incubó por 24 h y se midió la A_{600} final, con los datos de A iniciales y finales se calculó el % de Inhibición. Se utilizó metronidazol como antibiótico de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestra de manera adicional la Desv. est. para cada punto graficado.

En el **Cuadro 6**, se muestran los valores de CMI del extracto acuoso ALI y de sus fracciones primarias y se compara con los antibióticos de referencia (metronidazol y amoxicilina). Si bien, ni el extracto ni las fracciones mejoraron la actividad del antibiótico de referencia amoxicilina (CMI= 0.05 µg/mL), **ALI- 1 y 2** mejoraron la actividad del metronidazol, lo que las hace una buena fuente para la obtención de compuestos útiles en el tratamiento y/o erradicación de la bacteria y, por lo tanto, coadyuvar en el tratamiento de úlceras gástricas de origen bacteriano. En el caso de las fracciones primarias **ALI- 3 y 4**, se determinó que las CMI's eran superiores a los 250 µg/mL.

Cuadro 6. Efecto sobre el crecimiento de *H. pylori* del extracto acuoso y sus fracciones primarias, y su comparación con los antibióticos de referencia.

| Fracción ensayada | Rendimiento (%) | CMI (µg/mL) |
|---------------------------------------|-----------------|-------------|
| Extracto Acuoso Íntegro (ALI) | ----- | > 250 |
| Fracción de Diclorometano (ALI-1) | 7.9 | 62.5 |
| Fracción de Acetato de Etilo (ALI-2) | 8.5 | 125 |
| Fracción de <i>n</i> -Butanol (ALI-3) | 21.4 | > 250 |
| Fracción Acuoso Residual (ALI-4) | 62.1 | > 250 |

| Antibióticos de Referencia | CMI (µg/mL) |
|----------------------------|-------------|
| Amoxicilina | 0.05 |
| Metronidazol | 300 |

En cuanto a los resultados obtenidos por Castillo-Juárez y colaboradores en 2009 de la CMI de esta especie (125 µg/mL) es necesario plantear ciertas hipótesis acerca de la diferencia de CMI encontrada en este trabajo para la misma especie (>250 µg/mL), el extracto acuoso fue obtenido mediante decocción y el nuestro mediante infusión, la CMI del primer estudio fue obtenida mediante el método de dilución en placa de agar Mueller-Hinton (MH) y en este trabajo por el método de microdilución en cultivo líquido MH, el material vegetal se obtuvo en el Mercado de Sonora (Distrito Federal) por lo que no se asegura que la época de la colecta fuera la misma y eso influyera en la cantidad o presencia de metabolitos en la planta.

5.1.2. Aislamiento biodirigido por la actividad anti- *H. pylori* del compuesto Estafiatina.

Una vez identificadas las fracciones con mejor actividad antibacteriana, se decidió continuar con el fraccionamiento secundario biodirigido de **ALI- 1** en la búsqueda de los principios activos.

El fraccionamiento secundario realizado por cromatografía en columna abierta, usando gel de sílice como fase estacionaria y distintas mezclas de disolventes [Hex- AcoEtO- MeOH en distintas proporciones] generó un total de 206 fracciones que fueron reunidas en diecisiete grupos de fracciones secundarias de acuerdo a su perfil cromatográfico.

La evaluación de su potencial antibacteriano permitió establecer que existen varias fracciones secundarias que mejoran considerablemente la CMI de la fracción primaria **ALI-1**, con valores desde 7.81 y hasta 62.5 µg/mL; lo que indica que probablemente sean varios los metabolitos responsables de la actividad anti-*H. pylori* de esta especie (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Reuniones obtenidas del fraccionamiento secundario de ALI- 1.

| Reunión | Fracciones | Polaridad | Rendimiento (%) | CMI (µg/mL) |
|---------|------------|-------------------------|-----------------|-------------|
| I | 1-23 | Hex 100% Hex-DCM 95:5 | 0.620 | ND |
| II | 24-28 | Hex-DCM 80:20 | 0.031 | ND |
| III | 29-37 | Hex-DCM 60:40 | 1.058 | ND |
| IV | 38-57 | Hex-DCM 60:40, 1:1 | 0.778 | ND |
| V | 58-80 | Hex-DCM 1:1, 3:7 | 0.437 | ND |
| VI | 81-96 | Hex-DCM 3:7 | 0.155 | ND |
| VII | 97-103 | DCM 100% | 0.610 | 7.81 |
| VIII | 104-109 | DCM 100% | 1.636 | 15.62 |
| IX | 110-116 | DCM 100% | 1.013 | 7.81 |
| X | 117-124 | DCM 100% | 0.642 | ND |
| XI | 125-130 | DCM 100% | 14.998 | 31.25 |
| XII | 131-143 | DCM 100%, DCM-MeOH 95:5 | 4.727 | 62.5 |
| XIII | 144-153 | DCM-MeOH 95:5 | 6.783 | 31.25 |
| XIV | 154-158 | DCM-MeOH 95:5, 9:1 | 2.422 | 15.62 |
| XV | 159-176 | DCM-MeOH 9:1 | 2.901 | ND |
| XVI | 177-193 | DCM-MeOH 9:1, 7:3 | 2.179 | ND |
| XVII | 194-206 | DCM-MeOH 7:3 | 0.469 | 31.25 |

NOTA: El rendimiento obtenido es con respecto al punto de aplicación en la columna (6.7743 g de ALI-1).
ND: no determinado por bajo rendimiento.

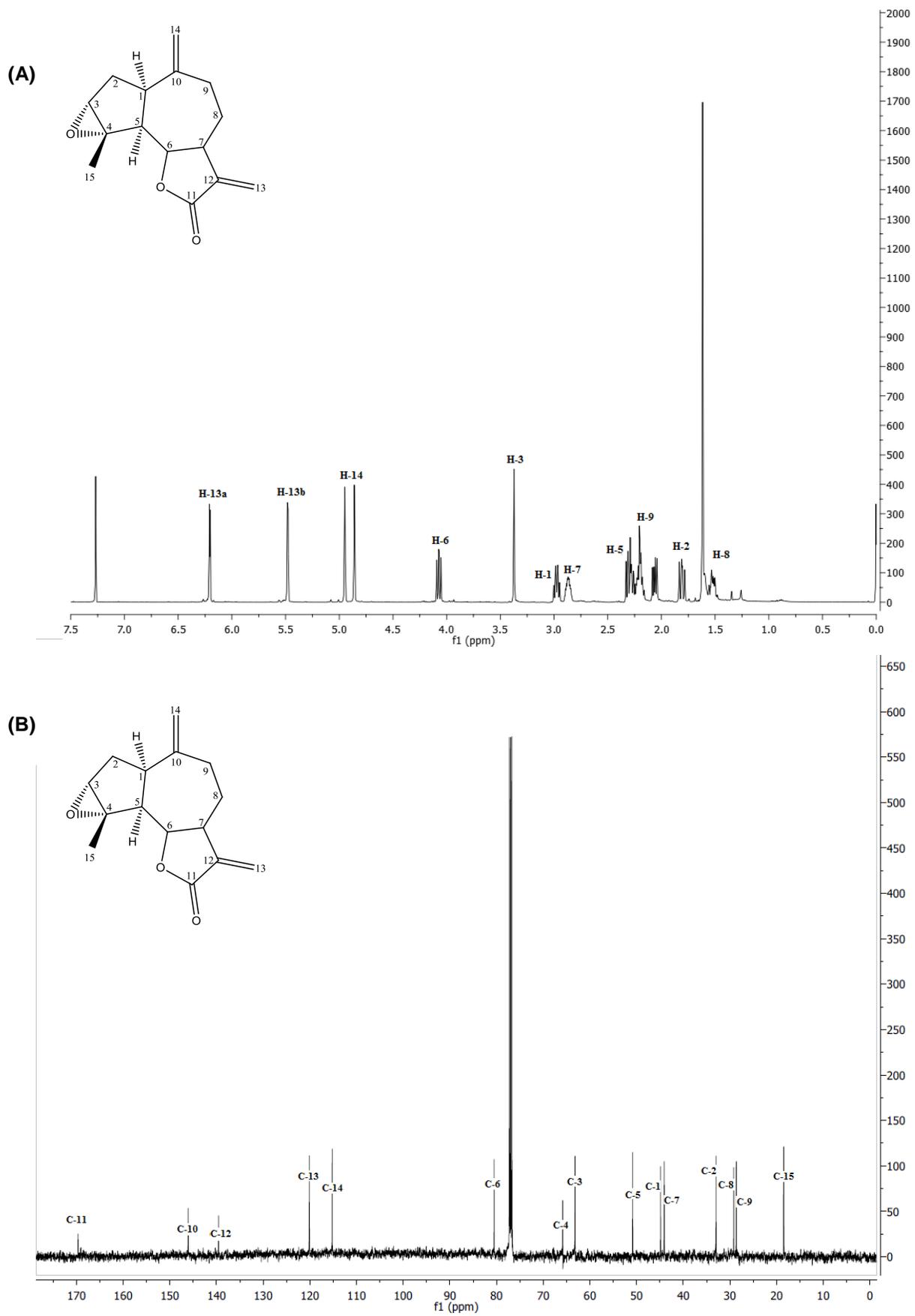
Del conjunto de fracciones **ALI 1-VIII** precipitaron de manera espontánea 110.8 mg de un sólido cristalino (**Fig. 14**) que presentó un punto de fusión de 103-104°C. Una muestra de este producto fue purificada por CCF (20 X 20 cm) utilizando como sistema de elución DCM puro.



