



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* Y
ANTINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA PLANTA
*CUPHEA AEQUIPETALA (Cav) LYTHRACEAE***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Oscar David Arroyo García



MÉXICO, D.F.

2013



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: María del Pilar Granada Macías

VOCAL: Profesor: José Fausto Rivero Cruz

SECRETARIO: Profesor: Juan Francisco Palacios Espinosa

1er. SUPLENTE: Profesor: Beatriz Ruiz Villafán

2° SUPLENTE: Profesor: Mabel Clara Frago Serrano

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 2, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: DR. JUAN FRANCISCO PALACIOS ESPINOSA

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ

SUSTENTANTE: OSCAR DAVID ARROYO GARCÍA

I. ÍNDICE

1.1. Lista de tablas	4
1.2 Lista de figuras	4
1.3 Lista de abreviaturas	5
II RESUMEN	8
III INTRODUCCIÓN	9
3.1.1. Antecedentes históricos sobre <i>Helicobacter pylori</i>	9
3.1.2. Taxonomía	12
3.1.3. Características generales de <i>H. pylori</i>	14
3.1.4. Epidemiología y transmisión	16
3.1.5. Factores de patogenicidad y virulencia.	19
3.1.6. Patologías asociadas a <i>H. pylori</i> .	24
3.1.7. Diagnóstico.	29
3.1.8. Tratamiento.	31
3.2.1. Uso de plantas medicinales como tratamiento alternativo en contra de <i>H. pylori</i> .	33
3.2.2. Generalidades de <i>Cuphea aequipetala</i> Cav. (Lythraceae)	34
3.2.3. Clasificación taxonómica de <i>Cuphea aequipetala</i>	34
3.2.4. Nombres comunes en México.	35
3.2.5. Sinonimia.	35
3.2.6. Antecedentes históricos.	37
3.2.7. Descripción botánica.	37
3.2.8. Distribución.	37
3.2.9. Hábitat.	38
3.3. Usos tradicionales	38
3.3.1. Actividad farmacológica y microbiológica.	40
3.3.2. Fitoquímica.	41
IV JUSTIFICACIÓN	45
V OBJETIVOS	46
5.1. OBJETIVO GENERAL	46
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	46
VI MATERIALES Y MÉTODOS.	47
6.1.1. Material vegetal.	47

6.1.2. Preparación del extracto acuoso y su fraccionamiento primario.	47
6.1.3. Fraccionamiento sucesivo de CA1.	48
6.1.4. Fraccionamiento sucesivo de CA2.	48
6.1.5. Fraccionamientos secundario de CA3.	49
6.2.1. Evaluación del extracto acuoso íntegro y sus fracciones sucesivas sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i>	51
6.2.3. Pruebas de identificación de <i>H. pylori</i>	¡Error! Marcador no definido.
6.2.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	52
6.3.1. Efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima ureasa	5¡Error! Marcador no definido.
6.3.2. Purificación parcial de la enzima ureasa de <i>H. pylori</i> .	57
6.3.3. Determinación de la actividad inhibitoria de CA1 y fracciones primarias sobre la enzima ureasa	58
6.4.1. Evaluaciones <i>in vivo</i>	61
6.4.1.1. Determinación de la Toxicidad Aguda del Extracto acuoso íntegro (CAI).	61
6.4.1.2. Determinación del efecto antiinflamatorio, mediante el modelo de edema auricular inducido con TPA y xilol	62
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
7.1.1. Preparación y fraccionamiento biodirigido del extracto acuoso íntegro	64
7.1.2. Fraccionamiento secundario de CA1	68
7.1.3. Fraccionamiento de CA2	69
7.1.4. Fraccionamiento terciario de CA2-A y CA2-B	70
7.1.5. Fraccionamiento secundario de CA3	73
7.2.1. Actividad anti-ureasa	77
7.3.1. Determinación de toxicidad aguda (método de Lorke)	79
7.4.1. Estudio de la actividad antiinflamatoria	81
VIII Conclusiones	87
IX Perspectivas	89
X Bibliografía	90

1.1 Lista de tablas

Tabla 1. Especies patógenas del genero *Helicobacter*.

Tabla 2. Plantas conocidas con el nombre hierba del cáncer.

Tabla 3. Reactivos empleados para determinar el efecto inhibitorio de CAI y fracciones primarias sobre la enzima ureasa.

Tabla 4. Rendimiento y actividad anti-*H. pylori* de CAI y sus fracciones primarias (CA1, CA2, CA3, CA4).

Tabla 5. Nomenclatura y actividad anti-*H. pylori* de las fracciones secundarias de CA1.

Tabla 6. Nomenclatura, rendimiento y actividad anti-*H. pylori* de las fracciones secundarias obtenidas de CA2.

Tabla 7. Nomenclatura, rendimiento y actividad anti-*H. pylori* de CA2-A y CA2-B.

Tabla 8. Nomenclatura, rendimiento y actividad anti-*H. pylori* de CA3.

Tabla 9. Toxicidad aguda de CAI.

Tabla 10. Efecto de CAI administrada vía oral y tópica sobre el edema inducido con xilol y TPA en oreja de ratón.

Tabla 11. Efecto de las fracciones primarias CA2, CA3 y CA4 administradas vía oral y tópica sobre el edema inducido con xilol y TPA en oreja de ratón.

1.2 Lista de figuras

Figura 1. Morfología de *Helicobacter pylori*.

Figura 2. Giulio Bizzozero.

Figura 3. Científicos Robin Warren y Barry Marshall.

Figura 4. Hidrólisis de la urea.

Figura 5. Estructura del estomago, lesión de ulcera gástrica.

Figura 6. Hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*).

Figura 7. Distribución de *Cuphea aequipetala cav* en la República Mexicana y Centro América.

Figura 8. Porcentaje de usos medicinales de *Cuphea aequipetala* Cav., reportados por los habitantes de Villa del Carbón Estado de México.

Figura 9. Quercetina-3-sulfato.

Figura 10. Estructuras químicas de compuestos aislados reportados del genero *Cuphea*.

Figura 11. Fraccionamiento sucesivo de CAI.

Figura 12. Pruebas bioquímicas para la tipificación de *H. pylori*.

Figura 13. Tinción de gram de un cultivo liquido de *H. pylori*.

Figura 14. Reacción de formación de indofenol.

Figura 15. Perfil cromatográfico de CAI y sus fracciones primarias.

Figura 16. Actividad inhibitoria del extracto acuoso íntegro (CAI) y de sus fracciones primarias.

Figura 17. Perfil cromatográfico de las fracciones secundarias de CA1.

Figura 18. Perfiles cromatográficos de las fracciones terciarias de CA2-A.

Figura 19. Perfiles cromatográficos de las fracciones terciarias de CA2-B.

Figura 20. Perfiles cromatográficos de las fracciones secundarias de CA3.

Figura 21. Grafica del efecto inhibitorio del extracto acuoso íntegro (CAI), sus fracciones primarias (CA2, CA3 y CA4) obtenidas de *C. aequipetala* sobre la actividad de la enzima ureasa.

1.3 Lista de abreviaturas

%I	Por ciento de inhibición.
A ₆₀₀	Absorbencia a 600 nm.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
A _f	Absorbencia final del cultivo.
A _i	Absorbencia inicial del cultivo.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal.
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia.
BabA2	Adhesina de unión al antígeno de los grupos sanguíneos A, B y O.
CA	<i>Cuphea aequipetala</i> .

CA1	Fracción primaria de diclorometano de <i>C. aequipetala</i> .
CA2	Fracción primaria de acetato de etilo de <i>C. aequipetala</i> .
CA3	Fracción primaria de <i>n</i> -butanol de <i>C. aequipetala</i> .
CA4	Fracción primaria acuosa residual de <i>C. aequipetala</i> .
CagA	Proteína asociada al gen <i>cagA</i> .
<i>cagA</i>	Gen que codifica para la proteína CagA.
<i>cag</i> PAI	Isla de patogenicidad <i>cag</i> .
CCA	Cromatografía en Columna Abierta.
CCF	Cromatografía en capa fina.
CD4	Glicoproteína de tipo inmunoglobulina que se expresa en la superficie de algunas células T y células dendríticas.
CMHP	Consenso Mexicano sobre <i>Helicobacter pylori</i> .
CMI	Concentración mínima inhibitoria.
DE ₅₀	Dosis efectiva media.
DL ₅₀	Dosis letal media.
DMSO	Dimétil sulfóxido.
G-C	Guanina-Citosina.
hrs	Horas.
<i>i.p.</i>	Administración intraperitoneal.
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (por sus siglas en inglés, International Agency for Research on Cancer)
IBP's	Inhibidores de la Bomba de Protones.
IL	Interleucina.
INI	Instituto Nacional Indigenista.
IU	Índice de Úlcera.
LPS	Lipopolisacárido.
MALT	Tejido Linfoide Asociado a Mucosa.
min	minutos.
nm	Nanómetros.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
<i>p.o.</i>	Administración por vía oral.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
SabA	Adhesina de unión al ácido siálico.
SSI	Solución salina isotónica.
TPA	13-acetato del-12- <i>O</i> -tetradecanoil-forbol.
UFC	Unidades formadoras de colonias.

UV	Ultravioleta.
Vac A	Citotoxina vacuolizante.
VEH	Vehículo donde se disuelven los tratamientos.
ΔA_{600}	Cambio de absorbencia a 600nm.
ΔA_c	Valor promedio de absorbencia de los controles.
ΔA_e	Valor promedio de absorbencia de los experimentales.

II RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, que está presente en más del 50% de la población mundial, es considerada como el principal agente etiológico de la gastritis crónica y de la úlcera péptica. También se le asocia con la patogenia del cáncer gástrico y del linfoma gástrico tipo MALT.

En la actualidad el tratamiento de elección para combatir la infección es la terapia triple, la cual consiste en la administración de dos antibióticos más un inhibidor de la bomba de protones. Dicha terapia tiene una efectividad aproximada del 80%, sin embargo, existen diversos problemas respecto al tratamiento, tales como la resistencia del microorganismo a los antibióticos usados, su alto costo, la complejidad y duración de la terapia, entre otros. Por estas razones se ha buscado en las plantas medicinales nuevas alternativas de tratamiento.

Cuphea aequipetala Cav. (Lythraceae) es una planta nativa de México conocida popularmente como “hierba del cáncer” y es utilizada para tratar diversos padecimientos de tipo digestivo como diarreas, disentería, dolor, ardor o infecciones del estómago; también es apreciada para tratar casos de cáncer o diversas neoplasias. Estudios recientes de dos de sus extractos (acuoso y metanólico) sobre el crecimiento de *H. pylori*, demostraron actividad inhibitoria significativa (Castillo-Juárez *et al.*, 2009).

Considerando estos antecedentes, en el presente trabajo de tesis se reporta el fraccionamiento del extracto acuoso íntegro (CAI), la evaluación de la actividad anti-*H. pylori* por el método de dilución en cultivo líquido, la actividad inhibitoria sobre la enzima ureasa usando el método colorimétrico de Weatherburn y el efecto antiinflamatorio del extracto acuoso íntegro y sus fracciones primarias empleando el modelo del edema auricular agudo inducido por la aplicación tópica de 13-acetato del-12-O-tetradecanoil-forbol y xilol. Finalmente, se reporta el potencial tóxico del extracto acuoso evaluado mediante la prueba de Lorke.

A partir de CAI se obtuvieron cuatro fracciones primarias (CA1, CA2, CA3 y CA4). Los resultados muestran que los extractos con mejor actividad anti-*H. pylori* fue CAI y CA1 (CMI=125 y 15.2 µg/ml) y fueron comparados con dos fármacos de referencia metronidazol y amoxicilina (CMI 300 y 0.01 µg/ml). En el caso de la enzima ureasa esta fue inhibida en mayor proporción por la fracción CA3 ya que a una

concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$ inhibió al 100% la acción de la ureasa. Por otro lado el efecto antiinflamatorio empleando xilol, la fracción CA4 mostro la mejor actividad administrada por vía tópica a una dosis de 0.5 mg/Kg (70.34% de inhibición), por otro lado, con 13-acetato del-12-O-tetradecanoil-forbol la fracción con mejor efecto fue CA3 vía tópica con una dosis de 0.5 mg/Kg (47.49% de inhibición). Como último punto, mediante el método de Lorke se obtuvo un $\text{DL}_{50} > 5000 \text{ mg/kg}$. Concluyendo, las fracciones menos polares presentaron mejor actividad anti-*H. pylori* y las extraídas con disolventes mas polares presentaron una mejor actividad antiinflamatoria como CA4 y en contra de la enzima ureasa como CA3, CA1 no presenta ningún efecto toxico bajo el modelo de Lorke.

III INTRODUCCIÓN

3.1.1. Antecedentes históricos sobre *Helicobacter pylori*

De acuerdo con algunas investigaciones se cree que *Helicobacter pylori* (Figura 1) pudo haber estado presente desde las primeras civilizaciones africanas (Vakil *et al.*, 2007), causando su migración junto al desplazamiento humano hace aproximadamente 58.000 años (Linz *et al.*, 2007).

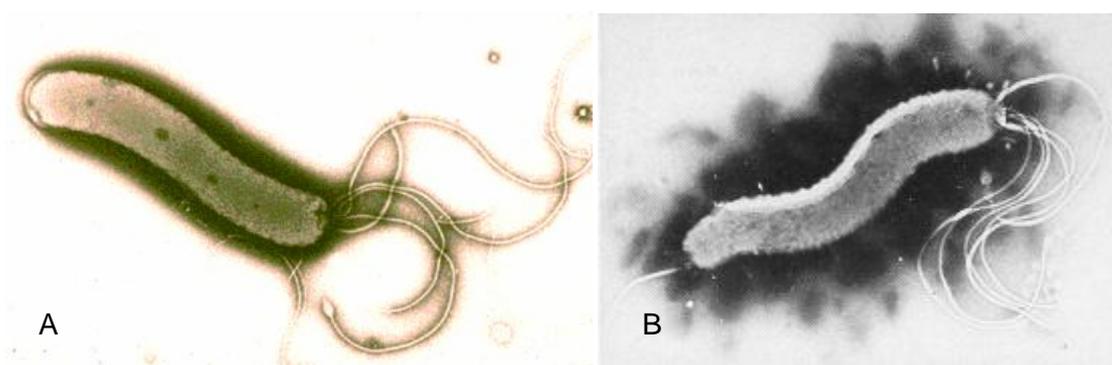


Figura 1. A) *H. pylori* (tomada de http://curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.mx/2008_07_01_archive.html, consultada el 1 de Marzo del 2013). **B)** aspecto de *H. pylori* cuando se observa por microscopia electrónica (tomada de <http://www.helicobacterspain.com/imagenes/..%5Cimagenes%5Cpyloribn.htm>, consultada el 1 de Marzo del 2013).

De este hecho, dan cuenta varios estudios, por ejemplo: utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se encontró en una población nativa de la región amazónica, cepas de *H. pylori* con genotipos del este de Asia; en cambio, estos genotipos no estuvieron presentes en otra población mestiza de Brasil. Con esto se puede suponer que el microorganismo estuvo presente en los colonizadores americanos que migraron de Asia aproximadamente once mil años atrás (Ghose *et al.*, 2002; Pamo, 2003; Falush *et al.*, 2003).

Esta bacteria fue ignorada durante muchos años hasta que, en 1893, Bizzozero (Figura 2A) encuentra en estómagos de perros y gatos un microorganismo que describe como un espirilo (Figura 2B) (Bizzozero, 1893). De manera similar, Balfour en 1906 observó microorganismos en forma de espiroquetas en muestras de úlceras gástricas en perros y monos (Balfour, 1906).



Figura 2. A) Giulio Bizzozero (1846-1901) (Tomado de Lazarte, 2009). **B)** Detalle de un dibujo de Bizzozero, mostrando espirilos libres en el lumen de las glándulas gástricas caninas y recogidas en vacuolas (Tomado de Bizzozero, 1893).

Casi 90 años más tarde, para ser exacto en 1983, dos investigadores de Australia, Barry Marshall y Robín Warren, lograron aislar y cultivar una bacteria espiral presente en la mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica y/o úlcera péptica. De acuerdo a su parecido morfológico (forma curva) y otras características con bacterias del género *Campylobacter* (crecimiento en medio rico y sensible a metronidazol), esta bacteria recibió el nombre de *Campylobacter pyloridis*. En 1987 de acuerdo a un estudio microbiológico donde se detectaron algunas diferencias con el género *Campylobacter* (presencia de 2 a 6 flagelos, carencia de filamentos axiales, microaerofilia y la presencia de algunas similitudes con el género *Vibrio*) se modificó el nombre a *Campylobacter pylori* (Warren *et al.*, 1983).

Posterior a estas pruebas, Marshall y Skirrow observaron que el porcentaje de G+C del ADN de la bacteria era del 34%, similar al género *Campylobacter*, pero mediante estudios más específicos demostraron diferencias en la composición de ácidos grasos, la secuencia de rARN, la falta de una quinona y la producción de ureasa. Por estos descubrimientos, en 1989, Goodwin incluyó a esta bacteria en un nuevo género: el género *Helicobacter* (*helix* helicoidal y *bacter* bacteria), para obtener su nombre actual *Helicobacter pylori* (Dewhirst *et al.*, 2000).

Por el descubrimiento de *H. pylori* y su relación con la úlcera gástrica y la gastritis, Robín Warren y Barry Marshall (Figura 3), en el 2005 fueron galardonados con el premio Nobel de medicina.

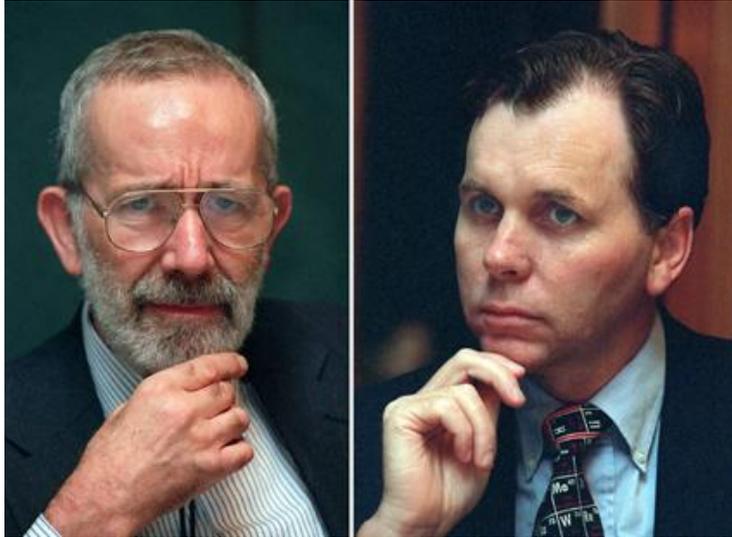


Figura 3. Robin Warren y Barry Marshall (tomada de; <http://www.br.de/fernsehen/bayerischesfernsehen/sendungen/gesundheit/themenuebersicht/medizin/magen-helicobacter-pylori-magengeschwuer-magenkrebs100.html>, consultada el 1 de Marzo del 2013)

3.1.2. Taxonomía

Como se mencionó anteriormente, la bacteria en un principio se incluyó dentro del género *Campylobacter* por algunas características distintivas (Pearson *et al.*, 1984; Romaniuk *et al.*, 1987; Goodwin *et al.*, 1989). Sin embargo, desde 1893 se ha nombrado de maneras diferentes (Dubreui *et al.*, 2002):

- *Campylobacter* like organism, CLO
- *Campylobacter pyloridis*
- *Campylobacter pyloric*
- *Campylobacter pylori*
- *Helicobacter pylori*

Actualmente el género *Helicobacter* se compone de 38 especies (Tabla 1) (Fernández, 2012) de las cuales algunas de ellas ocupan de hospedero natural al humano, como son *H. heilmannii*, *H. pullorum*, *H. rappini*, *H. fennelliae*, *H. cinaedi* que causan enfermedades diferentes a las relacionadas con *H. pylori* como son hepatocarcinomas, proctitis, hepatitis, colitis y necrosis hepática (Fox *et al.*, 1997).

Las especies de *Helicobacter* se subdividen en dos grupos: Las especies que tienen la capacidad de colonizar el estómago (Solnick y Schauer, 2001) y las especies

enterohepáticas que pueden colonizar la parte baja del tracto gastrointestinal (intestino o hígado) incluyendo colon e íleon, asociándose con inflamación crónica e hiperproliferación de células epiteliales (Kuster *et al.*, 2006).

Especie	Hospedero	Lugar de la infección	
<i>H. pylori</i>	Humano	Estómago	
<i>H. nemestrinae</i>	Macaco, hurón		
<i>H. bizzozeronii</i>	Perro, humano		
<i>H. heilmani</i>	Mamíferos		
<i>H. felis</i>	Gato, perro		
<i>H. mustelae</i>	Macaco, hurón		
<i>H. salomonis</i>	Perro, gato		
<i>H. acinonychis</i>	Leopardo		
<i>H. suis</i>	Cerdos		
<i>H. aurati</i>	Hámster sirio		
<i>H. cetoreum</i>	Cerdo, hurón		
<i>H. bovis</i>	Bovinos		
<i>H. cyanogastricus</i>	Perros		
<i>H. rappini</i>	Mamíferos		Intestino, hígado
<i>H. hepaticus</i>	Ratón		
<i>H. bilis</i>	Ratón, perro, humano		
<i>H. muridarum</i>	Ratón		
<i>H. rodentum</i>	Ratón, rata		
<i>H. canis</i>	Perro		
<i>H. fennelliae</i>	Humano		
<i>H. pollorum</i>	Pollo		
<i>H. pemetensis</i>	Aves		
<i>H. cinaedi</i>	Humano		

Tabla 1. Especies patógenas del género *Helicobacter* (Continuación).

Especie	Hospedero	Lugar de la infección
<i>H. canadensis</i>	Humano, pollo	Intestino, hígado
<i>H. cholecystus</i>	Hámster	
<i>H. troglodytes</i>	Rata	
<i>H. westmeadii</i>	Humano	
<i>H. winthamensis</i>	Humano	
<i>H. anseris</i>	Ganso	
<i>H. brantae</i>	Ganso	
<i>H. equorum</i>	Caballo	
<i>H. ganmani</i>	Ratón	
<i>H. mastomyrnis</i>	Mamíferos	
<i>H. mormota</i>	Mamíferos	
<i>H. mesocricetorum</i>	Hámster sirio	
<i>H. magdeburgensis</i>	Ratón	
<i>H. suncus</i>	Mamífero	
<i>H. typhlonicus</i>	Ratón	

(Tomada y modificada de Fernández, 2012)

3.1.3. Características generales de *H. pylori*

H. pylori es miembro de un grupo de bacterias adaptadas para vivir en la mucosa gástrica de humanos, para lo cual tiene características específicas incluidas su morfología y metabolismo. Es una bacteria Gram-negativa, polimórfica, por ejemplo puede presentar forma de espiral (en condiciones óptimas de crecimiento) y forma cocoide cuando no hay condiciones óptimas; está relacionada con algunas patologías gástricas (gastritis y úlceras gástricas). Dicha bacteria adquirió un gran interés ya que más del 50% de la población mundial está infectada con este microorganismo (Windsor *et al.*, 2000; Vale y Vitor, 2010).

Actualmente ha tomado un papel muy importante en el ámbito científico debido a sus características patogénicas involucradas en diversas enfermedades gastroduodenales. Se conoce que la bacteria juega un papel muy importante en la gastritis crónica, la úlcera péptica, el linfoma del tejido linfoide asociado a las mucosas (linfoma gástrico tipo MALT por sus siglas en inglés) y el adenocarcinoma gástrico. La OMS, en 1994, incluyó a *H. pylori* como agente carcinogénico de clase 1 (IARC, 1994; Jafri *et al.*, 2008).

H. pylori mide entre 2.5-5 μm de largo y 0.5-1 μm de ancho, tiene de 2 a 6 flagelos unipolares de aproximadamente 2.5 μm de largo los cuales ayudan a su movilidad en soluciones viscosas tales como la capa del moco que cubre las células epiteliales gástricas (Jones *et al.*, 1985; Kusters *et al.*, 2006), no presenta esporas y cuenta con un glicocálix distintivo que mide alrededor de 40 nm de espesor. La pared celular posee un número variable de proteínas de membrana de igual forma presenta lipopolisacáridos (Soltensz *et al.*, 1992). Es una bacteria exigente, solo crece en medios sólidos suplementados con 7 a 10% de sangre de carnero o caballo o medios suplementados con suero, hemina y almidón; además crece en una atmósfera microaerofílica (10% de CO_2), su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y requiere de 2 a 7 días de incubación. En medios sólidos presenta colonias pequeñas, convexas, lisas, translúcidas y húmedas como “gotitas de rocío” con un tamaño aproximado de 1-2 mm de diámetro.

No presenta crecimiento con la adición de ácidos biliares, produce enzimas que ayudan a su identificación bioquímica como son: ureasa, catalasa y oxidasa. Además, presenta resistencia al ácido nalidíxico (Goodwin *et al.*, 1993). Es fermentador de la D-glucosa, posee enzimas activas características del ciclo de la urea y puede metabolizar algunos aminoácidos por fermentación muy similar a las bacterias anaerobias (Torres *et al.*, 2002).

En cortes histológicos de estómago humano la bacteria presenta una forma bacilar la cual es muy útil para colonizar la capa del moco que cubre el epitelio gástrico específicamente en el píloro y antro donde está expuesta a gradientes de pH en un intervalo de 2 a 7 (Kusters *et al.*, 2006). Puede sobrevivir a pH ácidos debido a que puede sintetizar a la enzima ureasa la cual cataliza la hidrólisis de la urea formando amonio y dióxido de carbono, el amonio forma un ambiente neutro adecuado para la bacteria.