Fig. 14. Muestra del compuesto aislado (**Estafiatina**) de la fracción secundaria VIII.

Parte de este compuesto fue evaluado para determinar su potencial anti- *H. pylori* y la otra porción fue utilizada para obtener el registro de sus espectros de RMN (^1H y ^{13}C). El análisis espectroscópico (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C), además de su comparación con los datos reportados en la literatura especializada, permitieron establecer la identidad de este producto como la Estafiatina (**10**), una lactona sesquiterpénica de tipo guayanólida previamente reportada en esta especie medicinal (Balderas-López, 2006). En la **Fig. 15** se muestran los espectros de RMN ^1H y ^{13}C correspondientes al compuesto aislado Estafiatina.

La evaluación de la Estafiatina contra *H. pylori*, mostró una CMI de 15.62 $\mu\text{g/ml}$, lo cual nos indica que probablemente existan más compuestos activos en la fracción de origen. Es importante mencionar que, de acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer reporte acerca de la actividad anti- *H. pylori* de la estafiatina, sin embargo, varios metabolitos con este tipo de núcleo (lactona sesquiterpénica) han sido identificados como antibacterianos (Konstantinopoulou *et al.*, 2003; Vega *et al.*, 2009).



Ejemplo del efecto antimicrobiano de estos compuestos es la dehidroleucodina aislada de la especie *Artemisia douglasiana* que presentó una CMI entre 1–8 µg/mL contra *H. pylori* (Vega *et al.*, 2009). El compuesto antipalúdico artemisinina aislado de la especie *Artemisia annua* ha mostrado una actividad muy fuerte contra el *H. pylori* y sirvió como modelo para la síntesis de análogos de endoperóxido de lactonas sesquiterpénicas, sobresaliendo por su potente actividad contra la bacteria un derivado denominado GRB-1, el cual presentó un rango de CMI de 0.25–1.0 µg/mL (Goswami *et al.*, 2012). En otro estudio realizado por Konstantinopoulou y cols. en 2003 sobre la especie *Anthemis altissima* perteneciente a la familia Asteraceae, estudiaron la actividad *in vitro* de 5 lactonas sesquiterpénicas contra *H. pylori* (CMI entre 12.5 y 50 µg/mL) así como contra bacterias Gram positivas [*Staphylococcus aureus* (CMI de 50 µg/mL), *Bacillus cereus* (CMI entre 12.5, 25 y 50 µg/mL) y *Micrococcus flavus* (CMI de 50 µg/mL) y tres bacterias Gram negativas [*Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis* (no presentaron actividad inhibitoria) y *Escherichia coli* (CMI de 50 µg/mL)]

Las lactonas sesquiterpénicas son un grupo grande y diverso de compuestos biológicamente activos, el mayor número de estas se derivan de la familia Asteraceae, con más de 3000 estructuras reportadas. Dichos metabolitos suelen ser no tóxicos (aunque algunas si lo son como la repina y helenalina) y con sabor amargo. La gran diversidad de estructuras químicas que presentan va acompañada de un amplio espectro de actividades biológicas, dentro de ellas la actividad antiinflamatoria mediada por la inhibición de la síntesis de prostaglandina, la relajación del músculo liso *in vitro*, algunos estudios sugieren que la citotoxicidad esta mediada por la interacción de la parte activa de la lactona sesquiterpénica (doble enlace exocíclico conjugado con el grupo carbonilo del anillo lactónico) con las enzimas que tienen grupos sulfhídricos en su estructura inhibe la actividad de las enzimas y el metabolismo, e interacciones con el glutatión (GSH), y adicionalmente son potentes y específicos inhibidores de la respuesta inflamatoria mediada por el factor de transcripción NF-κB (Heinrich *et al.*, 1998). Estas propiedades podrían explicar el amplio uso de las especies

medicinales que contienen estos compuestos para el tratamiento de molestias inflamatorias y gastrointestinales.

5.2. Determinación de la toxicidad aguda de ALI.

La investigación de los efectos tóxicos agudos es uno de los primeros pasos importantes en el análisis toxicológico de especies vegetales de uso medicinal, se deben evaluar En este caso, se eligió el protocolo de Lorke porque quizás es uno de los métodos más ampliamente utilizados debido a su facilidad para implementarlo y a la cantidad mínima de animales que se utilizan en ambas etapas de las cuales consta (Lorke, 1983).

Los resultados de dicho estudio de toxicidad aguda mostraron que hasta la dosis de 5000 mg/kg administrados por vía intragástrica de **ALI** no provocó la muerte de ningún animal de experimentación (**Cuadro 8**), ni efectos tóxicos significativos comparados con el grupo testigo. En análisis macroscópico de distintos órganos como el bazo, el hígado y los riñones no mostraron cambios significativos con respecto a los del grupo control además, no hubo diferencia significativa en el peso de los animales en tratamiento con respecto a los que fueron administrados solo con el vehículo (datos no mostrados). Todo esto nos permitió establecer que la DL₅₀ es mayor a 5000 mg/kg mostrando, hasta cierto punto, su seguridad según nuestro modelo de estudio. Este paso fue muy importante ya que permitió establecer la relativa seguridad de nuestro extracto y nos permitió continuar con el estudio del efecto gastroprotector que involucra el uso de animales.

Cuadro 8. Toxicidad aguda de extracto acuoso íntegro, mediante el modelo de Lorke.

| Extracto | Fase 1 | | | Fase 2 | | | DL ₅₀ mg/Kg >5000 mg/Kg |
|-------------------------------|-------------|-----|------|-------------|------|------|--|
| | Dosis mg/Kg | | | Dosis mg/Kg | | | |
| Extracto Acuoso íntegro (ALI) | 10 | 100 | 1000 | 1600 | 2900 | 5000 | |
| Animales muertos | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | |

Estos resultados concuerdan con lo reportado en la Tesis de Maestría de Anaya-Eugenio a finales del 2011, quien mediante el mismo modelo determinó la toxicidad aguda tanto de extractos orgánicos como del extracto acuoso de *Artemisia ludoviciana* Nutt., obteniendo el mismo valor de DL_{50} , que el obtenido en el presente trabajo, para el extracto acuoso de esta planta.

5.3. Determinación de la actividad gastroprotectora de ALI.

Las úlceras pépticas se desarrollan cuando existe un desbalance del equilibrio normal de la mucosa gástrica causado ya sea por la agresión (exceso de ácido, pepsina y la presencia de *H. pylori*) o disminución de la resistencia gastroprotectora (mucina, prostaglandinas, bicarbonato, óxido nítrico) (Navarrete *et al.*, 1996). La infección por *H. pylori* y el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son de los factores causales más comunes en el desarrollo de úlceras. Otros factores no menos importantes son el consumo de alcohol y el hábito de fumar (Zapata-Colindres *et al.*, 2006).

En este trabajo se determinó el efecto de **ALI** en el modelo de úlceras agudas inducidas con etanol absoluto en ratones. La administración de dosis crecientes de **ALI** (30-300 mg/kg) provocó la protección del tejido gástrico de manera significativa (**Fig. 16**) y en forma dependiente de la dosis. Como fármaco de referencia se utilizó carbenoxolona (CAR) a la dosis de 50 mg/kg. El análisis macroscópico de los estómagos demuestra el potencial antiulcerogénico del extracto acuoso.

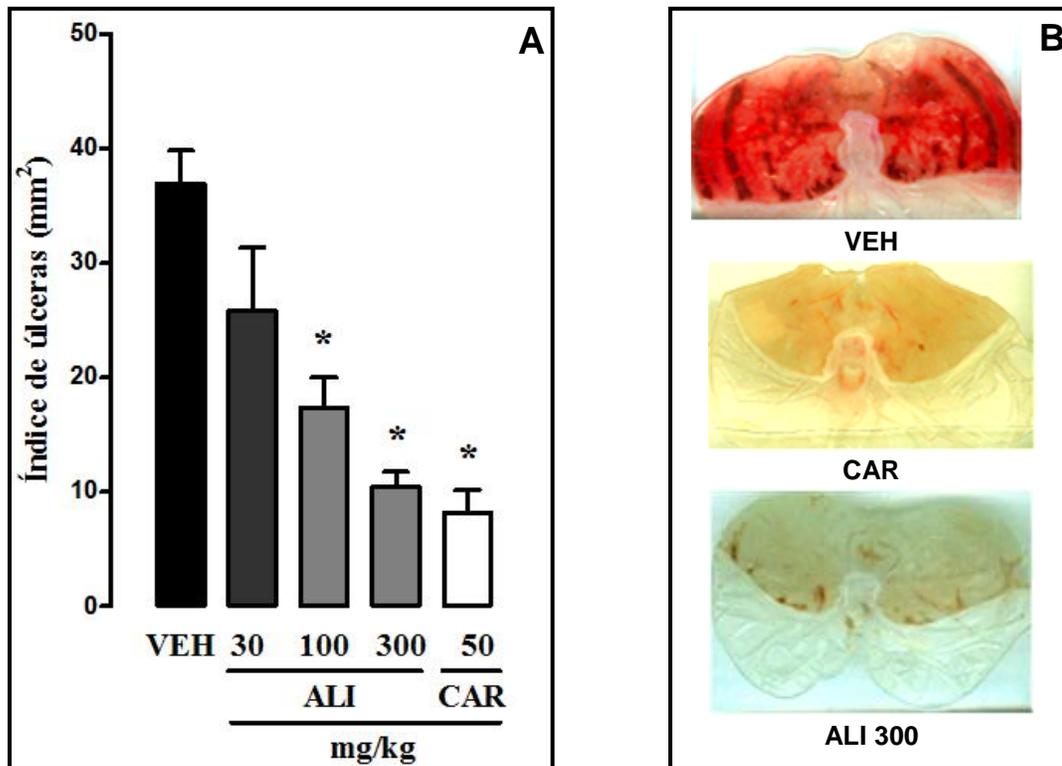


Fig. 16. Efecto gastroprotector del extracto acuoso de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* (ALI) en el modelo de inducción de úlceras agudas con etanol absoluto en ratones. **(A)** Cada barra representa la media de n=8 animales \pm E.E. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas mediante un análisis ANOVA seguida de una prueba de Dunnet. *P<0.05. **(B)** Muestras de tejido del grupo que recibió el vehículo (SSI), el fármaco de referencia (CAR) y la dosis más alta evaluada de ALI 300 μ g/mL (ALI 300).

En el caso de actividad anti- *H. pylori* y gastroprotección, los resultados no son extraños, ya que se tienen reportes de varias especies de la familia *Artemisia* que poseen propiedades gastroprotectoras e inhibidoras del crecimiento de *H. pylori*. Se han evaluado distintos preparados de especies como *A. asiatica*, *A. annua*, *A. douglasiana*, entre otras (Suck-Chei *et al.*, 2006; Falcão *et al.*, 2008; Penissi *et al.*, 2009) y de ellas han logrado aislar distintos metabolitos secundarios que han mostrado ser los responsables de dichas actividades. Tal es el caso de la dehidroleucodina, que ha mostrado ser el principal metabolito citoprotector de la especie *A. douglasiana* además de inhibir el crecimiento de varios aislados clínicos y cepas de referencia de *H. pylori* (Vega *et al.*, 2009). Otros metabolitos de

tipo lactona sesquiterpénicas han sido estudiados y mostraron tener un efecto gastroprotector moderado, tal es el caso de la dihidro-epi-deoxiarteauina B y la desoxiartemisina (Foglio *et al.*, 2002). Sin embargo, esta es la primera vez que se determina el potencial gastroprotector de el extracto acuoso de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana*.

6. CONCLUSIONES

1. Los resultados de este trabajo confirman que la flora medicinal de nuestro país representa una fuente importante para el descubrimiento de moléculas de utilidad terapéutica, tal como la erradicación de *Helicobacter pylori* y las enfermedades relacionadas con su presencia en el ser humano.
2. Este es el primer trabajo en el cual se fracciona el extracto acuoso íntegro de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* de manera biodirigida por la actividad anti-*H. pylori*.
3. Se estudió el potencial anti-*H. pylori* de la infusión (ALI) de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* y sus fracciones primarias. ALI y las fracciones ALI-1 y ALI-2 mostraron buen efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano en relación a los antibióticos de referencia metronidazol y amoxicilina.
4. El fraccionamiento biodirigido por la actividad antibacteriana permitió el aislamiento de una lactona sesquiterpénica conocida como estafiatina (CMI= 15.62 µg/mL) a partir de ALI-1. De acuerdo a nuestro conocimiento, este representa el primer reporte que se tiene de su actividad contra esta bacteria.
5. Se evaluó, de manera preliminar, su posible actividad gastroprotectora en animales de laboratorio, obteniendo que el extracto acuoso de la planta posee buena actividad antiulcerosa, 77% de gastroprotección a la dosis de 300 mg/kg; así como un comportamiento dosis-dependiente.
6. Se estudiaron los efectos tóxicos agudos utilizando el modelo de Lorke (1983), mostrando que la DL_{50} es >5000 mg/kg, indicando que esta especie no es tóxica bajo nuestro modelo de estudio, mostrando así su consistencia con la literatura en la cual no existen reportes de toxicidad por el uso que se le da a la planta.

7. Finalmente, se presenta a *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* como una planta con potencial para el tratamiento integral de la gastritis bacteriana y no bacteriana.
8. Asimismo se valida de manera parcial el uso etnofarmacológico que se le da a la especie, debido a que el uso popular de ésta es en preparaciones acuosas (específicamente infusión) para tratar enfermedades gastrointestinales y el empleo de esta planta como parte del tratamiento de estas patologías podría disminuir la presencia de la bacteria en zonas rurales.

7. PERSPECTIVAS

- Determinar la actividad bacteriostática o bactericida del compuesto aislado estafiatina, y la concentración a la cual presenta dicha actividad.
- Realizar el análisis de las diferentes fracciones orgánicas obtenidas en el fraccionamiento primario de ALL, para saber si existen otros compuestos a los cuales se les puedan atribuir las propiedades tanto antibacteriana como gastroprotectora de esta especie medicinal.
- Determinar si la actividad anti *H. pylori* se mantiene con aislados clínicos.
- Determinar si se mantiene el efecto del extracto, fracciones y compuestos aislados en un modelo *in vivo* de infección con *H. pylori*.
- Considerando que los ensayos realizados fueron a nivel agudo (*in vitro* e *in vivo*), es necesario continuar con un análisis más profundo realizando los modelos de toxicidad y gastroprotección a nivel subcrónico o crónico.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdo-Francais, J.M., Uscarga, D.L., Sobrino, C.S., Rivera R.F. J., Huerta, I. F. y Tamayo de la Cuesta, J.L., (2007). III Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 72:137-53.
- Alanís, A.D., Calzada, F., Cervantes, J.A., Torres, J. y Ceballos, G.M. (2005). Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 100:153-157.
- Anaya-Eugenio, G.D. (2011). Potencial antidiabético de preparados de *Artemisia ludoviciana* Nutt. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Ankli, A., Henrich, M., Bork P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schemid, C., Weiss, C., Bruggisser R., Gertsch J., Wasescha, M. y Sticher, O. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *J. Ethnopharmacol.* 79:43-52.
- Argueta, V.A., Caro, I.M. y Rodarte, M.E. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. *Inst Nal Indig.* Tomo I, II y III. *Inst Nal Indig (INI)*. pp. 538, 957 y 1547
- Aspholm-Hurtig, M., Dailide G., Lahmann, M., Kalia, A., Ilver, D., Roche, N., Vikström, S., Sjöström, R., Lindén, S., Bäckström, A., Lundberg, C., Arnqvist, A., Mahdavi, J., Nilsson, U.J., Velapatiño, B., Gilman, R.H., Gerhard, M., Alarcon, T., López-Brea, M., Nakazawa, T., Fox, J.G., Correa, P., Dominguez-Bello, M.G., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J., Normark, S., Carlstedt, I., Oscarson, S., Teneberg, S., Berg, D.E. y Borén, T. (2004). Functional Adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO Blood Group Antigen Binding Adhesin. *Science.* 305:519-522.
- Atherton, J.C. (2006). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. *Ann. l Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1:63-96.
- Atherton, J.C. y Blaser, M.J. (2009). Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J. Clin. Invest.* 119:2475-87.
- Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>. Consulta: 20 Oct 2012.