3.1.4. Epidemiología y transmisión

Epidemiología

La infección por esta bacteria es un problema a nivel mundial, más del 50% de la población mundial está infectada. En los países desarrollados la prevalencia es menor al 40%, mientras que en aquellos en vías de desarrollo, la infección se estima en valores cercanos al 80% (Vale y Vítor, 2010). La infección se adquiere a temprana edad, algunos datos de países en vías de desarrollo indican que a los cinco años más del 20% de los niños están infectados (pudiendo incrementarse hasta un 30-40% en los grupos de bajo nivel socioeconómico) y a los 20 años cerca del 80% (Torres *et al.*, 2002). Esto contrasta con los países desarrollados, del 5 al 10% de los niños están infectados antes de los 10 años de edad, por nombrar un ejemplo en Estados Unidos, la incidencia anual de infección es del 0.5% al 1% en niños menores de 10 años (Roosendaal, 1997; Everhart *et al.*, 2000; Mitchell, 2001) y la tasa de adquisición de nuevas infecciones entre adultos es baja (<1% por año) (Doodley *et al.*, 1989).

En México, en un estudio realizado en 1998 se determinó la presencia de este microorganismo en 11,605 sueros representativos de la población y se estableció que el 66% presentó la infección. La distribución de la prevalencia por grupos de edad observada fue la siguiente: 25% en el grupo de 1-4 años, 43% en el de 5-9 años, 55% en el de 10-14 años y 65% en el grupo de 65 años y mayores; más del 80% de los adultos estaban infectados a los 25 años de edad (Torres *et al.*, 2000).

Se relaciona la frecuencia de la bacteria con el 85 al 90% de las úlceras pépticas y más del 90%, con el cáncer gástrico y se señala al adenocarcinoma gástrico como la neoplasia más frecuente del aparato digestivo con tasas de letalidad muy altas en algunos estados de la República (Torres *et al.*, 2005). En estudios realizados en 2008 en México sobre la incidencia y mortalidad en este año era de 7,859 (6.2% de la población) y 6,751 (8.7% de la población) respectivamente. A nivel mundial en el mismo año se observaron 998,602 nuevos casos y 737,419 defunciones (IARC, 2008).

Dos estudios reportan que la reinfección en México después de erradicar a la bacteria es del 3.2% anual aproximadamente (Leal-Herrera *et al.*, 2003; Soto *et al.*, 2003) debido a la falta de cuidado y a la exposición a los múltiples factores de infección después de erradicar al bacilo (Pérez-Pérez *et al.*, 2004).

Transmisión

La ruta exacta de transmisión no está bien definida, el contacto directo de persona a persona es la forma más probable de adquirir al microorganismo. Esta forma de transmisión se puede dividir en dos categorías principales: transmisión vertical y horizontal. La primera consiste en la diseminación de la infección de los integrantes mayores a los menores dentro de la misma familia mientras que la horizontal involucra el contacto con personas externas al núcleo familiar sin excluir al factor ambiental (Vale y Vítor, 2010). Se ha observado que la prevalencia de la infección por la bacteria se encuentra incrementada en los miembros de las familias con niños infectados, comparada con miembros de familias de niños no infectados, esto nos indica que una de las fuentes de transmisión más estudiada es el contacto directo (Mitchell *et al.*, 1996). Por ejemplo, el riesgo de infección de un niño es aproximadamente ocho veces mayor cuando la madre está infectada y cuatro veces si el padre está infectado (Rothenbachern *et al.*, 2002).

Se han propuesto varias rutas para la transmisión del bacilo, entre ellas se incluyen las rutas gastro-oral, oral-oral y fecal-oral.

Vía oral-oral. Dado que la flora intestinal puede alcanzar y colonizar la boca después del vómito o la regurgitación, se ha postulado que la saliva podría ser un fuente de transmisión de *H. pylori*. Estudios han reportado la amplificación de ADN de la bacteria a partir de la saliva y la placa dental, mientras que de la misma fuente se ha logrado cultivar a la bacteria (Li *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1999; Vale y Vítor, 2010).

Vía fecal-oral. El bacilo es removido de la mucosa gástrica y eliminado por el intestino sobreviviendo en las heces y contaminando el ambiente. Estudios en aguas de ríos y lagos han propuesto que es la principal fuente de infección por contaminación de las heces. Se ha podido identificar en heces de niños y de pacientes adultos infectados (Thomas *et al.*, 1992; Torres *et al.*, 2002). Aunque los intentos por cultivar a *H. pylori* de heces fecales han tenido poco éxito debido a que la forma cocoide (no viable) es la que predomina en estas muestras, varios investigadores han detectado ADN de la bacteria. Algunos experimentos en animales demuestran también que esta vía de transmisión puede ser considerada (Vale y Vítor, 2010).

Gastro-oral. La presencia de este agente patógeno en el jugo gástrico en más del 58% de pacientes infectados plantea la posibilidad de que el reflujo puede representar

una forma de transmisión del organismo incluyendo la regurgitación de material gástrico y el vómito; ambos son comunes en la niñez y pueden favorecer la transmisión (Mitchell *et al.*, 1996). Parsonnet, logró aislar a este microorganismo en el 100% de las muestras que estudió a partir de adultos a quienes se les indujo el vómito y, de las muestras del aire tomadas cerca de estos sujetos durante el vómito, se recuperó al microorganismo en el 37.5% de los casos. Es poco frecuente la transmisión por medio de los tubos de endoscopia o sondas contaminadas que han estado en contacto con vómito o contenido gástrico de pacientes infectados (Parsonnet *et al.*, 1997).

3.1.5. Factores de patogenicidad y virulencia.

Factores involucrados en la colonización y prevalencia

Para colonizar el tracto gastrointestinal *H. pylori* tiene que prevalecer en el ambiente del estómago y sobrevivir en el medio ácido. Para ello, necesita diversos mecanismos de patogenicidad y virulencia. Un factor de virulencia se puede definir como todo aquel mecanismo que le permite a la bacteria colonizar, en este caso a la mucosa gástrica y evadir la respuesta inmune del huésped (Arévalo *et al.*, 2009).

La bacteria posee mecanismos que le permiten sobrevivir en el ambiente ácido del lumen hasta alcanzar el epitelio gástrico (Malaty *et al.*, 2000).

Flagelos y forma de la bacteria

La motilidad de *H. pylori* es un factor importante para la penetración a través de la capa de mucina para llegar a las células del epitelio gástrico. La bacteria posee flagelos unipolares que consisten principalmente de flagelina (FlaA y FlaB). Con la ayuda de sus flagelos y su forma helicoidal se puede desplazar a través de la capa de moco que cubre y protege a las células epiteliales de la mucosa gástrica. Los movimientos de la bacteria hacia la mucosa del estómago van determinados por factores quimiotácticos (urea y iones de bicarbonato) (Montecucco *et al.*, 2001).

Ureasa

La bacteria produce una enzima para mantener un microambiente neutro alrededor de ella durante su estancia en el estómago: la ureasa. Esta enzima se ha considerado como un factor de virulencia de gran importancia (Del Giudice, 2001). Consiste de dos subunidades, UreA y UreB (de 27 y 60 KDa respectivamente),

ensambladas en una estructura terciaria formada por seis monómeros de UreA y seis de UreB. La enzima cataliza la hidrólisis de urea formando NH_3 y CO_2 (Figura 4). El amonio forma un ambiente envolvente que neutraliza el ácido del citosol y periplasma y crea una capa neutra rodeando la superficie bacteriana (Montecucco *et al.*, 2001). Es una proteína muy abundante en la bacteria (5% a 10% del contenido de proteínas) esto la hace un poderoso inmunógeno.

La ureasa puede estar localizada dentro del citoplasma como en la superficie de la bacteria, su localización se puede asociar a las múltiples funciones de la enzima como factor de adhesión, la activación de los fagocitos para producir citocinas pro-inflamatorias y puede inducir efectos tóxicos en las células epiteliales.

La hidrólisis de la urea tiene efectos en las células de la mucosa gástrica que pueden llevar a la formación de úlceras, este daño puede estar ligado a la habilidad del amonio para inducir la formación de vacuolas en el citoplasma de células *in vitro* (Dunn *et al.*, 1997). De igual manera, al amonio producido se le atribuye que puede proteger a la bacteria del sistema inmune del hospedero por inactivación de la cascada del complemento (Del Giudice *et al.*, 2001). Sin embargo, concentraciones altas de este producto pueden también contribuir a la lisis de células epiteliales y favorecer ulceración (Futagami, 1998).

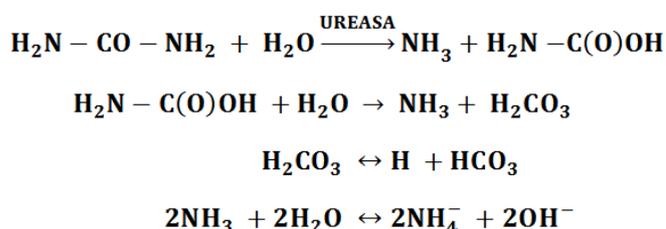


Figura 4. Hidrólisis de la urea: la enzima ureasa transforma la urea en amonio y dióxido de carbono (Tomado de Mobley *et al.*, 2001).

La ureasa es esencial para la colonización de la mucosa gástrica. En algunas pruebas empleando cepas de *H. pylori* carentes de este enzima se observó que no pueden colonizar el estómago humano, además de que la inmunización oral con la enzima administrada junto con adyuvantes, en pruebas de vacunación para prevenir la infección con *H. pylori* o *H. felis* en ratones, ha mostrado una protección significativa. Ambos hechos son prueba que la ureasa es un factor importante en el inicio de la infección (Eaton, 1991; Del Giudice *et al.*, 2001).

Las proteínas de Choque Térmico (Hps) actúan como acompañantes de la ureasa aumentando su actividad (Dunn *et al.*, 1997).

Adhesinas

Son proteínas que permiten la adhesión de la bacteria al epitelio gástrico. Cuando el bacilo ha penetrado la capa de moco del estómago se adhiere a las células gástricas epiteliales mediante adhesinas específicas. Se han identificado cerca de 20 adhesinas en este microorganismo, aun cuando no se ha podido establecer cuáles son de importancia para los procesos de adhesión *in vivo*. Durante la adherencia, la bacteria se ubica en las uniones intercelulares de las células del epitelio gástrico (Noach *et al.*, 1994).

En el caso de esta bacteria, se han identificado factores de adherencia en cepas virulentas que facilitan la unión del microorganismo a los antígenos de Lewis b (Le^b) presentes en las células del epitelio gástrico. BabA (antígeno de tipo sanguíneo ligado a adhesina), es un factor de adherencia expresado en algunas cepas de *H. pylori*, esta adhesina es codificada por el gen *babA2*. Su adherencia no sólo favorece la colonización de la mucosa gástrica sino también participa en el desarrollo de algunas enfermedades (Guruge *et al.*, 1998).

Este gen existe en tres formas alélicas (*babA1*, *babA2* y *babB*). El gen *babA2* es el único activo permitiendo la adhesión a las células del huésped, está asociado con úlceras gástricas o cáncer gástrico (Gerhard *et al.*, 1999) y parece guardar una fuerte correlación con otros factores de patogenicidad y virulencia como VacA s1 (citotoxina vacuolizante) y CagA + (proteína asociada al gen *cagA*) y a su vez, en casos de úlcera péptica, cáncer gástrico y adenocarcinoma (Torres *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002).

Citotoxina Vacuolizante A (VacA)

Dentro de los factores que están involucrados en la inflamación y daño al epitelio gástrico se puede destacar a la citotoxina vacuolizante (VacA) descrita por Leunk (1991). Esta toxina induce la formación de vacuolas en el epitelio gástrico produciendo la degradación de la mucosa del estómago. Tiene una estructura hexamérica o heptamérica, es activada por exposición al ácido y es resistente en ambientes del mismo tipo. Es codificada por el gen *VacA* que está presente en todas

las cepas de *H. pylori*, pero solo el 50% expresa la forma activa (Cover *et al.*, 1992).

Es sintetizada como una protoxina asociada a la membrana externa y su tamaño aproximado es de 87 KDa. El gen *vacA* presenta variaciones alélicas en dos regiones: en la región señal (s) y en la región media (m). Los alelos s1 y m1 del gen *vacA* se han asociado a úlceras pépticas y a atrofia de la mucosa gástrica, así como a una mayor actividad inflamatoria. Los pacientes con cáncer y úlceras usualmente presentan los tipos s1/m1 de *vacA*. En algunos estudios se ha encontrado que las bacterias con los genes *vacA/cagA* están asociadas a úlceras pépticas (Atherton *et al.*, 1995, 1997).

Isla de patogenicidad (*cag* PAI)

El gen que codifica a la proteína Cag A, se localiza en un fragmento de ADN cromosomal adquirido por transferencia horizontal, llamado la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*). Esta isla es una región insertada en el gen de la glutamato racemasa, con una longitud de 40 Kb, está involucrado en la virulencia y en daño a la mucosa gástrica. Codifica para varias proteínas además de CagA, una de las más importantes es el sistema de secreción tipo IV, su principal función es inyectar a la proteína CagA a las células epiteliales (Kuster *et al.*, 2006).

En la actualidad se sabe que cepas CagA+ son las que poseen la isla de patogenicidad *cag* PAI, se pueden encontrar en mayor cantidad en el antro e incrementan el riesgo a desarrollar gastritis atrófica, úlcera duodenal, metaplasia y cáncer gástrico, comparadas con las cepas que no tienen *cag* PAI o solo tienen fracciones de él y que son llamadas CagA- (Ching *et al.*, 1996).

La proteína CagA se ha detectado entre el 80 al 100% en adultos con úlcera duodenal infectados con *H. pylori* (Cover *et al.*, 1995), la distribución de estas cepas ha aumentado a tal grado que entre el 70 al 80% de los microorganismos aislados en países desarrollados expresan este gen. En algunos países orientales como Japón y Corea, la frecuencia de cepas *cagA+* puede alcanzar el 100%; de igual manera en México en pacientes con úlcera péptica se encontraron en el 81% (González *et al.*, 2000).

En dos estudios realizados por Peek y Censini en 1995 y 1996 encontraron que, durante la infección con cepas *cagA+*, se presentaba un proceso inflamatorio

gástrico mayor y la formación de úlcera péptica, en comparación con las cepas de *H. pylori cagA*-. Un mecanismo específico mediante el cual Cag A podría ejercer este efecto (inflamación) es mediante la regulación en la producción de IL-8. La bacteria puede inducir la formación de pedestales y al estar en contacto con las células epiteliales gástricas se pueden desencadenar múltiples cascadas de transducción de señales que regulan la secreción de IL-8, incluyendo la vía de NF- κ B (factor nuclear kappa B) y la de proteínas cinasas, eventos que dependen de la presencia de genes en la isla de patogenicidad (Peek *et al.*, 2002).

La caracterización genética de *vacA* y *cagA* en cepas aisladas en México, ha permitido conocer que la co-infección con múltiples cepas de *H. pylori* es frecuente en la población mexicana (Morales, 1999; González *et al.*, 2000).

Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) es el principal constituyente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, tal es el caso de *H. pylori*. Esta biomolécula provoca distintas respuestas en células de mamíferos, disparando varias cascadas de transducción de señales, resultando en la liberación de especies reactivas de nitrógeno, citosinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1 β) y óxido nítrico. Posee características que favorecen la resistencia y quizá contribuya al daño tisular. La bacteria sintetiza y expresa en su LPS antígenos del hospedero (antígenos de superficie Lewis x y Lewis y), lo que le permite evadir la respuesta inmune. Este mimetismo antigénico también puede inducir la producción de anticuerpos que reconocen células del hospedero y originar daño por respuesta autoinmune (Cavallo *et al.*, 2011).

Otras enzimas

La alcohol deshidrogenasa (ADH), le permite a la bacteria producir energía bajo condiciones anaeróbicas. También participa en la transformación de etanol a acetaldehído, este se puede acumular en el tejido gástrico causándole daño, promoviendo la erosión y ulceración de la mucosa (Olczack *et al.*, 2003).

También *H. pylori* produce catalasa y superóxido dismutasa (SOD), que constituyen una línea de defensa de la bacteria ante la acción de los leucocitos y polimorfonucleares activados.

La bacteria además tiene la capacidad de segregar mucinas, proteasas, fosfolipasa A, citotoxinas como interleucinas (IL) y hemolisinas, que permiten producir daño a la mucosa gástrica, propiciar la pérdida de hidrofobicidad en la mucosa y posiblemente disminuir la capacidad de las células para secretar moco (Olczack *et al.*, 2003).

3.1.6. Patologías asociadas a *H. pylori*.

Las enfermedades o patologías asociadas con la infección por *H. pylori* incluyen a la gastritis crónica activa, úlcera gástrica y duodenal, displasia gástrica, carcinoma y linfoma gástrico tipo MALT.

Gastritis

En la mayoría de los casos, la infección por *H. pylori* permanece asintomática durante toda la vida del individuo, lo cual incrementa el riesgo de que se presenten las enfermedades asociadas a la bacteria (Correa, 2005). La gastritis es la inflamación de la mucosa gástrica con alteraciones en la estructura glandular asociada en el 90-95% de los pacientes infectados por esta bacteria (Alcántara *et al.*, 1997).

Es probable que la causa inicial del proceso inflamatorio este mediado por los factores secretados por la bacteria como la ureasa, la citotoxina o por la presencia de la isla de patogenicidad. La inflamación de la mucosa gástrica durante la infección pueden mostrar presencia masiva de neutrófilos polimorfonucleares, linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos, acompañados por edema e hiperemia de la mucosa (Marshall, 1985).

H. pylori penetra a través de la capa de mucosa del estómago y se multiplica (Dixon, 2001). El antro es la parte del estómago que primero se logra colonizar, debido a que no existen células parietales que secreten ácido (Lee *et al.*, 1995; Gur *et al.*, 1999; Innocenti *et al.*, 2001). Cuando la bacteria empieza a colonizar la mucosa gástrica, el huésped presenta en general dos mecanismos de defensa; uno inflamatorio en la fase aguda y uno inmune o folicular en la fase crónica.

El bacilo daña la capa de mucosa del estómago principalmente en las faveolas y muy cerca de la superficie del epitelio, el huésped durante un infección aguda

desencadena una respuesta inmune local y sistémica, la respuesta local esta mediada por IgM e IgA, otra forma de respuesta a la infección es con la acción de las mucinas, exfoliación celular, presenta cambios regenerativos compensatorios y se encuentran células del sistema inmune como polimorfonucleares dentro de las faveolas y lámina propia. Esta fase es acompañada por hipoclorhídria, así como de una disminución del ácido ascórbico en el jugo gástrico. También hay liberación de lipopolisacáridos bacterianos que penetran el epitelio dañado, provocando la migración de los polimorfonucleares. Este proceso va de manera conjunta con otros productos bacterianos que liberan diversos mediadores inflamatorios que incrementan la permeabilidad vascular (Dixon, 2001).

Debido a la proliferación bacteriana y el cuadro inflamatorio desencadenado por los componentes de la membrana externa de la bacteria y el LPS, se genera la producción de citosinas tales como la IL-8 y la relacionada al crecimiento GRO α (Oncogén α relacionado con el crecimiento Actividad Estimuladora del Crecimiento de Melanoma α), con esto facilita el influjo de neutrófilos a la mucosa infectada. El incremento de la secreción de IL-8 y la respuesta de IgM contra *H. pylori* son las primeras señales de una respuesta inflamatoria, esta respuesta provoca cambios importantes por daño directo a células del estómago y duodeno (Innocenti *et al.*, 2001).

Gastritis crónica atrófica

Es una alteración de la estructura tanto física como funcional, más la pérdida del tejido glandular (disminución en la producción de moco) y sustancias elementales para mantener la mucosa, favoreciendo la aparición de úlceras (Logan *et al.*, 2001).

Durante la evolución de la infección, la gastritis aguda puede pasar a un cuadro más severo como a una gastritis crónica atrófica; en este caso la mucosa gástrica desencadena una respuesta inmune celular (CD-4 y CD-8), la proliferación de células B y la diferenciación de células plasmáticas que producen la síntesis de IgM y otros anticuerpos, lo cual genera la amplificación de la reacción inflamatoria. Las células B montan una segunda línea de defensa al no erradicar a la bacteria produciendo células plasmáticas e IgA, produciendo una repuesta específica contra *H. pylori* impidiendo la adherencia bacteriana.

Úlceras pépticas.

La úlcera consiste en una ruptura de la mucosa que protege al estómago (Figura 6B) de la acción del ácido y de las enzimas, sobrepasando la submucosa o muscularis mucosae (Figura 5A). Existen dos tipos de úlceras dependiendo de su localización, gástricas o duodenales.

H. pylori es responsable de cerca del 90-95% de las úlceras duodenales y de 70-75% de las úlceras gástricas, en infecciones por la bacteria las personas tienen de 3.2 a 10 veces más riesgo de desarrollar úlcera. Existen evidencias de que la úlcera se cura después de la erradicación del bacilo (Blaser, 1999; Blaser *et al.*, 2004).

Generalmente la bacteria no coloniza el duodeno, pero en casos con hiperclorhidria, el ácido llega hasta el duodeno y las células intestinales son reemplazadas por células gástricas (metaplasia gástrica) permitiendo la colonización bacteriana, la inflamación y posteriormente la ulceración (Figura 5B) (Godoy *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2004).

Tanto gastrina como histamina activan a las células parietales para que produzcan más ácido (Gur *et al.*, 1999). El exceso de ácido llega al duodeno donde neutraliza las sales biliares que normalmente inhiben a *H. pylori* y así la cantidad de ácido induce la metaplasia gástrica en duodeno.

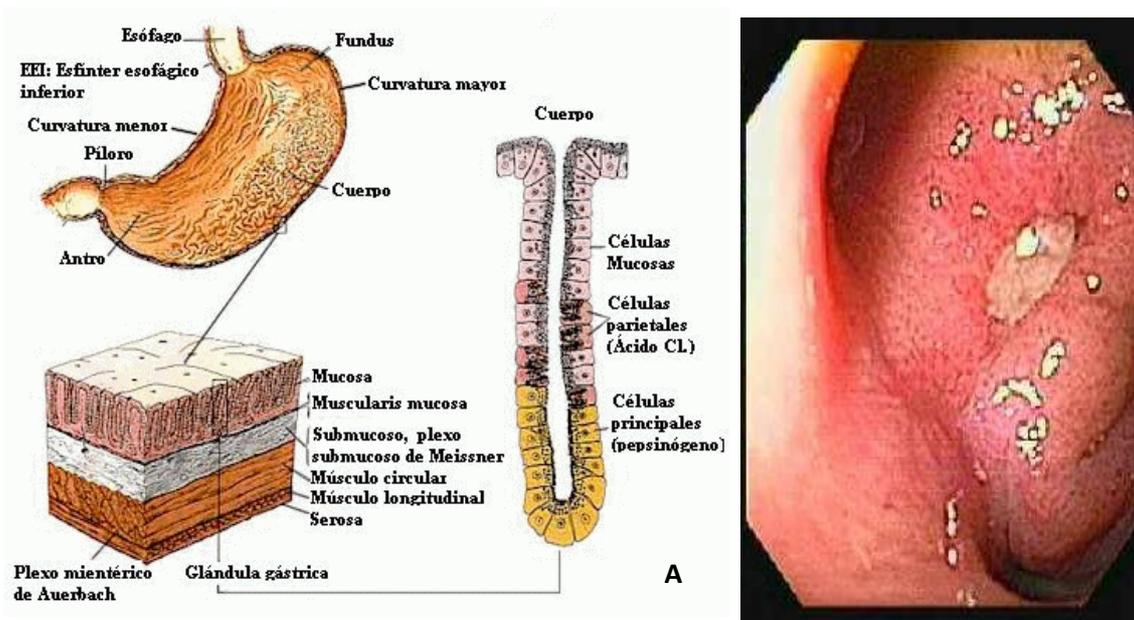


Figura 5. A) Estructura del estómago y mostrando a detalle su anatomía, capas y pliegues. (Tomado de Ibáñez *et al.*, 1998). B) Úlcera duodenal (Tomado de http://www.gastrointestinalatlas.com/Espanol/Duodeno/Ulcera_Duodenal/ulcera_duodenal.html, consultada el 1 de Marzo del 2013)

Displasia gástrica

Los estudios epidemiológicos realizados en la última década han establecido una fuerte relación causal entre la infección por *H. pylori* y el cáncer gástrico (Moller *et al.*, 1995; Uemura *et al.*, 2001; Peek *et al.*, 2006). Correa sugirió un modelo humano de la carcinogénesis gástrica en donde el desarrollo de cáncer gástrico se inicia a partir de gastritis crónica, metaplasia intestinal, displasia gástrica hasta llegar a cáncer invasivo (Correa *et al.*, 2007). La displasia epitelial gástrica se puede considerar una lesión precancerosa, generalmente se localizan zonas de displasia alrededor de los adenocarcinomas gástricos (Rugge *et al.*, 1995). Una infección por *H. pylori* estimula la proliferación celular en el epitelio gástrico e induce la apoptosis. La displasia es el resultado de un desequilibrio entre la apoptosis y la proliferación celular produciendo alteraciones o mutaciones de genes (Kerr *et al.*, 1994; Hofman *et al.*, 2006), es la única lesión histopatológica que se asocia específicamente con el cáncer gástrico. El tratamiento de erradicación para *H. pylori* posee un muy buen efecto en contra de la bacteria pero no impide el desarrollo de cáncer gástrico en todos los pacientes, del 1 al 3% de los sujetos con displasia epitelial desarrollan cáncer gástrico en un tiempo aproximado de 5 a 15 años (Rugge *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 2004; Mabe *et al.*, 2009).

Cáncer Gástrico.

H. pylori es considerada la principal causa de adenocarcinoma gástrico distal. La OMS clasificó a *H. pylori* como un carcinógeno del grupo 1, e implica que esta bacteria puede causar directamente cáncer a los humanos (IARC, 1994). El cáncer gástrico está asociado al desarrollo de tejido metaplásico y a displasia causados por el bacilo, el cual ya no es capaz de colonizar tejidos cancerosos debido a que la estructura del epitelio ya no es ideal para la colonización de la bacteria. (Asaka *et al.*, 2001).

El cáncer gástrico solo se presenta en un 3% de la gente infectada (Kim *et al.*, 2011). Debido que la infección de la bacteria está ligada a condiciones socioeconómicas se ha visto que el cáncer gástrico se presenta más en países en vías de desarrollados que en los países desarrollados (Kim *et al.*, 2011). Una hipótesis para este comportamiento son las diferencias en la toxicidad entre las diferentes cepas encontradas en las diferentes regiones geográficas.