- Axon A.T.R. (1995). Review article: is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9:585-588.
- Baele, M., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, K., Ducatelle, R., y Haesebrouck, F. (2009). Non-*Helicobacter pylori* helicobacters detected in the stomach of humans comprise several naturally occurring *Helicobacter* species in animals. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 55:306–313.
- Balderas- López, J.L. (2006). Fitoquímica comparativa de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* y evaluaciones biológicas preliminares. Tesis Maestría en Ciencias (Farmacia- Química Farmacéutica), UNAM.
- Besasso, H. 1996. *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. *Acta Gastroenterol. Latinoam.* 26:63.
- Bizzozero, G. (1893). Ueber die schlauchformigen drusen des magendarmkanals und die beziehungungen ihres epithels zu dem oberflachenepithel det schleimhaut. *Arch. Mikr Anat.*42:82
- Blagojevic, P., Radulovic, N., Palic, R. y Stojanovic, G. (2006). Chemical composition of the essential oils of Serbian wild-growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.*54:4780–4789.
- Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., Kleanthous, H., Cover, T. L., Peek, R. M., Chyou, P.H., Stemmermann, G.N. y Nomura, A. (1995). Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing Cag A is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 55:2111-2115.
- Blust, M. H. y Hopkins, T. L. (1987). Olfactory responses of a specialist and a generalist grasshopper to volatiles of *Artemisia ludoviciana* Nutt. (Asteraceae). *J Chem Ecol.* 13:1893-1902.
- Boixeda de Miquel, D., Martín de Argila, C. (2000). Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 24:141142.
- Bora, SK y Sharma, A. (2010). The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *Pharmac Biol.* 1-9.
- Borelli, F. e Izzo, A.A. (2000). The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother Res.* 14:581-591.

- Bork, P.M., Schmitz, M.L., Kuhn, M., Escher, C. y Heinrich, M. (1997). Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor κ B (NF- κ B). *FEBS Lett.* 402:85-90.
- Bork, P.M., Schmitz, M.L., Weimann, C., Kist, M. y Heinrich, M. (1996). Nahua Indian medicinal plants (Mexico): inhibitory activity of NF κ -B as an antiinflammatory model and antibacterial effects. *Phytomed.* 3:263-269.
- Bucciarelli, A., Mancini, M.M., Skliar, M.I. (2007). Propiedades gastroprotectoras de plantas medicinales. Estudios fitoquímicos y farmacológicos. *Rev Asoc Med de Bahía Blanca.* 17:3-9.
- Burgers, R., Schneider-Brachert, W., Reischl, U., Behr A., Hiller, K.A., Lehn, N., et al. (2008). *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. *Eur J Oral Sci.* 116:297-304.
- Burnens, A.P., Stanley, J., Morgenstern, R., Nicolet, J. (1994). Gastroenteritis associated with *Helicobacter pullorum*. *Lancet.* 344:1569-1570.
- Burnens, A.P., Stanley, J., Schaad, U.B., Nicolet, J. (1993). Novel *Campylobacter*-like organism resembling *Helicobacter fennelliae* isolated from a boy with gastroenteritis and from dogs. *J. Clin. Microbiol.* 31:1916-1917.
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L. y Aguilar, A. (2006). *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharm.* 108:367-370.
- Campo, S.M., Zullo, A., Hassan, C. y Moroni, S. (2007). Antibiotic treatment strategies for *Helicobacter pylori* infection. *Recent. Pat. on Antiinfect. Drug. Discov.* 2:11-7.
- Cantón, R., Boixeda, D., de Rafael, L., Baquero, F. (1995). Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad de *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol. Hepatol;* 18:15-22.
- Cassel-Beraud, A.M., Le Jan, J., Mouden, J.C., Andriantsoa, M., Andriantsiferana, R. (1991). Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter*

pylori in Tananarive, Madagascar and the antibacterial activity *in vitro* of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. *Arch Inst Pasteur Madagascar*.59:9-23.

- Castanedo, J.A. (1906). Informe de los trabajos realizados en el mes de enero de 1906. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo VIII. Oficina tipográfica de la Secretaría de Fomento. México.
- Castanedo, J.A. (1906). Informe de los trabajos realizados en el mes de junio de 1906. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo X. Tipografía la Universal de Taladrid, Blanco y comp. México.
- Castillo- Juárez, I. (2005). Análisis de plantas medicinales y compuestos con actividad anti- *Helicobacter pylori*. Tesis de licenciatura. Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México. p.100.
- Castillo- Juárez, I. y Romero I. (2007). Plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*: una revisión. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 80:35-61.
- Castillo- Juárez, I., González, V., Jaime- Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. y Romero, I. (2009). Anti -*Helicobacter pylori* activity of plants used in mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharm.* 122:402-205.
- Ceelen, L., Decostere, A., Verschraegen, G., Ducatelle, R, Haesebrouck, F. (2005). Prevalence of *Helicobacter pullorum* among patients with gastrointestinal disease and clinically healthy persons. *J. Clin. Microbiol.* 2984–2986.
- Cellini, L., Allocati, N., Piattelli, I., Fanci, P. y Dainelli, B. (1995). Microbial evidence of *Helicobacter pylori* from dental plaque in dyspeptic patients. *New. Mricrobiol.* 18:187-192.
- Chiba, N., Rao, B.V., Rademaker, J.V.V. y Hunt, R.H. (1992). Meta-analysis of the efficacy of antibiotic therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol.* 87:1716-27.
- Colin, W.W. (2002). Artemisia. *Edit Taylor and Francais Inc.* New York, USA. pp.107-118.
- Comité Internacional de Sistemática Procariotas (ICSP). Disponible en: <http://www.the-icsp.org/taxa/campylobacterlist.htm>. Consulta: 20 Oct 2012.

- CONABIO. Disponible en:
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisialudoviciana/fichas/ficha.htm#1>. Nombres. Consulta: 12 Feb 2012
- Correa, P., Haenszel, W., Cuello, C., Zavala, D., Fonham, E., Zaruma, G., Tannenbaum, S, Collazos, T. y Ruiz, B. (1990). Gastric precancerous process in a high risk population. Cohort follow-up. *Cáncer Res.* 50:4737-4740.
- De Groote, D., Van Doorn, L.J, Van den Bulck, K. (2005). Detection of non-*Helicobacter pylori* species in “*Helicobacter heilmannii*”-infected humans. *Helicobacter*, 10:398–406.
- Dehesa, M., Larised, J., Dibildox, M., Vega, B., Di Silvio, M., Rodríguez, L., Camorlinga, M., Almaguer, I., Ramírez Barba, E. y Torres, J. (1998). Comparison of 2 schedules based on pantoprazole for eradication of *Helicobacter pylori* in patients with active duodenal ulcer. *Rev Gastroenterol Méx.* 63:66-71.
- Dehesa, V.M. (1993). Métodos de diagnóstico en infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 58:87-95.
- Dias, P.C., Foglio, M.A., Possenti, A., Nogueira, D.C.F. y de Carvalho, J.E. (2001). Antiulcerogenic activity of crude ethanol extract and some fractions obtained from aerial parts of *Artemisia annua* L. *Phytother. Res.* 15:670–675.
- Dixon, M. (2001). Pathology of Gastritis and Peptic Úlceration. En: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. (Eds. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L. y Hazell, S.L.) *ASM Press Washington*. pp.459-469.
- Dowsett, S.A., and Kowolik, M.J. 2003. Oral *Helicobacter pylori*: Can we stomach it?. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.*14:226–233.
- Dubal, Z.B., Avasthe, R.K., Haque, N., Toppo, S., Murugkar, H.V. y Barduddhe, S.B. (2009). Efficacy of medicinal plant extracts and antimicrobials on different serotypes of *Escherichia coli*. *Indian J. Anim. Sci* 79:15-18.
- Dubreuil, J.D., Del Giudice, G., Rappuoli, R. (2002). *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potencial role in the infectious process. *Microbiol. Mol. Biol Rev.* 66:617-629.

- Eaton, K.A., Radin, M.J., Kramer, L., Wack R, Sherding, R, Krakowa, S y col. (1993). Epizootic gastritis associated with spiral bacilli in cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet Pathol* 30:55-63.
- Evans, D.J. Jr., Evans, D.G. (2000). *Helicobacter pylori* adhesins: review and perspectives. *Helicobacter*.5:183-95
- Falcão, H.S., Mariath, M.F.F.F. Diniz Batista, J.M. y Barbosa-Filho, J.M. (2008). Plants of the American continent with antiulcer activity. *Phytomed*. 15:132-146.
- Fernández, H. (2011). Género *Helicobacter*: un grupo bacteriano en expansión, con características zoonóticas. *La Gaceta de Infectología y Microbiología Clínica Latinoamericana*. 2:11-20.
- Fernández, S. S., Ramos, G. C., Mata, C. D. B., Villarreal, V. J., Treviño, V. L. (2005). *In vitro* antiprotozoal activity of the leaves of *Artemisia ludoviciana*. *Fitoter*. 76, 5:466-468.
- Flores, B.M., Fennel, C.L., Stamm, W.E. (1989). Characterization of *Campylobacter cinaedi* and *C. fennelliae* and analysis of the human immune response. *J. Infect. Dis*. 159: 635-640.
- Foglio, M.A., Dias, P.C., Antônio, M.A., Possenti, A., Rodríguez, R.A., da Silva E.F., Rehder, V.L., de Carvalho, J.E. (2002). Antiulcerogenic activity of some sesquiterpene lactones isolated from *Artemisia annua*. *Planta Med*. 68(6):515-8.
- Foley, J., Marks, S., Munson, L., Melli, A., Dewhirst, F., Yu, S. (1999). Isolation of *Helicobacter canis* from a colony of bengal cats with endemic diarrhea. *J. Clin. Microbiol*. 37:3271–3275.
- Fox, J.G., Blanco, M., Polidoro, D., Rosenblad, W., Murphy, J.C, Paster, B. y Dwhirst, F.E. (1992). High prevalence of *Helicobacter*-associated gastritis in purpose bred beagles. *Lab. Anim. Sci* 42: 420- 421.
- Fox, J.G., Yan L.L., Dewhirst F.E., Paster B.J, Shames B., Murphy J.C. y col. (1995). *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers and intestines of aged, inbred mice. *J Clin Microbiol*. 33:445-454.
- García, S., Alarcón, G., Rodríguez, C. y Heredia, N. (2006). Extracts of *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit growth, enterotoxin production and andhesion of *Vibrio cholera*. *W J. Microb. Biotechnol*. 22:669-674.

- Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Lying, H. y Opferkuch, W. (1993). Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 38:371-377.
- Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Lying, H. y Opferkuch, W. (1993). Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 38:371-7
- Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Bore´n, T., Rad, R., Schepp, W., Miehkei, S., Classen, M. y Prinz, C. (1999). Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:12778-12783.
- Gerrits, M.M., van Vliet, A.H., Kuipers, E.J. y Kusters, J.G. (2006). *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lance Infect. Dis.* 6:699-709.
- Geyer, C., Colbatzky, F., Lechner, J., Hermanns, W. (1993). Occurrence of spiral-shaped bacteria in gastric biopses of dogs and cats. *Vet. Rec.* 133:18-19.
- Gil, M.A, Beneyto, C.F., Calatayud, G.A., Giménez, F.F.J. y Cortina, B.P. (1990). Evolución de la mortalidad por cáncer de estómago en España (1951-1985). *Rev. Esp. Enf.Dig.* 78:61-66.
- Giorgano, O.S., Guerreiro, E. y Pestchanker, M.J. (1990). The Gastric Cytoprotective Effect of Several Sesquiterpene Lactones. *J. Nat. Prod.* 53:803–809.
- Globocan (2008), IARC, 2010. Section of Cancer Information. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>.
- Goodwin, C., McCulloch, R., Armstrong J. y Wee, H.S. (1985). Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J. Med. Microbio.* 19:257-267.
- Goodwin, C.S. y Armstrong J.A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur. J. Clin. Microbiol. & Inf. Dis.* 9:1-13.
- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., Mc Connel, W. y Harper, W.E.S. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb.

Nov. and *Campylobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:397-405.

- Goodwin, C.S. (1997). Antimicrobial treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Infect. Dis.* 25:1023-6.
- Goswami, S., Bhakuni, R.S., Chinniah, A., Pal, A., Kar, S.K. y Das, P.K. (2012). Anti-*Helicobacter pylori* potential of artemisinin and its derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* 407-12.
- Govindaraj, S., Kumari, B.D.R., Cioni, P.L., Flamini, G. (2008). Mass propagation and essential oil analysis of *Artemisia vulgaris*. *J. Biosc. & Bioengin.* 115:176–183.
- Graham, D.Y. (1993). Treatment of peptic ulcers caused by *Helicobacter pylori*. *N. Engl. J. Med.* 28:349-350.
- Guerra, F. (1990). La medicina precolombina. Editorial Cultura Hispánica, D. L. Universidad Autónoma de México, México DF. p.340.
- Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología. (2010). *Helicobacter pylori* en los países en desarrollo. p.5-6.
- Gupta, M. (1995). 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. CYTED, SECAB. Bogotá, Colombia. *Gut.* 40:297-301.
- Guruge, J.L., Falk, P.G., Lorenz, R.G., Dans, M., Wirth, H.P., Blaser, M.J., Bergi, D.E. y Gordon, J. I.(1998). Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:3925–3930.
- Hamada, T., Yokota, K., Ayada, K., Hirai, K., Kamada, T., Haruma, K. y col. (2009). Detection of *Helicobacter hepaticus* in human bile samples of patients with biliary disease. *Helicobacter*, 14:545–551.
- Hänninen, M.J, Happonen, Y., Saari, S., Jalava, K. (1996). Culture and characterization of *Helicobacter bizzozeronii*, a new canine gastric *Helicobacter* sp. *Int J Syst. Bacteriol* 46:160-166.
- Hannula, M. y Marja- Liisa, H. (2007). Phylogenetic analysis of *Helicobacter* species base on partial gyrB gene sequences. *Int. J. Syst. & Evol. Microbiol.* 57:444-449.

- Heike, V. (2009). Malezas de México. Revisión: 10 de febrero de 2012. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisia-ludoviciana/fichas/ficha.htm>
- Heinrich, M., Robles, M., West, J.E., Ortiz, B.O., Rodríguez, E. (1998). Ethnopharmacology of mexican Asteraceae (Compositae). *Ann Rev Pharmacol & Toxicol.* 38:539-565.
- Hernández, H. E., Mendoza, C. I., Camorlinga, M., Gonzalez-Valencia, J., Torres, J., Kretschmer, R., Pérez-Rodríguez, M. (2005). Frecuencias HLADQA1 y -DQB1 en nahuas infectados con *Helicobacter pylori*. *Rev Sal Públ y Nut.* Edición especial No. 5-2005.
- Hirschl, A. M. y Rotter, M. L. (1996). Serological test for monitoring *Helicobacter pylori* eradication treatment. *J. Gastroenterol.* 3:33-36.
- Hirschowitz, B. I., Mohnen, J. y Shaw, S. (1994). High recurrence rate of duodenal ulcer despite *H. Pylori* eradication in a clinical subset rapidly recurring peptic ulcer. *Gastroenterol* 106:A94.
- Holly, M., Scott, A. y Timothy, L.C. (2006). *Helicobacter pylori* Persistence: an Overview of Interactions between *H. pylori* and Host Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev.* 19:597-613.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1994). Infection with *Helicobacter pylori*. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr. *Eval. Carcinog. Riskc. Human.* 61:1-241.
- IARC Monographs, *Helicobacter pylori*, Revisión: 01 de febrero de 2012. Disponible en: monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/mono100B-15.pdf.
- ICSP (International Committee on Systematics of Prokaryotes), 2003. Disponible en: <http://www.the-icsp.org/taxa/campylobacterlist.htm>
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ögren, J., Frick, I.M, Kersulyte, D., Engin T. Incecik, Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L. y Boren, T., (1997). *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science.* 279:373-377.