Linfoma gástrico tipo MALT

Otro proceso maligno asociado a la infección por esta bacteria es el linfoma tipo MALT (tejido linfoide asociado a mucosas), que es un proceso poco frecuente en el cual los tumores gástricos surgen de la proliferación de linfocitos B. Es un tipo de linfoma que se localiza preferentemente en el antro del estómago, dado que es la zona donde existe más tejido linfoide. En la gastritis crónica pueden aparecer folículos linfoides y agregados linfáticos en la base de la mucosa gástrica, lo que constituye el llamado tejido MALT. La presencia de tejido MALT en el estómago, parece estar relacionada con fenómenos inmunológicos. La proliferación de los linfocitos B es secundaria a una activación específica de linfocitos T reactivos, estos son activados durante la infección (Du *et al.*, 1996). Adicionalmente, se ha comprobado que la erradicación de la bacteria induce regresión del linfoma MALT en un 70 a 80% de los casos (Wotherspoon, 1998).

3.1.7. Diagnóstico.

El diagnóstico de la infección puede realizarse por dos vías diferentes **invasiva**

y no invasiva. Los métodos invasivos utilizan una muestra obtenida por endoscopia y se detecta la presencia de la bacteria por cultivo bacteriológico, tinciones histológicas, técnicas moleculares, actividad de la ureasa, etc. (Gisbert *et al.*, 2005). Algunas de sus desventajas son; la toma de muestra es costosa, sólo un especialista lo puede realizar, doloroso para el sujeto de prueba (Dunn *et al.*, 1997, Kolts *et al.*, 1993, Torres *et al.*, 2002). Algunos ejemplos de estos métodos son:

Histología. Se hace cortes histológicos obtenidos de la biopsia, se observa con tinción de hematoxilina-eosina, Warthin Starry, Giemsa y Genta. Ofrece información en cuanto a la inflamación, presencia de atrofia, metaplasia, displasia; su costo es bajo y es fácil de realizar. Esta técnica puede presentar algunas complicaciones como, falsos negativos debido a la toma de muestra.

Cultivo microbiano empleando agar sangre. Utilizando muestras obtenidas de una biopsia se realiza un cultivo sin antibióticos y como control negativo se emplea un cultivo utilizando antibióticos de referencia, se incuba durante 24 hrs en condiciones microaerofílicas (5-10% de CO₂ y 37°C). Posteriormente se procede con la identificación por tinción de Gram y pruebas bioquímicas. Algunas de las ventajas del cultivo microbiano son: ser altamente específica y tener un alto grado de eficacia, algunas de las desventajas son: el tiempo de realización de la prueba, presencia de falsos positivos o negativos debido al manejo por parte del personal (Kolts *et al.*, 1993).

Determinación de la actividad de ureasa. Una de las técnicas invasivas más empleadas es el **Test Rápido de la Ureasa**. Se basa en la actividad de la ureasa producida por *H. pylori* en el estómago, la muestra se obtiene por medio de biopsia, la enzima hidroliza la urea en amonio y CO₂. El amonio eleva el pH dando el vire del reactivo indicador. Esta prueba es rápida, sensible y específica, la prueba está disponible en varias marcas comerciales o se puede preparar en el laboratorio (Dunn *et al.*, 1997).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se basa en el análisis de una secuencia específica de ADN de *H. pylori*, utilizando oligonucleótidos iniciadores de genes que son conservados en todas las cepas (Torres *et al.*, 2002).

Las pruebas **no invasivas** utilizan alguna propiedad de la bacteria, (Atherton,

1997), no se requiere de endoscopia y son más económicas, principalmente son tres pruebas (EIA, ELISA y PAU). Algunas evidencian directamente la infección (Torres *et al.*, 2002).

Las pruebas de detección directa son:

- Ensayo inmunoenzimático para detección de antígenos en Heces (EIA). Se basa en la detección de antígenos en heces en infección activa. EIA es un método simple, no requiere personal ni equipo especializado (Makristathis *et al.*, 1998). La técnica serológica determina anticuerpos específicos mediante un ensayo inmunoenzimático en placa de ELISA, da como resultados títulos elevados de IgM e IgA en infecciones iniciales o activas; con niveles elevados de IgG pueden indicar una infección activa o resuelta. Es una de las más sensibles, específica, rápida y fácil de realizar (Kolts *et al.*, 1993; Dunn *et al.*, 1997).

- En la actualidad una de las pruebas más empleadas comercialmente es la prueba de aliento de la ureasa (PAU). Se basa en la detección de la actividad de la ureasa bacteriana, la cual cataliza la hidrólisis de la urea contenida en el estomago en amonio y CO₂, la función principal del amonio es producir un ambiente neutro alrededor de la bacteria. El procedimiento es simple, se toman dos muestras de aliento la primera antes de ingerir urea marcada con ¹³C o ¹⁴C y la segunda después de la ingestión. Se monitorea la liberación de CO₂ marcado durante la expiración. Es un método diagnóstico muy rápido y sensible (Haruhiko *et al.*, 1998).

3.1.8. Tratamiento.

El tratamiento de elección a nivel mundial para la infección por *H. pylori* es la terapia triple, consiste en la combinación de dos antibióticos a elección entre la amoxicilina, tetraciclina, metronidazol, o claritromicina; acompañados con antagonistas de los receptores de histamina H₂ (ranitidina, cimetidina, famotidina y nizatidina) o un inhibidor de la bomba de protones (IBP) como omeprazol, lanzoprazol, pantoprazol o rabeprazol, (inhiben la secreción de ácido) este tratamiento de primera línea tiene una duración de 10 a 14 días (Collins *et al.*, 2006). Su rango de efectividad se encuentra entre el 80 y el 90%, las tasas de erradicación han venido disminuyendo al emplear en el tratamiento metronidazol, debido a la aparición de cepas resistentes a dicho fármaco, llegando a cifras de más del 70% de resistencia en algunos países (Collins *et*

al., 2006).

Debido a diversos procesos de resistencia, se emplea un nuevo tratamiento; la terapia cuádruple. En esta se maneja, además de la combinación de otros dos antibióticos diferentes a los utilizados en la terapia triple, la administración de subsalicilato de bismuto (protector de mucosa) (Di Mario *et al*, 2006; Guerrits *et al*, 2006; Suzuki *et al*, 2010).

En la terapia triple la elección de los antibióticos e inhibidores es de acuerdo a la resistencia microbiana local, esta puede variar incluso en las distintas zonas geográficas de un mismo país. Si en la terapia cuádruple (segunda línea de erradicación) muestra complicaciones, se recomienda la realización de un cultivo y antibiograma a fin de montar un tercero e incluso cuarto tratamiento de rescate para lograr la erradicación total de la bacteria (Di Mario *et al*, 2006; Suzuki *et al*, 2010).

En México el Consenso Mexicano sobre *H. pylori* (CMHP) indica la erradicación de la bacteria únicamente en los casos en los que se presente: úlcera péptica, gastritis atrófica y metaplasia intestinal, linfoma gástrico tipo B (tipo MALT), después de una resección gástrica parcial por cáncer, familiares cercanos a personas que han tenido cáncer gástrico y personas con uso crónico de IBP's ó AINE's (Abdo-Francis *et al*, 2007).

Algunas causas por las cuales los tratamientos pueden presentar fracasos terapéuticos son: a) la resistencia del microorganismo a los antibióticos de elección, causado por diversos factores como la falta de continuidad del tratamiento por parte de los pacientes, b) los altos costos de los tratamientos que hace que muchos pacientes no los puedan adquirir, c) los efectos secundarios que provoca al consumirse por un tiempo prolongado que hace que los pacientes abandonen el tratamiento y la reincidencia de la infección (contacto con personas infectadas). Aunado a lo dicho anteriormente se puede sumar algunos factores de predisposición a la infección los más importantes son: la edad, niveles de pobreza, hacinamiento, falta de higiene, malos hábitos alimenticios (fumar, estrés, alcohol), enfermedades que disminuyen la secreción ácida y la región geográfica. Por lo cual es necesario proponer terapias alternativas para lograr tratar la infección causada por la bacteria.

3.2.1. Uso de plantas medicinales como tratamiento alternativo en contra de *H. pylori*.

Debido a todos los problemas presentados durante la implementación de las terapias para erradicar a la bacteria, es necesario proponer terapias alternativas para lograr tratar la infección causada por la bacteria.

Una de las fuentes más importantes de sustancias con efectos farmacológicos son los productos naturales, en particular las plantas medicinales, las cuales constituyen un elemento importante para implementar nuevos planes de salud combinando la medicina tradicional con la medicina alopática (Argueta *et al.*, 1994).

La fitoquímica ha sido una herramienta muy importante para poder encontrar compuestos activos que pueden servir como alternativas para el tratamiento de enfermedades infecciosas principalmente en países en desarrollo, en el mundo se han estudiado diversas fuentes naturales con el fin de erradicar a *H. pylori*. Desde hace muchos años diversas culturas han utilizado a las plantas como tratamiento de diferentes enfermedades. Los productos naturales, principalmente los de origen vegetal, pueden ser fuentes potenciales para el descubrimiento y desarrollo de nuevos principios activos contra las infecciones que resultan difíciles de tratar. Alrededor del mundo diversos grupos de trabajo han encontrado miles de compuestos que presentan efectos inhibitorios sobre diversos microorganismos (O'Connor *et al.*, 2009), incluyendo por supuesto a *H. pylori*. Dichos trabajos incluyen la evaluación de extractos íntegros de una gran cantidad de especies medicinales, aislamiento de compuestos puros a partir de extractos bioactivos, estudios integrales que incluyen la evaluación de algunas enzimas y propiedades antiinflamatorias por su relación con *H. pylori* como agente causal de esos padecimientos.

Nuestro principal antecedente acerca del potencial inhibitorio del crecimiento de *H. pylori* de las plantas medicinales mexicanas es el realizado por miembros de nuestro grupo de trabajo (Castillo-Juárez *et al.*, 2009). En este trabajo se estudió la actividad anti-*H. pylori* de extractos acuosos y metanólicos de diversas plantas incluidas en la herbolaria tradicional mexicana usadas para tratar enfermedades gastrointestinales. Una de las plantas, cuyo extracto acuoso mostró una buena actividad fue *Cuphea aequipetala*, por lo que su ulterior estudio permitirá conocer más su potencial en el tratamiento de las enfermedades producidas por la bacteria.

3.2.2. Generalidades de *Cuphea aequipetala* Cav. (Lythraceae)

C. aequipetala pertenece a la orden de las Myrtales y a la familia Lythraceae, esta última se encuentra distribuida por todo el mundo, las especies presentes en zonas templadas son principalmente herbáceas, a menudo en hábitats húmedos en cambio las especies de climas tropicales son generalmente arbustos o árboles (Bucay *et al.*, 2003).

Dentro de la familia de las Lythraceas un género importante es *Cuphea*, posee alrededor de 843 especies de las cuales aproximadamente 300 han sido usadas como plantas ornamentales por la belleza de las flores y debido a su abundancia. (<http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Cuphea&commonname=>, consultada el 3 de Marzo del 2013, Roath *et al.*, 1993).

3.2.3. Clasificación taxonómica de *Cuphea aequipetala*

Reino: *Plantae*
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Equisetopsida*
Subclase: *Magnoliidae*
Súper orden: *Rosanae* Takht
Orden: *Myrtales*
Familia: *Lythraceae*
Género: *Cuphea*
Especie: *Cuphea aequipetala* Cav. (Figura 6)

(<http://www.tropicos.org/TaxonomyBrowser.aspx?nameid=19200456&projectid=0&conceptid=1>, consultada el 3 de Marzo del 2013).

3.2.4. Nombres comunes en México.

En México se le conoce con distintos nombres comunes de acuerdo a la región donde se le encuentra. Destacan: alfilerillo, cachanchillo, hierba del ángel, hierba del descáncer, hierba de la calavera, hierba del cáncer, trompetilla, ajam bomol, petalillo, zapotillo, miel de abeja, mirto, mirto morado, etc.



Figura 6. Hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala* Cav.) (Tomada de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lythraceae/cuphea-aequipetala/fichas/ficha>, consultada el 1 de Marzo del 2013)

3.2.5. Sinonimia.

Existen varias sinonimias entre las que se encuentran: *Parsonsia aequipetala* (Cav.) Standley, *Cuphea scabrida* HBK, *Cuphea virgata* Cav. (Bucay et al., 2003)

Por otra parte, en nuestro país se conocen a 19 diferentes especies de plantas (Tabla 2) con el nombre común de hierba del cáncer, estas plantas corresponden a 6 familias y 8 géneros diferentes (Martínez, 1979).

Tabla 2. Plantas conocidas con el nombre Hierba del cáncer

Nombre científico	Género	Familia
<i>Acalypha adenophora</i> Mull.	<i>Acalypha</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
<i>Acalypha adenostachya</i> Muell Arg.	<i>Acalypha</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
<i>Acalypha alopecuroides</i> Jacq.	<i>Acalypha</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
<i>Acalypha indica</i> (Muell. Arg.) Pax & Hoffm	<i>Acalypha</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
<i>Acalypha monostachya</i> Cav.	<i>Acalypha</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
<i>Acalypha lindheimerii</i> Muell. & Arg.	<i>Acalypha</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
<i>Acalypha cincta</i> Muell. Arg.	<i>Acalypha</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
<i>Acalypha phleoides</i> L.	<i>Acalypha</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
<i>Ayenia pusilla</i> L.	<i>Ayenia</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
<i>Castilleja communis</i> Benth.	<i>Castilleja</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
<i>Castilleja arvensis</i> Cham. & Schlechtendal.	<i>Castilleja</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
<i>Castilleja tenuifolia</i> Benth.	<i>Castilleja</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
<i>Cuphea aequipetala</i> Cav.	<i>Cuphea</i>	<i>Lythraceae</i>
<i>Cuphea wrightii</i> A. Gray.	<i>Cuphea</i>	<i>Lythraceae</i>
<i>Gomphrema globosa</i> L.	<i>Gomphrema</i>	<i>Amaranthaceae</i>
<i>Lepechinia Schiedeana</i> (Schl.) Vat.	<i>Lepechinia</i>	<i>Lamiaceae</i>
<i>Lythrum acinifolium</i> Koehne.	<i>Lythrum</i>	<i>Lythraceae</i>
<i>Lythrum alatum</i> Pursh.	<i>Lythrum</i>	<i>Lythraceae</i>
<i>Salvia misella</i> Kunth.	<i>Salvia</i>	<i>Lamiaceae</i>

3.2.6. Antecedentes históricos.

Francisco Hernández en su libro I, Cap. XXXVII que redactó en el siglo XVI, nos menciona a *Cuphea aequipetala* como apancholoa o “hierba que brota en las aguas” (Aguilar *et al.*, 1994). El mismo autor menciona que es de naturaleza fría, seca y astringente; por lo cual cura las quemaduras y las úlceras de la boca. En dicho texto describe algunas formas de utilizar la planta “el agua en la que se hayan remojado por algún tiempo las raíces después de machacarlas colocada y tomada detiene el flujo de vientre”, Hernández señala que se pueden evitar procesos abortivos. Maximino Martínez la refiere como tónica y vulneraria. Se ha señalado que esta planta es “algo tóxica y venenosa”, aunque no se dan detalles sobre esta observación (Argueta *et al.*, 1994).

3.2.7. Descripción botánica.

Es una hierba de 40 cm a 1 m de altura, su tallo es generalmente postrado y con pelos de color violáceo o rojizo, aunque por lo común mucho más corta, hispida con pelos largos y pubescencia tomentosa o glabrada. La raíz generalmente gruesa; tallo ramificado, ascendente rastrero o procumbente, en ocasiones sarmentoso, de color rojo oscuro o morado

3.2.8. Distribución.

Es una planta nativa de México que se encuentra en los estados de San Luís Potosí, Michoacán, Chiapas, Morelos, Distrito Federal, Veracruz, Estado de México, Hidalgo, Coahuila, Puebla, Durango, Guerrero, Jalisco, Guanajuato, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Tamaulipas y Tlaxcala, inclusive se encuentra en Guatemala y Honduras (Grantham, 2002) (Figura 7).



Figura 7. Distribución de *Cuphea aequipetala* Cav en la república mexicana y centro América. (Tomada y modificada de: [http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/googlemap.php?taxon=Cuphea aequipetala&clid=](http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/googlemap.php?taxon=Cuphea%20aequipetala&clid=), consultada el 3 de Marzo del 2013)

3.2.9. Hábitat.

Está asociada a terrenos de cultivo de temporal crece en climas cálidos, semicalido, semiseco y templado, en bosques tropicales, caducifolios y subcaducifolios, matorrales xerófilos, pastizales y bosques espinosos, mesófilos de montaña, de encino, de pino, mixto de pino-encino y de junípero. Se encuentra entre los 1900 y 2200 metros sobre el nivel del mar (msnm). (http://www.hipernatural.com/es/plthierba_cancer.html, consultado el 3 de Marzo del 2013; Rzedowski *et al.*, 2001)

3.3. Usos tradicionales:

En la mayoría de los estados donde se emplea la planta se realiza una infusión de la parte aérea administrada por vía oral, se emplea en algunos padecimientos de tipo digestivo como son: diarreas, disentería, dolor, ardor o infecciones del estómago y problemas del hígado.

En el D.F., se toma en ayunas, combinada con ajeno (*Artemisia absinthium*), *tatalencho* y romero (*Rosmarinus officinalis*) para tratar padecimientos gástricos como; diarreas, dolor, ardor, disentería (Martínez, 1997).

Se emplea en diversos padecimientos como paperas, dolor de cintura y golpes (se aplican fomentos en la parte golpeada). El cocimiento de la planta se usa para lavar heridas, granos, golpes e inflamaciones. La infusión de la parte aérea se emplea en afecciones hepáticas y contra tumores cancerosos. La planta hervida con sal o en cataplasma se emplea para curar heridas (contusas, infectadas o con llagas), golpes, inflamaciones en general (incluyendo las de la piel o del estómago), padecimientos cutáneos; infecciones, granos y llagas. Algunas veces se ingiere tres veces al día, para quitar el dolor, ya sea solo o acompañado de otras plantas como la hierba mora y el romero. La hierba completa se emplea en rituales ceremoniales. (<http://www.mexicodesconocido.com.mx/notas/3771-Hierba-del-cancer>, consultada el 1 de Marzo del 2013).

En los estados de Michoacán y Morelos se le emplea en el tratamiento del cáncer, reduce el dolor de los tumores cancerosos para eso se toma la infusión de las flores y hojas. En una mezcla de la hierba del golpe, hierba del cáncer y la hierba mora se emplean en Veracruz, para el tratamiento de la enfermedad denominada *pocholocas*, brote de granos por todo el cuerpo.

En el estado de Morelos dan a las mujeres embarazadas un té digestivo para mejorar el apetito elaborado con la raíz de esta planta junto con estafiate, hierba del ángel y raíces de yolochichitl.

En Chiapas se emplea en lavados contra flujos vaginales, inflamación gastrointestinal y en casos de disentería (Emes, 1994).

En el estado de Hidalgo a las mujeres parturientas se les frota la espalda y cadera con las hojas machacadas después del baño de temascal.

En algunas localidades del Estado de México como Texcoco se utiliza toda la planta en forma oral para heridas, llagas, salpullido, golpes y el cáncer (Mendoza, 1999). En Villa del Carbón emplean toda la planta para tratar cólicos, cáncer, golpes, heridas, etc. (Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2012) (Figura 8).

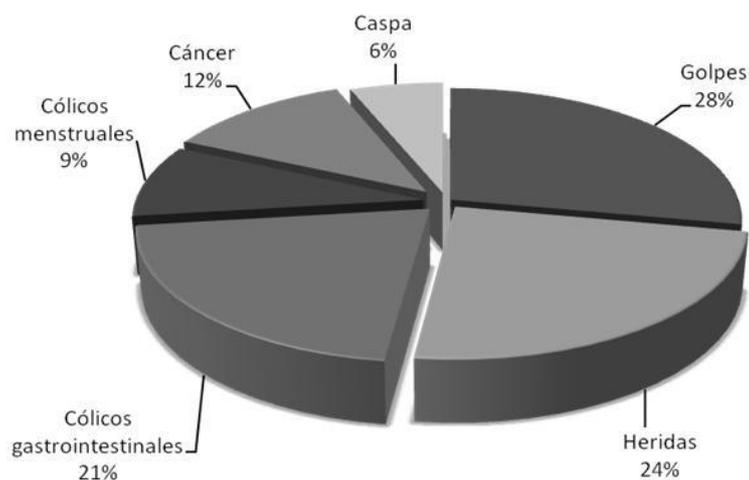


Figura 8. Porcentaje de usos medicinales de *Cuphea aequipetala* Cav., reportados por los habitantes de Villa del Carbón Estado de México (Tomado de Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2012).

3.3.1. Actividad farmacológica y microbiológica.

El extracto de acetona-agua de *C. aequipetala* ha sido previamente reportado con actividad citotóxica *in vitro* contra las líneas tumorales humanas DU-145 (próstata) y HCT-15 (colón) con $CE_{50} = 8.15$ y $18.70 \mu\text{g/ml}$, respectivamente (Vega-Ávila *et al.*, 2004). Otros estudios han mostrado que los extractos, procedentes de las hojas de *C. aequipetala*, obtenidos con hexano, cloroformo y etanol no presentaron actividad citotóxica ($CE_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$) sobre los cultivos de células P388 (leucemia murina), KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y KB- V1 (células de carcinoma nasofaríngeo resistente a vincristina) (Villarreal *et al.*, 1992).

Por otra parte, los extractos de acetona-agua de las partes aéreas de la planta (flores, hojas y tallos) mostraron actividad citotóxica contra células de carcinoma de laringe humana (HEp-2) (Bucay *et al.*, 2003).

Los ensayos de citotoxicidad de tres extractos: acetato de etilo, hexano y metanol, se probaron sobre cultivos de tres líneas celulares provenientes de cánceres humanos: KB (Carcinoma nasofaríngeo), UIISO-SQC1 (células escamosas de carcinoma de cérvix [cuello uterino]) y HCT-15 COLADCAR (carcinoma de colón). De acuerdo con los resultados obtenidos sólo se apreció ligera actividad citotóxica en el extracto metanólico ($CE_{50} = 17.4 \mu\text{g/ml}$), sobre la línea celular UIISO-SQC1. Los demás extractos no mostraron actividad citotóxica (Bucay *et al.*, 2003)

Finalmente, en cuanto a la actividad antimicrobiana, el extracto acuoso de las partes aéreas de *C. aequipetala* mostró fuerte actividad contra *H. pylori* (Castillo-Juárez *et al.*, 2009).

Otras especies relacionadas, como *Cuphea hyssopifolia* sintetizan los elagitaninos macrocíclicos cufina D₁, cufiina D₂, oenoteina B y woodfordina C (Chen *et al.*, 1999), dichos compuestos inhibieron *in vitro* el crecimiento de las líneas tumorales humanas KB, HeLa, DU-145, HL-60 y Hep 3B (Wang *et al.*, 1999). Estos taninos también inhibieron el crecimiento de tumores S-180 en ratones. La cufina D1 ocasionó el mayor incremento en la sobrevivencia de los ratones con tumores S-180 (Wang *et al.*, 1999).

3.3.2. Fitoquímica.

El género *Cuphea* se distribuye desde México hasta Brasil. Las especies de *Cuphea* se cultivan como fuentes de aceites ricos en ácidos grasos de cadena media (Graham, 1992; Phippen, 2010; Tisserat *et al.*, 2012) y se utilizan en la medicina tradicional como antioxidantes (Schuldt *et al.*, 2004), antihipertensivos (Braga *et al.*, 2000), citotóxicos (Wang *et al.*, 1999) y antiprotozoarios (Barbosa *et al.*, 2007). Por ejemplo, las hojas de *C. carthagenensis* representan una fuente importante de antioxidantes fenólicos que pueden tener efectos cardiovasculares potencialmente beneficiosos. Un análisis químico cualitativo indicó la presencia del flavonoide quercetina 3-β-D-glucósido en todas las especies de *Cuphea* (Schuldt *et al.*, 2004).

En las partes aéreas de *C. carthagenensis* se encontraron flavonoides como quercetina-3-sulfato (Figura 9), quercetina-5-O-β-glucopiranosido, y quercetina-3-O-α-arabinofuranósido, que se han sugerido como marcadores químicos de esta especie (Krespsky *et al.*, 2012). La composición de *C. carthagenensis* es poco conocida, comprende triterpenos tales como carthagenol (González *et al.*, 1994) y varios flavonoles, flavonas y flavanonas, junto con el ácido glucurónico (Santos *et al.*, 1995; Calzada, 2005).

La quercetina-3-sulfato puede contribuir al uso tradicional de esta especie en el tratamiento de enfermedades circulatorias y del corazón (Simones *et al.*, 1998). Aunque no es activo en sí mismo, su producto de metabolismo, la quercetina, sí posee efecto vasodilatador (Ajay *et al.*, 2003). El efecto vasodilatador de los extractos de *C. carthagenensis* ha sido demostrado *in vitro* por medio de ensayos sobre la aorta de rata (Schuldt *et al.*, 2000).

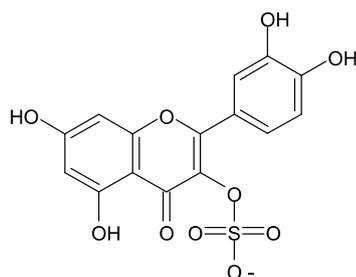


Figura 9. Quercetina-3-sulfato

Los antioxidantes, incluyendo compuestos fenólicos (por ejemplo, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos) tienen diversos efectos biológicos, tales como efectos anti-inflamatorios, citotóxicos y antitumorales, como resultado de su actividad antioxidante (Vega, 2005; Krishnaiah *et al.*, 2010). La cantidad y calidad de los compuestos fenólicos varían en respuesta a factores ambientales, tales como la intensidad de la luz y la disponibilidad de nutrientes y entre las diferentes etapas fisiológicas y de desarrollo (Klepacka *et al.*, 2011; Estrada-Zuñiga *et al.*, 2012; Naghilo *et al.*, 2012). Por el contrario, la actividad de antioxidantes se puede ver afectada por la preparación del extracto (Perez-Jimenez *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2011; García-Márquez *et al.*, 2012).