- Irwin, M., Lee, K., Simpson, R., y Geissman, T. (1969). Sesquiterpene lactones of *Artemisia*. *Ridentin*. *Phytochem.* 8:2009- 2012.
- Itoh, T, Yanagawa, Y, Shingaki, M, Masubuchi, N, Takahashi, S, Saito, S. (1994). Isolation of *Helicobacter heilmannii* like organisms from the stomachs of cynomolgus monkeys and colonization of them in mice. *Gastroenterol.* 106:A99.
- Jalava, K, Kaartinen, M, Utriainen, M, Happonen, I, Hanninen, ML. (1997). *Helicobacter salomonis* sp. nov., a canine gastric *Helicobacter* sp. related to *Helicobacter felis* and *Helicobacter bizzozeronii*. *Int. J. Syst. Bacteriol* 47:975-982.
- Jalava, K., On, S.L., Harrington, C.S., Andersen LP, Hänninen, M.L., Vandamme, P.A. (2001). A cultured strain of “*Helicobacter heilmannii*”, a human gastric pathogen, identified as *H. bizzozeronii*: evidence for zoonotic potential of *Helicobacter*. *Emerg. Infect. Dis.*7:1036–1038.
- Josenhans, C., Labigne, A., Suerbaum, S. (1995). Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J. Bacteriol.* 177: 3010-20
- Karagin, P.H., Stenram, U., Wadstrom, T., Ljungh, A. (2010). *Helicobacter* species and common gut bacterial DNA in gallbladder with cholecystitis. *World J Gastroenterol* 16:4817- 4822.
- Kato, T., Sairo, Y., Niwa, M., Inove, M., Moroyama, N. y Ogoshi, K. (1994). *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinoma. *Eur J. Gastroenterol. Hepatol.* 6:593-596.
- Katz, K., Corti, R. E., López, G.A. y Podin, L.F. (1993). *Helicobacter pylori*. Datos recientes en fisiopatogenia y terapéutica de la patología gastroduodenal. *Arch Argent Enf Aparat Dig.* 7:75-78.
- Keilsey, R. y Shafizadeh, F. (1979). Sesquiterpene lactones and systematics of the genus *Artemisia*. *Phytochem.* 18:1591-1611.
- Khandaker, K., Palmer, K.R., Eastwood, M.A. Scott, A.C. Desai, M., and Owen, R.J. (1993). DNA Fingerprints of *Helicobacter-Pylori* from Mouth and Antrum of Patients with Chronic Ulcer Dyspepsia. *Lancet* 342:751–751.

- Konstantinopoulou, M., Karioti, A., Skaltsas, S., Skaltsa, H. (2003). Sesquiterpene lactones from *Anthemis altissima* and their anti-*Helicobacter pylori* activity. *J. Nat. Prod.* 66:699-702.
- Kostrzynska, M., Betts, J.D., Austin, J.W., Trust, T.J. (1991). Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J. Bacteriol.* 173: 937-46
- Kusters, J.G., van Vliet, M.H.A. y Kuipers, E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microb. Rev.* 19:449-490.
- Kutz, J. (1996). ¿Cuáles son y qué importancia revisten las distintas cepas patógenas del Hp en el desarrollo de la enfermedad asociada a la infección? *Acta Gastroenterol Latinoam.* 25:33-34.
- Kwon, D.H., Kim, J.J., Lee, M., Yamaoka, Y., Kato, M., Osato, M.S., El-Zaatari, F.A. y Graham, D.Y. (2000). Isolation and characterization of tetracycline-resistant clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44:3203-5.
- Ladrón de Guevara, L., Gomez, P. A., Nicolas, P. L., Lichtinger, A., Figueroa, B. S., Shapiro, S. I., Rubinstein, M., Di, S. y López, M. (2004). Evaluación de la sintomatología y calidad de vida en la dispepsia funcional antes y después de tratamiento de erradicación de *H. pylori*. *Rev. Gastroenterol.* 69:203-208.
- Laine, L., Lewin, D., Naritoku, W., Estrada, R. y Cohen, H. (1996a). Prospective comparison of commercially available rapid urease tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Gastrointest. Endosc.* 44:5:523-526.
- Lee, A., Hazell, S.L., O'Rourke, J. y Kouprach, S. (1988). Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect. Immun* 56:2843-2850.
- Lee, K. y Geissman, T. (1967). Sesquiterpene lactones of *Artemisia*. Constituents of *A. ludoviciana ssp. mexicana*. *Phytochem.* 9:403-408.
- Lee, K. y Geissman, T. (1970). Sesquiterpene lactones of *Artemisia*. Constituents of *A. ludoviciana ssp. mexicana*. *Phytochem.* 9:403-408.
- Linares, E., Bye, R. y Flores, B. (1999). Plantas Medicinales de México. Usos y remedios tradicionales. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p.125.

- Lindt ,T., Veldhuyzen van, Z. S. J.O. y Unge, P. (1996). Eradication of *Helicobacter pylori* using one week triple therapies combining omeprazole with two antimicrobials: The MACH 1 study. *Helicobacter*. 1:138-144.
- Lopes-Lutz, D., Daniela, S. Alviano, D., Alviano, C.S. y Kolodziejczyk, P.P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochem*. 69:1732–1738.
- López, A. (1992). Gastritis. *Medicine*. 6:73-85.
- Lorke, D. (1983) A new approach to partial acute toxicity testing. *Archiv. of Toxicol*, 54:275-287.
- Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N., Ångström, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.A., Altraja, S., Wadström, T., Kersulyte, D., Berg, D.E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K.E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B.B., Arnqvist, A., Hammarström, L. y Borén, T. (2002). *Helicobacter pylori* SabA Adhesin in Persistent Infection and Chronic Inflammation. *Science*. 297:573–578.
- Malagón, F., Vázquez, J., Delgado, G., Ruíz, A. (1997). Antimalaric effect of an alcoholic extract of *Artemisia ludoviciana mexicana* in rodent malaria model. *Parassitol*. 39:3-7.
- Malaty H.M. y Graham D.Y. (1994). Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 35:742–745.
- Malaty, H. M., Kumagai, T., Tanaka, E., Ota, H., Kiyosawa, K., Graham, D. Y., Katsuyama, T., (2000). Evidence from a Nine-Year Birth Cohort Study in Japan Transmission Pathways of *Helicobacter pylori* Infection. *J. Clin. Microbiol*. 38:1971-1973.
- Marshall, B.J. y Goodwin, C.S. (1987). Revised Nomenclature of *Campylobacter pylorides*. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 37:68.
- Marshall, B.J. y Surveyor, I. (1988). Carbon-14 urea breath test for the diagnosis of *Campylobacter pylori* associated gastritis. *J. Nucl. Med*. 29:11-16.
- Marshall, B.J. y Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1:131-5