Otros flavonoides se han descrito anteriormente para las especies de *Cuphea*, como glucósidos de apigenina, luteolina, kaempferol, quercetina, ramnetina, isoramnetina y miricetina (Santos *et al.*, 1995). Los flavonoides se han empleado para distinguir entre géneros, especies y categorías infraespecífica (Barron *et al.*, 1988; Salatino *et al.*, 2000).

De 16 especies de *Cuphea* recogidos del sureste y del centro de Brasil, se han identificado 35 flavonoides. La mayoría de los compuestos son 3-O-glucósidos de flavonoles, pero también se encontraron flavonas (Santos *et al.*, 1995). Los flavonoides obtenidos a partir de los especímenes investigados de *Cuphea*, muestran un predominio de los glucósidos de quercetina y derivados de miricetina (Santos *et al.*, 1995).

El perfil de ácidos grasos de aceite de *Cuphea Viscosissima* y *C. lanceolata* muestra que contiene; ácido decanoico 65.6%, 0.6% ácido octanoico, ácido

dodecanoico 3.2%, 6.5% ácido tetradecanoico, ácido palmítico 7.2%, 0.8% ácido esteárico, ácido oleico 9.1%, y ácido linoleico 5.9%.

En un estudio realizado por Knothe y colaboradores en 2009 en el cual buscan una alternativa para fabricar combustibles orgánicos, reportan al aceite de *Cuphea viscosissima* y *C. lanceolata* como un posible biocombustible, debido a la cantidad de ácido decanoico (aproximadamente 65%).

Además de los ácidos grasos también se reportan para el género la presencia de triterpenos, esteroides, sapogeninas, gluco-alcoholes (manitol, fitoesteroides, β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, β -amirina, ácido betulínico y espifriedelinol) (Figura 10) (Gonzales *et al.*, 1993).

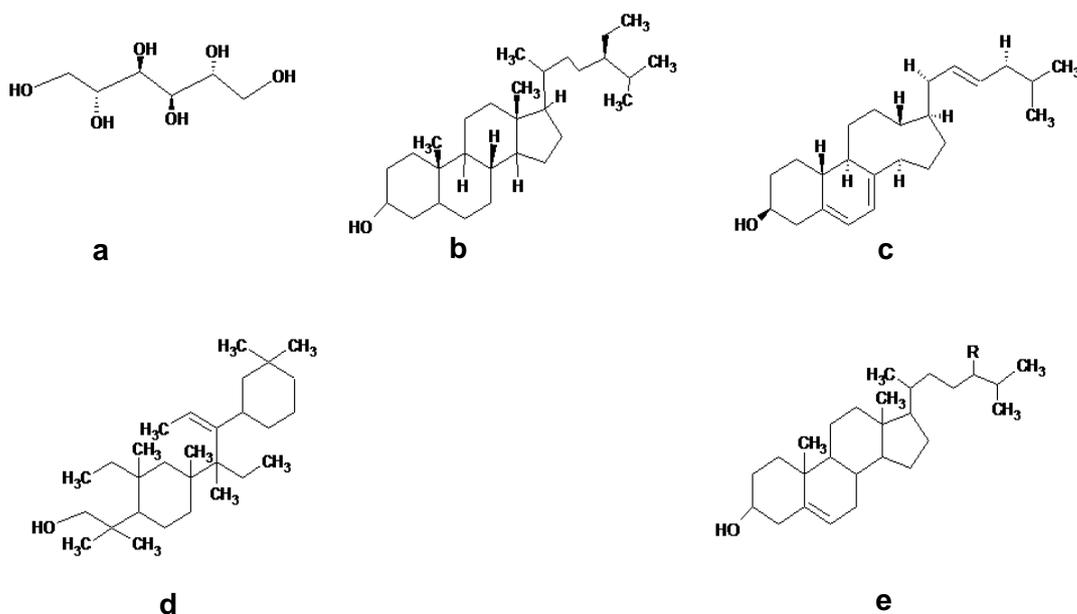


Figura 10. Algunos compuestos aislados reportados del género *Cuphea*: a) manitol; b) β -sitosterol; c) ergosterol; d) β -amirina; e) estigmasterol

En un estudio realizado por Waizel en el 2003 demostró en *C. aequipetala* la presencia de alcaloides, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas y glucósidos en las fracciones metanólica y de acetato de etilo, también en la fracción hexánica se encontraron glicósidos. *C. aequipetala* contiene grasa sólida, caucho, aceite esencial,

ácido tánico 5.35%; glucósidos, resina ácida, glucosa, principios pécticos 8.85%; dextrina, almidón, sales minerales y celulosa (Waizel *et al.*, 2003).

IV JUSTIFICACIÓN

H. pylori está reconocida como el principal agente etiológico de la gastritis crónica, de las úlceras duodenal y gástrica, del adenocarcinoma gástrico y del linfoma tipo MALT. La prevalencia de *H. pylori* es del 70-90% en países en desarrollo y del 25-50% en países desarrollados.

El régimen de tratamiento recomendado a nivel mundial contra la infección por *H. pylori*, es la terapia triple, la cual consiste en la combinación de un inhibidor de la bomba de protones (IBP) con dos antibióticos, preferentemente, metronidazol, claritromicina y/o amoxicilina (Gisbert *et al.*, 2005; Monés *et al.*, 2005; Malfertheiner *et al.*, 2007). La eficacia de este tratamiento ha disminuido en los últimos años por debajo del 80% y en algunos estudios, menor al 70% (Vilaichone *et al.*, 2006; Cavallaro *et al.*, 2006; Vakil *et al.*, 2007; Graham *et al.*, 2008; Rokkas *et al.*, 2008; Egan *et al.*, 2008). En este tipo de terapias se presentan diversas complicaciones, en primera instancia son tratamientos que implican una cantidad de fármacos considerable lo que conlleva a la aparición de efectos secundarios nocivos y, como consecuencia los pacientes no concluyen los tratamientos, debido a esto se puede presentar el desarrollo de resistencia a los antibióticos utilizados en la terapia. Por último, el elevado costo del tratamiento hace que no todos los pacientes diagnosticados puedan tener acceso a los medicamentos.

Las necesidades actuales de salud en el mundo y la crisis económica de muchos países, como el nuestro, hacen indispensable un estudio más profundo de los recursos médicos disponibles. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha promovido la utilización de todos los recursos existentes sin discriminaciones ideológicas, ni políticas, reconsiderando la potencialidad, eficacia y aceptación de las medicinas tradicionales en las culturas populares, entre ellos se encuentran las plantas medicinales (WHO, 2000). Tan sólo en México se tiene estimado que existen 30,000 especies de plantas de las cuales aproximadamente 3,000 tienen usos medicinales (Bye *et al.*, 1995).

Tal es el caso de *Cuphea aequipetala*, conocida comúnmente como Hierba del cáncer. En nuestro país, algunas poblaciones la han utilizado en el tratamiento de trastornos gastrointestinales y de tipo inflamatorio. Además goza de popularidad por su uso en el tratamiento de algunos tumores (Hernández, 1959).

El presente trabajo tiene como objetivo profundizar la investigación realizada previamente por Castillo-Juárez y colaboradores (2009) donde se encontró que el extracto acuoso de esta especie inhibía el crecimiento de *H. pylori* (CMI de 125 µg/ml). Partiendo de este antecedente, en este trabajo se planteó realizar el fraccionamiento dirigido de acuerdo a su efecto en contra de la bacteria, así como el establecimiento del potencial antiinflamatorio de la especie utilizando el modelo del edema auricular agudo inducido por dos agentes edematogénicos (xilol y el acetato de tetradecanoilforbol) y, finalmente, la evaluación preliminar de los efectos tóxicos agudos del extracto acuoso en ratones así como el cálculo de su dosis letal media empleando el método de Lorke (1983).

V OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Establecer las propiedades anti-*Helicobacter pylori* y antiinflamatorias del extracto acuoso y fracciones primarias de *Cuphea aequipetala*; con el propósito de coadyuvar en el establecimiento de su potencial como alternativa terapéutica en el tratamiento integral de los diversos padecimientos relacionados con la bacteria *H. pylori*.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Fraccionar biodirigidamente, por la actividad anti-*H. pylori*, al extracto acuoso de *C. aequipetala* mediante técnicas cromatográficas convencionales y por la determinación de la concentración mínima inhibitoria utilizando el método de dilución en cultivo líquido.

- Establecer el efecto del extracto acuoso íntegro y fracciones primarias sobre la enzima ureasa de *H. pylori*, mediante el método colorimétrico descrito por Weatherburn.
- Determinar la toxicidad aguda del extracto acuoso íntegro, por medio de la estimación de la DL₅₀ utilizando el método descrito por Lorke (1983) en ratones.
- Indagar el potencial antiinflamatorio de CAI y fracciones primarias, utilizando el modelo de edema auricular inducido con xilol y el acetato de tetradecanoil-forbol en ratones.

VI MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1.1. Material vegetal.

Las partes aéreas (tallos, flores y hojas) de *C. aequipetala* se colectaron en el poblado de Ozumba, Estado de México. Una muestra fue depositada en el Herbario del Instituto de Biología de la UNAM con Número de colecta 2965 y No. de MEXU 1319151. La identificación botánica estuvo a cargo de la M. en C. Edelmira Linares y el Dr. Robert Bye. La planta seca fue molida.

6.1.2. Preparación del extracto acuoso y su fraccionamiento primario.

El extracto acuoso se preparó por infusión de 10 g de planta molida en 250 ml de agua recién hervida; se dejó reposar por 10 minutos y se filtró. Este proceso se repitió tantas veces fue necesario hasta procesar 1 Kg del material vegetal. Posteriormente se eliminó el agua por un proceso de liofilizado para obtener el extracto final (CAI), obteniendo 100 g.

El fraccionamiento primario de CAI se llevó a cabo por particiones sucesivas líquido-líquido con distintos disolventes orgánicos de polaridad creciente: diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOEt) y *n*-butanol (But). Este proceso generó cuatro fracciones primarias nombradas de CA1 a CA4, siendo CA4 el residuo acuoso. A dichas porciones se les eliminó el disolvente con ayuda de vacío en rotaevaporador; los residuos se pesaron y se determinaron sus rendimientos.

6.1.3. Fraccionamiento sucesivo de CA1.

El fraccionamiento secundario se realizó mediante una cromatografía en columna abierta (CCA), la cual contenía 77.207 g de sílica gel 60 y como punto de aplicación 1.00 g de CA1; como medio de elución se emplearon distintas mezclas de disolventes orgánicos de polaridad creciente [Hex-DCM (1:0→0:1), DCM-MeOH (1:0→1:1)]. Este proceso generó un total de 326 fracciones, las cuales fueron concentradas al vacío para eliminar el disolvente y agrupadas en seis grupos de fracciones secundarias de acuerdo a su similitud cromatográfica (CA1-A hasta la F), monitoreada por cromatografía en capa fina (CCF) empleando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (sílica gel 60 F254, Merck). Todas estas fracciones fueron concentradas al vacío y pesadas (Figura 11).

6.1.4. Fraccionamiento sucesivo de CA2.

El fraccionamiento secundario fue realizado mediante un proceso de precipitación, Al tratar a CA2 con acetato de etilo se observó una porción soluble (CA2-A) y un precipitado amarillo el cual fue decantado y disuelto con metanol (CA2-B).

La porción soluble en acetato de etilo (CA2-A, 3 g) se fraccionó mediante CCA de fase normal (187.76 g de sílica gel) y como eluyentes [Hex-AcoEto (1:0→0:1) y AcoEto-MeOH (1:0→1:1)]. Como resultado de este procedimiento se obtuvieron 189 fracciones agrupadas en siete reuniones nombradas CA2-AI a la -AVII.

Por otra parte, 658.4 mg de CA2-B se procesaron mediante CCA con Sephadex LH 20 (45 X 5 cm) y metanol como eluyente. De este proceso se obtuvieron 140 fracciones que se agruparon en cinco porciones nombradas CA2-BI a la BV, de acuerdo a su orden de elución (Figura 11).

6.1.5. Fraccionamientos secundario de CA3.

El fraccionamiento secundario de CA3 se realizó mediante una CCA de exclusión molecular (Sephadex LH 20), como fase móvil se utilizó metanol puro. La muestra (5 g) disuelta en mezcla metanol-agua (1:1), se aplicó en la columna, este proceso permitió la obtención de 19 fracciones secundarias agrupadas por orden de elución en 7 grupos (CA3 A-G) (Figura 11).

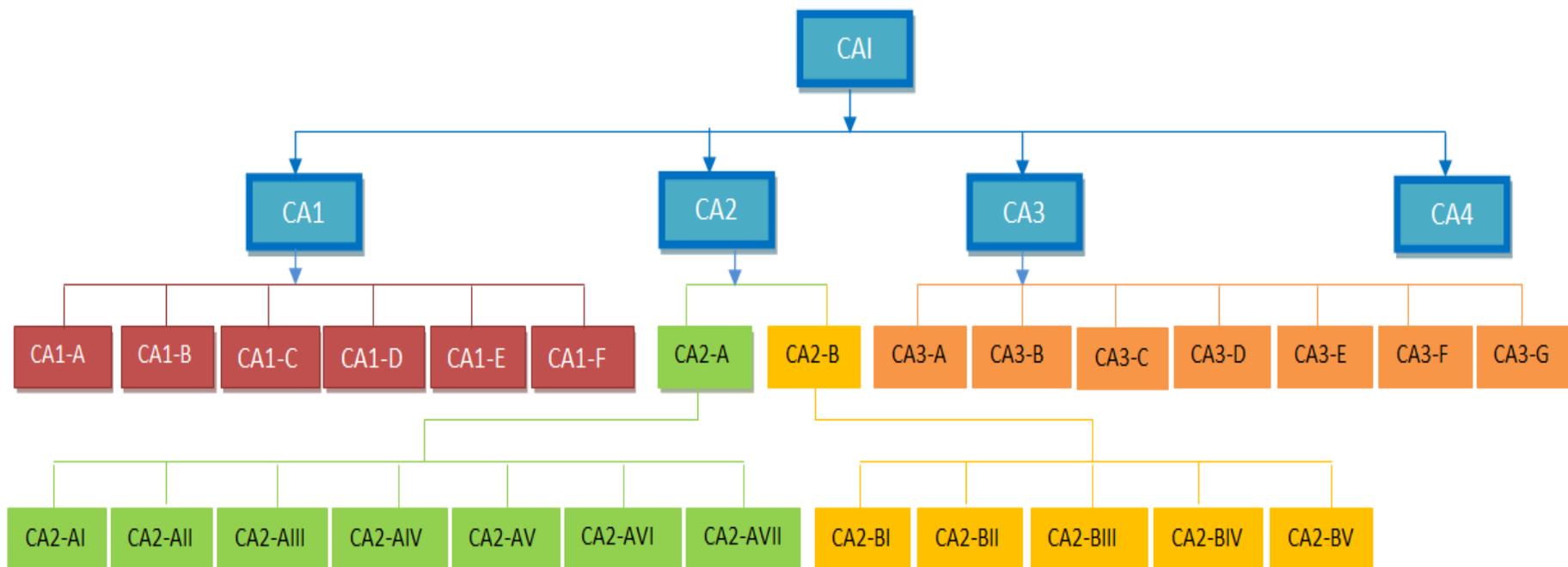


Figura 11. Fraccionamiento sucesivo de CAI

6.2.1. Evaluación del extracto acuoso íntegro y sus fracciones sucesivas sobre el crecimiento de *H. pylori*

MEDIOS DE CULTIVO

Placas de agar sangre para el cultivo de *H. pylori*

Se disolvieron 43 g de agar Casman en un litro de agua destilada. Se esterilizó a 121°C por 20 min en una autoclave (Irayama H-M-II) y se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 45-50°C. En seguida, se agregaron cuatro antibióticos [vancomicina (10 mg/l), anfotericina (2 mg/l), polimixina (2.5 mg/l) y trimetoprima (5 mg/l)] y sangre de carnero (Microlab) desfibrinada 5%; la mezcla se agitó para disolver los antibióticos y homogenizar la sangre agregada. Finalmente, se vació el medio previamente preparado en cajas Petri estériles.

Medio de cultivo líquido Mueller-Hinton para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se resuspendieron 21 g/l de medio caldo Mueller Hinton (DIFCO) en agua destilada adicionado con β -ciclodextrina al 0.2%. Se esterilizó a 121°C por 20 min; se dejó enfriar y se agregaron los siguientes antibióticos a sus concentraciones correspondientes: anfotericina 2 mg/l, polimixina 2.5 mg/l, trimetropina 5 mg/l y vancomicina 10 mg/l.

Medio de cosecha para la conservación de *H. pylori*

Se resuspendieron 28 g/l de caldo Brucella (DIFCO) en agua bidestilada, se agrega glicerol al 10% (J.T Baker) y se esterilizó a 121°C durante 20 min; se dejó enfriar y se agregó 10% de suero fetal bovino estéril (Gibco BRL) y vancomicina a una concentración de 10 mg/l, se depositó en tubos Falcon y se resguardaron en refrigeración hasta su uso.

Placas de cultivo empleadas para determinar cuentas viables y unidades formadoras de colonias (UFC)

Se adicionaron 43 g/l de agar Casman y β -ciclodextrina (0.2%) en agua destilada. Se esterilizó a 121°C durante 20 min; se dejó enfriar hasta un intervalo de entre 45-50°C y se agregó vancomicina (10 mg/l), para finalizar, se vació el medio previamente preparado en cajas Petri estériles.

6.2.3. Pruebas de identificación de *H. pylori*

H. pylori posee diferentes enzimas que utiliza para obtener energía o para defenderse del ambiente hostil en el que se encuentra; estas características bioquímicas se han utilizado como métodos de identificación. Las pruebas principales que pueden detectarse en el laboratorio y que permiten su identificación correcta son: pruebas bioquímicas (catalasa, ureasa y oxidasa) y la tinción de Gram.

Prueba rápida de ureasa

La ureasa es una enzima capaz de hidrolizar a la urea produciendo amonio y como consecuencia se origina una neutralización del ambiente cercano a *H. pylori*. Esta característica puede detectarse en el laboratorio mediante el vire de color de anaranjado a rojo que se ocasiona al aumentar el pH de un medio que contiene urea, debido a la producción de amonio por acción de la ureasa bacteriana.

Se preparó una solución de urea 6 M a pH 7.0 y de rojo de fenol al 0.05% hasta obtener una coloración naranja; alcanzando este color se agrega una asada con bacterias. La prueba es positiva si se presenta un cambio de color a rojo-naranja (Figura 12C).

Prueba de la catalasa

La catalasa es un enzima capaz de descomponer al peróxido de hidrogeno y convertirlo en agua liberando oxígeno. Esta liberación de oxígeno se observa visualmente como producción de burbujas.

En un portaobjetos limpio, se colocó una gota de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3.5%, se adiciona una asada con bacterias. La prueba es catalasa positiva si se observa producción de burbujas (Figura 12B).

Prueba oxidasa

La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de la enzima citocromo oxidasa que lleva a cabo la oxidación del citocromo C. La citocromo oxidasa reduce al oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo, los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa.

La citocromo oxidasa es capaz de oxidar al aceptor de electrones dimetil-*p*-fenilendiamina en presencia de oxígeno formando un compuesto colorido (púrpura). En un cuadro de un kit comercial dry Slide Oxidase (Difco) que contiene dimetil-*p*-fenilendiamina se colocó una porción de cultivo que contiene bacterias, si se observa una coloración azul-púrpura intenso por unos cuantos segundos es indicativo que la bacteria es oxidasa positiva (Figura 12A).

Tinción de Gram

Con la ayuda de un asa se extendió una muestra del cultivo bacteriano junto con una gota de agua en un portaobjetos limpio y se dejó secar. Se realizó una tinción de Gram añadiendo en orden y en intervalos aproximados de 1 minuto con un enjuague previo con agua corriente los colorantes cristal violeta, lugol, alcohol-acetona y safranina. De acuerdo con las características del cultivo se puede observar las diferentes formas posibles de la bacteria: forma de bacilo en cultivos frescos o líquidos (Figura 13), la forma cocoide se puede visualizar en cultivos viejos, sólidos o deficientes de nutrientes.

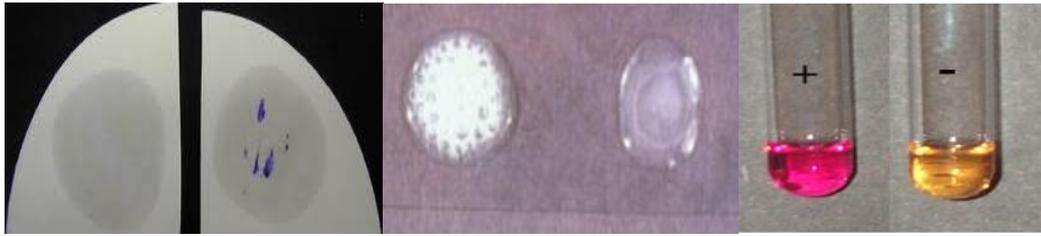


Figura 12. Pruebas bioquímicas para la tipificación de *Helicobacter pylori*: a) prueba de la oxidasa, reacción positiva semicírculo derecho; b) prueba de la catalasa, a la derecha control negativo, reacción positiva lado izquierdo; c) prueba actividad ureasa, control negativo lado derecho, ejemplo positivo lado izquierdo

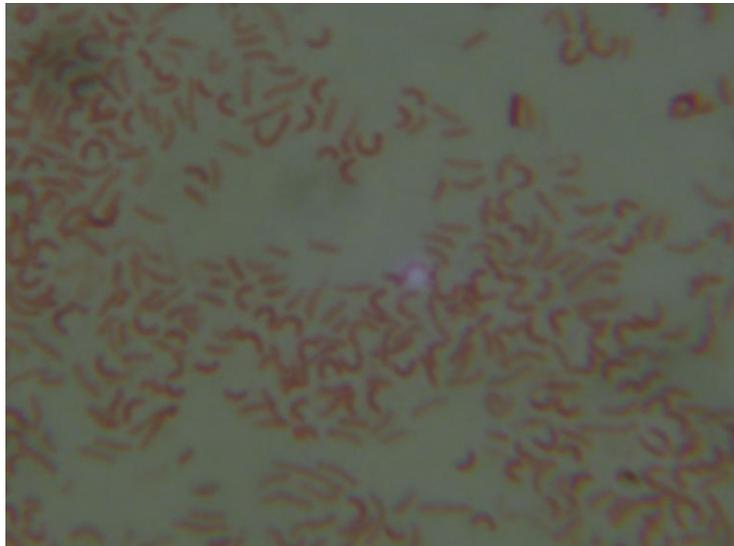


Figura 13. Tinción de Gram de un cultivo líquido de *H. pylori*

Cepa utilizada y conservación del inóculo de *H. pylori* en medio de cosecha

Se utilizó una cepa de referencia ATCC 43504, la cual se encuentra almacenada a -80 °C en medio de cosecha. Las bacterias se resuspenden y se siembran en placas de agar sangre, posteriormente se introducen en una incubadora Nuair TS autoflow (mod. 3500) ajustada a 37 °C con 10% de CO₂ y 5% de O₂. El CO₂ utilizado es de una pureza estándar (INFRA). Después de 24 horas de incubación en la atmósfera microaerofílica descrita, el cultivo se observa como un tapete translúcido,

el cual es colectado y conservado en medio de cosecha, se resguardan a -80 °C hasta su utilización.

6.2.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Tiene como objetivo determinar el efecto que puede tener algún extracto o fracción en contra de la bacteria mediante el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la concentración mínima a la cual se obtiene el 100% de la inhibición en el crecimiento del cultivo bacteriano.

Se preparó un cultivo de *H. pylori* en medio líquido Mueller-Hinton a temperatura ambiente, el cual debe tener un valor aproximado de $A_{600}= 0.230$ nm empleando un espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech), posteriormente se incubó en condiciones microaerófilas con agitación constante (10% de CO₂, 37°C y 150 rpm) durante 5 h aproximadamente, hasta obtener una lectura final $A_{600}=0.300$ nm, es decir que la bacteria se encuentra en su fase logarítmica de crecimiento (fase log), (correspondiente a un valor de 10⁸ UFC/ml).

Los extractos o fracciones a probar se disolvieron en DMSO o agua y se prepararon diluciones seriadas para obtener las siguientes concentraciones finales 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 y 7.81 µg/ml. Las pruebas se realizaron en placas de 24 pozos con una capacidad de 3 ml, a cada pozo se le agregó 1.5 ml del cultivo de bacterias en su fase log más 10 µl de la muestra, todo esto se realizó por triplicado. Como control negativo se utilizaron 10 µl de DMSO o agua, como control positivo se emplearon los antibióticos de referencia, metronidazol y amoxicilina.

Al depositar los tratamientos en los diferentes pozos se tomó una alícuota (750 µl) para determinar una lectura inicial, posteriormente la placa se colocó en incubación durante 24 hrs en las condiciones microaerófilas descritas previamente. Transcurrido este periodo de incubación se obtuvo la lectura final.

El cálculo de la CMI se obtuvo aplicando las siguientes formulas:

En primer lugar se obtiene la diferencia de absorbencias de los controles empleados como vehículos, de los antibióticos y de los distintos tratamientos con la siguiente ecuación:

$$\Delta A = A_f - A_i$$

Donde: ΔA es la diferencia de absorbencias de cada cultivo (controles y experimentales), A_i = absorbencia inicial del cultivo, A_f = absorbencia final del cultivo

Posteriormente, se obtuvo el crecimiento bacteriano (%C), utilizando el valor promedio de los controles (ΔA_c) y de los triplicados de cada uno de los experimentales (ΔA_e)

$$(\Delta A_e)(100)/\Delta A_c = \%C$$

Con este porcentaje, se obtuvo el porcentaje de inhibición (%I) de los diversos extractos o fracciones y de los diferentes antibióticos de referencia

$$100 - \%C = \%I$$

6.3.1. Efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima ureasa

El efecto de CAI y sus fracciones primarias sobre la actividad de la enzima ureasa se realizó mediante un microensayo colorimétrico, detectando la producción de amonio en placas de 96 pozos con fundamento en la reacción Weatherburn (Weatherburn, 1967; Tong *et al.*, 2004) (Figura 14).