- Marshall, B.J., Armstrong, J.A., McGeachie, D.B. y Glancy, R.J. (1985). Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* 142:436 – 439.
- Martínez, V. M., Martínez, R. y Espinosa, P.G. (1994). *Fitoterapia* LXV: 371.
- Matsumoto, T., Goto, M., Murakami, H., Tanaka, T., Nishiyama H. y Ono E. (2007). Multicenter study to evaluate bloodstream infection by *Helicobacter cinaedi* in Japan. *J. Clin. Microbiol*, 45:2853– 2857.
- Mazari-Hiriart, M., López-Vidal, Y., Castillo-Rojas, G., Ponce de León, S. y Cravioto, A. (2001). *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater Environments in Mexico City. *Archives of Medical Research*. 32:458-467.
- Mégraud, F. y Lehours, P. (2007). *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:280-322.
- Melito, P.L., Munro, C., Chipman, P.R., Woodward, D.L., Booth, T.F. y Rodgers, F.G. (2001). *Helicobacter winghamensis* sp. nov., a novel *Helicobacter* spp. isolated from patients with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 39:2412–2417.
- Mitchell, H.M., Lee, A. y Carryck, J. (1989). Increased Incidence of *Campylobacter pylori* Infection in Gastroenterologists: Further Evidence to Support Person-to-Person Transmission of *C. pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.* 24:396-400.
- Mitchell, H.M. (2001). Epidemiology of Infection. En: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics (Eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L y Hazell, S. L.). *AMS Press Washington*, pp.7-18.
- Mitchell, J. D., Mitchell, H. M. y Tobias, V. (1992). Acute *Helicobacter pylori* infection in an infant, associated with gastric ulceration and serological evidence of intra-familial transmission. *Am. J. Gastroenterol.* 87:382-386.
- Mobley, H.L.T. (2001). Ureasa. En: *Helicobacter pylori*: Physiology and genetics. (Eds. Mobley, H.L.T., Mendz GL. y Hazell SL.). *ASM Press. USA*. pp.179-191.
- Molhar, A., Ley, C., Guarner, J., Herrera- Goepfert, R., Sánchez, L., Halperin, D. y Personnet, J. (2002). Alta frecuencia de lesiones precursoras de cáncer gástrico asociadas a *Helicobacter pylori* y respuesta al tratamiento, en Chiapas, México. *Gac. Med. Mex.* 138:405-410.
- Montecucco, C. and Rappuoli, R. (2001). Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Reviews*.2:457-466.

- Monteiro, L., de Mascarel, A., Sarrasqueta, AM., Bergey, B., Barberis, C., Talby, P., Roux, D., Shoulder, L., Goldfain, D., Lamouliatte, H. y Mégraud, F. (2001). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new test. *Am J Gastroenterol.* 96:353-8.
- Morris, B.L., Terry, L.T., Jun-Ling, Ma., Yun-Sheng, Chang., Wei-Cheng, You., Weng-Dong, Liu., Zhang, L. y Mitchell, H.G. (2001). *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *Scand. J. Infect. Dis.* 33:686-691.
- Morris, B.L., Terry, L.T., Jun-Ling, Ma., Yun-Sheng, Chang., Wei-Cheng, You., Weng-Dong, Liu., Zhang, L., Pee, D. y Mitchell, H. G. (2002). *Helicobacter pylori* infection in rural China: demographic. Lifestyle and environmental factors. *Int. J. Epidemiol.* 31:638-645.
- Murata, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Fu, H.Y., Tanimura, H., Tsujimoto, M. y col. (2004). *Helicobacter bilis* infection in biliary tract cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2:90-94.
- Namavar, E., Roosendaal, R., Kuipers, E.J., de Groot, P., van der Bijl, M.W., Peña, A.S. y de Graaff, J. (1995). Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, oesophagus, stomach and faeces of patients with gastritis. *Eur. J. Clin. Microb. & Inf. Dis.* 14:234-237.
- Navarro, V., Villarreal, M., Rojas, G., Lozoya, X. (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious disease. *J Ethnopharmacol.* 53:143-147.
- NIH. (1994). Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. *Jama.* 272:64-69
- O'Rourke, J. y Bode, G. (2001). Morphology and ultrastructure. En: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. (Eds. Mobley HLT. Mendz GL. y Hazell SL.). ASM Press Washington, pp.53-67.
- Ogura, K., Maeda, S., Nakao, M., Watanabe, T., Tada, M., Kyutoku, T., Yoshida, H., Shiratory, Y. y Omata, M. (2000). Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J. Exp. Med.* 192:1601-10.

- Okamoto, T., Yoshiyama, H., Nakazawa, T., Park, I.D., Chang, M.W., Yanai, H., Okita, K. y Shira, M. (2002). A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:849-56.
- Olivier, B.J., Bond, R.P., van Zyl, W.B., Delport, M., Slavik, T., Ziady, C., Droste, J.S.T.S., Lastovica, A., and van der Merwe, S.W. (2006). Absence of *Helicobacter pylori* within the oral cavities of members of a healthy South African community. *J. Clin. Microb.* 44:635–636.
- OMS (Organización Mundial de la salud). 2004. Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. ARP-Sociedad para el Avance del Pensamiento Crítico.
- Otto, G., Lee, A., Fox, J.G. y Murphy, J.C. (1992). Colonization of cats by potentially zoonotic *Helicobacter*-like organisms: implications for animal and public health. *Lab Anim Sci* 42:421.
- Pan, S., Liao, Ch., Lien, G.S. y Chen, S.H. 1991. Histological maturity of healed duodenal ulcers and ulcer recurrence after treatment with colloidal bismuth subcitrate or cimetidine. *Gastroenterol.* 101:1187-1191.
- Parsonnet, J. 1993a. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 22:89-104.
- Parsonnet, J. 1993b. *Helicobacter pylori* as a risk factor for gastric cancer. *Eur J. Gastroenterol. Hepatol.* 5:5103-107.
- Parsonnet, J., Samloff, I. M., Nelson, L. M., Orentreich, N., Vogelman, J. H. y Friedman, G. D. (1993). *Helicobacter pyloric*, pepsinogen, and risk for gastric adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomark.* 2:462-466.
- Parsonnet, J., Shmuelly, H. y Haggerty, T. (1999). Fecal and Oral Shedding of *Helicobacter pylori* From Healthy Infected Adults. *FREE. JAMA.* 282(23):2240-2245.
- Pearson, A.D., Ireland, A., Bamforth, J., Walker, C., Brooth, L., Hawtin, P., Holdstock, G. y Millward- Sadler, H., (1984). Polyacrylamide gel electrophoresis of spiral bacteria from the gastric antrum. *Lancet.* 1:1349-13540.

- Penissi, A.B., Fogal, T.H., Guzmán, J.A., Piezzi, R.S. (1998). Gastroduodenal mucosal protection induced by dehydroleucodine: mucus secretion and role of monoamines. *Dig. Dis. Sci.* 43:791-8.
- Penissi, A.B., Vera, M.E., Mariani, M.L., Rudolph, M.I., Ceñal, J.P., de Rosas, J.C., Fogal, T.H., Tonn, C.E., Favier, L.S., Giordano, O.S. y Piezzi, R.S. (2009). Novel anti-ulcer α - β -unsaturated lactones inhibit compound 48/80-induced mast cell degranulation. *Eur. J. Pharmacol.* 612: 122-130.
- Pérez-Pérez, G., Rothenbacher, D. y Brenner, H. (2004). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 9:1-6.
- Pounder, R. E. & D. NG. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9:33-39.
- Premio Nobel en Fisiología y Medicina de 2005. Disponible en: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005". Nobelprize.org. 20 Oct 2012. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/
- Price, A. B. (1991). The Sydney system: histological division. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 6:209-222.
- Prinz, C., Schöniger, M., Rad, R. (2001). Inflammation Blood Group Antigen Binding Adhesin during Chronic Gastric Key Importance of the *Helicobacter pylori* adherence Factor. *Cancer Res.* 61:1903-1909.
- Raedsch, R., Pohl, S., Plachky, J., Stiehl, A. y Kommenell, B.(1989). The growth of *Campylobacter pylori* is inhibited by intragastric bile acids. En: *Gastroduodenal Pathology and Campylobacter pylori.* (Eds. Megraud F. y Lamouliatte H.) Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp 409-412.
- Raman, M.R, Tewari, M. y Shukla, H.S. (2010). *Helicobacter* species and pathogenesis of gallbladder cancer. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 9:129-134.
- Repetto, M., Maria, A., Guzmán, J., Giordano, O. y Llesuy, S. (2003). Protective effect of *Artemisia douglasiana* Besser extracts in gastric mucosal injury. *J. Pharm. & Pharmacol.* 55:551–557.
- Repetto, M.G. y Llesuy, S.F. (2002). Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35:523-534.