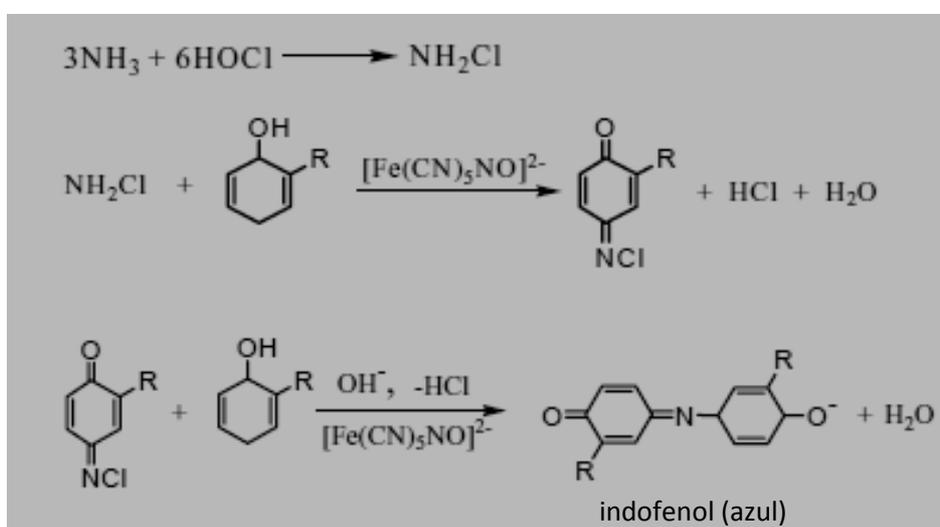


Figura 14. Reacción de formación de indofenol (tomado de Lau *et al.*, 2003)

6.3.2. Purificación parcial de la enzima ureasa de *H. pylori*.

Se preparó un cultivo de bacterias en medio Mueller-Hinton como ya se explicó en la sección anterior y se incubó hasta que alcanzó una $A_{600} = 0.3$ ($\approx 1 \times 10^8$ UFC/ml) se tomaron 50 ml de cultivo y se centrifugó dos veces con 9 ml de PBS (pH=7.2) durante 10 min a 5 000 rpm y 4 °C.

El sedimento obtenido se resuspendió en 5 ml de PBS sobre un baño de hielo. La ruptura de las bacterias se realizó por sonicación, se le añadió 50 μ l de un cocktail de inhibidores de proteasas (SIGMA) y 10 μ l de EDTA (1 mM).

El extracto de bacterias se centrifugó durante 10 min a 12 000 rpm y 4 °C (centrifuga Sorvall RC 5C Plus, rotor SS34). El sobrenadante obtenido contiene la enzima ureasa con una mezcla de proteínas y material celular. Esta porción se centrifugó nuevamente por 40 min a 45 000 rpm y 4°C (ultracentrifuga Beckman XL-90, rotor 65- Ti), el sobrenadante se filtró con un Centricon® con un tamaño de corte de 100 KDa (la enzima ureasa tiene un peso molecular de 550 KDa a 1000 rpm, 4 °C hasta obtener un volumen de 500 μ l del concentrado, en el cual se encuentra la enzima ureasa parcialmente pura, la cantidad de proteína fue determinada mediante el método de Bradford empleando como estándar, albúmina de suero bovino (BSA).

Donde:

Reactivos para desarrollar color

Reactivo de color A: fenol 0.714 M

Reactivo de color B: NaOH 0.719 mM y NaClO 0.177 mM (0.44%)

Solución de urea 75 mM

Soluciones de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ para curva de calibración: 7.3, 14 y 29 mM.

6.3.3. Determinación de la actividad inhibitoria de CAI y fracciones primarias sobre la enzima ureasa

El estudio del efecto de CAI y sus fracciones primarias se realizó mezclando los distintos reactivos en las cantidades especificadas en la Tabla 3

Tabla 3. Reactivos empleados para determinar el efecto inhibitorio de CAI y fracciones primarias sobre la enzima ureasa, la adición de los reactivos fue en orden de izquierda a derecha

	PBS (μ l)	Enzima parcialmente pura (μ l)	AHA* (μ l)	Extractos y fracciones (μ l)	Pre-incubación 10 min	Urea (μ l)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (μ l)	Incubación con el sustrato 10 min	Reactivo de color A* (μ l)	Reactivo de color B** (μ l)
Control negativo	120	20	--	--	X	10		X	50	100
Control positivo	140	--	10	--	X	--		X	50	100
Tratamientos	110	20	--	10	X	10		X	50	100
Control ureasa	130	20	--	--		--		X	50	100
Control urea	140	--	--	--		10		X	50	100
Control extracto solo	140	--	--	10		--		X	50	100
amonio	140						10			

* AHA, ácido acetohidroxámico

Concentraciones finales de: Reactivo de color A: fenol 0.119 mM, Reactivo de color B: NaOH 0.119 mM y NaClO 0.059 mM, Solución stock de urea: 5 mM

Las condiciones de incubación fueron a 37 °C protegiendo de la luz y sin agitación. La preincubación tiene el objetivo de inicial la interacción del extracto correspondiente con la enzima ureasa, el periodo de incubación junto con el sustrato es para que se lleve a cabo la reacción enzimática de la ureasa, Una vez transcurrido este tiempo se añaden los reactivos de color, colocando los reactivos se colocó la placa en un equipo ELISA para efectuar su lectura a $\lambda =$

Todos los valores obtenidos fueron comparados con una curva patrón de amonio cuya fuente es $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a diferentes concentraciones (concentraciones finales de $\text{NH}_4 = 7.3, 14$ y 29 mM).

Análisis de resultados

Una vez obtenidos los valores experimentales de absorbencia, se utilizó la siguiente ecuación para restar la contribución de los distintos reactivos adicionados y obtener la absorbencia final real (A_r).

$$C - (US + UR) = A_r$$

Donde: (C) es igual al promedio de las absorbencias de los controles negativos, (UR) es el promedio de los controles de urea y (US) el promedio de los controles de ureasa.

Para calcular el porcentaje de inhibición enzimática se utilizó la siguiente expresión:

$$100 - (X - (US + UR + T)) = \% \text{ de inhibición}$$

Donde: (X) es igual al promedio de las absorbencias de los tratamientos y (T) el promedio de las absorbencias de los controles de cada extracto o fracción sola.

Los valores obtenidos se interpolan en la curva patrón de amonio para calcular la cantidad de moles obtenidos en la reacción por la acción de la ureasa, así mismo se calculó la actividad específica expresada en; nanomoles de amonio/min/ μg de proteína.

6.4.1. Evaluaciones *in vivo*

Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 con un peso promedio de 20-25 g los cuales fueron suministrados por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales fueron tratados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado de los animales (NOM-062-ZOO-1999). Se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio por un periodo aproximado de 3 días con acceso libre de agua y alimento, fueron sacrificados utilizando una cámara de CO₂

6.4.1.1. Determinación de la Toxicidad Aguda del Extracto acuoso íntegro (CAI).

La toxicidad aguda de CAI se evaluó mediante el establecimiento de la dosis letal media (DL₅₀) utilizando la metodología descrita por Lorke (1983). El protocolo consta de dos fases: en la primera, se emplean grupos de 3 animales cada uno con 12 hrs de ayuno y agua *ad libitum*. Estos fueron observados durante los 30 min previos a la administración por vía oral de tres dosis distintas de CAI a evaluar (10, 100 y 1000 mg/Kg) diluido en solución salina isotónica (SSI). En la segunda fase de la prueba, las dosis seleccionadas se determinan de acuerdo al número de animales muertos en la primera fase (criterios de Lorke) y se sigue el mismo procedimiento de la primera fase. Una vez administrado el extracto a evaluar, el comportamiento de los animales fue observado y registrado durante las primeras 8 hrs y posteriormente, cada 24 hrs por un periodo 14 días; para así determinar algún cambio en su patrón conductual, efectos tóxicos o la muerte. Como control negativo para cada fase, y de manera complementaria, tres animales adicionales fueron administrados con el vehículo utilizado donde se suspendieron los tratamientos de prueba (1 ml/Kg). Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados.

6.4.1.2. Determinación del efecto antiinflamatorio, mediante el modelo de edema auricular inducido con TPA y xilol

Se evaluó la actividad antiinflamatoria mediante el modelo de edema agudo inducido por el TPA y xilol en oreja de ratón (De Young *et al.*, 1989; Xiaofeng *et al.*, 2012). Los animales fueron anestesiados previamente con una solución de pentobarbital sódico de uso veterinario al 10% por vía *i.p.* Los extractos y fracciones (0.1-0.5 mg/oreja por vía tópica y 10-100 mg/Kg *p.o.*) se suspendieron en etanol al 70% y SSI, respectivamente. Como control positivo se empleó a la indometacina (0.5 mg/oreja de manera tópica y 10 mg/Kg *p.o.*) disuelta en acetona o SSI. Los fármacos de referencia y las muestras fueron preparados minutos antes del ensayo. Para la cuantificación del edema se midió el grosor auricular al inicio y al final del experimento con la ayuda de un micrómetro (Mitutoyo no. 293–831). De manera adicional, se tomaron biopsias de 7 mm de diámetro de cada oreja y se determinó el peso. El efecto antiinflamatorio se expresa como el % de inhibición del edema auricular.

$$\% \text{Inhibición} = ((\Delta E_c - \Delta E_e) / \Delta E_c) * 100$$

Donde: Ee es el promedio de las lecturas de grosor de los animales experimentales y Ec de los controles Para la administración oral, los tratamientos y fármaco de referencia se administraron a razón de 10 ml/Kg de peso, 30 min antes del agente injuriante. Cuando la administración fue tópica, los tratamientos y fármaco de referencia se administraron inmediatamente después del agente edematogénico.

Agente edematogénico 13-acetato del-12-O-tetradecanoil-forbol (TPA)

A cada animal se le administró, de manera tópica en la oreja derecha 20 µl/oreja de los tratamientos de prueba o los fármacos de referencia; inmediatamente se administró en ambas orejas 2.5 µg del agente injuriante (TPA) disuelto en 20 µl de acetona. 4 hrs después, los animales fueron sacrificados

Agente injuriante xilol

A cada animal se le administró de manera tópica en la oreja derecha 20 μ l/oreja del extracto de prueba o los fármacos de referencia; inmediatamente después se administraron 30 μ l de xilol en la oreja derecha y una hora después los animales fueron sacrificados.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde que la infección por *H. pylori* ha sido aceptada como una de las causas primarias de la úlcera péptica y su relación directa con la aparición de cáncer gástrico, la búsqueda de nuevos tratamientos que eviten los efectos secundarios indeseados y antibióticos a los cuales no sea resistente la bacteria se ha intensificado en distintos campos de la investigación (Slover *et al.*, 2009). En la mayoría de los países en vías de desarrollo, el uso de la medicina tradicional a base de plantas es empleada de manera común para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, incluyendo la gastritis, úlcera péptica y diarrea. Las ventajas que ofrece el uso de estas especies vegetales para el tratamiento de distintos padecimientos no solo se acotan a la enfermedad en cuestión, sino que, debido a la presencia de distintos compuestos, ofrecen la posibilidad de efectos polifarmacológicos (Digest, 1987).

El presente trabajo de tesis describe la evaluación anti-*H. pylori* y antiinflamatoria del extracto acuoso de la especie medicinal *C. aequipetala*, empleada de manera tradicional como antiinflamatorio y para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, como gastritis, infecciones, dolor, disentería y diarrea; y que previamente fue identificada como activa frente *H. pylori in vitro* (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

7.1.1. Preparación y fraccionamiento biodirigido del extracto acuoso íntegro

En primer lugar, se realizó la preparación del extracto acuoso mediante una infusión (CAI) con un rendimiento del 10%. Cabe señalar que la infusión es una de las formas tradicionales en que ésta planta medicinal se usa con fines terapéuticos.

Posteriormente, CAI se sometió al fraccionamiento primario, el cual fue realizado por particiones líquido-líquido. Como resultado se obtuvieron 4 fracciones primarias que, conforme se aumentaba la polaridad del disolvente empleado se obtenía un mayor rendimiento (Tabla 4), esto nos podría indicar que la mayoría de los compuestos contenidos en el extracto acuoso son de naturaleza polar. Como se puede observar en la

CCF (Figura 15), cada una de las fracciones extraídas concentró distintos grupos de compuestos.

Tabla 4. Nomenclatura, rendimiento y actividad anti-*H. pylori* de CAI y sus fracciones primarias (CA1, CA2, CA3, CA4)

Nombre	Nomenclatura	Peso (g)	Rendimiento %	CMI (µg/ml)
** Extracto íntegro	CAI	100	**10	125
Extraída con diclorometano	CA1	2.03	2.03	15.2
Extraída con acetato de etilo	CA2	20.05	20.05	250
Extraída con metanol	CA3	35.42	35.42	250
Residuo acuoso	CA4	42.50	42.50	>250

** El valor de rendimiento del extracto acuoso integro está determinado a partir de la cantidad total del material vegetal utilizado

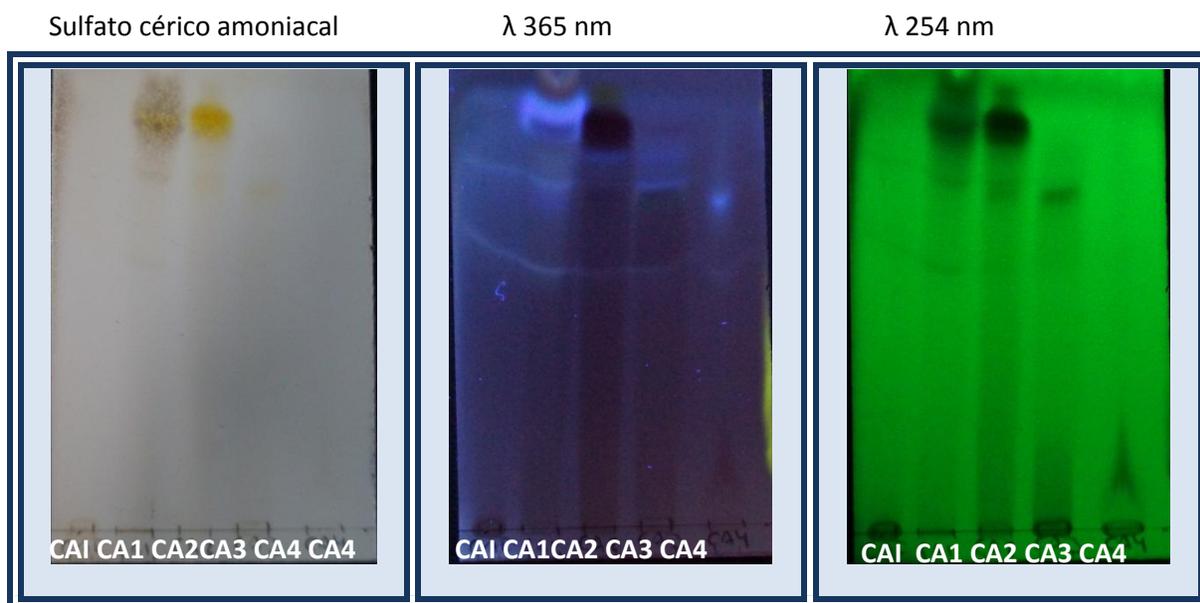


Figura 15. Perfil cromatográfico de CAI y sus fracciones primarias (CA1, CA2, CA3 y CA4). El sistema de elución contiene AcoEto-MeOH-H₂O (5:4:1), se reveló a dos diferentes longitudes de onda (λ= 365 y 254) y con el agente revelador sulfato cérico.

Enseguida se prosiguió a la evaluación del potencial anti-*H. pylori* del extracto y fracciones primarias. Cabe destacar que las evaluaciones de la actividad antibacteriana

se realizaron en cultivo líquido de acuerdo a lo reportado previamente en nuestro grupo de trabajo (Castillo-Juárez *et al.*, 2009). Aun cuando las guías internacionalmente aceptadas para este fin recomiendan la evaluación de productos puros en cultivos sólidos (CLSI, 2005), la solubilidad de los extractos y fracciones de origen vegetal limitan su evaluación. En el laboratorio se ha demostrado que la disponibilidad de las moléculas se favorece al añadir los extractos directamente sobre las bacterias en una cantidad reducida de medio líquido, por tal motivo, nuestras muestras fueron probadas así.

La CMI obtenida para CA1 fue de 125 $\mu\text{g/ml}$. Este valor concuerda con lo previamente obtenido por Castillo-Juárez y colaboradores en 2009.

En cuanto a la actividad anti-*H. pylori* de las fracciones primarias observamos que CA1 presenta la mejor actividad (CMI=15.2 $\mu\text{g/ml}$) (Tabla 4) en comparación con el extracto íntegro y la fracción primaria CA2 (CMI= 250 $\mu\text{g/ml}$), por otro lado CA3 y CA4 presentaron valores mayor e igual a 250 $\mu\text{g/ml}$. En la Figura 16, se muestra el efecto de las diferentes concentraciones probadas de cada una de las fracciones primarias y del extracto. En comparación con el antibiótico de referencia metronidazol, CA1 tiene una actividad muy buena comparada con el este último (CMI 300 $\mu\text{g/ml}$) y aunque no mejora la CMI de la amoxicilina (CMI= 0.01 $\mu\text{g/ml}$, datos no mostrados en la figura), se puede considerar con muy buen potencial en la búsqueda de compuestos bioactivos, dado que CA1 es aún una fracción metabólicamente compleja.

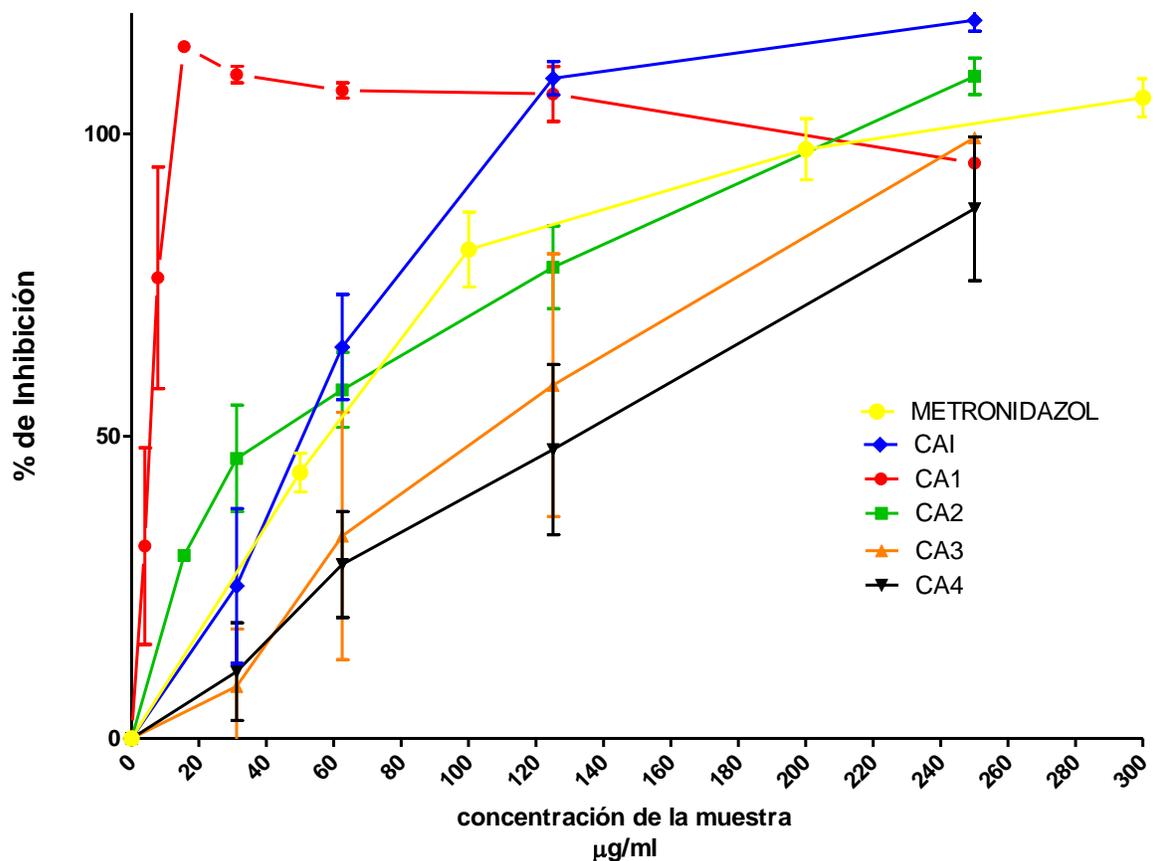


Figura 16. Actividad inhibitoria del extracto acuoso íntegro (CAI) y de sus fracciones primarias (CA1, CA2, CA3 y CA4) comparadas con el fármaco de referencia metronidazol empleando cultivos de *H. pylori*.

Por su parte CA2, si bien no tuvo una CMI tan buena como CA1, su valor también es mejor que el del metronidazol, por lo que del mismo modo debe considerarse con potencial en la búsqueda de compuestos anti- *H. pylori*. De tal forma, se observó que las fracciones de menor polaridad presentaban mejor actividad en contra de la bacteria, lo que nos hace suponer que los compuestos activos del extracto acuoso corresponden a los de polaridades bajas. CA3 aun cuando no presento un buen potencial antibacteriano se fraccioño debido a otras actividades farmacológicas importantes relacionadas con la bacteria como la inflamación y la presencia de ulceras gástricas. Finalmente CA4 no fue sujeto de ningún proceso de fraccionamiento.

7.1.2. Fraccionamiento secundario de CA1

Dado que esta fracción fue la de mejor efecto inhibitorio sobre *H. pylori* (CMI 15.62 $\mu\text{g/ml}$), se sometió a un fraccionamiento secundario con una CCA de sílica gel 60. De este proceso se obtuvieron un total de 326 fracciones y de acuerdo al monitoreo realizado mediante CCF, se formaron seis reuniones finales nombradas CA1-A a la F con los rendimientos que se muestran en la Tabla 5 y con los perfiles cromatográficos en CCF presentados en la Figura 17. Estas fracciones fueron evaluadas contra el crecimiento de la bacteria y, los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5. De lo anterior se desprende que las seis reuniones poseían una CMI muy buena en comparación con el metronidazol (300 $\mu\text{g/ml}$). Las dos fracciones con la mejor actividad (CMI's) fueron CA1-B y CA1-C (CMI 7.3 $\mu\text{g/ml}$) las cuales mejoraron la actividad de CA1 que les dio origen. El fraccionamiento fue adecuado debido a que se mejoro la actividad anti-*H. pylori* comparado con CA1, en su perfil cromatográfico se puede observar que las fracciones más activas son de naturaleza menos polar (excluyendo a CA1-A), sin embargo, el rendimiento es bajo y la complejidad metabólica aún es grande.

Tabla 5. Nomenclatura y actividad anti-*H. pylori* de las fracciones secundarias de CA1

Nombre	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
CA1	15.2
CA1-A	250
CA1-B	7.3
CA1-C	7.3
CA1-D	31.2
CA1-E	31.2
CA1-F	125
Metronidazol	300
Amoxicilina	0.01

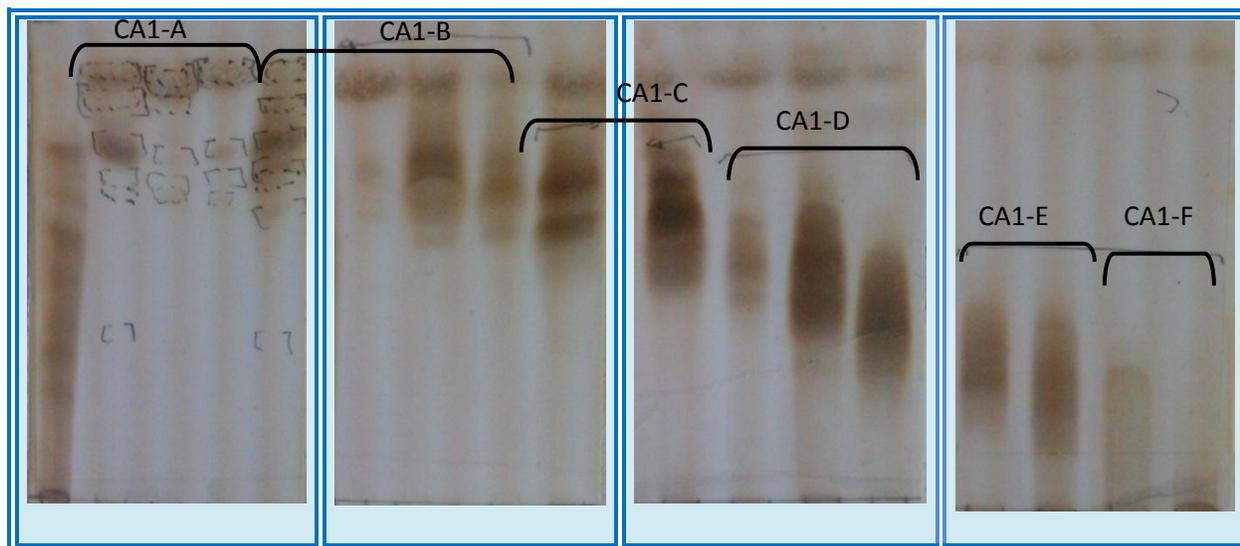


Figura 17. Perfil cromatográfico de las fracciones secundarias de CA1. El sistema de elución empleado fue 5:4:1 MeOH:AcoEto:H₂O, como agente revelador se empleó sulfato cérico.

7.1.3. Fraccionamiento de CA2

Por su parte, el fraccionamiento secundario de CA2 (con una CMI de 250 µg/ml) se realizó por un proceso de precipitación formando dos fracciones secundarias: Una soluble en acetato de etilo y otra soluble en metanol. Para identificarlas fueron nombradas CA2-A y CA2-B, respectivamente. La evaluación antimicrobiana mostró que CA2-A (62.5 µg/ml) posee la mejor actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *H. pylori* (Tabla 6), en comparación con su antecesora CA2 y el metronidazol (250 y 300 µg/ml respectivamente), además observamos que dicha fracción es la menos polar de ambas, esto nos permite asegurar que el procedimiento empleado para fraccionar a CA2 fue el idóneo, de tal manera que podemos proponer el uso de esta fracción para continuar el estudio biodirigido. No obstante que el valor de CMI de CA2-B no mejoró a la que le dio origen, si mantiene la actividad antimicrobiana, lo que nos permite sugerir su fraccionamiento posterior.

Tabla 6. Nomenclatura, rendimiento y actividad anti-*H. pylori* de las fracciones secundarias obtenidas de CA2.

Nombre	Peso (mg)	Rendimiento %	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
CA2	20050	20.05	250
CA2- A	3000	14.96	62.5
CA2- B	658.4	3.28	250
Metronidazol			300
Amoxicilina			0.01

7.1.4. Fraccionamiento terciario de CA2-A y CA2-B

CA2-A se fraccionó mediante CCA de gel de sílice, obteniendo 189 fracciones, este proceso fue monitoreado por CCF. Como resultado se obtuvieron 7 reuniones (CA2-AI al VII), (Tabla 7 y Figura 18). Las dos primeras (CA2-AI y CA2-AII) poseen la mejor actividad inhibitoria con valores de 7.3 $\mu\text{g/ml}$ aunque otras fracciones también mejoraron la actividad de CA2-A. La actividad de CA2-AI y AII es muy buena comparada con los valores reportados para metronidazol (300 $\mu\text{g/ml}$), sin embargo no logra superar la actividad de la amoxicilina (0.01 $\mu\text{g/ml}$), recordando que este fármaco de referencia es un compuesto puro y las fracciones terciarias aun no se encuentran puras.

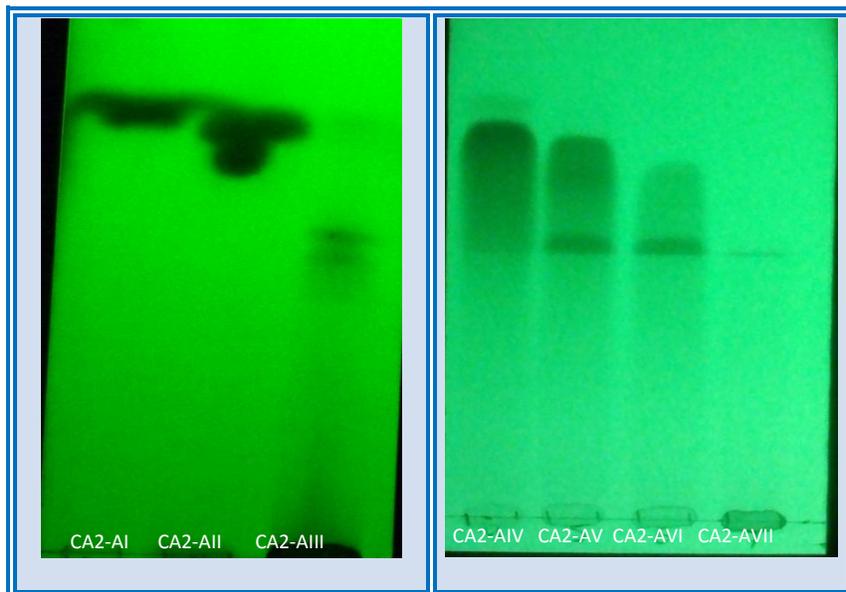
CA2-B se procesó mediante una CCA de exclusión molecular con Sephadex LH-20. Las porciones obtenidas fueron agrupadas en 5 fracciones (CA2-BI a la V), (Tabla 7 y Figura 19). El fraccionamiento no fue el adecuado, la actividad anti-*H. pylori* se mantuvo igual en todas las fracciones (250 $\mu\text{g/ml}$).

Tabla 7. Nomenclatura, rendimiento y actividad anti-*H. pylori* de las fracciones terciarias de CA2-A y CA2-B

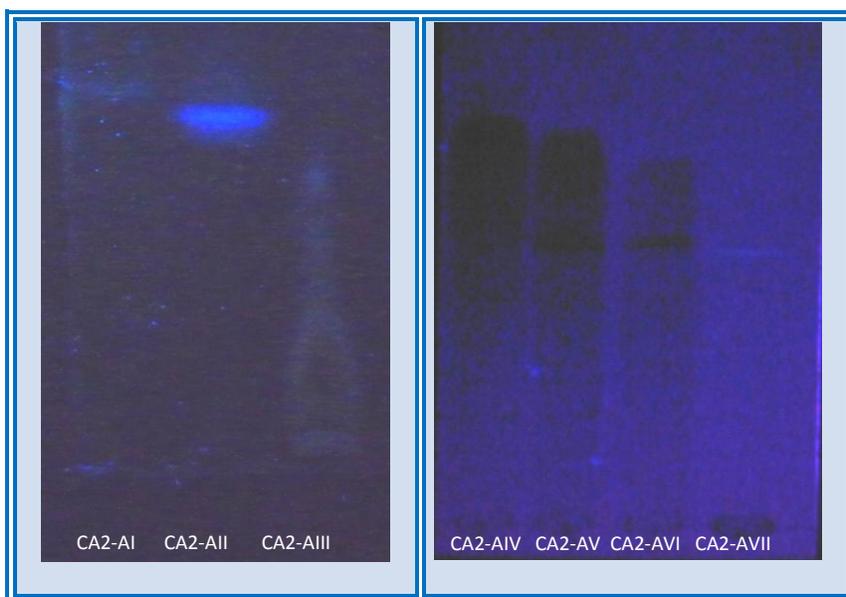
Nombre	Peso (mg)	R %	CMI (µg/ml)	Nombre	Peso (mg)	R %	CMI (µg/ml)
CA2-A	3000	14.96	62.5	CA2-B	658.4	3.2	250
CA2- AI	98	3.26	7.3	CA2- BI	101.1	15.3	250
CA2- AII	200.2	6.67	7.3	CA2- BII	212.5	32.3	250
CA2- AIII	205.2	6.84	31.2	CA2- BIII	141.5	21.5	250
CA2- AIV	500.1	16.67	31.2	CA2- BIV	98.6	15.0	250
CA2- AV	390.5	13.01	125	CA2- BV	80.2	12.2	250
CA2- AVI	602.5	20.08	62.5				
CA2- AVII	857.2	28.57	31.2				
Metronidazol			300				300
Amoxicilina			0.01				0.01

R %= Rendimiento (%)

λ 254nm



λ 365nm



Sulfato cérico amoniacal

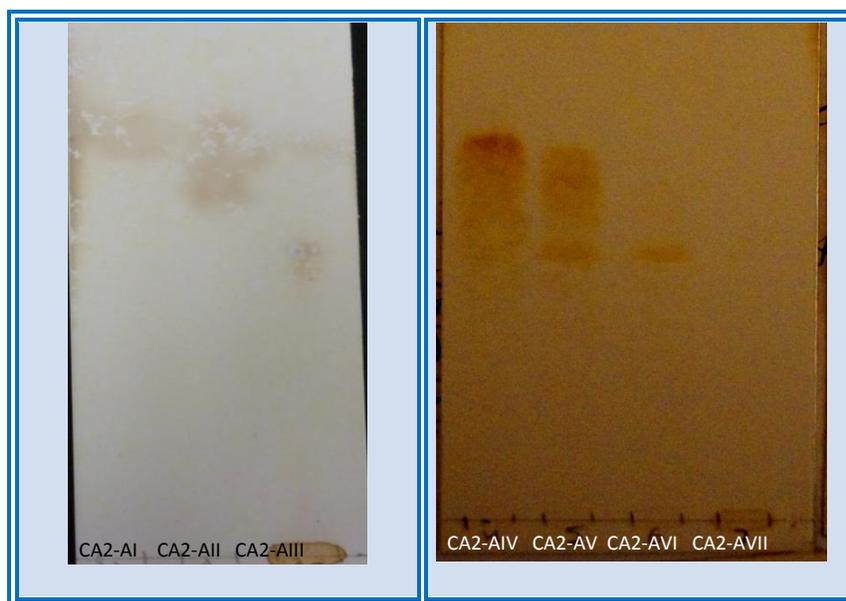


Figura 18. Perfiles cromatográficos de las fracciones terciarias de CA2-A. El sistema de elución contiene AcOEt-MeOH (8:2) más 2 gotas de ácido fórmico, se reveló con luz UV a dos diferentes longitudes de onda ($\lambda=365\text{nm}$ y 254nm) y con el agente revelador sulfato cérico.

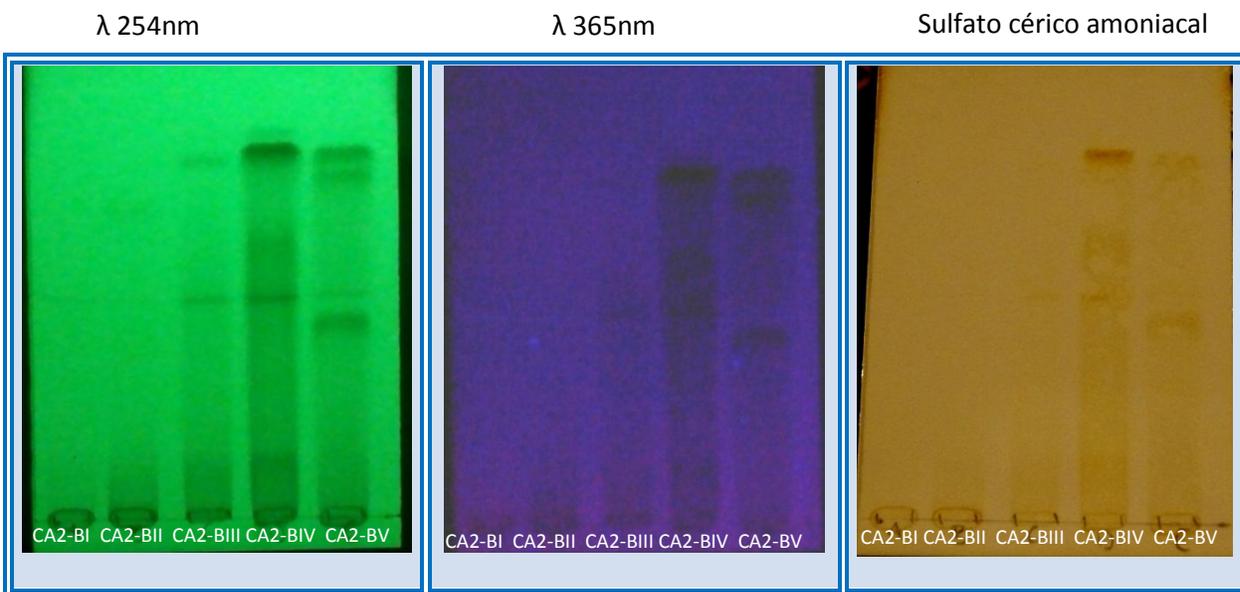


Figura 19. Perfiles cromatográficos de las fracciones terciarias de CA2-B. El sistema de elución contiene AcOEt-MeOH-H₂O (7:2:1) mas 2 gotas de ácido fórmico, se reveló con luz UV a dos diferentes longitudes de onda (λ = 365nm y 254nm) y con el agente revelador sulfato cérico.

7.1.5. Fraccionamiento secundario de CA3

Aun cuando CA3 no mejoró la actividad anti-*H. pylori* de CA1; algunas pruebas realizadas en el laboratorio demostraron que esta fracción primaria posee interesantes efectos antiinflamatorios y gastroprotectores [(evaluados mediante los modelos de edema agudo inducido con xilol y TPA (datos mostrados más adelante) y el de ulcera aguda inducida con etanol absoluto (a 100 mg/Kg mostro un efecto gastroprotector de 69.2%)] por tal motivo se continuo con el fraccionamiento secundario. Este se realizó por CCA de exclusión molecular (Sephadex LH-20 y MeOH); se obtuvieron 5 fracciones y fueron agrupadas de acuerdo a su orden de elución (CA3-I a la V). La evaluación antimicrobiana permitió identificar a dos fracciones con un buen potencial anti-*H. pylori* (CA3-A, CMI de 31.2 μ g/ml), seguida de CA3-B (CMI 125). El resto de ellas fueron menos activas (\geq 250 μ g/ml) (Tabla 8 y Figura 20).

Finalizando lo concerniente al proceso de fraccionamiento, la fracción primaria que presento el menor efecto anti-*H. pylori* fue CA4 (CMI de más 250 μ g/ml), por tal motivo no se continuo con su fraccionamiento, las fracciones de mayor polaridad no presentaron una

buena actividad en contra de la bacteria, en comparación con la fracción de más baja polaridad (CA1).

El efecto mostrado por las fracciones primarias y secundarias corrobora el comportamiento antes mencionado donde las fracciones con menor polaridad presentan una mejor actividad anti-*H. pylori*.

Estos valores en comparación con los fármacos de referencia metronidazol y amoxicilina (CMI de 300 y 0.01 µg/ml, respectivamente), provee de evidencia que las fracciones de baja polaridad pueden ser fuentes potenciales de compuestos anti-*H. pylori* y podemos proponer a *C. aequipetala* como una planta con un buen potencial inhibitorio en contra de la bacteria.

Tabla 8. Nomenclatura, rendimiento y actividad anti-*H. pylori* de las fracciones secundarias de CA3.

Nombre	Fracciones	Peso (mg)	Rendimiento %	CMI (µg/ml)
CA3		35420	35.4	250
CA3 A	1-3	500	1.4	31.2
CA3 B	4-5	600	1.7	125
CA3 C	6-7	320	0.9	250
CA3 D	8-11	210	0.6	>250
CA3 E	12-14	340	0.9	250
CA3 F	16-18	2300	6.5	250
CA3 G	19	600	1.7	250
Metronidazol				300
Amoxicilina				0.01

λ 254 nm

λ 365 nm

Sulfato cérico amoniacal

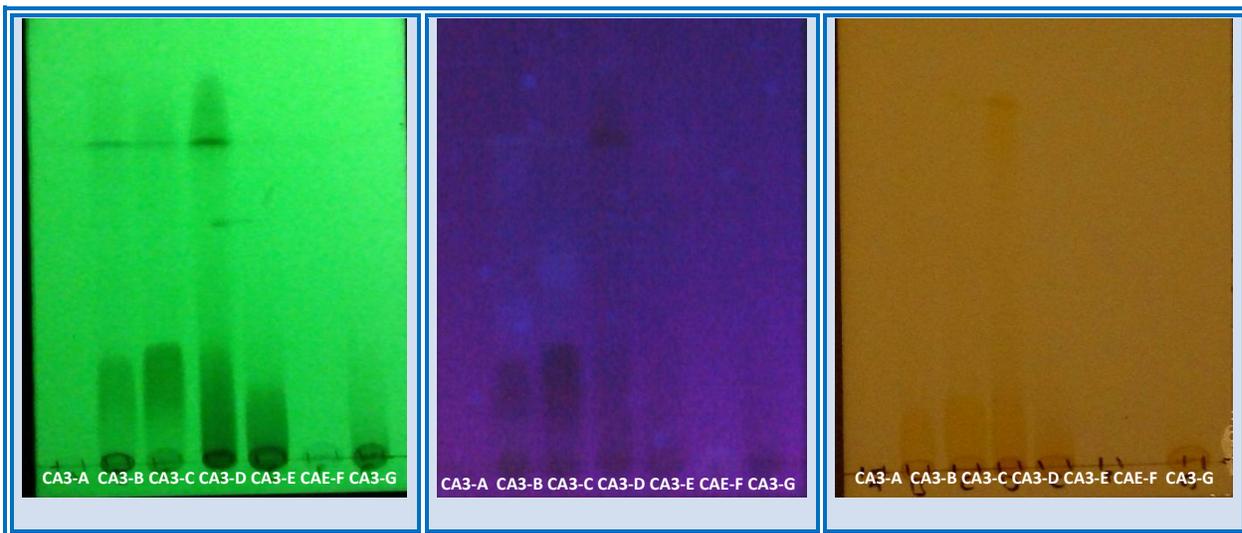


Figura 20. Perfiles cromatográficos de las fracciones secundarias de CA3. El sistema de elución contiene AcOEt-MeOH-H₂O (6:2:2) mas 2 gotas de ácido fórmico, se reveló a dos diferentes longitudes de onda ($\lambda = 365\text{nm}$ y 254nm) y con el agente revelador sulfato cérico.

En este trabajo no se logró aislar compuestos de las fracciones que presentaron buena actividad inhibitoria contra *H. pylori*, principalmente por el bajo rendimiento de las fracciones más activas. Ejemplo de ello es CA1 con un rendimiento de 2.03%, y sus fracciones secundarias; en cambio las fracciones más polares pero menos activas presentaron rendimientos entre 35.42 y 42.5% (CA3 y CA4 respectivamente), lo mismo sucedió en los subsecuentes fraccionamientos.

El comportamiento encontrado durante el fraccionamiento biodirigido de CA1, concuerda con algunos ensayos en la literatura donde se observa que extractos de polaridades bajas o intermedias, poseen mejores actividades anti-*H. pylori* que de aquellos que se obtienen con disolventes de alta polaridad como el agua. En algunos ensayos se muestra este fenómeno, por ejemplo, Gadhi y colaboradores en 2001 evaluaron la actividad anti-*H. pylori* de la planta *Aristolochia paucinervis* originaria de Marruecos. Este trabajo partió de dos extractos metanólicos provenientes de rizomas y de hojas, respectivamente. De cada uno de los extractos se realizaron fraccionamientos sucesivos por particiones liquido-liquido, de donde se obtuvieron cuatro fracciones de cada uno (Hexano, cloroformo, acetato de etilo y n-butanol). Posteriormente se les determinó su CMI empleando el método de dilución en placa, se probaron las 8 fracciones obtenidas de los dos extractos metanólicos. Como resultado solo cuatro fracciones presentaron efectos inhibitorios, dos de ellas fueron los extractos metanólicos iniciales y las otras restantes fueron las fracciones hexánicas tanto de hojas como de rizomas. La

fracción hexánica obtenida a partir de rizomas mostro una CMI de 16 $\mu\text{g/ml}$ mientras que la fracción extraída con hexano a partir del extracto metanólico de hojas presento la mejor actividad inhibitoria CMI de 4 $\mu\text{g/ml}$ mejorando la actividad de su predecesora (CMI de 32 $\mu\text{g/ml}$) con estos resultados se puede observar que los extractos de menor polaridad presentan una mejor actividad inhibitoria (Gadhi *et al.*, 2001).

En otro reporte se pudo observar este mismo comportamiento. Chinniah y colaboradores (2009), mediante el fraccionamiento biodirigido de un extracto metanólico de las parte aéreas de *Tephrosia purpurea* (CMI₅₀=100 $\mu\text{g/ml}$) lograron identificar que las fracciones de menor polaridad incrementaron su actividad comparándolos con los de mayor polaridad y el extracto de origen. De esta forma, las fracciones hexánica y clorofórmica mejoraron la actividad del extracto inicial (CMI₅₀ =50 y 25 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente), mientras que aquellas porciones obtenidas por la partición con butanol y el acuoso residual fueron menos activas (CMI₅₀ 200 y 100 $\mu\text{g/ml}$).

Considerando lo anterior, acerca de la polaridad de las fracciones más activas, es posible preparar un extracto empleando disolventes menos polares como hexano, diclorometano u alcoholes como metanol o etanol. Con el fin de encontrar fracciones activas que tengan mejor rendimiento y que puedan purificarse los compuestos bioactivos con mayor facilidad.

7.2.1. Actividad anti-ureasa

Como se describió anteriormente, esta enzima es muy importante para la sobrevivencia de la bacteria ya que es usada para neutralizar el microambiente ácido que rodea a la bacteria mediante la hidrolisis de la urea, generando dióxido de carbono y amonio. Por este motivo se evaluó la actividad inhibitoria sobre esta enzima para obtener evidencia suficiente de que *C. aequipetala* puede tener un efecto integral en contra de la bacteria. Se evaluó el extracto acuoso integro y sus fracciones primarias. CAI mostró una actividad inhibitoria considerable comparada con un inhibidor competitivo reversible, el ácido acetohidroxámico (AHA) (control positivo), el cual se une a la enzima en su sitio activo. Con respecto a las fracciones primarias, CA3 presentó la mejor actividad inhibitoria.

La evaluación se realizó empleando la reacción de Weatherburn. Los resultados (Figura 21) mostraron que CA1 y las fracciones primarias CA2, CA3 y CA4 (31.25-250 µg/ml), provocaron un efecto inhibitorio importante. CA1 y CA3 fueron los únicos tratamientos que alcanzaron el 100% de inhibición de la enzima a concentraciones de 250 y 125 µg/ml, respectivamente. CA1 no fue probado con este método debido a su bajo rendimiento.

AHA inhibió en un 94.58% a una concentración de 200 µg/ml. Todas las fracciones, incluyendo a AHA, mostraron un comportamiento concentración-dependiente.

Estos resultados nos indican que CA1 y, en especial la fracción CA3, representan fuentes potenciales de inhibidores de ureasa, algo muy importante considerando que esta enzima es un blanco terapéutico para erradicar al bacilo y es trascendental para la sobrevivencia de la bacteria ya que es usada para neutralizar su microambiente.

Es interesante hacer notar que CA3, que presentó la mejor actividad inhibitoria sobre la ureasa (100% de inhibición con 125 µg/ml), no presentó la mejor actividad inhibidora del crecimiento del cultivo de *H. pylori* (CMI >250 µg/ml). Por su parte, CA2, que tenía mejor actividad frente al crecimiento del cultivo bacteriano (CMI= 250 µg/ml), tuvo menor efectividad que CA3. Desgraciadamente la fracción CA1, que era la más activa frente a *H. pylori*, no pudo ser evaluada para la actividad ureasa. Las discrepancias encontradas se puede relacionar con la metodología de las dos pruebas, durante la determinación de la CMI, el cultivo de *H. pylori* esta a pH neutro y la enzima no es utilizada por la bacteria porque está en un ambiente apropiado para su crecimiento; en cambio, en el ensayo colorimétrico para determinar la actividad de la ureasa, se utiliza a la enzima parcialmente pura y condiciones óptimas para la reacción por lo que es posible ver el efecto directo del extracto sobre la enzima.

Los resultados muestran que estas metodologías (cultivo en medio líquido y el método colorimétrico empleando la reacción de Weatherburn) permiten visualizar blancos terapéuticos diferentes de los extractos, por ejemplo, CA3 es capaz de inhibir a la enzima ureasa, cuando está directamente en contacto con ella, pero no en un cultivo *in vitro*, por lo que es muy importante considerar esto al querer diseñar una terapia contra la bacteria.

Actualmente, se busca que los nuevos fármacos en contra de *H. pylori* eviten la invasión y prevalencia de la bacteria en casos de gastritis y úlcera péptica, por lo que al inhibir esta enzima, la bacteria no se encontraría en un ambiente adecuado para

sobrevivir y mucho menos reproducirse (Castro-Fernández *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2009). Muchos trabajos en la literatura científica dan cuenta de ello y de la importancia de las plantas medicinales como fuente de estos metabolitos bioactivos (Mehreen *et al.*, 2012). Por lo tanto, la búsqueda de nuevos inhibidores de la ureasa con una buena biodisponibilidad y toxicidad baja es importante, especialmente en los países de bajos ingresos con alta tasa de infección de *H. pylori* (Mahmood *et al.*, 2012).

En trabajos realizados en la universidad de Irán, estudiaron el efecto inhibitorio sobre la enzima ureasa (Jack-Bean), por plantas utilizadas en la medicina tradicional. Se evaluaron extractos (MeOH-H₂O) de 21 plantas; de las cuales 5 de ellas presentaron un efecto inhibitorio cercano al 90% a una concentración de 1 mg/ml, estas cinco plantas fueron *Camelia sinensis* (95.4% de inhibición), *Citrus aurantifolia* (97.6%), *Matricaria recutita* (88.9%), *Nasturtium officinale* (99.1%) y *Punica granatum* (96.7%) (Mahmood *et al.*, 2012). Comparando estos resultados con los presentados en esta tesis, CA1 y CA3 con concentraciones más bajas (250 y 125 µg/ml) presentaron efectos inhibitorios favorables inhibiendo en su totalidad a la enzima.

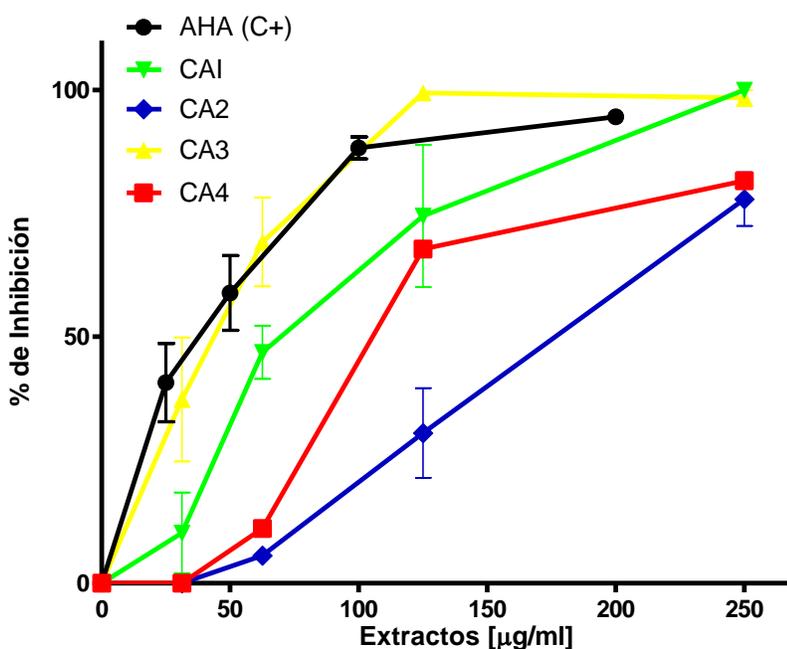


Figura 21. Efecto inhibitorio del extracto acuoso íntegro (CAI), sus fracciones primarias (CA2, CA3 y CA4) obtenidas de *C. aequipetala* sobre la actividad de la enzima ureasa. Se usó el ácido acetohidroxámico (AHA) como control positivo. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones $n=3 \pm E.E.M$

Evaluaciones en modelos animales

7.3.1. Determinación de toxicidad aguda (método de Lorke)

Por tradición popular, los individuos de las distintas comunidades han descartado aquellas plantas detectadas como tóxicas. La información existente acerca de la toxicidad de plantas usadas en la medicina tradicional es limitada, por lo que estudios de toxicidad aguda y crónica en animales de experimentación se hacen imprescindibles al momento de evaluar su utilización en terapéutica (Álvarez *et al.*, 1990).