- Robles-Zepeda, R.E., Velázquez-Contreras, C.A., Garibay-Escobar, A., Gálvez-Ruiz, J.C., Ruiz-Bustos, E. (2011). Antimicrobial activity of Northwestern Mexican plants against *Helicobacter pylori*. *J. Med. Food.* 14:1280-3.
- Rodríguez, E., Towers, G., y Mitchell, J. (1976). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochem.* 15:1573-1580.
- Rojas, M. (2006). Tratado de Medicina Tradicional Mexicana. Tomo II. *Tlahui*, México.
- Romaniuk, P.J., Zoltowska, B., Trus, T.J., Lane, D.J., Olsen, G.L., Pace, N.R. y Stahl, D.A. (1987). *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter sp.* *J. Bacteriol.* 169:2137-2141.
- Romero, S., Archer, J.R., Hamacher, M.E., Bologna, S.M., Schell, R.F. (1998). Case report of an unclassified microaerophilic bacterium associated with gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 26:142-143.
- Romo, J. y Tello, H. (1972). Estudio de la *Artemisia mexicana*. Armexina, un nuevo santanólido cuya lactona posee fusión *cis*. *Rev. Latinoamer. Quím.* 3:122-126.
- Romo, J., de Vivar, R., Treviño, R., Joseph-Nathan y Díaz, E. (1970). constituents of *artemisia* and *chrysanthemum* species-the structures of chrysartemins A and B. *Phytochem.* 9:1615-1621.
- Ruiz- Cancino, A, Cano, A. y Delgado, G. (1993). Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*. *Phytochem.* 33:1113-1115.
- Sacks, L.V., Labriola, A.M., Gill, V.J., Gordin, F.M. (1991). Use of ciprofloxacin for successful eradication of bacteremia due to *Campylobacter cinaedi* in a human immunodeficiency virusinfected person. *Rev Infect. Dis.* 13:1006-1008.
- Sánchez-Viesca, F. y Romo, J. (1963). Estafiatin, a new sesquiterpene lactone isolated from *Artemisia mexicana* (Willd). *Tetrahedron.* 19:1285–1291.
- Scholte, G.H.A., van Doorn, L.J., Cats, A., Bloemena, E., Lindeman, J., Quint, W.G.V., Meuwissen S.G.M., Kuipers, E.J. (2002). Genotyping of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded gastric biopsy specimens: relation to histological parameters and effects on therapy. *Am. J. Gastroenterol.* 97:1687-1695.

- Smoot, D.T., Resau, J.H., Naab, T., Desbordes, B.C., William, T., Bull.Henry, K., Curry, S.B., Nidiry, J., Sewchand, J., Mills- Robertson, K., Frontin, K., Abebe, E., Dillon, M., Chippendale, G.R., Phelps, P.C, Scout, V.F. y Mobley, H.L.T. (1993). Adherence of *Helicobacter pylori* to Cultured Human Gastric Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 61:350-355.
- Sobrino-Cossio, S., Rivera-Ramos, J.F., Ayala-Aguilar, G., Bosques-Padilla, F., Esquivel- Ayanegui, F., Herrera-Goepfert, R., Moreno-Terrones, L., Rodríguez-Magallán, A. y Torres- López, J. (2007). Epidemiología y Fisiopatogenia. III Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Rev. Gastroenterol.* 72:137-153.
- Solnick, J.V. y Schauer.(2001). Emergente of diverse *Helicobacter pylori* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:59-57.
- Souza, M.C, Beserra, A.M., Martins, D.C., Real, V.V., Santos, R.A., Rao, V.S., Silva, R.M. y Martins, D.T. (2009). *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. *J. Ethnopharmacol.* 123:452-8.
- Stege, P. W., Davicino, R. C., Vega, A. E., Casali, Y. A., Correa, S., Micalizzi, B. (2006). Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (jarilla) against *Helicobacter pylori*. *Phytomed,* 13:724-727.
- Suck-Chei, C., Eun-Ju, C., Hyun-Mee, O., SungGa, L., Jeong-Kun, L., Meung-Su, L., Yong-II, S., Suck-Jun, C., Jeong-Ryong, C., Kang-Min, L., Won-Jung, L., Jae-Sik, P., Chang-Yell, S., Tae-Young, O. y Chang-Duk, J. (2006). DA-9601, a standardized extract of *Artemisia asiatica*, blocks TNF- α -induced IL-8 and CCL20 production by inhibiting p38 kinase and NF- κ B pathways in human gastric epithelial cells. *J. Gastroenterol.* 12:4850-4858.
- Suerbaum, S. y Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* 347:1175–1186.
- Tee, W., Montgomery, J. y Dyall-Smith, M. (2001). Bacteremia caused by an *Helicobacter pullorum*-like organism. *Clin Infect Dis* 33:1789–1791.
- Terres, J., (1897). Informe de los trabajos realizados en el mes de febrero de 1897. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo II. Oficina tipográfica de la Secretaría de Fomento. México.

- Torres, J. (1897). Informe de los trabajos realizados en el mes de febrero de 1897. Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo III. Oficina tipográfica de la secretaría de fomento. México.
- Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gómez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo, R. R., Tapia, C. R. y Muñoz, O. (1998). A community-based seroepidemiological study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J. Infect. Dis.* 178:1089–1094.
- Torres, J., Lopez, L., Lazcano, E., Camorlinga, M., Flores, L. y Muñoz, O. (2005). Trends in *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14:18
- Totten, P.A., Fennell, C.L., Tenover, F.C., Wezenberg, J.M., Perine, P.L., Stamm, W.E. y Holmes, K.K. (1985). *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.) and *Campylobacter fennelliae* (sp. nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *J. Infect. Dis.* 151:131-139.
- Trivett-Moore, N., Rawlinson, W., Yuen, M. y Gilbert, G. (1997). *Helicobacter westmeadii* sp. nov., a new species isolated from blood cultures of two AIDS patients. *J. Clin. Microbiol* 35:1144–1150.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. (2012). Disponible en: <http://www.tropicos.org>
- Vakil N. y Megraud F. (2007). Eradication Therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 133:985–1001.
- Vale, F.F., Vitor, J.M.B. (2010). Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas?. *Inter. J. of Food Microb.* 138:1–12
- Valle, J., Kekki, M., Sipponen, P., Ihamaki, T. y Siurala, M. (1996). Long-term course and consequences of *Helicobacter pylori* gastritis. *Scand. J. Gastroenterol.* 31:546-550.
- van Amsterdam, K., van Vliet, AH., Kusters, JG. y van der Ende, A. (2006). Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*- related diseases. *FEMS Microbiol. Rev.* 30:131-56.

- van den Bulck, K., Decostere, A., Baele, M., Driessen, A., Debongnie, J.C., Burette, A. y col. (2005). Identification of Non-*Helicobacter pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. *J. Clin. Microbiol.* 43:2256–2260.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. y De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* Taxonomy: enmendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 41:88-103.
- Varoli, O., Landini, M. P., La PLaca, M., Tucci, A., Corinaldesi, R., Paparo, G. F., Stanghellini, V. y Barbara, L. (1991). Presence of *Helicobacter pylori* in gastric juice. *Am. J. Gastroenterol.* 86(2): 249.
- Vega, A.E., Wendel, G.H., Maria, A.O. y Pelzer, L. (2009). Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* and dehydroleucodine against *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacol.* 124:653-5.
- Villaseñor, R.J.L., y Espinosa, G.F.J. (1998). Catálogo de malezas de México. UNAM. Consejo Nacional Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F. pp. 449
- Walker, M.M., Logan, R.P., Gummett, P.A., Baron, J.H. y Misiewicz, J.J. 1993. The influence of *Helicobacter pylori* eradication on the structure of duodenal ulcer scars. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 5:S97-S98.
- Warren, J. R. y Marshall, B. J. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 1:1273-1275.
- Zapata-Colindres, J.C., Zepeda-Gómez, S., Montano-Loza, A., Vazquez-Ballesteros, E., Jesus-Villalobos, J. y Valdovinos-Andraca, F. (2006). The association of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peptic ulcer disease. *Cancer. J. Gastroenterol.* 20:277–280.
- Zavala-Sánchez, M.A., Pérez- Gutiérrez, S., Pérez- González, C., Sánchez-Saldivar, D., y Arias- García, L. (2002). Antidiarrhoeal activity of nonanal, an aldehyde isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharmac. Biol.* 40:263-268.