Los estudios de toxicidad aguda constituyen generalmente la primera etapa en la investigación y están destinados a evaluar la naturaleza cualitativa y cuantitativa de los efectos tóxicos de un determinado producto luego de un corto tiempo de exposición (Gorzalczany *et al.*, 1999).

Durante las dos etapas de las que consiste la metodología de Lorke, se demostró que ninguna de las dosis administradas de CAI (10 a 5000 mg/Kg) vía intragástrica provocó defunciones de los animales empleados (n=3, para cada dosis a probar) (Tabla 9), tampoco presentaron cambios conductuales significativos en comparación con el control (solo vehículo). De acuerdo a estos valores obtenidos se puede determinar que la $DL_{50} > 5000$ mg/Kg, concluyendo que CAI no presenta ningún efecto tóxico bajo este modelo.

Tabla 9. Toxicidad aguda de CAI por el método de Lorke

Etapa 1	Dosis (mg(Kg))	10	100	1000
	Animales muertos	0	0	0
Etapa 2	Dosis (mg(Kg))	1600	2900	5000

	Animales muertos	0	0	0
--	-------------------------	----------	----------	----------

Previamente se había determinado el potencial citotóxico de *C. aequipetala*, donde se encontró que algunos extractos como el acetona-agua y el metanólico, resultaron activos contra las siguientes líneas celulares; Hep-2 (carcinoma de laringe), HCT-15 (carcinoma de colón) y DU-145 (carcinoma de próstata) y sobre la línea celular UISO-SQC1 (células escamosas de carcinoma de cérvix [cuello uterino]) (Bucay *et al.*, 2003; Vega Avila *et al.*, 2004).

Por otra parte, no resultaron con actividad citotóxica frente a las líneas: KB (Carcinoma nasofaríngeo) y HCT-15 COLADCAR (carcinoma de colon).

La investigación bibliográfica sobre antecedentes toxicológicos de *C. aequipetala* solamente arrojan que los extractos de etanol, n-butanol y acetona son tóxicos bajo el modelo de estudio que utiliza *Artemia salina*, reportando una CL_{50} de 5011.87, 3000 y 2100 ppm respectivamente (Reyes, 2010). Estos resultados no se pueden comparar directamente con alguna actividad en el ser humano ya que se trata de un crustáceo y no está relacionado evolutivamente con los mamíferos. Cabe mencionar que *C. aequipetala* se utilizaba tradicionalmente sin ningún registro de toxicidad aguda *in vivo*.

7.4.1. Estudio de la actividad antiinflamatoria

El empleo de esta especie en desordenes gastrointestinales, especialmente la gastritis, nos hace pensar que podría poseer principios activos antiinflamatorios.

La característica distintiva principal por la que *H. pylori* inicia la inflamación en la mucosa gástrica es la producción de citocinas inflamatorias y el estrés oxidante que conduce a la gastritis en todos los individuos infectados (Keates *et al.*, 1997). Por lo tanto, sería conveniente encontrar nuevos agentes, que además de contar con una actividad anti-*H. pylori* tuvieran también propiedades anti-inflamatorias.

En este trabajo reportamos la actividad antiinflamatoria de CAI y sus fracciones primarias, a excepción de CA1 (por no contar con suficiente material para las pruebas). Las muestras fueron evaluadas mediante el modelo de edema agudo inducido con xilol y

TPA en oreja de ratón y para conocer la influencia de la vía de administración, el extracto y las fracciones fueron aplicados de manera tópica y oral.

Los resultados demostraron que CAI posee un mejor efecto antiinflamatorio en el modelo con xilol y un efecto moderado en el modelo con TPA mediante las dos vías de administración (oral y tópica). En los dos modelos CAI presentó un comportamiento dosis dependiente.

Por ejemplo la mejor actividad obtenida con CAI implementando xilol como agente edematogénico, fue mediante la administración oral a una dosis de 30 mg/Kg, 36.36% de inhibición; comparada con el 54.36% presentada por la indometacina por vía oral en una dosis de 10 mg/Kg (Tabla 10). Con TPA, CAI por la misma vía de administración a una dosis de 100 mg/Kg, mostró la mejor actividad (27.26%), en este caso se comparó con el valor más alto de indometacina vía oral (48.93%), con 10 mg/Kg (Tabla 10).

En cuanto a las fracciones, en el modelo de edema agudo inducido con xilol, casi todos los tratamientos mostraron un efecto inhibitorio mayor en comparación con los administrados con el agente edematogénico TPA. Los resultados obtenidos con xilol fueron: para CA2 a dosis de 100 mg/Kg y CA3, CA4 a 30 mg/Kg administrados por la vía oral presentaron los siguientes valores de % de inhibición: 25.57, 31.65 y 28.29%, respectivamente) (Tabla 11) mientras que con el modelo con TPA empleando una dosis de 100 mg/Kg para las tres fracciones (36.03, 16.53 y 15.00% de inhibición) (Tabla 11). En cambio, el fármaco de referencia indometacina presentó una mejor actividad inhibitoria en el modelo con TPA (56.29%) por vía oral con una dosis de 10 mg/Kg que con en el modelo con xilol, por la misma vía, en donde se obtuvo un 43.26% de inhibición.

Las características distintivas de estos dos agentes edematogénicos son las siguientes; la aplicación tópica de TPA induce una reacción inflamatoria caracterizada por edema, acumulación de células y a nivel molecular la inducción de TNF- α , leucotrienos B4 (LTB4) y prostaglandinas E1, E2 y F2 (De Young *et al.*, 1989). La magnitud de la inflamación puede estar correlacionada con la inducción de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la cual alcanza su máxima concentración en seis horas después de la aplicación del edematógeno (De Young *et al.*, 1989).

Por otro lado el edema inducido con xilol se correlacionan con la fase temprana inflamatoria exudativa (Ozaki, 1990) e implica la acción de aminas vasoactivas tales como la histamina, la serotonina, quininas (bradiquinina) y metabolitos del ácido araquidónico

(por ejemplo, prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos) (Green, 1974, Vinegar *et al.*, 1987), estos mediadores pueden inducir edema en la oreja mediante la promoción de la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular (Calson, 1985). También se ha observado en presencia de xilol, la participación de mediadores inflamatorios como la histamina, cininas y fibrinolisisina (Tao *et al.*, 2011; Eddoukus *et al.*, 2012). La aplicación de xilol induce un edema de tipo neurogénico, que está parcialmente asociada con la sustancia P; un undecapéptido del sistema nervioso central y periférico que actúa como un neurotransmisor o neuromodulador en varios procesos fisiológicos. La sustancia P es liberada de las neuronas en el cerebro en respuesta al estrés, así facilita la neurotransmisión dopaminérgica de las neuronas sensoriales en la médula espinal contra estímulos nocivos y excita las neuronas dorsales. En la periferia, la liberación de la sustancia P de las neuronas sensoriales provoca vasodilatación y extravasación de plasma sugiriendo su papel en la inflamación neurogénica.

Las fracciones primarias fueron evaluadas y comparadas con indometacina del mismo modo que CAI, en este caso las fracciones de mayor polaridad mostraron un mejor efecto inhibitorio que las fracciones de menor polaridad. Por ejemplo empleando xilol, la fracción CA4 mostró la mejor actividad antiinflamatoria administrada por vía tópica a una dosis de 0.5 mg/oreja (46.88% de inhibición). Por otro lado con TPA este fenómeno no se cumple ya que CA4 administrada por vía tópica, a la misma concentración tuvo un efecto del 18.83% de inhibición, empleando este mismo agente edematogénico, la fracción con mejor actividad fue CA2 por la vía oral con una dosis de 100 mg/Kg (36.03% de inhibición). En términos generales CA4 fue la que presentó la mejor actividad incluso mayor a los valores obtenidos por el fármaco de referencia.

En algunos trabajos como el realizado en la universidad de Nigeria por Okoli y colaboradores, en donde evaluaron la actividad inhibitoria del extracto hexánico obtenido de las hojas de la planta *Aspilia africana* C.D. Adams empleando el modelo edema agudo inducido con xilol en oreja de ratón; con dosis de 5 mg/oreja para el extracto y su fármaco de referencia (indometacina) a la misma dosis, sus resultados fueron buenos ya que obtuvieron con el tratamiento un efecto de 71.43% y con indometacina un 63.27% de inhibición. La aplicación tópica del extracto de la oreja de ratón resultó una muy buena supresión del edema agudo (Atta *et al.*, 1998, Okoli *et al.*, 2006).

Realizando un análisis comparativo en la planta *A. africana* la actividad antiinflamatoria recae en sus fracciones de baja polaridad. Revisando nuestros resultados,

administradas por la vía tópica algunas de las fracciones primarias de *C. aequipetala* a dosis más bajas obtuvieron resultados muy buenos si tomamos en cuenta que se está empleando una dosis 10 veces menor, por ejemplo CA4 con 0.5 mg/oreja se obtuvo 46.88% de inhibición.

Finalmente y de acuerdo a los resultados obtenidos, tanto el extracto acuoso como sus fracciones primarias, mostraron el mejor efecto antiinflamatorio empleando xilol como agente edematogénico.

Tabla 10. Efecto de CAI administrada vía oral y tópica, sobre el edema inducido con xilol y TPA en oreja de ratón

Tratamiento	Vía de administración	Dosis	% de inhibición ± SEM (mg)
Xilol (30 µL/oreja)	Oral	10	16.92 ± 4.43
		30	36.36 ± 7.67
		100	35.05 ± 3.04
	Tópica	0.1	2.36 ± 2.66
		0.25	14.61 ± 2.47
		0.5	22.03 ± 4.05
Indometacina	Oral	10	54.83 ± 4.68
	Tópica	0.5	53.55 ± 3.50
TPA (2.5 µg/oreja)	Oral	10	12.25 ± 1.35
		30	15.60 ± 2.24
		100	27.26 ± 0.99
	Tópica	0.1	10.42 ± 2.00
		0.25	14.30 ± 3.02
		0.5	23.65 ± 4.96
Indometacina	Oral	10	48.93 ± 2.36
	Tópica	0.5	73.12 ± 5.03

Tabla 11. Efecto de las fracciones primarias CA2, 3 y 4 administrada vía oral y tópica, edema inducida con xilol y TPA en oreja de ratón				
Tratamiento		Vía de administración	Dosis	% de inhibición ± SEM (mg)
Xilol (30 µL/oreja)	CA2	Oral	30	19.65 ± 4.72
			100	25.57 ± 3.25
		Tópica	0.25	27.58 ± 4.26
			0.5	29.93 ± 4.46
	CA3	Oral	30	31.65 ± 5.00
			100	29.54 ± 3.48
		Tópica	0.25	11.63 ± 3.11
			0.5	19.04 ± 4.30
	CA4	Oral	30	28.29 ± 6.25
			100	23.53 ± 3.39
		Tópica	0.25	41.97 ± 5.54
			0.5	46.88 ± 5.11
TPA (2.5µg/oreja)	CA2	Oral	30	34.75 ± 3.29
			100	36.03 ± 3.30
		Tópica	0.25	17.78 ± 3.38
			0.5	25.62 ± 2.12
	CA3	Oral	30	7.06 ± 2.30
			100	16.53 ± 1.92
		Tópica	0.25	13.63 ± 5.30
			0.5	23.87 ± 4.20
	CA4	Oral	30	8.38 ± 3.54
			100	15.00 ± 3.36
		Tópica	0.25	16.65 ± 2.78
			0.5	18.83 ± 2.82

VIII Conclusiones

Con respecto a la actividad contra *H. pylori*, al comparar las CMI's obtenidas para los antibióticos de referencia metronidazol y amoxicilina (300 y 0.01 µg/ml, respectivamente) con el extracto acuoso íntegro (CAI) (125 µg/ml) y la fracción primaria de diclorometano (CA1, CMI=15.2 µg/ml), concluimos que ambas presentan buena actividad contra la bacteria. Por su parte, las fracciones secundarias de diclorometano CA1-A y CA1-B (CMI=7.3 µg/ml), la fracción secundaria de acetato de etilo CA2-A (CMI= 62.5 µg/ml) y la fracción secundaria de n-butanol CA3-A (CMI= 31.2 µg/ml) mejoraron la actividad de su antecesor, por lo que se puede señalar que tienen un buen potencial para la obtención de compuestos con actividad anti-*H. pylori* a partir de ellas.

En lo que respecta a la enzima ureasa, la evaluación inhibitoria de CAI y sus fracciones primarias, indicaron que, tanto CAI como CA3 inhibieron totalmente la actividad de la ureasa a dosis de 250 y 125 µg/ml respectivamente, comparando estos resultados con los obtenidos por el fármaco de referencia el ácido acetohidroxámico (AHA) que inhibió en un 94.58% a una concentración de 200 µg/ml, se puede señalar que CAI y CA3 tienen un buen potencial para la obtención de compuestos con actividad inhibitoria de la enzima ureasa, ya que el AHA es un compuesto puro y CAI o CA3 aun son extractos sin purificar. Al comparar los resultados de CMI y la actividad anti-ureasa de CA3, presentó su mejor actividad inhibitoria, en contra de la enzima (100% de inhibición con 125 µg/ml) y no presentó una buena actividad inhibidora del crecimiento del cultivo de *H. pylori* (CMI >250 µg/ml). Con este comparativo se puede visualizar blancos terapéuticos diferentes de los extractos, por ejemplo, CA3 es capaz de inhibir a la enzima, cuando está directamente en contacto con ella, pero no en un cultivo *in vitro*.

En seguida se estableció el potencial antiinflamatorio del extracto acuoso íntegro y sus fracciones primarias. La fracción primaria CA4 presento la mejor actividad siendo administrada por la vía tópica a una dosis de 0.5 mg/oreja (46.88% de inhibición), las demás fracciones primarias presentaron efectos inhibitorios buenos comparados con el control positivo. La administración oral de CAI mostro una buena actividad (36.36% de inhibición del edema a la dosis de 30 mg/Kg). La mayoría de las fracciones fueron dosis dependientes en los dos modelos edematogénicos (xilol y TPA). La actividad antiinflamatoria de CAI es muy parecida a la de sus fracciones primarias por lo cual se puede deducir que la actividad presentada por CAI está sustentada por varios compuestos contenidos en las fracciones primarias.

Con los datos obtenidos en primera instancia se puede sugerir que la actividad antiinflamatoria tanto de CAI como de las fracciones primarias está relacionada con la formación de un edema de tipo neurogénico, asociado parcialmente con la sustancia P, provoca un efecto de vasodilatación y extravasación de plasma, estimulando una inflamación neurogénica.

Finalmente los estudios de toxicidad aguda de CAI indicaron que la planta no es tóxica con una $DL_{50} > 5000$ mg/kg de acuerdo al modelo de Lorke. Es el primer ensayo *in vivo* empleando animales de laboratorio.

Con estos resultados podemos aportar evidencia parcial de que *C. aequipetala* puede ser una alternativa viable en el uso para tratar diversos padecimientos gástricos como la gastritis y procesos inflamatorios, involucrados o en la infección por *H. pylori*.

IX Perspectivas

- Continuar con el fraccionamiento sucesivo de las fracciones primarias que presentaron buenas actividades anti-*H. pylori*, antiinflamatoria y anti-ureasa, para la obtención de compuestos activos.
- Evaluar la actividad anti-*H. pylori* empleando muestras de aislados clínicos.
- Determinar si se mantiene el efecto anti-*H. pylori* del extracto acuoso empleando un modelo de infección *in vivo*.
- Establecer el mecanismo de acción antiinflamatorio de CA4 implementando, diferentes agentes edematogénicos y aislar a los compuestos responsables.
- De acuerdo con los resultados obtenidos de toxicidad aguda de CAI, es necesario continuar con un estudio integral empleando modelos *in vivo* de toxicidad a largo plazo.

X Bibliografía

- Abdo-Francis, J., Uscanga, D., Sobrino, C., Rivera R., Huerta I. y Tamayo de la Cuesta, J. L. (2007). III Consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. Rev. Gastroenterol. Mex. 72:137-153.
- Aguilar C., Camacho, S. Chino, P. Jácquez y López M. (1994). Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. Edición del IMSS México: 129-130.
- Aguilar-Rodríguez S., Echveste-Ramírez N., López-Villafranco M., Aguilar-Contreras A., Vega-Ávila E. y Reyes-Chilpa R. (2012). Etnobotánica, micrografía analítica de hojas y tallos y fitoquímica de *Cuphea aequipetala* Cav. (*Lythraceae*): una contribución a la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas: 11 (4); 316 - 330 ISSN 0717 7917.
- Alcántara V., Vilchis J. (1997). Cáncer gástrico e infección por *Helicobacter pylori*. Revista Médica del Hospital General: 60(2); 60- 65.
- Alm, R., Bina J., Andrew B., Doig P., Hancock R., and Trust T. (2000). Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outlier membrane protein families. Infect. Immun: 68: 4155-4168.
- Alonso-Castro *et al.*, (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. Journal of Ethnopharmacology: 133; 945-972.
- Ando T., Kusugami K., Ohsuga M., Shinoda M., Sakakibara M., Saito H., Fukatsu A., Ichiyama S., Ohta M. (1996). Interleukin-8 activity correlates with histological severity in *Helicobacter pylori* associated antral gastritis. Am J Gastroenterol. 91; 1150-1156.
- Ando T., Pérez-Pérez G., Kusugami M., Ohsuga M., Boch K., Blaser M.J. (2000). Anti Cag A immunoinmunoglobulin responses correlate with interleukin-8 induction in human gastric mucosal biopsy culture. Clin Diagn Lab Immunol: 5: 803-809.
- Arévalo A., Trespalacios A. y Otero W. (2009). The importance of CagA protein in *Helicobacter pylori* infection. Rev. Col. Gastroenterol: 24; 388-395.
- Argueta A. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. México: INI. 1,2: 628-630.
- Asaka, M., Sepúlveda, A. R., Sugiyama, T. y Graham, D. Y. (2001). Gastric cancer. En: *Helicobacter pylori*. Physiology and genetics. Eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L. ASM Press Washington: 481-498.
- Atherton, J. C. (1997). Non-endoscopic tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Aliment. Pharmacol. Ther. 11 Suppl: 1; 11-20.
- Atherton, J. C., Cao, B., Peek, R. M., Tummuru, M. K. R., Blaser, M. J., and Cover, T. L. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*:

association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem*: 270; 17771-17777.

- Atherton, J.C., Blaser, M.J. (2009). Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J. Clin. Invest.* 119: 9; 2475-2487.
- Balfour, A. (1906). A haemogregarine of mammals and some notes on trypanosomiasis in the Anglo-Egyptian Sudan. *J. Trop. Med*: 9; 81–92.
- Barbosa, E., Calzada, F., Campos, R. (2007). *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*: 109; 552-554.
- Barron, D., Varin, L., Ibrahim, R., Harborne, J., Williams, C. (1988). *Phytochemistry*: 27; 2375.
- Bizzozero, G. (1893). Ueber die schlauchformigen drüsen des magendarmkanals und die beziehungungen ihres epithels zu dem oberflächenepithel der schleimhaut. *Arch. Mikr. Anat*: 42; 82.
- Bizzozero, G. (1892). Sulle ghiandole tubulari del tubo gastroenterico e sui rapporti del loro epitelio coll'epitelio di rivestimento della mucosa. *Atti della Reale Accademia delle Scienze di Torino*: 28; 233- 251.
- Blaser, M. J., Atherton, J. (2004). *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*: 113; 321-333.
- Blaser, M. J., Smith, P. D. (1999). Persistent mucosal colonization by *Helicobacter pylori* and the induction of inflammation. In Gallin J and Snyderman R eds. *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 1107-1116.
- Braga, F., Wagner, H., Lombardi, J. A., and Braga de Oliveira, A. (2000). Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for *in vitro* angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine*: 7; 245-250.
- Bye, R., Estrada, L. E., y Linares M. (1995) Recursos genéticos en plantas medicinales de México. *Avances en el estudio de los recursos fitogénitos de México. Sociedad Mexicana de Fitogenética*: 341-359.
- Calzada, F. (2005). Additional antiprotozoal constituents from *Cuphea pinetorum*, a plant used in Mayan traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytotherapy Research*: 19; 725-727.
- Carlson, R. P. (1985). Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents Actions*: 17; 197–204.

- 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. *Journal of Ethnopharmacology*: 122; 402-405.
- Castillo-Juarez, I., Rangel-Vega, A., Romero, I. (2010). Rapid paper disk test for identification of *Helicobacter pylori* in mixed cultures of gerbil gastric homogenates. *Journal of Microbiological Methods*: 83; 20–25.
- Castro-Fernández, M., Sánchez-Muñoz, D., García-Díaz, E. (2004). Diagnosis Of *Helicobacter Pylori* Infection In Patients With Bleeding Ulcer Disease: Rapid Urease Test And Histology. *Rev. Esp. Enferm Dig*: June.
- Cavallaro, L.G., Egan, B., O'Morain, C., Di Mario, F. (2006). Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*: 11 (Supl. 1); 36-9.
- Cavallo, P., Cianciulli, A., Mitolo, V., Panaro, A. M. (2011). Lipopolysaccharide (LPS) of *Helicobacter* modulates cellular DNA repair systems in intestinal cells. *Clin. Exp. Med*: 11; 171-179.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P. (1996). *cag*, pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci. USA*: 93; 1468-1453.
- Ching, C. K., Wong, B. C. Y., Kwok, E., Ong, L., Covacci, A., y Lam, S. K. (1996). Prevalence of *CagA*-bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti- *CagA* assay in patients with peptic ulcer disease and in controls. *Am. J. Gastroenterol*: 91; 949.
- Chinniah, A., Mohapatra, S., Goswami, S., Mahapatra, A., Kar, S., Mallavadhani, U., Das, P. (2009). On the potential of Tephrosia purpurea as anti-*Helicobacter pylori* agent. *Journal of Ethnopharmacology*: 124; 642–645.
- Cohen, H., Laine, L. (1997). Endoscopic methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol: Ther.* 11 Suppl 1; 3-9.
- Correa, P., Miller, M. J. (1998). Carcinogenesis, apoptosis, and cell proliferation. *Br Med Bull*: 54; 151-162.
- Correa, P. (2005). New strategies for the prevention of gastric cancer: *Helicobacter pylori* and genetic susceptibility. *J Surg Oncol*: 90; 134-138.
- Cover, T. L., Blaser, M. J. (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*: 15; 10570-10575.

- Cover, T. L., Glupczynski, Y., Lange, A., Burette, A., Tummuru, M., Perez, G., Blazer, M. (1995). Serologic detection of infection with *cagA Helicobacter pylori* strains. *J. Clin. Microbiol*: 1496-1500.
- De Young, L., and Young J. M. (1989) Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation*: 215–231.
- Del Giudice, G. (2001). The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Ann Rev Immunol*: 19:523-563.
- Denise, M., Monack, A. M., Stanley, F. (2004). Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system, *Nature Reviews Microbiology*: 2; 747-765.
- Dewhirst, F. E., Fox, J. G., Sind, S. L. W. (2000). Proposal of minimal standards for describing new species of the genus *Helicobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*: 50; 2231-2237.
- Di Mario, F., Cavallaro, L. G., Scarpignato, G. (2006). Rescue therapies for the management of *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Dis*: 24; 113-130.
- Digest. R. (1987). *Plantas Medicinales*. The Readers Digest Association, Inc. México: 64,65,87.
- Dixon, M. F. (2001). Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration. En: *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Eds. Mobley H. L. T., Mendz G. L. y Hazell S. L. ASM Press, Washington: 459-469.
- Doodley, C. P., Cover, T. L., Blaser, M. J. (1989). Characterization of human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect. Immun*: 58; 603-610.
- Du, M., Diss, T. C., Xu, C., Peng, H., Isaacson, P. G., Pan L. (1996). Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. *Leukemia*: 10(7); 1190-1197.
- Dubreui, D., Giudice, G., Rappuoli, R. (2002). *Helicobacter pylori* Interactions with Host Serum and Extracellular Matrix Proteins: Potential Role in the Infectious Process. *Microbiology and molecular biology reviews*: No. 4, Vol. 66; 617–629.
- Dunn, B. E., Hartley, C. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews*: 10(4); 720-741.
- Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R., Krakowka, S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*: 59; 2470 –2475.
- Eddouks, M., Chattopadhyay, D., y Zeggwagh, N. (2012). Animal Models as Tools to Investigate Antidiabetic and Anti-Inflammatory Plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: 14.

- Egan, B., Marzio, L., O'Connor H., and O'Morain, C. (2008), Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*: 13; 35–40.
- Emel, O., Zeki, Y. I., Seyfettin, I., Nuri, A., Ahmet, E., Bulent, C., Mehemet O., Kemal, D. A., Onder, O., Hikmet, B. (2003). New, Practical, Low-Dose 14C-Urea Breath Test For The Diagnosis Of *Helicobacter Pylori* Infection: Clinical Validation And Comparison With The Standard Method. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*: 30; 1457-1462.
- Emes, B. M. (1994). Hierba del cáncer. Flora medicinal indígena de México, Tomo II. México: Instituto Nacional Indigenista.
- Estrada-Zúniga, M., Arano-Varela, H., Buendía- González, L. and Orozco-Villafuerte, J. (2012). Fatty acids, phenols content, and antioxidant activity in *Ibervillea sonorae* callus cultures. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*: 11; 89-96.
- Everhart, J., Kruszon-Moran, D., Pérez-Pérez, G., Tralka, T., McQuillan, G. (2000). Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the Unites States. *J. Infect. Disc*: 181; 1359-1363.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J. K., Stephens, M., Kidd, M. (2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*: 299; 1582-1585.
- Fernández H. (2012). Género *Helicobacter*: un grupo bacteriano en expansión con características zoonóticas. *Gaceta de Infectología y Microbiología Clínica Latinoamericana*; 2: 11-20.
- Figure, N., Bianciardi, L.(1892). Helicobacters were discovered in Italy in 1892. An episode in the scientific life of an eclectic pathologist , Giulio Bizzozero. In: Marshall, Barry (Editor). *Helicobacter pioneers: Firsthand Accounts from the Scientist who Disco- vered Helicobacters, 1892-1982*. Melbourne: Blackwell Science Asia: 2002; 1-13.
- Fox, J., Lee, A. (1997). The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. *Lab. Anim. Sci*: 47; 222-255.
- Futagami, S., Takahashi, H., Norose, Y., Kobayashi, M. (1998). Systemic and local immune responses against *Helicobacter pylori* urease in patients with chronic gastritis: distinct IgA and IgG productive sites.*Gut*: 43; 168 175.
- Gadhia, C., Benharrefa, A., Janaa, M., Lozniewski, A. (2001). Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Aristolochia paucineris* Pomelextracts. *Journal of Ethnopharmacology*: 75; 203–205.
- García-Márquez, E., Román-Guerrero, A., Pérez- Alonso, C., Cruz-Sosa, F., Jiménez-Alvarado, R. and Vernon-Carter, E. (2012). Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of Muitle extracts and their decay upon storage at different pH. *Revista Mexicana de*

- Gerrits, M. M., Van Vliet, A. H., Kuipers, E. J., Kusters, J. C. (2006). *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet. Infect. Dis*: 6; 699-709.
- Ghisalberti, E. L. (2008). Detection and isolation of bioactive natural products. In: *Bioactive natural products: Detection, isolation, and structural determination*: 11-76 (Taylor & Francis Group, New York).
- Ghose, Ch., Pérez-Pérez, G. I., Domínguez, M. G., Pride, D. T., Bravi, C. M., Blaser, M. J. (2002). East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its Ancient human carriage. *Proc Natl Acad Sci*: 99; 15107- 15111.
- Gisbert, J. P., Calvet, X., Gomollón, F., Monés, J., (2005). Grupo Conferencia Española de Consenso sobre *Helicobacter pylori*. Tratamiento erradicador de *Helicobacter pylori*. Recomendaciones de la II Conferencia Española de Consenso. *Med Clin (Barc.)*: 125; 301-16.
- Godoy, A., Harris, P.R., Arenillas, S., Riera, F., Garcia, D., Einisman, H., Pena, A., Perez-Perez, G. (2003). CagA antibodies as a marker of virulence in Chilean patients with *Helicobacter pylori* infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*: 37; 596-602.
- Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, D., Sly, L., McConnell, W., Harper, W. S. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen as *Helicobacter pylori*, and *Helicobacter mustelae*, respectively. *Int J Syst Bacteriol*: 4; 397-405.
- Goodwin, C. S., Worsley, B. W. (1993). The *Helicobacter* genus: the history of *H. pylori* and taxonomy of current species. *Helicobacter pylori* Biology and Clinical Practice. CRG Press. Ppl.
- Gonzalez, V., Atherton, J., Muñoz, O., Dehesa, M., La Garza, A., Torres, J. (2000). *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in Mexican adults and children. *J. Infect Dis*: 182; 1450-1454.
- Gorzalczany, S., Rojo, A., Rondinaz, R., Debenedetti, S., y Aceved, C. (1999). Estudio de Toxicidad Aguda por Vía Oral de Plantas Medicinales Argentinas. *acta Farm. Bonaerense*: 18 (3); 221.
- Graham, S., Kleiman, R. (1992). Composition of seed oils in some Latin American *Cuphea* (Lythraceae). *Industrial Crops and Products*: 1; 31-34.
- Graham, D., Yamaoka, L. (2008). Therapy for *Helicobacter pylori* infection can be improved. *Drugs*: 68; 725-36.

- Grantham, M. (2002). *Cupheas* at Strybing Arboretum. Pacific horticulture; 6: 1-4.
- Green, K. L. (1974) Role of endogenous catecholamines in the antiinflammatory activity of R-adrenoceptor blocking agents. Br. J. Pharmacol: 51; 45–53.
- Gur, G., Boyacioglu, S., Gul, C., Turan, M., Gursoy, M., Baysal, C., Ozdemir, N. (1999). Impact of *Helicobacter pylori* infection on serum gastrin in haemodialysis patients. Nephrol. Dial. Transplant: 14; 2688-2691.
- Guruge, J. L., Falk, P. G., Lorenz, R. G., Dans, M., Wirth, H. P., Blaser, M. J., Berg, D. E., Gordon, J. I. (1998). Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. Proc Natl Acad Sci: 95; 3925-3930.
- Haruhiko, Y. (1998). Use of gastric juice-based PCR assays to detect *Helicobacter pylori* infection in culture-negative patients. The J. Of Infectious Diseases; 81: 527-535.
- Hernández, F. (1959). Historia Natural de la Nueva España. México. U.N.A.M. Tomo III: 137.
- http://www.br.de/fernsehen/bayerischesfernsehen/sendungen/gesundheit/themenu_ebersicht/medizin/magen-helicobacter-pylori-magengeschwuer_magenkrebs100.html.
- <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lythraceae/cuphea-aequipetala/fichas/ficha>.
- http://curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.mx/2008_07_01_archive.html.
- http://www.gastrointestinalatlas.com/Espanol/Duodeno/Ulcera_Duodenal/ulcera_duodenal.html.
- <http://www.helicobacterspain.com/imagenes/..%5Cimagenes%5Cpyloribn.htm>.
- http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/googlemap.php?taxon=Cuphea_aequipetala&clid=.
- http://www.hipernatural.com/es/plthierba_cancer.html.
- <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Cuphea&commonname=>.
- <http://www.tropicos.org/TaxonomyBrowser.aspx?nameid=19200456&projectid=0&conceptid=1>.
- <http://www.mexicodesconocido.com.mx/notas/3771-Hierba-del-cancer>.

- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1994). Infection with *Helicobacter pylori*. Schistosomes, Liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hu: 61; 1-241.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1994). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks on humans, Lyon: World Health Organisation: 61; 177-240.
- Ibáñez, A., Baeza, P., Guzmán, B., Llanos, L., Zúñiga, D., Chianale, B., Rollán, R., Pimentel, M., Rahmer, O. (1998). Tratamiento de la Hemorragia Digestiva alta de origen no variceal. Evaluación de 10 años de experiencia. Rev: 50 (4); 370-378.
- Innocenti, M., Svennerholm, A. M., Quiding-Järbrink, M. (2001). *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharides Preferentially Induce CX Chemokine Production in Human Monocytes. Infect Immun: 69(6); 3800-3808.
- Jafri, N., Hornung, C., Howden, C. (2008). Meta-analysis: Sequential Therapy Appears Superior to Standard Therapy for *Helicobacter pylori* Infection in Patients Naive to treatment. Ann Intern Med: 148; 923- 931.
- Jimenez, M., Castillo, I., Azuara, E. and Beristain, C. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina* subsp capuli) extracts. Revista Mexicana de Ingeniería Química: 10; 29-37.
- Jones, B. D., Mobley, H. L. (1987). Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. Infect. Immun. 55(9): 2198-203.
- Kerr, J., Winterford, C., Harmon, B. (1994). Apoptosis. Its significance in cáncer and cáncer therapy. Cáncer: 73; 2013-26.
- Klepacka, J., Gujska, E., Michalak, J. (2011). Phenolic compounds as cultivar- and variety-distinguishing factors in some plant products. Plant Foods for Human Nutrition: 66; 64-69.
- Kolts, B. E., Joseph, B., Achem, S. R. (1993). *Helicobacter pylori* detection: Aquality and cost analysis Am. J. Gastroenterol: 88; 650-5.
- Krepsky, P., Isidorio, R., Dias de Souza J., Cortes, S., Castro F. (2012). Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. *Phytomedicine*: 19; 953-957.
- Krishnaiah, D., Sarbatly R., Nithyanandam, R. (2010). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and Bioproducts Processing: 89; 217-233.
- Kusters, J. G., Van Vliet, A. H., Kuipers, E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infections. Clin. Microbiol. Rev. 19(3); 449-90.

- Lau, K., Edwards, S., Diamond, D. (2004). Solid-state ammonia sensor based on Berthelot's reaction. *Sensors and Actuators: B* 98; 12–17.
- Lazarte R. (2009). La historia de los científicos involucrados en el descubrimiento del *Helicobacter pylori*, en especial del pionero Giulio Bizzozero. *Gastroenterol. latinoam*: 20 (1): 53-62.
- Leal-Herrera, Y., Torres, J., Monath, T. P. (2003). High rates of recurrence and of transient reinfections of *Helicobacter pylori* in a population with high prevalence of infection. *Am. J. Gastroenterol*: 98; 2395–402.
- Lee, A., Dixon, M. F., Danon, S. J., Kuipers, E., Megraud, F., Larsson, H., Mellgard, B. (1995). Local acid production and *Helicobacter pylori*: a unifying hypothesis of gastroduodenal disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol*: 7(5); 461-465.
- Leung, W., Lin, S., Ching, J., To, F., Ng, E., Chan, F., Lau, J., Sung, J. (1999). Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implications in gastro-oral transmission. *Am J Gastroenterol*: 94; 2881-2884.
- Leunk, R. (1991). Production of cytotoxin by *Helicobacter pylori*. *Rev Infect Dis*: S8; S686-S689.
- Li, C., Da, H., Ferguson, A., Chi, D. S., Zhao, R., Patel, R., Krishnaswamy, T. E. (1996). A newly development PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig Dis Sci*: 41; 2142-2149.
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*: 445; 915-918.
- Logan, R. P. H., Walker, M. M. (2001). ABC of the upper gastrointestinal tract. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ*: 323(7318); 920-922.
- Lorke, D. (1983) A new approach to partial acute toxicity testing. *Archiv. Of Toxicol*: 54; 275-287.
- Mahmood, B., Khadijeh, S., Farzaneh, N., Roya, B., Faraz, M., Massoud, A. (2012). A Preliminary Investigation of the Jack-Bean Urease Inhibition by Randomly Selected Traditionally Used Herbal Medicine. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*: 11 (3); 831-837.
- Mabe, K., Takahashi, M., Oizumi, H., Tsukuma, H., Shibata, A., Fukase, K., Matsuda, T., Takeda, H., and Kawata, S. (2009). Does *Helicobacter pylori* eradication therapy for peptic ulcer prevent gastric cancer?. *World J Gastroenterol*:

15(34); 4290–4297.

- Makristathis, A., Eva, P. (1998). Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and Antigen Enzyme Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*: 36 (9); 2772-2774.
- Malaty, H., Kugamagai, T., Tanaka, E., Ota, H., Kiyosawa, K., Graham, D., Katsuyama, T. (2000). Evidence from a nine-year birth cohort study in Japan transmission pathways of *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Microbiol*: 38; 1971-1973.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D. (2007). The European *Helicobacter* Study Group (EHSg). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*: 56; 772-81.
- Martínez, M. (1979). Hierba del cáncer. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. México: Fondo de cultura económica.
- Martinez, M. (1997). Catalogo de nombres comunes vulgares y científicos de plantas medicinales, consultado en ceamish: 755- 756.
- Marshall, B., Warren, J. (1985). Unidentified curved bacilli in stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*: 1; 1311-1315.
- Marshall, B. (2002). *Helicobacter pylori*: 20 years old on. *Clinical Medicine*. JRCPL: 2; 147-152.
- Matsuo, T., Ikura, Y., Ohsawa, M., Ogami, M., Kayo, S., Yoshimi, N., Hai, E., Naruko, T., Ohishi, M., Higuchi, K., Arakawa, T., Mitchell, H. M., Hazell, S. L., Bohane, T. D., Ueda, M. (2003). Mast cell chymase expression in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Histopathology*: 43; 538-549.
- Mendoza, C. G. (1999). Cuadro resumen No. 1. Plantas medicinales que se comercializan en fresco en el mercado de Sonora, D.F., ordenadas por nombre común. Catálogo y usos terapéuticos de plantas medicinales que se comercializan en fresco en el mercado de Sonora. México: Universidad Nacional Autónoma Chapingo.
- Merrell, D. S., Goodrich, M. L., Otto, G., Tompkins, L. S., Falkow, S. (2003). pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun*: 71; 3529–3539.
- Mitchell, H. M., Hazell, S. L., Kolenikow, T., Mitchell, J., Frommer, D. (1996). Antigen recognition during progression from acute to chronic infection with *cagA* positive strains of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*: 64; 1166-1172.

- Mitchell, H. M. (2001). Epidemiology of infection. in *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L. ASM press Washington: 7-18.
- Mobley, H. L. T., Mendz and Hazell, S. I. (2001). *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASML. Press. Washington D.C: 97-106, 125-131, 179-187, 397-405 y 565-75.
- Moller, H., Heseltine, E. and Vainio, H. (1995), Working group report on schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Meeting held at IARC, LYON. Int. J. Cancer: 60; 587–589.
- Monés, J., Gisbert, J. P., Borda, F., Domínguez-Muñoz, E. (2005). Grupo Conferencia Española de Consenso sobre *Helicobacter pylori*. Indications, diagnostic test and *Helicobacter pylori* eradication therapy. Recommendations by the 2nd Spanish Consensus Conference. Rev Esp Enferm Dig. 97: 348-74.
- Montecucco, C., Rappuoli, R. (2001). Living dangerously: How *Helicobacter pylori* survive in the human stomach. Nature Rev: 2; 457-465.
- Morales-Espinosa, R., Castillo-Rojas, G., Gonzalez-Valencia, G., Ponce de Leon, S., Cravioto, A., Atherton, J. C., Lopez –Vidal, Y. (1999). Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different vacA and cagA genotypes. J. Clin. Microbiol: 37; 3001-300.
- Moreira, V., López, A. (2004). Úlcera Péptica. Servicio de Gastroenterología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid Rev. Esp. Enferm. Dig: 96 (1).
- Naghiloo, S., Movafeghi, A., Delazar, A., Nazemiyeh, H., Asnaashari, S. and Reza, D. M. (2012). Ontogenetic variation of total phenolics and antioxidant activity in roots, leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. (Fabaceae). BiolImpacts: 2; 105-109.
- NHI (National Institutes of Health). (1994). Consensus conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NHI Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. *Jama*. 272: 1; 65-69.
- Noach, L. A., Rolf, T. M., Tytgat, G. N. (1994). Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. J Clin Pathol: 47; 699-704.
- O'Connor, A., Gisbert, J. and O'Morain, C. (2009). Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*: 14; 46-51.
- Okoli, C. O., Akah, P. A., Nwafor, S. V., Anisiobi, A. I., Ibegbunam, I. N., Erojikwe, O. (2007). Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams, Journal of Ethnopharmacology: 109; 219–225.
- Olczak, A. A. (2003). Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. Infect Immun: 71; 580-583.

- Ozaki, Y. (1990). Anti-inflammatory effect of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb, and its active principles. *Chem. Pharm. Bull.* 38; 1045–1048.
- Palacios-Espinosa, J. F., *et al.* (2011). Anti-*Helicobacter pylori* and gastroprotective activities of aqueous extract of *Cuphea aequipetala* (Lythraceae). 54th Annual Meeting of the Western Pharmacology Society.
- Pamo, O. (2003). El ADN y las infecciones del pasado. *Diagnóstico*: 42; 245-251.
- Parente, F., Cucino, C., Bianchi, P. (2003). Treatment options for patients with *Helicobacter pylori* infection resistant to one or more eradication attempts. *Dig. Liver Dis*: 35; 523-528.
- Parsonnet, J., Friedman, G., Orentreich, N., Vogelmann, H. (1997). Risk for gastric cancer in people with CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*; 40: 3; 297-301.
- Pearson, A. D., Bamforth, J., Booth, L., Holdstock, G., Ireland, A., Walker, C., Hawtin, P., Millward-Sadler, H. (1984). Polyacrylamide gel electrophoresis of spiral bacteria from the gastric antrum. *Lancet*: 1349-1350.
- Peek, R., Miller, G. G., Tham, K. T., Perez-Perez, G., Zhao, X., Atherton, J. C., Blaser, M. J. 1995. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA+* *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest*. 71:760-770.
- Peek, R. M., Blaser, M. J. (2002). *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*: 2; 28-37.
- Peek, R. M. (2004). Clandestine intracellular delivery of *Helicobacter pylori* CagA: guess who's coming to dinner? *Gastroenterology*: 127; 669-67.
- Peek, R. and Crabtree, J. (2006), *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J. Pathol*: 208; 233–248.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz- Rubio, M., Serrano, J., Goñi, I., Saura- Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*: 1; 274-285.
- Pérez-Pérez, G., Rothenbacher, D., Brenner, H. (2004). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*: 9; 1-6.
- Phippen, W. (2010). *Cuphea*, In: Vollmann J, Rajcan I. *Oil Crops*. Springer New York: 517-533.
- Ramirez, R. A. (2006). *Helicobacter pylori*. Libro Tópicos selectos en Medicina Interna. Gastroenterología. Primera edición. Editorial Santa Ana: 177-195.
- Reyes G. En proceso de obtención del título de Químico con la tesis: “Estudio

Fitoquímico de la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala* cav.) usada en la medicina tradicional” (2010).

- Roath, W., Widrlechner M., and Kirkbride J. (1993). Collecting *Cuphea* in Brazil, Mexico and United States. *Plant-Genetic-Resources-Newsletter*: 93: 29-33.
- Rokkas, T., Sechopoulos, P., Robotis, I., Margantinis, G., Pistiolas, D. (2008). Cumulative *H. pylori* eradication rates in clinical practice by adopting first-and second-line regimens proposed by the Maastricht III Consensus and a third-line empirical regimen. *Am J Gastroenterol*: 103; 1-5.
- Romaniuk, P. J., Zoltowska, B., Trus, T. J., Lane, D. J., Olsen, G. J., Pace, N. R., Stahl, D. A. (1987). *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *J. Bacteriol*: 169(5); 2137-2141.
- Rothenbacher, D., Winkler, M., Gonser, T., Adler, G., Brenner, H. (2002). Role of infected parents in transmission of *Helicobacter pylori* to their children. *Pediatr Infect Dis*: 21; 674-679.
- Roosendaal, R., Kuipers, E. J., Buitenwerf, J., Van Uffelen, C., Meuwissen, S. G., Van Kamp, G. J. (1997). *Helicobacter pylori* and the birth cohort effect: evidence of a continuous decrease of infection rates in childhood. *Am J Gastroenterol*: 92; 1480-1484.
- Rugge, M., Farinati, F., Baffa, R., Sonogo, F., Di Mario, F., Leandro, G., Valiante, F. (1994). Gastric epithelial dysplasia in the natural history of gastric cancer: a multicenter prospective follow-up study. *Interdisciplinary Group on Gastric Epithelial Dysplasia. Gastroenterol*: 107(5); 1288-1296.
- Rugge, M., Leandro, G., Farinati, F., Di Mario, F., Sonogo, F., Cassaro, M., Guido, M., Ninfo, V. (1995). Gastric epithelial dysplasia. How clinicopathologic background relates to management. *Cancer*: 76(3); 376-382.
- Rzedowsky, J. (1985). “*Cuphea aequipetala* Cav”. En: Plantas medicinales de Jesús del Monte. <http://www.ccu.umich.mx/museo/histnatural/botanica/plantas-medicinal/lythra.html>.
- Rzedowski, G..C., Rzedowski, J., *et al.* (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán): 1406.
- Salatino, A., Salatino, M., Santos, D. Patricio, M. (2000). *Genet. Mol. Biol*: 23; 931.
- Santos, D., Salatino, M. and Salatino, A. (1995). Flavonoids of species of *Cuphea* (Lythraceae) from Brazil. *Biochemical Systematics & Ecology*: 23 (1); 99-

- Shin, S., Park, C., Baek, N., Chung, I., and Park, C. (2009). Betulinic and Oleanolic Acids Isolated from *Forsythia suspensa* VAHL Inhibit Urease Activity of *Helicobacter pylori*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*: 14; 140-145.
- Schuldt, E., Farias, M., Ribeiro-do-Vallea, R., Ckless, K. (2004). Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. *Phytomedicine*: 11; 523-529.
- Slover, C., Adeniyi, B., Doyle, B., Locklear, T., Danziger, L., and Mahady, B. (2009). Natural products research in *Helicobacter pylori* infections. *Evaluation of Herbal Medicinal Products, Perspectives on quality, safety and efficacy*: 149-150.
- Solnick., Schauer. (2001). Emergence of diverse *Helicobacter pylori* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev*: 14; 59-57.
- Soltész, V., Barbro, Z. (1992). Of *Helicobacter pylori* under various transport conditions. *Journal of clinical microbiology*; 30(6): 1453-1456.
- Sonnenberg, A. A. (2002). Personal history of giving birth to the cohort phenomenon of peptic ulcer disease. In: Marshall, Barry (Editor). *Helicobacter pioneers: Firsthand Accounts from the Scientist who Discovered Helicobacters, 1892-1982*. Melbourne: Blackwell Science Asia : 53-74.
- Soto, G., Bautista, C. T., Roth, D. E. (2003). *Helicobacter pylori* infection is common in Peruvian adults after antibiotic eradication therapy. *J. Infect. Dis*: 188; 1263–75.
- Suzuki, H., Nishizawa, T., Hibi, T. (2010). *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Future Microbiol*: 5; 639-646.
- Tao, G., Yun-Xia, D., Hui, X., Chun-Yan, Y., Cheng-Cheng, C., Sheng-li, P., y Yang-Lin, W. (2011) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethyl acetate fraction *Zanthoxylum armatum* in mice. *Fitoterapia*: 82; 347-351.
- Thomas, J. E., Gibson, G. R., Darboe, M. K., Dah, A., Weaver, L. T. (1992). Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet*: 340; 1194-1195.
- Tisserat, B., O'Kuru, R., Cermak, S., Evangelista, R., Doll, K. (2012). Potential uses for *Cuphea* oil processing by products and processed oils. *Industrial Crops and Products*: 35; 111-120.
- Tong, L. K., Edwards, S., Diamond, D. (2004). Solid-state ammonia sensor based on Berthelot's reaction. *Sensors and Actuators: B*, 98; 12-17.
- Torres, J. (2000). Aspectos epidemiológicos y clínicos de la infección por *H. pylori* en niños. *Rev Gastroenterol Mex*: 65 (2); 13-19.

- Torres, J., Camorlinga, P. M., Bohorquez, C. M. C. (2002). Programa de actualización para medicina general (PAC), Infectología-2. Programa de Actualización Continua en Infectología: Unidad 9; 488-522.
- Torres, J., López, L., Lazcano, E., Camorlinga, P. M., Flores, L., Muñoz, O. (2005). Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*: 14; 1874-1877.
- Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., Schlemper, R. (2001). *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*: 13; 345(11); 784-9.
- Vakil, N., Megraud, F. (2007). Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*: 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? *International Journal of Food Microbiology*: 138; 1-12.
- Valle, J., Kekki, M., Sipponen, P., Ihamäki, T., Siurala, M. (1996). Long-term course and consequences of *Helicobacter pylori* gastritis. Results of a 32-year follow-up study. *Scand. J. Gastroenterol*: 31(6); 546-550.
- Vega, E. (2005). *Estudio de Cuphea aequipetala Cav.* sobre la proliferación de células humanas transformadas. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana; 133.
- Vega-Avila, E., Tapia, R., Jiménez, M., Villarreal, M., and Román, R. (2004). Cytotoxic Activity of *Cuphea aequipetala*. *Proc. West. Pharmacol. Soc*: 47; 129-133.
- Vilaichone, R. K., Mahachai, V., Graham, D. Y. (2006). *Helicobacter pylori* diagnosis and management. *Gastroenterol Clin North Am*: 35; 229-247.
- Villarreal, M. L. Alonso, D., Melesio, G. (1992). Cytotoxic activity of some mexican plants used in traditional medicine. *Fitoterapia*. LXII: 518-522.
- Vinegar, R., Truax, J. F. (1987). Pathways to inflammation. III. Introduction to and philosophy of the symposium. *Fed. Proc*: 46; 89-90.
- Waizel Bucay, J., Martínez, G., Villarreal, L., Cortés, D., Pliego, A. (2003). Estudio preliminar etnobotánico, fitoquímico, de la actividad citotóxica y antimicrobiana de *Cuphea aequipetala Cav.* *Polibotánica*; 15: 99-108.
- Waizel- Bucay, L., Martinez, P. (2010). Estudio preliminar etnobotánico, fotoquímico; de; actividad citotóxica y atimicrobiana de *Cuphea aequipetala*.
- Wang, C., Chen, L., Yang, L. (1999). Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea hyssopifolia*. *Cancer Letters*; 140: 195-200.

- Warren, J. R., Marshall, B. J. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*: 1; 1273-1275.
- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. *Analytical Chemistry*: 39; 971-974.
- Windsor, H., O'Rourke. (2000). Bacteriology and Taxonomy of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*: 29; 623-631.
- Wong, B., Lam, S., Wong, W., Chen, J., Zheng, T., Feng, R., Lai, K., Hu, W., Yuen, S., Leung, S., Fong, D., Ho, J., Ching, C., Chen J. (2004). *Helicobacter pylori* Eradication to Prevent Gastric Cancer in a High-Risk Region of China. *JAMA*: 291(2); 187-194.
- Wotherspoon, A. C. (1998). Gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Med*: 49; 289-299.
- Xiao, Z., Shi, D., Li H., Zhang, L., Xua, C., and Zhua, H. (2007). Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*: 15; 3703–3710.
- Xiaofeng, N., Wei, X., Weifeng, L., Ting, F., Hua, H., Yongmei L. (2012). Isofraxidin exhibited anti-inflammatory effects in vivo and inhibited TNF- α production in LPS-induced mouse peritoneal macrophages in vitro via the MAPK pathway. *International Immunopharmacology*: 14; 164–171.
- Yu, J., Leeung, W. K., Go, M. Y. Y., Chan, M. C. W., To, K. F., Ng, E. K. W., Chan, F. K. L., Ling, T. K. W., Chung, S. C. S., Sung, J. J. Y. (2002). Relationship between *Helicobacter pylori* babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Helicobacter pylori*: 51; 480-484.